

令和元年6月21日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14559

研究課題名（和文）哺乳類神経回路の単一ニューロン解析システムの構築

研究課題名（英文）Development of a versatile vector system for single-cell labeling and gene function studies in vivo

研究代表者

岩里 琢治（IWASATO, Takuji）

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：00311332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：単一細胞の標識と同時に標識細胞特異的に遺伝子ノックアウトができる簡便で効率のよい方法（Supernova法）の開発に成功した。Supernova法では、2種類のベクターを脳に導入することにより、ベクターが導入された細胞のうちの一部でのみ遺伝子発現が増幅され、少数の細胞のみが極めて明るく蛍光標識される。また、標識された細胞特異的に遺伝子をノックアウトできる画期的なシステムである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子を操作するためにTALEN, CRISPR/Cas9などの最新のゲノム編集技術を取り入れることで、高性能で汎用性のあるSupernovaシリーズを構築した。その結果、遺伝子組換え動物ではない多くのモデル生物においても単一細胞遺伝子ノックアウトできるようになった。また、ベクター導入に、これまでの子宮内電気穿孔法に加えてアデノ随伴ウイルス（AAV）が利用できるようになり、幅広い組織への適用が可能になった。

研究成果の概要（英文）：We developed “Supernova” that is a versatile vector system for single-cell labeling and gene function studies in vivo. Supernova system enables single-cell labeling and labeled cell-specific gene manipulation, when introduced by in utero electroporation (IUE) or adeno-associated virus (AAV).

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経回路 単一細胞解析 細胞標識 遺伝子ノックアウト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳では、無数の神経細胞（ニューロン）が複雑なネットワーク（神経回路）を作ることで、様々な脳機能が生み出されている。脳の神経回路が作られ、機能するしくみを細胞レベル、分子レベルで理解するためには、脳の中に高密度で存在するニューロンのうちのごく少数だけを標識し、そのニューロン特異的に目的の遺伝子をノックアウトして、細胞の挙動を追跡することが必要である。しかしながら、従来の方法では標識される細胞の密度が高くなりすぎ、単一細胞解析には適さなかったり、適用できる発達段階、脳の領域、ニューロンの種類、ノックアウト可能な遺伝子が限られたりする問題を抱えていた。また、細胞標識と同時に遺伝子ノックアウトもできるシステムとして、MADM システム (Cell 2005) と SLICK システム (Nat. Neurosci. 2008) の 2 種類が報告されていたが、これらの手法はいずれも特殊なトランスジェニックマウスに依存しており、限られた脳領域や遺伝子にしか用いることができない。また、これらのシステムが適用可能な場合でも、使用するためには膨大な時間、労力、費用がかかるという問題があった。これらの問題を解決し、まばらな細胞標識と遺伝子ノックアウトの両方を効率よくできるシステムの開発が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究は、神経回路の発達や機能における細胞自律的な遺伝子機能を解析するために、脳の中のごく少数の神経細胞のみを標識し、その標識した細胞特異的に標的遺伝子の機能を阻害できる汎用性の高い手法を構築することを目的として行われた。

3. 研究の方法

Supernova システムの原型は、新生仔大脳皮質の二光子顕微鏡 *in vivo* イメージングの目的のために開発された (Mizuno et al., Neuron 2014)。今回の研究では、Supernova の汎用性を高めるための様々な工夫をし、その性能を詳細に検証した。また、TALEN, CRISPR/Cas9, アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターなど様々な最先端の遺伝学的ツールを組み合わせることによって、その汎用性を格段に高めることを行った。

4. 研究成果

(1) IUE 版 Supernova の仕組み

Supernova は、これまでに無かった新しい発想の手法である。

TRE-SSR (ベクター 1) と CAG-RT-stop-RT-XFP-ires-tTA (ベクター 2) を子宮内電気穿孔法 (IUE) を用いて、大脳皮質の神経細胞に導入する (図 1 a, SSR: 部位特異的組換え酵素 (Cre, Flpe など); RT: 組換え酵素の認識シーケンス (loxP, FRT など); XFP: 蛍光蛋白質 (GFP, RFP など))。すると、遺伝子導入された細胞のうちのごく一部で、ベクター 1 の SSR の漏れが閾値を超えて、多コピー存在するベクター 2 の一部で stop シーケンスを除去し、tTA が弱く発現する。その tTA がベクター 1 の TRE と結合し、SSR の発現を誘導し、それがベクター 2 の多くのコピーで stop シーケンスを除去する。このポジティブフィードバックによって、最初に SSR の漏れが閾値を超えたごく一部の細胞でのみ蛍光蛋白質 (XFP) および SSR が強く発現する (図 1 b)。

