

93. iPS 細胞ゲノム改変技術を用いた自閉症分子病理像の解明

田淵 克彦

信州大学 学術研究院 医学系 分子細胞生理学教室

Key words : CRISPR/Cas9, 自閉症, ゲノム, シナプス

緒言

自閉症の原因として、近年シナプス異常との関係が注目されており、特にシナプス接着因子の遺伝子異常が自閉症患者から数多く見つかっている。この中でも、シナプス接着因子 Neurexin および Neuroligin は、自閉症の原因として最も注目を浴びている分子の一つである¹⁻⁵⁾。我々は、Neurexin/Neuroligin 複合体に着目して、この複合体を構成する遺伝子についてのゲノム改変を、従来の ES 細胞での相同組み換えを用いた方法と CRISPR/Cas9 を用いた方法の両方で行い、研究を行った。従来の ES 細胞での相同組み換えを用いた方法として、 β -Neurexin-1, -2, -3 の遺伝子改変マウスを用いた研究を行い、 β -Neurexin が内在性カンナビノイドシグナルを抑制していることを見出した⁶⁾。また、Neurexin-3 のコンディショナルノックアウトを用いた研究を行い、この分子が海馬で細胞外領域を介して AMPA 受容体、嗅球で細胞内領域を介して GABA 受容体機能を制御していることを見出した⁷⁾。CRISPR/Cas9 システムについては、iPS 細胞でのゲノム改変を行うとともに、子宮内電気穿孔法と組み合わせた単一ニューロン特異的遺伝子ノックイン法を開発した。本報告書は、執筆スペースの関係で、これらの成果のうち特に、CRISPR/Cas9 システムを用いた単一ニューロンでのゲノム改変による EGFP の β -actin 遺伝子へのノックインの研究を中心に記載する。

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム改変のうち、遺伝子破壊（ノックアウト）は非分裂細胞であるニューロンでも報告があるが、相同組み換えを利用したノックインは、ニューロンで行うのは困難とされてきた。我々の研究は、自閉症関連遺伝子に患者から見つかった変異を導入して研究を行うことが中心であるため、CRISPR/Cas9 システムを利用してニューロン特異的に遺伝子ノックインを行う方法の確立に取り組んだ。このために、自閉症関連分子 Neurexin の細胞内領域と結合して、その後のシナプス可塑性に役割を演じている β -actin に着目し、この遺伝子に EGFP を導入して、 β -actin の挙動を可視化することを目指した。

方法

1. CRISPR/Cas9 ベクターの作製及び評価

β -actin の N 末に EGFP をノックインするための CRISPR/Cas9 ベクターを作製するために、まず、 β -actin 遺伝子の翻訳開始点付近のゲノム配列を標的とする 20 塩基からなる single-guide RNA (sgRNA) の候補を 2 種類選択した (sgRNA#1 及び sgRNA#2)。この配列を含むオリゴ DNA を、CAG プロモーターによって *Cas9* 遺伝子が発現するカセットと、ヒト U6 プロモーターによって sgRNA が発現するカセットを共有する pCGSapI ベクターの sgRNA cloning site に挿入し、2 種類の CRISPR/Cas9 ベクターを作製した (pCGSapI- β -actin-sgRNA#1 及び pCGSapI- β -actin-sgRNA#2)。2 種類の sgRNA の切断効率を検討するために、 β -actin の翻訳開始部位を含む 600 bp のゲノム断片を、EGFP の前半部分と後半部分をコードする遺伝子が分断された発現ベクター (pCAG-EGxxFP) の、分断部分の真ん中に挿入したベクター (pCAG-EG- β -actin-FP) と、pCGSapI- β -actin-sgRNA#1 または pCGSapI- β -actin-sgRNA#2 を HEK293T 細胞に共導入した。pCAG-EG- β -actin-FP の β -actin ゲノムが切断されると、分断されていた EGFP 遺伝子が組み換えを起こして完全型になり EGFP のシグナルを発するメカニズムを利用し、sgRNA#2 がより切断効率が高いと判定し、以後の研究は sgRNA#2 を用いて行った。EGFP のドナーベクターとして、EGFP コーディング配列の両端に、 β -actin の翻訳開始点の前と後それぞれ約 500 bp のフラグメントを挿入したコンストラクト (pBSSK-EGFP- β -actin-donor) を作製した。

