

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14592

研究課題名(和文) 自閉症関連シナプス接着因子の細胞内シグナル誘導機構解明のための研究手法の確立

研究課題名(英文) Development of a technique to study signaling mechanism of synaptic adhesion molecules relevant to autism.

研究代表者

田淵 克彦 (Tabuchi, Katsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20546767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の特定のニューロンにノックインを行う技術開発のため、マウス  $\beta$ -actin遺伝子へのEGFP遺伝子の挿入を試みた。胎生15日目のマウス側脳室に、 $\beta$ -actinのN末を標的としたsgRNAとCas9を発現するベクター、 $\beta$ -actinの標的領域の5'側、3'側それぞれ0.5 kbをEGFP配列の両端に付加したドナーベクター、RFP発現ベクターを注入し、電気パルスをかけた結果、大脳皮質のニューロンの一部で、 $\beta$ -actinの局在に一致したEGFPのシグナルが検出された。また、ドナーベクターの相同配列の長さを延長することと、Rad51発現ベクターの共導入で、ノックイン効率は10倍まで上昇した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集は、近年爆発的に研究されるようになってきたが、これらの多くは培養細胞で行われており、in vivoでの研究は特に脳では少なかった。また、脳内の特定ニューロンへ遺伝子ノックインを行う研究は、本研究開始当初は皆無であった。本研究は、子宮内エレクトロポレーション法を用いることにより、大脳皮質の特定のニューロンに遺伝子ノックインを行うことが可能であることを証明した。加えて、ノックイン効率を高めるための方法についても提示した。本研究で開発した技術により、自閉症などの神経疾患で見つかった変異をニューロンに1世代で簡便に導入し、解析することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a technology to knock-in genes into specific neurons in the brain, we attempted to insert the EGFP gene into the mouse  $\beta$ -actin gene. We injected a vector expressing Cas9 and sgRNA targeting the N-terminal end of  $\beta$ -actin, a donor vector containing 0.5 kb genome fragment of 5' and 3' of the target region of  $\beta$ -actin as homology arms besides the EGFP sequence, and an RFP expression vector in the mouse lateral ventricle at embryonic day 15 and applied electric pulses. We detected EGFP signals consistent with the localization of  $\beta$ -actin protein in some population of neurons in the cerebral cortex. In addition, knock-in efficiency was increased up to 10-fold by extending the length of the homology arms of the donor vector and co-introduction of the Rad51 expression vector.

研究分野：神経生理学

キーワード：ゲノム編集 子宮内エレクトロポレーション法 シナプス

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

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症の原因として、シナプス異常が指摘されており、これまでにヒトの自閉症患者から、シナプスで機能する遺伝子の変異が数多く見つかった。我々はこの中で、特にシナプス接着因子に着目し、シナプス機能と自閉症との関係について研究を行ってきた。シナプス接着因子は、細胞外ドメインを介して、シナプス前終末とシナプス後部を物理的に接合する機能を中心に研究されていたが、近年、細胞内ドメインを介して細胞内シグナルを伝達し、シナプス機能をダイナミックに制御していることも指摘されるようになってきた。ただ、シナプス接着因子を介したシグナル伝達は、きわめて繊細なメカニズムで制御されていて、遺伝子のコピー数が違うだけで効果が大幅に変わるものと考えられている。このため、ヒトで見つかった自閉症変異のシナプス機能に及ぼす効果を調べるためには、従来の様な変異コンストラクトを過剰発現するのでは不十分で、ゲノムそのものを改変するノックイン技術を用いる必要が生じる。一方、一つの遺伝子に対して、複数の遺伝子変異が自閉症患者から見ついている状況で、それぞれについて一つ一つノックイン動物を作成するのはコストと時間を考えれば非現実的である。もし、一世代で特定のニューロンに遺伝子変異をノックインできる技術が開発できれば、これらの問題は解決できる。このため、本研究ではCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術に着目し、脳内の特定のニューロンで簡単に遺伝子をノックインできる技術の開発に取り組むことにした。

### 2. 研究の目的

本研究は、CRISPR/Cas9 システムを用いて、脳の特定のニューロンで簡単に遺伝子のノックインを大規模な技術の開発を行うことを目的として取り組んだ。このため、脳の特定のニューロンに効率よく遺伝子を導入する方法として、子宮内エレクトロポレーション法を用いることにした。ノックインを試す標的として、ニューロン内で発現が強く、タンパク質の局在もよく知られている  $\beta$ -actin を選び、ここにEGFPをノックインすることで、ノックインが成功したかどうかの有無を顕微鏡下でモニターできるようにした。また、ノックイン効率を向上させるために、ドナーベクターの相同アームの長さを変えたり、DNA修復因子として知られる Rad51 を共導入して、これらの効果について検証を加えた。

