53　脳組織内の新規合成タンパク質のイメージング	三國　貴康

【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、脳組織中で内在性の新規合成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新規合成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 CaMKⅡα 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 CaMKⅡα 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 CaMKⅡα 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



53. 脳組織内の新規合成タンパク質のイメージング

三國　貴康

新潟大学 脳研究所 細胞病態学分野

Key words：ゲノム編集，CRISPR-Cas9，内在性タンパク質，新規合成，イメージング

緒　言

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する良い方法は存在していない。従来、新規合成タンパク質を特異的に観察するために、国内外で様々な研究が行われてきた。放射性同位元素を用いて新規合成タンパク質を特異的に検出する方法は古くからなされているが、この方法では特定のタンパク質の新規合成分を検出できない。最近では、Erin Schuman のグループが化学的方法を用いて特定の新規合成タンパク質を可視化する方法を開発している［1，2］が、膨大な条件検討が必要でスループットが低いため、様々なタンパク質を標的するのは難しい。

三國はこれまでに、SLENDR 法［3］および vSLENDR 法［4］を開発することで、哺乳類の生体脳で相同組換え修復によるゲノム編集を実現した。相同組換え修復によるゲノム編集は、正確に塩基配列を挿入し、除去し、置換したりするような思い通りのゲノムの改変を可能にする。神経細胞のような非分裂細胞で相同組換え修復を誘導するのは難しいとされていたが、三國は、子宮内電気穿孔法やアデノ随伴ウイルスベクターといった遺伝子導入方法を最適化して CRISPR-Cas9 と組み合わせることで、生体脳内で効率良く相同組換え修復によるゲノム編集をできるようにした。これにより、あらゆる時期の個体の脳の任意の細胞種、脳領域あるいは脳全体で効率良く自在にゲノムを編集できるようになった。そのうえで三國は、この自在なゲノム編集技術を用いることで、生体脳内で特定の内在性タンパク質を標識してその時間的・空間的なダイナミクスを定量的にイメージング解析できるようにした。複雑な形の神経細胞が高密度にひしめく脳組織では、タンパク質を 1 細胞で可視化しコントラスト良く観察する必要がある。三國は、SLENDR 法/vSLENDR 法により、生体脳の一部の細胞で目的遺伝子に標識タグ配列を挿入し、内在性に発現する目的のタンパク質を脳組織内 1 細胞において標識・イメージングすることに成功している［5，6］。

本研究では、SLENDR および vSLENDR 法をベースにして、脳組織中で内在性の新規合成タンパク質をハイスループットに可視化する技術を開発した。本研究で開発する方法により、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ことが期待される。

方　法

1. ゲノム編集による化学タグノックイン

目的タンパク質を化学標識するために、マウス個体の脳細胞で目的タンパク質をコードする遺伝子座に化学タグ配列を正確にノックインした。そのために、SLENDR 法あるいは vSLENDR 法を用いた（図 1）。SLENDR 法では、胎生 12～14 日齢のマウス胎児の脳室に、ゲノム編集に必要なコンポーネント（ガイド RNA および SpCas9 発現ベクター、相同組換え用の鋳型 DNA）を子宮内電気穿孔法で導入した（電圧 33～50 V, 50 msec のパルスを 1 秒おきに 4 回。NepaGene エレクトロポレーターを使用）。生後 5～7 日齢のマウスの海馬からスライス培養を作製し、

培養 12～15 日にイメージング実験を行った。vSLENDR 法では、マウス海馬から作製したスライス培養に、ゲノム編集に必要なコンポーネント（ガイド RNA および SpCas9 発現カセットおよび相同組換え用の鋳型 DNA）を搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを培養 5～7 日に添加し（1 スライス当たり約 10^{10}ゲノムコピー）、培養 12～15 日にイメージング実験を行った。