2. 子宮内電気穿孔

妊娠 15.5 日目のマウスについて、麻酔下で子宮を腹膜外に露出し、pCGSapI- β -actin-sgRNA#2、pBSSK-EGFP- β -actin-donor、及び遺伝子導入マーカーである TagRFP 発現ベクター (pCAG-TagRFP) を含む DNA 溶液を胎児の側脳室に注入し、その後胎児の頭部をピンセット型電極で挟み、ネッパジーン CUY21 エレクトロポレーターで、電気パルスを加え、電気穿孔を行った。その後、子宮を腹腔内に戻し、腹膜を縫合し、通常飼育して自然分娩を行わせた。生まれた仔マウスについて、生きたまま頭蓋越しに励起光を当てて TagRFP のシグナルを検出し、遺伝子導入個体を同定した。

3. 形態学的解析

生後 14 日-16 日の遺伝子導入マウスを 4 % PFA 溶液にて還流固定し、脳を剖出して、切片を作製し、スライドグラスにマウントした後、共焦点顕微鏡で EGFP のシグナルを指標としてノックインされたニューロンを同定し、EGFP が集積している樹状棘突起の数や形態の解析を行った。

4. 電気生理学的解析

生後 14 日-16 日の遺伝子導入マウスの脳を剖出し、大脳皮質を含む急性切片を作製し、EGFP のシグナルを発現しているニューロンについてパッチクランプを行った。電流固定モードでニューロンの膜特性を記録し、電圧固定モードで自発性シナプス活動を記録した。

結 果

子宮内電気穿孔法を用いて、 β -actin の翻訳開始点付近を標的とした sgRNA と *Cas9* 遺伝子、EGFP の修復用ドナーベクターと TagRFP マーカー遺伝子を胎生 15.5 日目のマウスの神経芽細胞に導入した。この時期の神経芽細胞は、将来大脳皮質 2/3 層の錐体ニューロンに分化する。生後 14 日目の遺伝子導入マウスを灌流固定し、大脳皮質の切片を共焦点顕微鏡下で観察した結果、TagRFP で標識された遺伝子導入ニューロンの一部で、EGFP のシグナルが検出された。このシグナルは、樹状棘突起で特に強く集積しており、内在性 β -actin のシグナルと一致した。このことから、CRISPR/*Cas9* を利用した *in vivo* でのニューロン特異的な遺伝子ノックインが本手法により可能となることが確認された。これまでに、EGFP- β -actin コンストラクトをニューロンで単に過剰発現することにより、内在性の β -actin の挙動をモニターしたり、樹状棘突起の数や形態を解析する研究が行われてきたが、最近、過剰発現した β -actin が樹状棘突起の数を増加させる作用があることが知られるようになってきた。今回の遺伝子ノックインで、このような影響があるかどうか確認するために、子宮内電気穿孔による EGFP- β -actin 遺伝子を過剰発現したニューロンと、今回のノックインニューロンと、野生型のニューロンの間で樹状棘突起の数を比較したところ、過剰発現で見られる樹状棘突起の増加はノックインでは見られなかった。