(2) Supernova による細胞標識密度は安定である。

生後 8 日目 (8 日齢)、22 日齢、2 ヶ月齢、4 ヶ月齢、8 ヶ月齢で細胞標識密度を比較したところ、有意な差は見つからなかった。この結果は、Supernova 標識は新生仔期から成体にいたるまで安定していることを示す。

(3) Supernova による細胞標識の密度は調節可能である。

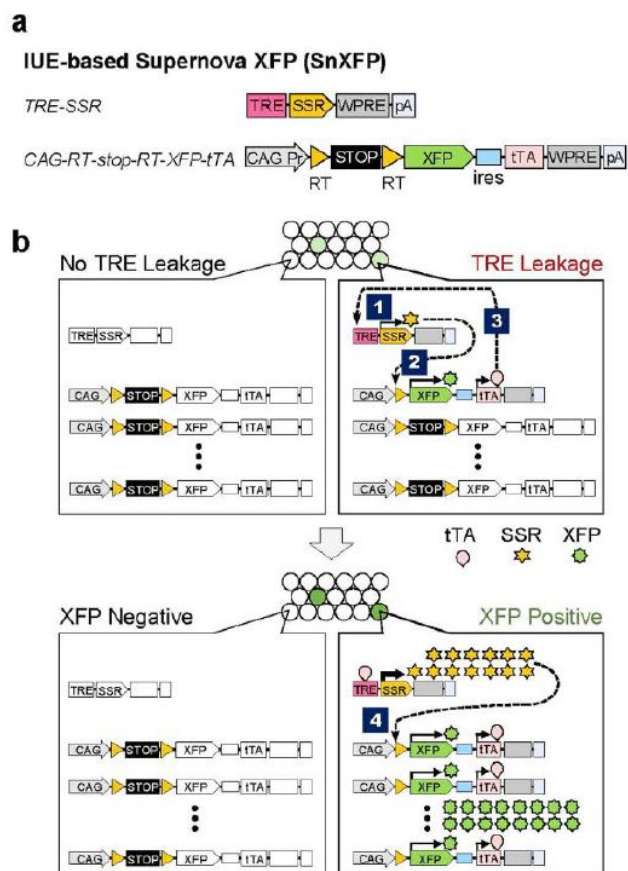


図 1

IUE によって導入するベクター 1 の濃度を 5 ng/ul, 50 ng/ul, 500 ng/ul と変えてみると、細胞標識密度が増加した。このことは、Supernova によって細胞標識の密度が調節可能であることを示す(図 2)。

(4) Supernova で単一細胞に複数のタンパク質を同時に発現させることができる。

ベクター 2 として、GFP と RFP の二つのベクターを同時に導入すると GFP 陽性細胞のほとんどは RFP 陽性であり、RFP 陽性細胞のほとんどが GFP 陽性であった。この結果は、Supernova で単一細胞に複数のタンパク質を同時に発現させることができることを示す。

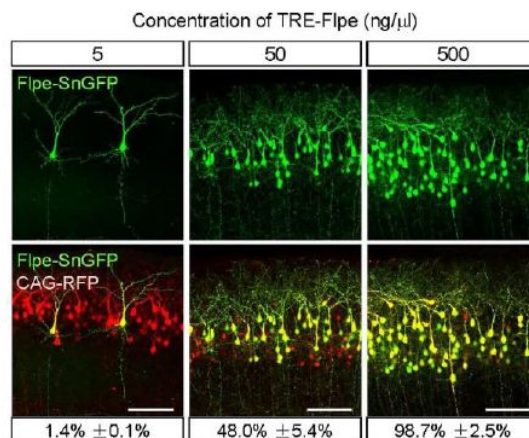


図 2

(5) Cre/loxP を用いた単一細胞遺伝子ノックアウト

Supernova ベクターを flox マウスに導入することにより、標識された細胞のほとんどで遺伝子がノックアウトされていることを確認した。また、逆に標識されていない細胞で遺伝子ノックアウトはほとんど観察されなかった。このことは Supernova 法による遺伝子ノックアウトの高い特異性を示す。

(6) RNAi を用いた単一細胞遺伝子ノックダウン

Supernova を用いて shRNA を発現させたところ、ほとんどの細胞で遺伝子のノックダウンが確認された。

(7) TALEN を用いた単一細胞ゲノム編集

Supernova を用いて TALEN を発現させたところ、ほとんどの細胞でタンパク質の減少が観察された。さらに、DNA を回収して確認したところ、ゲノムに変異がはいっていることが確認された。