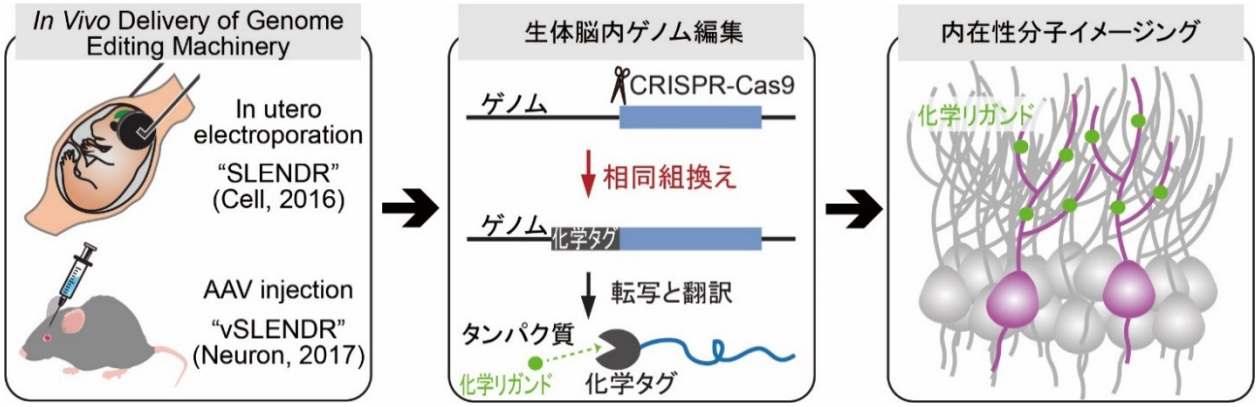


図 1. SLENDR および vSLENDR 法による内在性タンパク質の化学標識

子宮内電気穿孔法（SLEDNR 法）またはアデノ随伴ウイルスベクター（vSLENDR 法）によりゲノム編集に必要な要素を個体の脳細胞に導入する（左）。相同組換えによるゲノム編集で目的の遺伝子座に正確に化学タグ配列を挿入する（中央）。化学リガンドを脳組織に添加することで、目的の内在性タンパク質を脳組織内 1 細胞のコントラストで高感度にイメージングできる（右）。

2. スライス培養の作製

先行論文の方法に準拠して、マウス海馬あるいは大脳皮質からスライス培養を作製した［7］。生後 5～7 日齢のマウスの海馬あるいは大脳皮質を切り出し、チョッパーで 325 μm の厚さでスライスを作製し、培地を添加したミリセル膜上に置いて、37℃ 5% CO_2の条件で培養した。培地は 2～3 日に 1 回交換した。

3. パルスチェイス法

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、SLENDR 法および vSLENDR 法と、化学タグによるパルスチェイス法（図 2）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［8］。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する。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、図 2）。

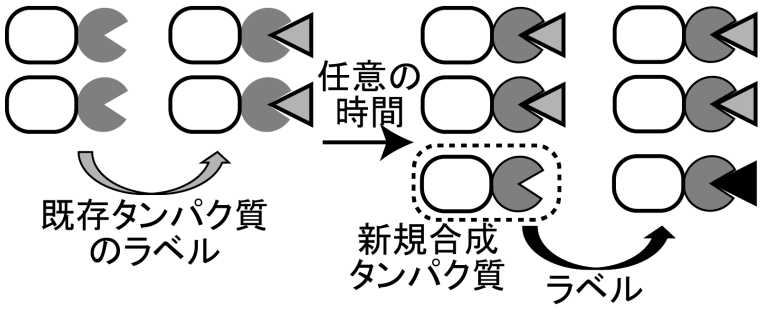


図 2. パルスチェイス法

任意の時間枠で合成された内在性タンパク質を選択的にラベルするパルスチェイス法の概念図を示す。

4. イメージング

パルスチェイス法で選択的に標識した新規合成タンパク質を、共焦点レーザー顕微鏡（オリンパス社 FV1200）または2光子顕微鏡（ライカ社SP5）で観察した。

結　果

1. 化学タグノックインによる内在性タンパク質の局在の高感度イメージング

本研究で開発する方法により特定の新規合成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 CaMKⅡαタンパク質に着目した［9］。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 CaMKⅡα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（図3）。そのうえで、化学リガンドを添加することで、脳組織内1細胞で内在性のCaMKⅡαタンパク質の局在を感度良くイメージングし、CaMKⅡαタンパク質が神経細胞内の樹状突起スパインに主に集積していることを確認した（図4）。

