

本件の取り扱いについては、下記の解禁時間以降でお願い申し上げます。
 TV・ラジオ・WEB … 日本時間 平成 28 年 10 月 24 日(月)18 時
 新聞 … 日本時間 平成 28 年 10 月 25 日(火)朝刊

平成 28 年 10 月 21 日

どの領域・細胞種の脳細胞でも高輝度標識し、任意の遺伝子を改変する新技術「Supernova シリーズ」

■ 概要

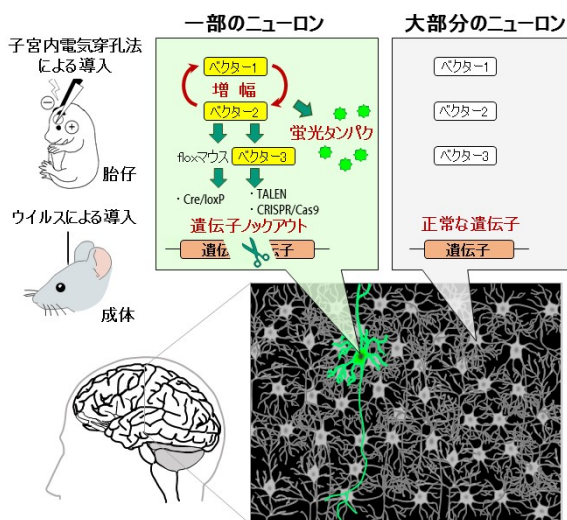
国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門(岩里研究室)の羅研究員(元総合研究大学院大学大学院生)と水野助教らは、脳の細胞中で遺伝子機能を解析するための、新規ベクターシステム「Supernova シリーズ」を開発しました。このシステムは簡便かつ高性能で、幅広い用途に適用できます。

哺乳類の脳は、無数の神経細胞(ニューロン)が複雑なネットワーク(神経回路)を作ることで、様々な機能を生み出しています。脳の中に高密度で存在するニューロンから一部だけをランダムに選んで標識し、その細胞のみで目的の遺伝子をノックアウトすることができれば、脳の神経回路が形成され、機能するしくみを細胞レベル、分子レベルで理解することにつながります。しかしながら、これまでにまばらな細胞標識と遺伝子ノックアウトの両方を効率よくできるシステムはありませんでした。

本成果の Supernova 法⁽¹⁾では 2 種類または 3 種類のベクターを組み合わせるだけで、少数の細胞のみを蛍光タンパクで可視化できるとともに、可視化された細胞だけで目的の遺伝子をノックアウトすることが可能となります。遺伝子ノックアウトには、flox マウス⁽²⁾とよばれる遺伝子組換えマウスを用いる手法に加え、ゲノム編集の手法(TALEN⁽³⁾と CRISPR/Cas9⁽⁴⁾)も利用できるようになり、Supernova 法は広範なモデル生物に使うことができます。また、ベクター導入にウイルスを用いる手法も利用できるので、脳以外の組織にも用いることができます。本手法によって遺伝子改変による細胞の挙動などの変化を追跡することが可能です。

今回開発された手法は神経科学にとどまらない幅広い生命科学分野で、単一細胞における遺伝子機能解析に貢献することが期待されます。

図1



Supernova 法のしくみ

2 種類の Supernova ベクター(ベクター1、ベクター2)を組み合わせることで、ベクター1とベクター2を取り込んだ細胞のうちの一部のみ正のフィードバックにより蛍光タンパクの発現の増幅が起こり、強い蛍光を発する。flox マウスと呼ばれる遺伝子組換えマウスを用いると Cre/loxP 法で目的の遺伝子をノックアウトできる。また、TALEN や CRISPR/Cas9 法を利用したベクター3を導入すれば、遺伝子組換え動物を用いずに目的の遺伝子をノックアウトすることもできる。ベクターは、子宮内電気穿孔法あるいはアデノ随伴ウイルスを用いて導入する。

■ 成果掲載誌

本研究成果は、平成 28 年 10 月 24 日 10 時(英国時間)に英国オンラインジャーナル Scientific Reports に掲載されます。

論文タイトル: Supernova: A Versatile Vector System for Single-Cell Labeling and Gene Function Studies *in vivo* (スーパーノヴァ: 生体での単一細胞の標識と遺伝子機能解析のための汎用性の高いベクターシステム)

著者: Wenshu Luo*, Hidenobu Mizuno*, Ryohei Iwata, Shingo Nakazawa, Kosuke Yasuda, Shigeyoshi Itoharu, Takuji

