

## I ゲノム編集法による分化後神経細胞における 神経細胞内の蛋白質のラベリング

*In vivo* gene labeling within post-mitotic neurons through  
genome editing

生沼泉  
Oinuma, I.

遺伝子治療への技術応用のためには、組み換え効率を高め、生体内において分化後神経細胞での相同組み換えを可能とする必要がある。我々は、電気パルス法を用いた相同組み換えと蛋白質標識の至適化の検討を行うことで、マウス成体の中枢神経組織である大脳皮質において、分化後神経細胞における相同組み換えに成功した。大脳皮質脳神経ネットワークの破綻は様々な疾患に繋がる。大脳皮質内の神経細胞に対する直接的な遺伝子治療技術の開発は、各種難治性疾病の治療基盤の確立となる。以上から、我々はまず、大脳皮質神経細胞を直接操作し、相同組み換えを行うことを試みた。我々は、哺乳類モデル動物としてマウスを用い、妊娠 14.5 日齢の子宮内に居るマウスに対して、大脳皮質内に対する直接的遺伝子導入を行った。条件検討の結果、電気パルスを用いた「電気細孔法」を用いた遺伝子導入により、母体から出産された各仔において大脳皮質特異的に神経細胞での遺伝子導入を確認し、体細胞への直接的遺伝子導入を確認した。また、この遺伝子導入操作を施した仔は、通常通り哺乳され正常な発生過程を辿った。

この技法を用い、実際に分化後神経細胞における相同組み換えに挑戦した。学習や記憶に関係する遺伝子である *PSD-95* に着目し、マウス *PSD-95* 遺伝子座をターゲットとした相同組み換えによる蛋白質標識を目的とし、ノックインコンストラクトを構築した。このコンストラクトおよび遺伝子導入細胞を確認するための発現ベクターコンストラクトを妊娠 14.5 日齢の母体マウス子宮内に居るマウス 1 匹 1 匹に対して、電気細孔法を用い同時に導入し、生後 2 ヶ月まで通常通り母親の下で哺乳・保育した後に、仔を組織化学および Western Blot 法により解析することにより、狙った遺伝子領域での相同組み換えを検証した。検討の結果、一部の神経細胞で相同組み換えが起こったことで発せられる緑色蛍光を確認でき、さらにこの緑色蛍光タンパク質が内在性の *PSD-95* タンパク質に意図した通りに融合されていることを、Western Blot 法で確認した。以上の成果から、マウス生体において、電気パルス法を用いて遺伝子置換を引き起こすことに成功した。また、同様の技法は大脳皮質組織のみならず、網膜組織においても適応されることが明らかになり、確立した系の普遍性の裏付けも得られた。今後、網膜および大脳皮質神経細胞の遺伝性変性疾患への治療応用が期待される。

さらに、初代培養神経細胞においても、電気パルス法を用いた遺伝子置換の条件検討を行った。遺伝子治療の汎用性の向上のためには、各タンパク質をコードする遺伝子の

C末側のみならず、N末側への遺伝子置換操作を可能とある必要があり、われわれは、N末側へのノックイン技術の確立を目的として、神経伸長に促進的に働くアクチン制御因子の lamellipodin (Lpd)に着目し、ラット *Lpd* 遺伝子座の N末側への緑色蛍光タンパク質(EGFP) のノックインのための条件を検討した。プロモーター領域を含まれる可能性を極力排除し、相同組み換えが起こらない限り緑色蛍光タンパク質が発現しないようにした。設計したコンストラクトをラット大脳皮質神経細胞に導入し、試験管内で培養した。神経細胞内で相同組み換えが起こり、*Lpd* 遺伝子の N末側に EGFP が融合されているかどうかを、細胞から抽出したゲノム DNA サンプルに対する RT-PCR 法を用いて確認した。PCR 法による検討の結果、相同組み換えが起こり、神経細胞内在性の *Lpd* 遺伝子座のゲノム配列に EGFP が融合されていることが確認できた。この結果から、従来から実施されている C末側のみでなく、homology arm の長さを工夫することで、targeting vector からの意図しない発現を起こすことなく、意図した相同組み換え下での遺伝子融合産物の発現を可能とすることができることがわかった。この技法は、様々な神経伸長因子をターゲットとすることで、今後、神経損傷モデル系での神経再生への利用応用が期待される。

## II 核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析

### Interaction between nuclear lamina and heterochromatin

廣瀬富美子  
Hirose, F.