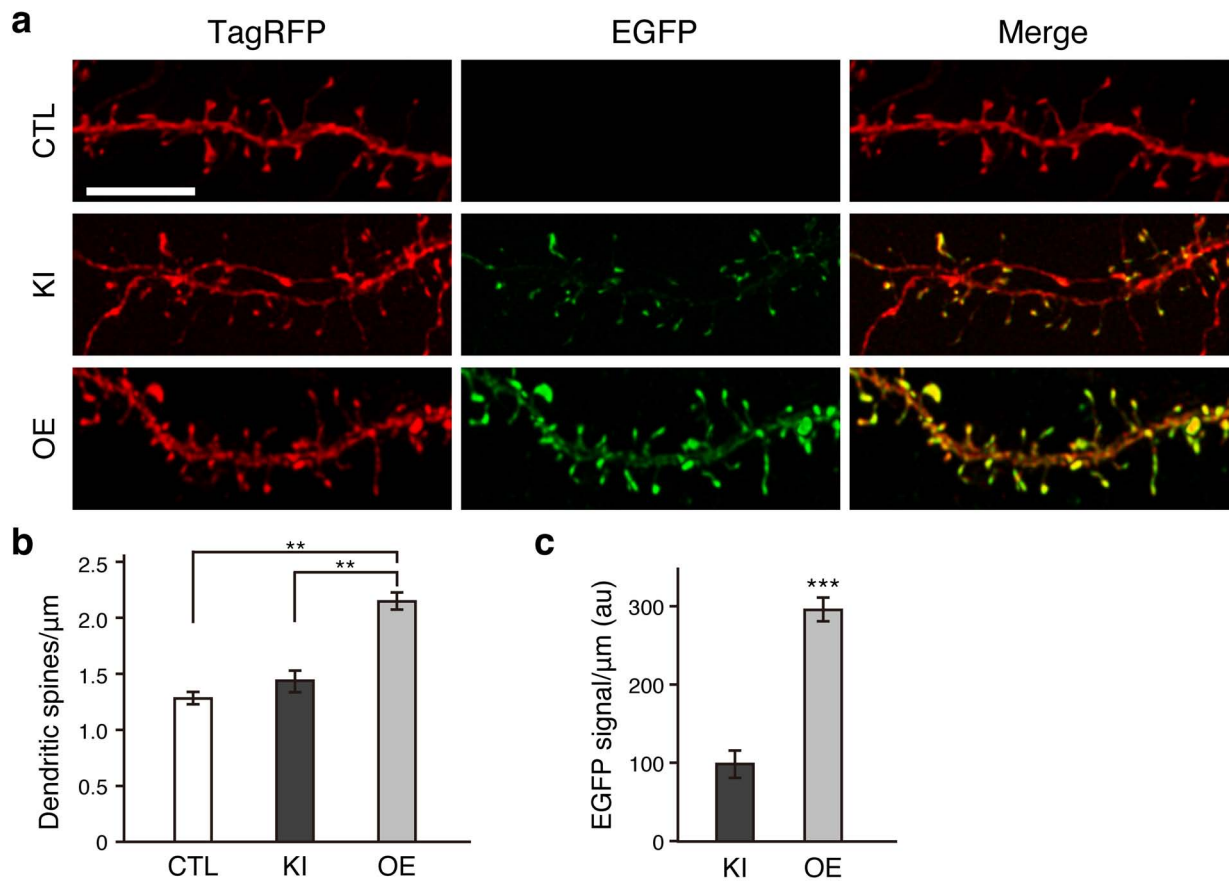


図1. CRISPR/Cas9によるEGFP- β -actinノックインニューロンの樹状突起

a) 樹状突起と棘突起像。Scale Bar: $5\mu\text{m}$ 。b) 棘突起の数の比較。 $**P < 0.01$ (Tukey's test)。c) EGFPのシグナル強度の比較。 $***P < 0.001$ (Student's t-test)。(CTL: 野生型コントロール、KI: ノックイン、OE: 過剰発現)。

また、ニューロンやシナプス機能への影響について、パッチクランプ法を用いた電気生理により解析したところ、過剰発現ニューロンでは静止膜電位の低下やシナプスの自発的活動の増加が見られたが、ノックインニューロンではこれらは見られなかった。