(8) CRISPR/Cas9 を用いた単一細胞ゲノム編集

Supernova を用いて Cas9 とガイド RNA を発現させたところ、ほとんどの細胞でタンパク質が無くなっていることが観察された(図 3)。図では、CREB のノックアウトを行っている。CREB は海馬の興奮性神経細胞のほとんどで強く発現しているが、Supernova で GFP 標識された細胞でのみ CREB の発現が免疫組織化学で検出されないことがわかる。さらに、DNA を回収して確認したところ、ゲノムに変異がはいっていることが確認された。

Supernova-mediated CRISPR/Cas9 system

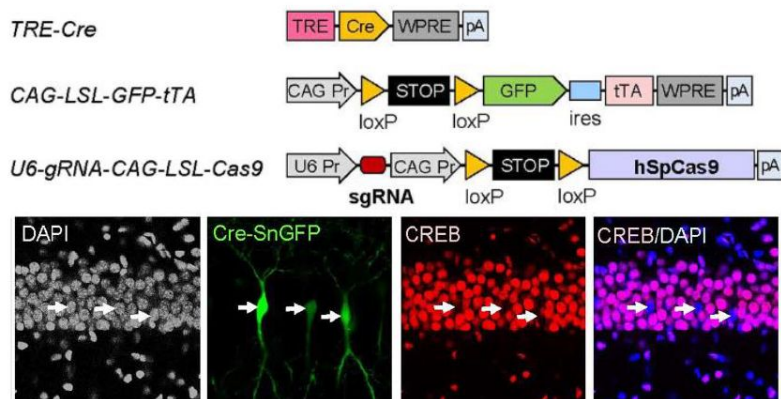


図 3

(9) AAV 版 Supernova の開発

アデノ随伴ウイルス (AAV) 版の Supernova を作製してその性能を検証したところ、疎ら(まばら)で明るい細胞標識、および、標識細胞特異的な遺伝子ノックアウトが確認された(図 4)。図 4 は海馬での AAV 版 Supernova 標識を示す。

AAV-based Supernova system

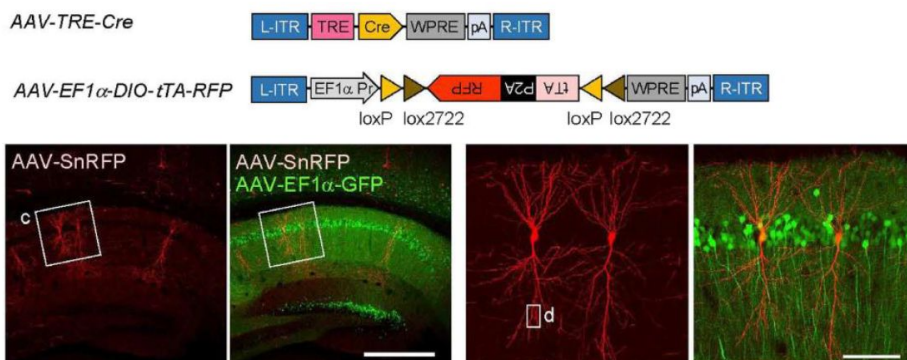


図4

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Nakazawa S, Mizuno H, Iwasato T. Differential dynamics of cortical neuron dendritic trees revealed by long-term in vivo imaging in neonates. *Nat Commun.* 9, 3106. (2018) 査読有

DOI: 10.1038/s41467-018-05563-0

Mizuno H, Nakazawa S, Iwasato T. In Vivo Two-photon Imaging of Cortical Neurons in Neonatal Mice. *J. Vis. Exp.* 140, e58340. (2018) 査読有

DOI: 10.3791/58340

Mizuno, H., Ikezoe, K., Nakazawa, S., Sato, T., Kitamura, K., Iwasato, T. Patchwork-Type Spontaneous Activity in Neonatal Barrel Cortex Layer 4 Transmitted via Thalamocortical Projections. *Cell Rep.* 22, 123-135. (2018) 査読有

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.12.012

Iwasato, T., Erzurumlu, Reha, S. Development of tactile sensory circuits in the CNS. *Current Opinion in Neurobiology*, 53, 66-75, ELSEVIER (2018) 査読有

DOI: 10.1016/j.conb.2018.06.001

Katori, S., Noguchi-Katori, Y., Okayama, A., Kawamura, Y., Luo, W., Sakimura, K., Hirabayashi, T., Iwasato, T., Yagi, T. Protocadherin- C2 is required for diffuse projections of serotonergic axons. *Sci Rep.* 7, 15908. (2017) 査読有

DOI: 10.1038/s41598-017-16120-y

Katori, S., Noguchi-Katori, Y., Itohara, S., Iwasato, T. Spinal RacGAP -Chimaerin is Required to Establish the Midline Barrier for Proper Corticospinal Axon Guidance. *J Neurosci.* 37, 7682-99. (2017) 査読有

