

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03534

研究課題名（和文）新戦略を用いた遺伝子導入技術の開発と成体海馬における「細胞競合仮説」の検証と解析

研究課題名（英文）Development of new gene transfer technology using novel strategy and verification of cellular competition hypothesis in adult hippocampus

研究代表者

小原 圭吾（KOHARA, Keigo）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60740917

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：これまで、現代生命科学において、自在性のある「遺伝子導入ウイルス技術」を開発するのは困難であった。報告者らは、「外来導入遺伝子の戦い」という新たな概念を創案し、遺伝子組換え酵素であるCre、FLPがお互いに戦い合うように設計した新戦略を発明し（特願2019-238481）、反発分離的な遺伝子導入を可能とする新戦略技術群「BATTLE」を生み出すことに成功した。さらに、既存の膨張顕微鏡技術と融合させた複合技術「BATTLE-1EX」を開発し、光を用いてシナプスの全体構造とその構成タンパク質の局在を高精細にナノスケールで可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度に発展した現代科学において、新たな概念を創出することは、極めて困難になりつつある。本研究課題において、「遺伝子の戦い」という新たな概念が生み出されたことは、非常に高い学術的意義があるといえる。さらに、本研究課題は、その概念を活用して、これまでの従来技術では難しかった「反発分離的な遺伝子導入」を可能とする新技術「BATTLE」を開発することに成功した。今後、生物学、基礎医学研究領域における幅広い分野に適用可能な基盤的戦略技術である「BATTLE」を用いて、生命科学のさまざまな分野が進展し、生命の全体像の理解や様々な疾患の原因解明が進むことが期待され、高い社会的意義を持つといえる。

研究成果の概要（英文）：Developing flexible transgenic viral methods has been challenging in modern life science. Here, we created a novel concept, “Battle of transgenes,” and succeeded in developing the new method, “BATTLE,” enabling split-tunable transgene expression. Furthermore, combining it with the expansion microscope method, we also developed “BATTLE-1EX,” which visualized the whole structures of synapses and localizations of endogenous synaptic proteins with high resolutions.

研究分野：神経科学

キーワード：遺伝子の戦い 海馬 遺伝子導入 神経細胞 Cre

## 1. 研究開始当初の背景

脳神経科学を含む現代の生命科学において、遺伝子導入技術は極めて重要な基盤技術の一つであり「ライフサイエンス技術の扇の要」である(図1)。トランスジェニック技術、in utero electroporation などの遺伝子導入技術に対して、ウイルスを用いた遺伝子導入技術は、「適用動物種が霊長類を含め、極めて広範」、「作製・維持コストが低い」、「作製時間が短い」、「高度な手技を必要としない」、「既に作製された膨



図1. 自在性のある遺伝子導入法が必要とされる背景

大な数の既存ウイルスが簡単に入手可能」、「将来的な臨床応用の可能性を含む」といった強力な長所・特徴を多く持つことが知られている。しかしながらウイルスを用いた遺伝子導入技術には「自在性」といった点において、以下の技術的障壁が立ちはだかっている現状があった。

- (1). 既存のウイルス遺伝子導入技術を用いた際、近傍領域にある別々の細胞に複数遺伝子をスプリットして導入することはこれまで困難であった。(細胞特異的プロモーターを用いれば不可能ではないが、ウイルスにおける搭載容量の問題から大多数のケースで難しかった。また同じ種類の細胞群の細胞に複数遺伝子を別々にスプリットで導入することは至難の技であった。)
- (2). 複数遺伝子の導入比率を容易にチューニングできる技術はこれまであまりなかった。(導入比率ごとにデザインしたプラスミドベクターを最初から作り直す必要があり、「自在性」を備えたものはほとんど無かった。)

一方で、脳神経科学分野において、「局所脳領域において神経活動依存的な細胞競合によって神経回路やシナプスが精錬され調節される」という有力な仮説が存在する。しかしながら、この仮説を成体実験動物において検証するのに適した遺伝子導入技術がこれまでほとんど無かったために、成体マウス海馬でその仮説が検証されることは極めて少なかった。したがって「神経活動依存的な細胞競合」が成体マウス海馬においてあるのか無いのか、また海馬 CA1 の場所細胞の場所依存性神経活動の場所受容野形成、神経活動発火特性に対して重要な役割を持っているのかどうか、ほとんど解明されておらず、大きな謎として残っていた。