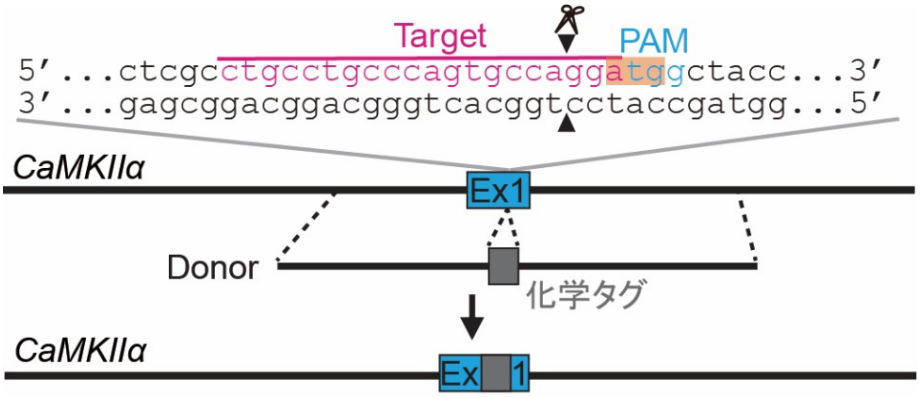


図3. SLENDRおよびvSLENDR法によるCaMKⅡαの化学タグノックイン
CaMKⅡαの遺伝子座に相同組換え修復によるゲノム編集で正確に化学タグ配列をノックインする概念図を示す。

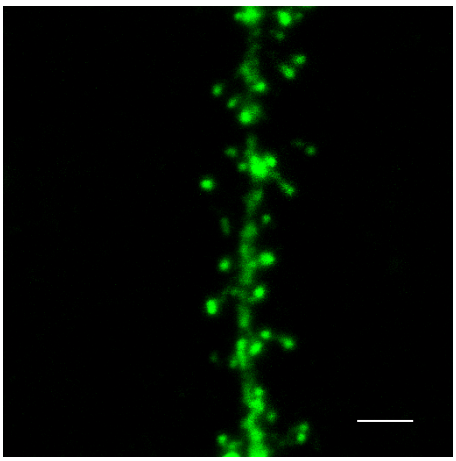


図4. 脳組織内での内在性CaMKⅡαタンパク質の化学タグ標識
内在性 CaMKⅡαタンパク質の化学タグによる可視化。マウス大脳皮質 2/3 層ニューロンでの可視化例。スケールバーは1μm。

2. 新規合成タンパク質のイメージング

化学タグで標識した CaMKⅡαタンパク質に、まず、ある色の化学リガンドを添加した。そのうえで、2 時間後に別の色の化学リガンドを添加し、パルスチェイス法によって 2 時間内に新規に合成された CaMKⅡαタンパク質を選択的にイメージングした（図 5）。タンパク質合成阻害薬であるアニソマイシン存在下では、2 回目のラベルシグナルはほとんど検出できなかったので、コントロールにおいて検出した 2 回目ラベルシグナルは確かに 2 時間内に新規に合成された CaMKⅡαタンパク質であることが示された。

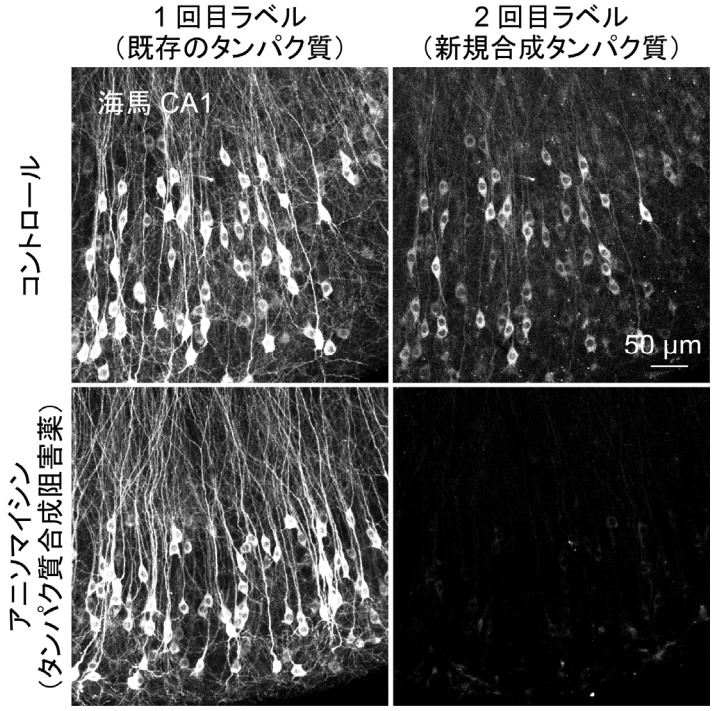


図 5. 脳組織内での新規合成 CaMKⅡαタンパク質の可視化例
マウス海馬 CA1 錐体細胞で、2 時間内に合成された内在性 CaMKⅡαタンパク質（右上）。
アニソマイシン存在下では新規合成 CaMKⅡαタンパク質はほとんど検出できない。
スケールバーは 50μm。

