

【目的】細胞は、細胞外からの刺激に応じて特定のタンパク質を新規に合成し、刺激に応じた細胞内プロセスを時空間的に正確に実現する。脳においては、タンパク質の新規合成は、神経回路の形成やリモデリングなど様々な過程に不可欠であることが知られている。ゆえに、新規合成タンパク質を選択的に観察しその機能を操作する方法は、様々な脳内過程における細胞内プロセスをタンパク質レベルで理解するために必須である。しかしながら、これまで新規合成タンパク質を選択的に観察しその機能を操作する良い方法は存在していない。

三國はこれまでに、脳組織内の 1 細胞で正確なゲノム編集を行い、内在性タンパク質の局在や動態を迅速にかつ高解像度で観察する方法「SLENDR 法」を開発した (Mikuni et al., Cell 2016)。また、SLENDR 法を発展させて、あらゆる時期の脳の任意の細胞種、脳部位あるいは脳全体で内在性タンパク質の局在や動態を観察できる「vSLENDR 法」を開発した (Nishiyama* and Mikuni* et al., Neuron 2017)。本研究では、SLENDR および vSLENDR 法をベースにして、脳組織中で内在性タンパク質をハイスループットに可視化する技術の確立を目的とした。

【方法】ある時間枠に新規合成された特定のタンパク質をイメージングするために、三國が開発したゲノム編集による内在性タンパク質の可視化技術 (SLENDR および vSLENDR 法) と、化学タグによるパルスチェイス法を組み合わせた。化学タグは、低分子リガンドが特異的かつ不可逆的に結合する「受け皿タンパク質」であり、低分子リガンドとして波長の異なる様々な蛍光リガンドを使用できる。この化学タグの性質を利用して、脳組織において、SLENDR/vSLENDR 法により化学タグを付加した特定の内在性タンパク質に対し、まずある色の蛍光リガンドで染色した。その後、任意の時間が経った後、異なった色の蛍光リガンドで染色することで、新規合成されたタンパク質を特異的に染色した (パルスチェイス法)。染色した新規合成タンパク質を、共焦点あるいは二光子顕微鏡で観察した。

【結果】上記の方法により特定のタンパク質をイメージングできるかどうかを確認するために、脳でシナプス可塑性に重要とされる CaMKII α タンパク質に着目した。子宮内電気穿孔法あるいはアデノ随伴ウイルスベクターでゲノム編集に必要なコンポーネントをマウスの大脳皮質あるいは海馬の錐体細胞に導入し、相同組換え修復によるゲノム編集で CaMKII α の遺伝子座に化学タグをエンコードする配列を正確に挿入することに成功した。そのうえで、2 色の化学タグリガンドを用いて、上記のパルスチェイス法を用いて、2 時間内に新規合成された CaMKII α タンパク質を選択的に可視化することに成功した。本研究で開発した方法により、脳組織での新規合成タンパク質の動態を高い時空間分解能で迅速に調べられるので、様々な脳内過程の分子メカニズムの理解が飛躍的に進む。

脳組織内 1 細胞での新規合成タンパク質のイメージング