## 2. 研究の目的

本研究課題の申請時における第一の目的は、非常に数多くの長所・特徴・潜在能力を持つ「ウイルスを用いた遺伝子導入技術」において、存在する技術的障壁を克服し、新たな戦略を用いて、「自在性」のある「遺伝子導入ウイルス技術」を開発することである。本研究の申請時における、第二の目的は、「本研究課題で開発される新戦略技術の適用による成体マウス海馬における“神経活動依存的な細胞競合仮説”の検証、および海馬 CA1 場所細胞の場所受容野形成、精錬における“神経活動依存的な細胞競合”の役割の解明」である。

### 3. 研究の方法

遺伝子組換え酵素同志がお互いに戦い合う「遺伝子の戦い」という新しい戦略を活用することにより、興奮性神経細胞に適用可能な「自在性」のある「遺伝子導入ウイルス技術」を開発する。さらにその新戦略技術と、神経活動を不活性化させる Kir2.1 を用いて、マウス自由行動化における微小蛍光内視顕微鏡による in vivo 神経活動イメージングを行い、成体マウス海馬 CA1 において“神経活動依存的な細胞競合仮説”の検証を行う。そして海馬 CA1 場所細胞の場所受容野形成、精練における“神経活動依存的な細胞競合”の役割の解明を行う。

### 4. 研究成果

本研究課題は、申請時において、第1の目的と第2の目的を設定していたが、当初予見することが困難であったパンデミック、すなわち、コロナウイルスの世界的蔓延が研究実施期間中に発生し、その深刻な影響のため、第2の目的に用いる微小内視蛍光顕微鏡イメージングの実験担当者が研究実施することが困難になった事情が生じてしまった。このため、その不測の事態に柔軟に対処し、第1の目的を重点的に推進した。その結果、第1の目的に関して、予想をはるかに上回る研究成果を得ることに成功した。以下にその研究成果を記載する。

#### 主な成果

これまでの現代生命科学において、自在性のある「遺伝子導入ウイルス技術」を開発するのは困難であった。本研究課題において、報告者らは、「外来導入遺伝子の戦い」という新たな概念を創案し、遺伝子組換え酵素である Cre、FLP がお互いに戦い合うように設計した新戦略を発明し（特願 2019-238481）、反発分離的な遺伝子導入を可能とする新戦略技術群「BATTLE」を生み出すことに成功した（Kohara K et al., iScience 2020）。そして、この「BATTLE」技術をさらに発展させ、複数の神経細胞を別々の蛍光色素でまばらに可視化する「BATTLE-2」技術を開発した。さらに、遺伝子組換え酵素である Cre, FLP, Dre が三つ巴で戦い合うことにより、3種類の複数遺伝子の反発分離的な導入を可能とする技術「BATTLE-2.1」の開発にも成功した。さらに、既存の膨張顕微鏡技術と融合させた複合技術「BATTLE-1EX」を開発し、光を用いてシナプスの全体構造（プレシナプスとポストシナプスの両方を含めたシナプスの全体構造）とその構成タンパク質の局在を高精細に可視化することに成功した（図2）（Kohara K et al., iScience 2020, Inoue A et al., Star Protocols 2020）。

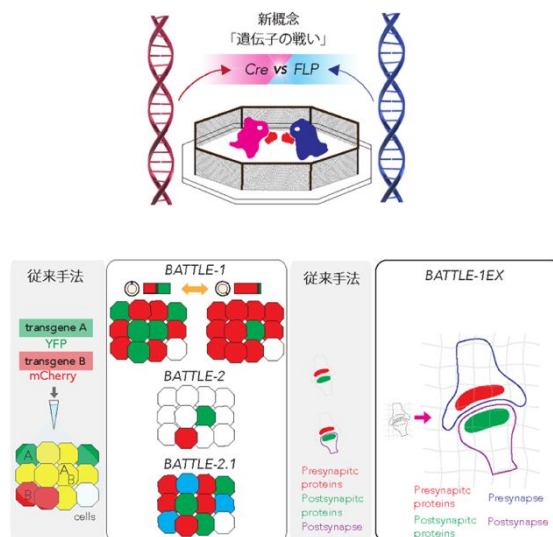


図2. 遺伝子の戦いを表したイラストと「BATTLE」技術の概略図

(Kohara K et al., iScience 2020 グラフィカルアブストラクトから改変引用)