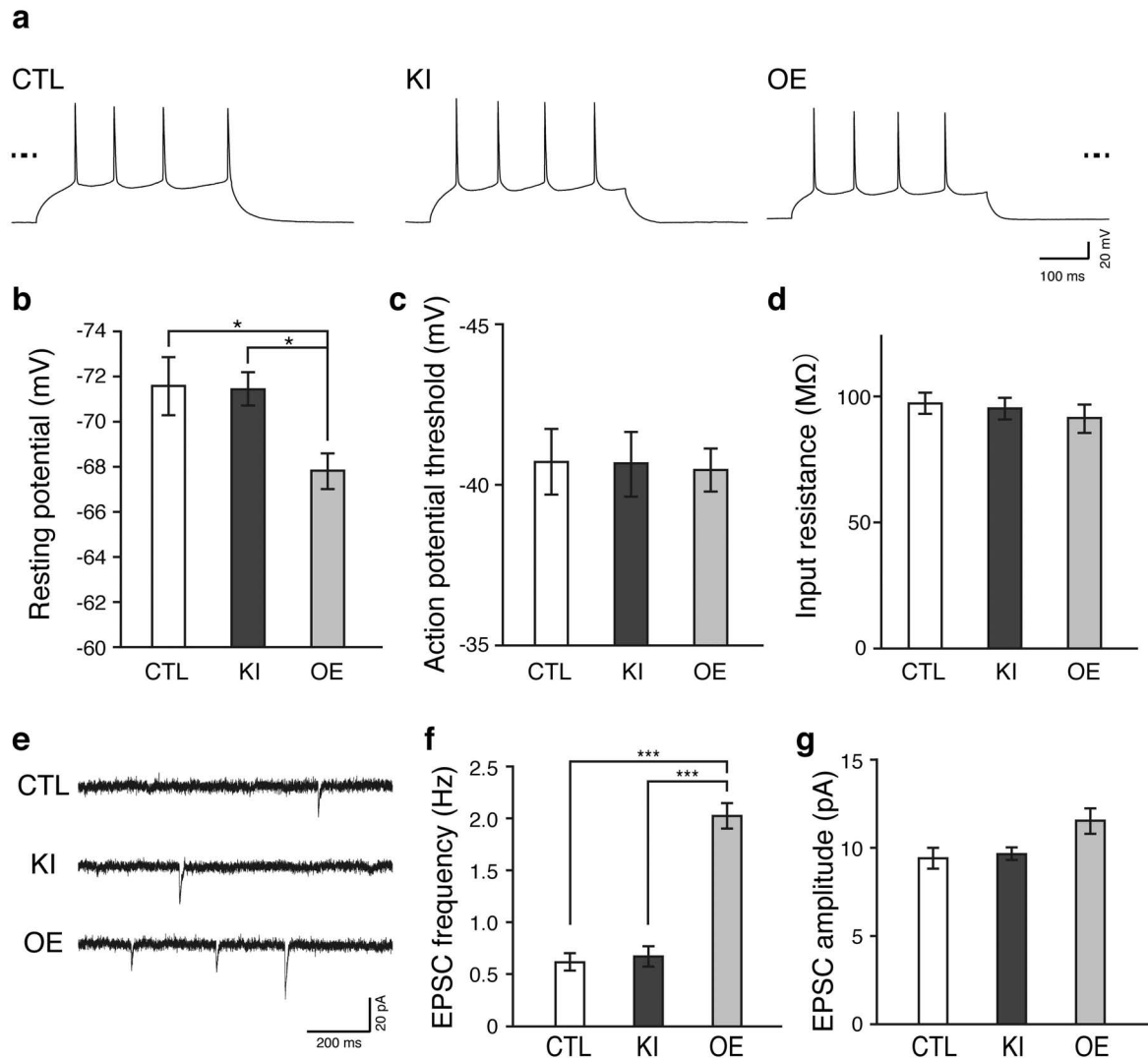


図2. CRISPR/Cas9によるEGFP- β -actinノックインがニューロンの生理機能に与える影響
 a) 電流固定によるニューンの膜電位変化の波形。b-d) ニューロンの膜特性の比較。* $P < 0.05$ (Tukey's test)。
 e-g) シナプスの自発的活動の比較。** $P < 0.001$ (Tukey's test)。(CTL: 野生型コントロール、KI: ノックイン、
 OE: 過剰発現)。

考 察

CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム改変は、ここ数年で急速に普及してきて世界中の多くの研究者が用いるようになってきたが、これまで *in vivo* のニューロン特異的に遺伝子をノックインする方法の成功例はなかった。本研究の成功により、自閉症患者から見つかった遺伝子変異を迅速にマウスのニューロンに導入して、変異がニューロンに及ぼす形態学的、生理学的影響を簡便に解析できるようになると考えられる。本研究成果は、本報告書を執筆時点で論文に投稿中である。現在我々は、様々なシナプス遺伝子について本手法を用いて遺伝子ノックインを行っており、解析しているところである。本研究に関連して、多数の研究プロジェクトの確立につなげることができた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、信州大学学術研究院医学系の植村健、森琢磨、新藤隆行、桜井敬之、本林光雄である。

文 献

- 1) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T; Paris Autism Research International Sibpair Study. *Nat Genet.* 2003;34(1):27-9. PMID:12669065
- 2) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. Autism Genome Project Consortium. *Nat Genet.* 2007;39(3):319-28. PMID:17322880
- 3) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Südhof TC. *Science.* 2007;318(5847):71-6. PMID:17823315
- 4) An autism-associated point mutation in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. Etherton MR, Tabuchi K, Sharma M, Ko J, Südhof TC. *EMBO J.* 2011;30(14):2908-19. doi: 10.1038/emboj.2011.182. PMID:21642956
- 5) Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. Etherton M, Földy C, Sharma M, Tabuchi K, Liu X, Shamloo M, Malenka RC, Südhof TC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(33):13764-9. doi: 10.1073/pnas.1111093108. PMID:21808020
- 6) β -Neurexins Control Neural Circuits by Regulating Synaptic Endocannabinoid Signaling. Anderson GR, Aoto J, Tabuchi K, Földy C, Covy J, Yee AX, Wu D, Lee SJ, Chen L, Malenka RC, Südhof TC. *Cell.* 2015;162(3):593-606. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.056. PMID:26213384
- 7) Distinct circuit-dependent functions of presynaptic neurexin-3 at GABAergic and glutamatergic synapses. Aoto J, Földy C, Ilcus SM, Tabuchi K, Südhof TC. *Nat Neurosci.* 2015;18(7):997-1007. doi: 10.1038/nn.4037. PMID:26030848