Iwasato (羅ブンジュウ*, 水野秀信*, 岩田亮平、中沢信吾、安田光佑、糸原重美、岩里琢治) (*equal contribution)

■ 研究の詳細

● 研究の背景

哺乳類の脳では、無数の神経細胞(ニューロン)が複雑なネットワーク(神経回路)を作ることで、様々な脳機能が生み出されています。脳の神経回路が作られ、機能するしくみを細胞レベル、分子レベルで理解するためには、脳の中に高密度で存在するニューロンのうちのごく少数だけを標識し、そのニューロン特異的に目的の遺伝子をノックアウトして、細胞の挙動を追跡することが必要です(図1)。しかしながら、従来の方法では標識される細胞の密度が高くなりすぎ、単一細胞解析には適さなかったり、適用できる発達段階、脳の領域、ニューロンの種類、ノックアウト可能な遺伝子が限られたりする問題を抱えていました。また、細胞標識と同時に遺伝子ノックアウトもできるシステムに至っては、汎用性のある方法は存在せず、新たな手法の開発が待たれていました。

● 本研究の成果

国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門(岩里研究室)の羅研究員と水野助教らは、単一細胞の標識と同時に標識細胞特異的に遺伝子ノックアウトができる簡便で効率のよい方法(Supernova 法)の開発に成功しました。Supernova 法では、2種類のベクター(ベクター1とベクター2)を脳に導入することにより、ベクターが導入された細胞のうちの一部のみ遺伝子発現が増幅され(図1)、少数の細胞のみが極めて明るく蛍光標識されます。また、flox マウスと呼ばれる遺伝子組換えマウスを用いたり、あるいは後述のようにベクター3を同時に導入したりすることにより、標識された細胞特異的に遺伝子をノックアウトできる画期的なシステムです(図1)。2014年には、同研究室の水野助教らがこの手法の原型を用いて、生きている新生仔マウスの脳の中の神経細胞を明るく標識し観察することに世界で初めて成功しました(Mizuno et al., Neuron 2014)。今回は遺伝子を操作するために(ベクター3を用いて)TALEN, CRISPR/Cas9などの最新のゲノム編集技術を取り入れることで、高性能で汎用性のある Supernova シリーズを構築しました(図2、図3)。この結果、遺伝子組換え動物ではない多くのモデル生物において遺伝子ノックアウトできるようになりました。また、ベクター導入に、これまでの子宮内電気穿孔法に加えてアデノ随伴ウイルス(AAV)が利用できるようになり、幅広い組織への適用が可能になりました。

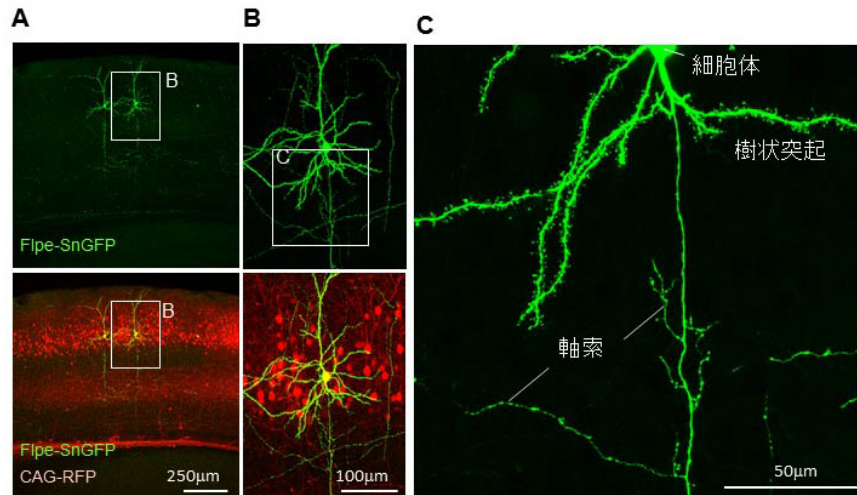


図2: Supernova 法による明るく疎らなニューロン標識

Supernova ベクターは脳の中の多くの細胞に導入されている(赤色)が、そのうちの一部だけが緑色に明るく標識されたことにより、細胞の形態(樹状突起や軸索の形態)を明瞭に観察することができた。B,C はそれぞれ A,B の一部の拡大。