### 3. 研究の方法

(1) **-actin に対する guide-RNA (sgRNA) の作成:** -actin の翻訳開始点付近に sgRNA 候補配列を複数選択し、sgRNA と Cas9 の両方の発現ベクターを有するベクター-pCGSapI の SapI サイトに挿入し、U6 プロモーターにより選択した sgRNA が発現されるコンストラクトを作成した。選択した sgRNA の切断効率を検証するため、pEGXXFP による方法を用いた。これは、EGFP のコード配列がスパーサーにより真ん中で分断されているもので、スパーサーが切断されると、相同組み換えメカニズムにより完全な EGFP 配列が出来上がり、EGFP シグナルを発するものである。-actin の翻訳開始点前後の 0.5kb のゲノム領域を pEGXXFP のスパーサー部分に挿入し、pCGSapI- -actin と pEGXXFP コンストラクトを H293 細胞に同時にトランスフェクションした。トランスフェクションした HEK293 細胞のうち、EGFP が最も多く発現させることができたものを、子宮内エレクトロポレーションに用いる sgRNA として選択した。

(2) **ドナーベクターの作成:** EGFP のコード領域に相当する DNA 断片の両端に、-actin の翻訳開始点の前後 0.5kb ~ 2kb のゲノム断片を接合したものを pBluescript ベクターに挿入した。

(3) **子宮内エレクトロポレーション:** 妊娠 15 日目の雌マウスの子宮を麻酔科で露出し、pCGSapI- -actin、ドナーベクター、赤色蛍光タンパク質 (RFP) 発現ベクターを含む DNA 混合液を、羊膜越しに胎児の側脳室に注入し、ピンセット型電極で電気パルスをかけた。処置後、子宮を母体へ戻して縫合し、自然分娩で遺伝子導入マウスを得た。遺伝子導入の有無は、LED ペンライトにより新生児の頭蓋越しに確認した。

(4) **形態学的解析:** 成熟マウスを 4%パラホルムアルデヒドにて還流固定したあと脳を摘出し、マイクロトームにて 50  $\mu$ m の切片を作成した。切片をスライドガラスに乗せてカバーガラスをかけ、共焦点顕微鏡にて EGFP および RFP のシグナルを観察した。ノックイン効率は、全遺伝子導入ニューロン (RFP 陽性ニューロン) 中の EGFP 発現ニューロンで算出した。

(5) **電気生理学的解析:** 成熟マウスから麻酔科で脳を剖出し、低温人口脳脊髄液 (ACSF) へ浸した。その後速やかにマイクロトームで 350  $\mu$ m の切片を作成し、正立水浸顕微鏡下で、RFP および EGFP のシグナルを観察した。EGFP 発現ニューロンについて、微小ガラス電極により全細胞モードでパッチを作成し、電圧固定法及び電流固定法により電気信号を計測した。

(6) **単一ニューロン RT-PCR:** 微小ガラス電極でパッチし、電気記録を取得した後、パッチしたニューロンの細胞質を吸引し、マイクロチューブへ移した。EGFP 内およびドナーベクターの外側に設計したプライマーを用いて RT-PCR を行い、正常にノックインができていないことを検証した。

### 4. 研究成果

子宮内エレクトロポレーション法により、胎生 15 日目のマウスの側脳室に、pCGSapI- -actin コンストラクト、両端 0.5 kb ずつの -actin 相同アームを含む EGFP ドナーコンストラクト、遺伝子導入マーカーとなる RFP 発現子コンストラクトを含む DNA 混合液を

注入し、電気パルスをかけてエレクトロポレーションを行い、生まれてきたマウスが成熟した後、大脳皮質の切片を共焦点顕微鏡下で解析したところ、大脳皮質 2/3 層の錐体ニューロンの一部で遺伝子導入を示す RFP のシグナルが確認され、全遺伝子導入ニューロン (RFP 陽性) のうち、約 2% で EGFP のシグナルが確認された。EGFP のシグナルは、樹状棘突起で特に強く、内在性  $\beta$ -actin タンパク質の局在と一致するものであった。単一ニューロン RT-PCR により、EGFP が  $\beta$ -actin 遺伝子にゲノム上でノックインされていることが確認できた。電気生理学的解析により、 $\beta$ -actin ノックインニューロンは、遺伝子導入がなされていないニューロンと比較して、シナプスの活動性やニューロンの興奮性に変化がなく、ノックインによるニューロン機能に対する悪影響がないことが確認できた。

ノックイン効率を上げるため、ドナーベクターの相同アームの長さを変えたコンストラクトについて試した。相同アームの長さが長くなるほど、ノックイン効率は上昇し、5' 側の相同アームを 1.6 kb、3' 側の相同アームの長さを 2kb にしたところ、ノックインされたニューロンは、全遺伝子導入ニューロン中の 14% まで上昇した。なお、相同アームをこれ以上長くすると、内在性のプロモーター領域や polyA シグナルが入ってきて、ドナーベクター自体が