考　察

本研究により、ある時間枠に新規に合成された内在性タンパク質の選択的なイメージングが可能になった。本研究で開発した方法は、ハイスループットなゲノム編集技術に基づいているので、これから様々なタンパク質の新規合成成分をイメージングしていくことができる。SLENDR/vSLENDR 法による既存の内在性タンパク質の可視化に加えて、本研究による新規合成タンパク質の可視化もできるようになれば、タンパク質の細胞内ダイナミクスをより統合的に理解できるようになる。また、本研究で開発する方法の原理（ゲノム編集や化学的ラベリングなど）は脳以外の系にも適用可能である。タンパク質の新規合成は脳以外でも様々な過程に不可欠であり、本方法は、神経科学分野のみならず幅広い生命科学分野において有用な方法となる。

本研究では主に脳スライスでの実験となったが、本研究で開発した技術は原理的に *in vivo* でも使用可能である。今後は行動下動物での実験にも応用され、学習・記憶など様々な行動における新規合成タンパク質の動態の観察が期待される。また、観察結果の機能的意義づけをより詳細に行うために、光照射によるタンパク質の操作方法と組み合わせる研究も考えられる。タンパク質の機能を高い時空間分解能で調べるために、光照射分子不活性化法（CALI 法）がある［10］。CALI 法は、標的タンパク質に融合されたラジカル発生色素を光照射することで、標的タンパク質を任意の時間・場所で不活性化する技術である。脳組織において本研究で開発した方法と CALI 法を組み合わせることで、

特定の新規合成タンパク質を光操作により時間的・空間的に正確に不活性化できるようになるので、新規合成タンパク質の動態と機能を統合的に理解できるようになる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、米国の HHMI ジャネリア研究所のルーク・レイヴィス博士である。

文　献

1) Dieterich DC, Hodas JJ, Gouzer G, Shadrin IY, Ngo JT, Triller A, et al. In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. Nature neuroscience. 2010;13(7):897-905. Epub 2010/06/15. doi: 10.1038/nn.2580. PubMed PMID: 20543841; PubMed Central PMCID: PMC2920597.

2) tom Dieck S, Kochen L, Hanus C, Heumuller M, Bartnik I, Nassim-Assir B, et al. Direct visualization of newly synthesized target proteins in situ. Nature methods. 2015;12(5):411-4. Epub 2015/03/17. doi: 10.1038/nmeth.3319. PubMed PMID: 25775042; PubMed Central PMCID: PMCPMC4414919.

3) Mikuni T, Nishiyama J, Sun Y, Kamasawa N, Yasuda R. High-throughput, high-resolution mapping of protein localization in mammalian brain by *in vivo* genome editing. Cell. 2016;165(7):1803-17. Epub 2016/05/18. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.044. PubMed PMID: 27180908; PubMed Central PMCID: PMC4912470.

4) Nishiyama J, Mikuni T, Yasuda R. Virus-Mediated Genome Editing via Homology-Directed Repair in Mitotic and Postmitotic Cells in Mammalian Brain. Neuron. 2017;96(4):755-68. Epub 2017/10/24. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.004. PubMed PMID: 29056297; PubMed Central PMCID: PMCPMC5691606.

5) Mikuni T, Uchigashima M. Methodological approaches to understand the molecular mechanism of structural plasticity of dendritic spines. The European journal of neuroscience. 2020. Epub 2020/04/06. doi: 10.1111/ejn.14734. PubMed PMID: 32248570.

6) Mikuni T. Genome editing-based approaches for imaging protein localization and dynamics in the mammalian brain. Neurosci Res. 2019. Epub 2019/04/30. doi: 10.1016/j.neures.2019.04.007. PubMed PMID: 31034861.

7) Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. Journal of neuroscience methods. 1991;37(2):173-82. Epub 1991/04/01. PubMed PMID: 1715499.

8) Grimm JB, English BP, Chen J, Slaughter JP, Zhang Z, Revyakin A, et al. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. Nature methods. 2015;12(3):244-50, 3 p following 50. Epub 2015/01/20. doi: 10.1038/nmeth.3256. PubMed PMID: 25599551; PubMed Central PMCID: PMCPMC4344395.

9) Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. Nature reviews Neuroscience. 2012;13(3):169-82. Epub 2012/02/16. doi: 10.1038/nrn3192. PubMed PMID: 22334212; PubMed Central PMCID: PMC4050655.

10) Linden KG, Liao JC, Jay DG. Spatial specificity of chromophore assisted laser inactivation of protein function. Biophys J. 1992;61(4):956-62. Epub 1992/04/01. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81902-1. PubMed PMID: 1581504; PubMed Central PMCID: PMCPMC1260354.