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3123-16.2017

Moreno-Juan, V., Filipchuk, A., Anton-Bolanos, N., Mezzera, C., Gezelius, H., Andres, B., Rodriguez-Malmierca, L., Susin, R., Schaad, O., Iwasato, T., Schuele, R., Rutlin, M., Nelson, S., Ducret, S., Valdeolmillos, M., Rijli, F., Lopez-Bendito, G. Prenatal thalamic waves regulate cortical area size prior to sensory processing. *Nature Commun.* 8, 14172. (2017) 査読有

DOI: 10.1038/ncomms14172

Luo, W., Mizuno, H., Iwata, R., Nakazawa, S., Yasuda, K., Itohara, S., Iwasato, T. Supernova: A Versatile Vector System for Single-Cell Labeling and Gene Function Studies in vivo. *Sci Rep.* 6, 35747. (2016) 査読有

DOI: 10.1038/srep35747

Iwata, R., Iwasato, T. In vitro Assay for Dendritic Spine Retraction of Hippocampal Neurons with Sparse Labeling. *Bio-Protocol* 6, e1937. (2016) 査読有

DOI: 10.21769/BioProtoc.1937

Shinoda, Y., Ishii, C., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Ishii, Y., Sano, Y., Iwasato, T., Itohara, S., Furuichi, T. CAPS1 stabilizes the state of readily releasable synaptic vesicles to fusion competence at CA3-CA1 synapses in adult hippocampus. *Sci Rep.* 6, 31540. (2016) 査読有

DOI: 10.1038/srep31540

〔学会発表〕(計 16 件)

岩里琢治、赤ん坊の脳の中での神経回路の発達 マウス遺伝学と二光子イメージングを用いた研究、第 18 回 BIRD 脳科学セミナー、2019 年

Takuji Iwasato. In vivo imaging of barrel cortex layer 4 during thalamocortical reorganization. 遺伝研研究会 2018 “Circuit construction in the mammalian brain”, 2018 年

Takuji Iwasato. In vivo imaging of barrel cortex circuit refinement in neonates. Spontaneous Activity in Brain Development (SPONT 2018), 2018 年

Takuji Iwasato. In vivo functional and morphological imaging of neural circuit refinement in the neonatal barrel cortex. CSHA(Cold Spring Harbor Asia) on Neuroscience 2018, 2018 年

岩里琢治、新生仔マウスのパレル皮質神経回路発達の in vivo イメージング(In vivo imaging of barrel cortex circuit refinement in neonates)、第 41 回日本神経科学大会、2018 年

岩里琢治、マウスで迫る「赤ん坊の脳の発達のしくみ」、JT 生命誌研究館・国立遺伝学研究所共同企画シンポジウム、2018 年

岩里琢治、マウス遺伝学を用いた体性感覚系神経回路発達の解析、新潟大学脳研究所共同研究合同セミナー、2017 年

Takuji Iwasato. Unveiling the mechanisms of neuronal circuit refinement in the neonatal mouse barrel Cortex. Academia Sinica Symposium, 2017 年

岩里琢治、マウス大脳皮質の生後発達期神経回路リモデリング、第 12 回「認識と形成」研究会、2017 年

岩里琢治、生後発達期の大脳皮質リモデリング、生理学研究所研究会「大脳皮質回路の機能原理を探る」、2017 年

岩里琢治、マウス大脳皮質の生後発達期神経回路リモデリング、第 5 回「幸福脳」研究会(名古屋大学・慶応大学合同ミーティング)、2017 年

岩里琢治、哺乳類中枢神経系における神経回路形成の遺伝学的解析、新潟大学脳研究所共同研究合同セミナー、2017 年

Takuji Iwasato. In vivo imaging of neonatal mouse barrel cortex. Dart Neuroscience

Seminar Series at The Scripps Research Institute 2016年

岩里琢治、新生仔大脳皮質における神経回路スクラップ&ビルド、スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御シンポジウム、2016年

岩里琢治、独自の二光子イメージング技術を用いた、新生仔マウス大脳皮質における神経回路発達の解析、第159回日本獣医学会学術集会、2016年

Takuji Iwasato. In vivo imaging of neonatal mouse barrel cortex. シンポジウム "Circuit Construction in the Mammalian Brain", 2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ベクターシステム、遺伝子発現方法、標的遺伝子ノックアウト方法、標的遺伝子ノックダウン方法、標的遺伝子編集方法、及び遺伝子発現キット

発明者：岩里琢治、水野秀信、羅ブンジュウ、岩田亮平

権利者：大学共同利用機関法人情報・システム研究機構

種類：特許

番号：特願 2016-165093 号

出願年：平成 28 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://iwasato-lab.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。