核膜の裏側に存在する核ラミナは A-type lamin (lamin A/C)と B-type lamin (lamin B)タンパク質が重合した網目状の繊維構造である。核ラミナは、核膜とクロマチンの両者と相互作用し、転写・DNA複製・DNA修復など多岐にわたる核内反応の調節に関わっている。なかでも、核膜直下でのヘテロクロマチンの形成に深く関わっていることが知られているが、これに関わる因子やその制御メカニズムについては、解明されていない。我々はこの問題を解決するために、核ラミナとクロマチンの相互作用に関わる因子の同定を試みている。核ラミナは細胞分裂のたびに崩壊と再構築を繰り返す。我々は、核ラミナとクロマチンとの特異的な相互作用は、核ラミナの構築と分裂期染色体の脱凝縮が起こる分裂期終盤に起こるであろうと想定し、この時期に lamin A と相互作用する因子を検索してきた。その結果、ヘテロクロマチン結合たんぱく質である HP1 が免疫沈降実験で lamin A と共沈降し、さらに細胞内での共局在することを見出した。

我々は lamin A が核膜直下のヘテロクロマチン形成に関与することを示す予備的な証拠を得ている。そこで、分裂期の終わりから G1 期にかけて起こるヘテロクロマチンの核膜直下への再配置に lamin A-HP1 間相互作用が関与しているかどうかを調べるために、ヘテロクロマチンと lamin A の核内ダイナミクスを追跡するための蛍光たんぱく質を利用したライブセルイメージングの系を立ち上げた。また、核ラミナの構成因子であるラミン A をノックダウンし、ヘテロクロマチンの核膜直下への配置に対する影

響を調べた結果、ラミン A は分裂期終期から G1 期における核内でのヘテロクロマチンの正しい配置に必要であることが証明した。現在、生細胞での lamin A と HP1 との相互作用を解析するために、蛍光たんぱく質を利用した細胞内のたんぱく質因子間相互作用を検出できる Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析システムの構築を行っている。

## 発表論文等 List of Publications

- I-1 Takahiko Matsuda, and Izumi Oinuma: Imaging endogenous synaptic proteins in primary neurons at single-cell resolution using CRISPR/Cas9. *Mol. Biol. Cell* 30(22) 2838-2855. doi: 10.1091/mbc.E19-04-0223. (2019)
- I-2 Takahiko Matsuda, and Izumi Oinuma: Optimized CRISPR/Cas9-mediated in Vivo Genome Engineering Applicable to Monitoring Dynamics of Endogenous Proteins in the Mouse Neural Tissues. *Sci. Rep.* Aug 5;9(1):11309. doi: 10.1038/s41598-019-47721-4. (2019)
- II-1 廣瀬富美子 : Assembly of heterochromatin under the nuclear membrane is determined at the end of mitosis. ポスター発表 第 42 回分子生物学会年会 (令和元年 12 月、福岡国際会議場)

## 科学研究費補助金等

1. 科学研究費助成事業 (基盤 C) (平成 29-令和 1 年度)  
研究課題 低分子量 G 蛋白質 R-Ras によるガイダンス因子シグナル統合の分子機序の解明  
研究代表者 生沼 泉
2. 科学研究費助成事業 (新学術領域研究) (平成 31-令和 2 年度)  
研究課題 アクチン足場の選択的スプライシングの時空間ダイナミクスが担う軸索誘導の新概念  
研究代表者 生沼 泉
3. 研究助成金 公益財団法人カシオ科学振興財団研究助成金 (平成 31-令和 1 年度)  
研究課題 損傷神経細胞の体内修復利用を可能とする電気パルスを用いた遺伝子導入法を用いた遺伝子工学技術の開発  
研究代表者 生沼 泉
4. 科学研究費助成事業 (基盤 C) (平成 30-令和 2 年度)  
研究課題 G1 期における核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析  
研究代表者 廣瀬 富美子