## 国内外における位置付け

本研究課題において、新しい概念が創出され、さらにそれに基づき、「BATTLE」技術が新規開発されており、国内および国外を見てもその独自性は極めて高いといえる。

「遺伝子の戦い」は「ウイルス対細胞の戦い」よりも小さく、いわば最小スケールでの戦いである。このことから、本研究課題から生み出された新概念、新戦略は、ともに極めてユニークであるので、基礎研究分野のみならず、非研究分野の一般の方々に対する強いインパクトも備えているといえる。

シナプスは脳神経系のネットワークの接合部位であり、脳の様々な機能発現において欠かせない重要な部位であるが、これまで、シナプスの全体像（プレシナプスとポストシナプス）を光で可視化することは非常に困難であった。本研究課題において、シナプスの全体像の可視化、および内在性のシナプス関連タンパク質の局在の同時可視化を可能とする技術「BATTLE-1EX」が開発された。したがって、本研究課題によって、国内外からみても独自性の高い技術が開発されたといえる。

## 今後の展望

今後は、「遺伝子の戦い」を生まれながらにプログラムされた新しい遺伝子組み換えマウスの開発など、さらに「BATTLE」技術を発展進化させていくことが期待される。「BATTLE」技術が基盤的に活用されることにより、幅広い分野における生命の理解、および様々な疾患の原因の解明が進展していくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Kohara Keigo, Inoue Akitoshi, Nakano Yousuke, Hirai Hirokazu, Kobayashi Takuya, Maruyama Masato, Baba Ryosuke, Kawashima Chiho | 4. 巻<br>23                    |
| 2. 論文標題<br>BATTLE: Genetically Engineered Strategies for Split-Tunable Allocation of Multiple Transgenes in the Nervous System           | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>iScience   | 6. 最初と最後の頁<br>101248 ~ 101248 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.isci.2020.101248   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Inoue Akitoshi, Kobayashi Takuya, Hirai Hirokazu, Kanaya Noriko, Kohara Keigo  | 4. 巻<br>1                     |
| 2. 論文標題<br>Protocol for BATTLE-1EX: A High-Resolution Imaging Method to Visualize Whole Synaptic Structures and their Components in the Nervous System | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>STAR Protocols   | 6. 最初と最後の頁<br>100166 ~ 100166 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.xpro.2020.100166   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小原圭吾、井上昭俊、中野洋輔、平井宏和、小林拓也、丸山正人、雲財知、馬場亮輔、川島千穂 |
| 2. 発表標題<br>「遺伝子組換え酵素の戦い」と反発分離調節的な遺伝子発現を実現する新規の実験戦略     |
| 3. 学会等名<br>第43回日本神経科学大会                                |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|  |              |               |
|--|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>「遺伝子の分離発現方法、ポリヌクレオチド、及び遺伝子組換え用キット」 | 発明者<br>小原圭吾  | 権利者<br>関西医科大学 |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2019-238481                | 出願年<br>2019年 | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

|  |
|--|
| 研究内容<br><a href="http://keigokohara.com/research/">http://keigokohara.com/research/</a><br><br>新聞報道（日刊工業新聞）<br>遺伝子の戦い、人工的に発生 関西医大など新技術<br><a href="https://www.nikkan.co.jp/articles/view/563482">https://www.nikkan.co.jp/articles/view/563482</a><br><br>新聞報道（朝日新聞）<br>学習・記憶の謎ときに挑戦 カギを握る「海馬」で新発見<br><a href="https://www.asahi.com/articles/ASNB654FZN9JPLBJ006.html">https://www.asahi.com/articles/ASNB654FZN9JPLBJ006.html</a> |
|--|

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 井上 明俊<br><br>(INOUE Akitoshi)<br><br>(50709152) | 関西医科大学・医学部・助教<br><br><br><br>(34417) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|