$\beta$ -actin-EGFP 発現コンストラクトになってしまうため、相同アームの長さはこれ以上延長することはできなかった。CRISPR/Cas9 によるノックインは、homology directed repair (HDR) メカニズムによるが、この HDR には DNA 修復因子である Rad51 が大きな役割を果たすことが知られている。Rad51 を投与すると、HDR が促進してノックイン効率が上昇するのではないかとの仮説のもと、子宮内エレクトロポレーションを行う際に、Rad51 発現ベクターも同時に注入した。1.6 kb-2 kb の相同アームを有するドナーベクターを用いた場合、Rad51 を共導入したものでノックイン効率は 25% まで上昇した。これは、形態学的や電気生理学的に遺伝子がノックインされたニューロンを解析するには十分な効率であり、当初の目的であるシナプス接着因子の遺伝子変異の効果を解析するための技術開発という点に関して、達成できたと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Han, K. A., Ko, J. S., Pramanik, G., Kim, J. Y., Tabuchi, K., Um, J. W. and Ko, J. PTPsigma Drives Excitatory Presynaptic Assembly via Various Extracellular and Intracellular Mechanisms. *J Neurosci.* 38(30):6700-6721. (2018)

10.1523/JNEUROSCI.0672-18.2018 ( 査読有 )

Kasem, E., Kurihara, T. and Tabuchi, K. Neurexins and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Res.* 127:53-60. (2018)

10.1016/j.neures.2017.10.012 ( 査読有 )

Cao, X. and Tabuchi, K. Functions of synapse adhesion molecules neurexin/neuroligins and neurodevelopmental disorders. *Neurosci Res.* 116:3-9. (2017)

10.1016/j.neures.2016.09.005 ( 査読有 )

Baig, D. N., Yanagawa, T. and Tabuchi, K. Distortion of the normal function of synaptic cell adhesion molecules by genetic variants as a risk for autism spectrum disorders. *Brain Res Bull.* 129:82-90. (2017)

10.1016/j.brainresbull.2016.10.006 ( 査読有 )

Miki, T., Kaufmann, W. A., Malagon, G., Gomez, L., Tabuchi, K., Watanabe, M., Shigemoto, R. and Marty, A. Numbers of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channel clusters match those of functionally defined vesicular docking sites in single central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(26):E5246-e5255. (2017)

10.1073/pnas.1704470114 ( 査読有 )

Uemura, T., Mori, T., Kurihara, T., Kawase, S., Koike, R., Satoga, M., Cao, X., Li, X., Yanagawa, T., Sakurai, T., Shindo, T. and Tabuchi, K. Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and in utero electroporation techniques. *Scientific Reports.* 6:35861. (2016)

10.1038/srep35861 ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 6件)

Takuma Mori, Enas Ahmed Fathalla Kasem, Xueshan Cao, Xue Li, Taiga Kurihara, Takeshi Uemura, Toru Yanagawa & Katsuhiko Tabuchi : Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) disrupts excitatory-inhibitory balance of synapses by down-regulation of GluN2B “Current Trends in Biomedicine” Workshop SYNAPSE FORMATION, SPECIFICATION, AND ELIMINATION FROM MOLECULES TO CIRCUITS Universidad Internacional de Andalucía (Baeza, Spain) 2017年9月27日

植村健、鈴木絵美、小池梨絵、川瀬詩織、栗原大河、崎村建司、三品昌美、田淵克彦 : 小脳顆粒細胞特異的ニューレキシントリプルノックアウトマウスの作成と解析 第40回日本神経科学大会 幕張メッセ(千葉県千葉市) 2017年7月21日

Katsuhiko Tabuchi : Modification of genes associated with synaptic functions in the subpopulation of neurons in mouse brains and the effects on pathophysiology of autism. 第39回日本神経科学大会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016年7月22日

中易知大、Enas Kasem、Pang Bo、栗原大河、田淵克彦 : 自閉症に関連したニューロリギン変異体の包括的行動解析と行動・電気生理学的異常の改善に向けた薬物スクリーニング 第40回日本神経科学大会 幕張メッセ(千葉県千葉市) 2017年7月21日

Enas Ahmed Kasem, Takuma Mori, Xueshan Cao, Xue Li, Toru Yanagawa, Katsuhiko Tabuchi : Down-regulation of Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) disrupts excitatory-inhibitory balance of synaptic input in a cell autonomous manner. 第40回日本神経科学大会 幕張メッセ(千葉県千葉市) 2017年7月20日

Katsuhiko Tabuchi : Distortion of the synaptic functions in the microcircuit of the brain in model mice for neurodevelopmental disorders. The 47th NIPS International Symposium “Decoding Synapses” 岡崎コンフェレンスセンター(愛知県岡崎市) 2016年10月6日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

CRISPR/Cas9 システムにより、マウス大脳皮質ニューロン特異的な遺伝子のノックインに成功  
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2seiri/ja/knockin.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：植村 健

ローマ字氏名：TAKESHI UEMURA

研究協力者氏名：森 琢磨

ローマ字氏名：TAKUMA MORI

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。