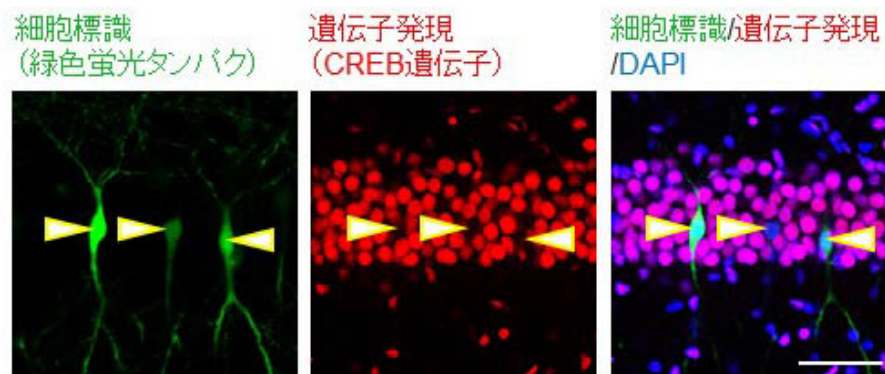


図3: Supernova 法による標識細胞特異的遺伝子ノックアウト

Supernova 法に CRISPR/Cas9 法を組み合わせることで海馬で CREB 遺伝子のノックアウトを行った例を示す。海馬の細胞(DAPIで青色に染まっているもの)のうち緑色で標識されていない細胞のほとんどすべてで CREB(赤色)が発現しているが、緑色で標識された細胞(矢頭)では CREB の発現が見られない。なお、緑色蛍光は非常に強いですが、そのままでは CREB 発現の検出の邪魔になるので、あえて褪色させてある。

● 今後の期待

Supernova 法を用いることで、原理的には脳のすべての領域のすべての細胞種を疎らに標識できるようになりました。さらに、標識細胞特異的に任意の遺伝子をノックアウトできるようになり、神経回路の形成や機能の細胞レベル、分子レベルでの理解の飛躍的な進歩が期待できます。この手法はマウス以外の動物や脳以外の組織にも適用できるため、幅広い生命科学研究への貢献も期待できます。なお、今回開発したベクター類はリクエストに応じて国内外の研究室に提供する予定です。非営利のプラスミドバンクへの寄託手続きも進めています。

■ 用語解説

(1) Supernova 法:

「神経細胞を疎らに標識」することができるベクターシステム。Supernova 法では、ベクターが導入された細胞のうちのごく少数でのみ、テトラサイクリン遺伝子発現増幅システムと部位特異的組換えシステムを利用した正のフィードバックによって、高輝度の蛍光標識ができる。これにより単一の神経細胞の形を明瞭に可視化できるようになった。導入するベクターの濃度を変えることにより標識密度を調節することも可能。さらに、Cre/loxP, TALEN あるいは CRISPR/Cas9 と組み合わせることにより、様々な標識細胞特異的に目的の遺伝子をノックアウトすることができるという特長を持つ。

(2) flox マウス:

標的となる遺伝子が 2 個の loxP とよばれる配列ではさまれた構造のゲノムをもつ遺伝子組換えマウス。このマウスの一部の細胞でCre組換え酵素を発現させると、その細胞の中でのみ、2個の loxP 間で組換えがおき、結果として標的遺伝子がゲノムから切り出されてノックアウトされる。

(3) TALEN:

魚類や両生類でよく使われているゲノム編集システム。最近、哺乳類でも高い効率を示すように改良された。

(4) CRISPR/Cas9:

近年大きな話題となっている生体組織でのゲノム編集技術。日々改良・応用が進んでおり、いかなる遺伝子をも、簡便・迅速・高効率で編集できるようになってきている。

■ 研究体制と支援

本研究は、情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門(岩里研究室)にて、羅ブンジュウ研究員(元総合研究大学院大学大学院生)と水野秀信助教が中心となり、岩田亮平博士(同)、中沢信吾氏(総合研究大学院大学大学院生)の協力のもとおこなわれました。AAV を用いたシステムの構築では、理研脳センター 行動遺伝学技術開発チーム[安田光佑博士(元研究員)、糸原重美博士(シニアチームリーダー)]の協力を受けました。この研究は新学術領域研究(「スクラップ&ビルド」、「適応回路シフト」)など科研費の支援を受けて行われました。

■ 参考文献

Mizuno, H., Luo, W., Tarusawa, E., Saito, Y.M., Sato, T., Yoshimura, Y., Itohara, S., and Iwasato, T. (2014). NMDAR-regulated dynamics of layer 4 neuronal dendrites during thalamocortical reorganization in neonates. *Neuron* 82, 365–379.

■ 問い合わせ先

<研究に関すること>

- 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 形質遺伝研究部門
総合研究大学院大学 生命科学研究科 遺伝学専攻 (兼任)
教授 岩里琢治(いわさと たくじ)

<報道担当>

- 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 リサーチ・アドミニストレーター室
清野 浩明(せいの ひろあき)