

神経細胞の活動を記録できる人工蛋白質プローブの開発

香川大学 医学部 神経機能形態学
鈴木 辰吾

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

脳の活動を神経細胞の単位で理解するためには、まず特定の脳活動に関与するニューロンを網羅的に同定する必要がある。つまり、特定の脳の活動に関与したニューロンを炙り出すことができれば、脳の活動とニューロンとを対比することが可能になり、脳の動作原理への理解が一步前進する。しかし、単に脳に存在する物質や現象を検出する現行の研究方法では、このようなニューロンの同定は難しい。一方、ニューロンの活動をただ受動的に測定するのではなく、ニューロン自身に提示させ、その提示方法を操作できるような、より積極的な研究手法を開発すれば、特定の活動に関与するニューロンを、より詳細に同定できると考えられる。現在のところ、細胞内のカルシウム上昇をリアルタイムで可視化できる人工遺伝子プローブなどが作成されているが、これらの方法ではイメージングを行う必要があるため、侵襲を伴うと同時に、反応した神経細胞を全脳レベルで網羅的に解析することは困難である(参考文献1)。一方、最初期遺伝子であるc-fosなどを指標に活動した神経細胞を探し出すc-fosマッピングなどの方法も存在するが、これらはさまざまな刺激にตอบสนองすることから、真に神経活動に依存して活性化した神経細胞を網羅的に探し出す方法としては不十分と考えられる。そこで本研究では、現在発展しつつある合成生物学的な手法を用いて、ニューロンの活性化をニューロン自身が感知する新しい方法の開発を行い、全脳レベルで活性化した神経細胞を炙り出せる方法の基盤とすることを目的とした研究を行った。これらが開発されれば、光スイッチなどの特定の刺激による遺伝子誘導と組み合わせることにより(参考文献2)、特定の時間内に活性化した神経細胞を全脳レベルで網羅的に同定できる可能性が考えられる。

2. 方法

神経細胞の活動によって、ニューロン内のカルシウム濃度が上昇し、カルシウム依存的なプロテアーゼが活性化する(参考文献3)。そこで、このプロテアーゼの活性化によって、核外移行シグナルが分離し、遺伝子の転写活性が増大する人工蛋白質を設計した。具体的には、核外移行シグナル、プロテアーゼ感受性配列、TetRのDNA結合ドメイン、さらに転写活性化ドメインからなる人工蛋白質を設計し、これらを遺伝子合成と分子生物学的な実験手法を組み合わせで作成した。そして、これらが培養細胞において、実際にカルシウム、さらにカルパイン活性に依存して遺伝子発現を誘導するのかを以下に示す実験により検証した。

【遺伝子作成】

人工遺伝子に使用した蛋白質ドメインは哺乳類細胞におけるコドン使用頻度をもとに最適化して合成した。その後、適切な制限サイトがない蛋白質ドメインをコードする遺伝子には、PCRにて制限酵素サイトを導入し、各蛋白質ドメインを遺伝子のデザインのもとにつなぎ合わせてひとつの遺伝子とした。遺伝子の人工合成はGenescript社にて行った。人工遺伝子はN末側にコザック配列、C

末側にペスト配列を付加させた上、哺乳類細胞における遺伝子発現用ベクターであるpcDNA3.1vectorに導入した。Elucをレポーターとして搭載するプラスミドは産業技術総合研究所の中島芳浩研究員より供与頂き、これをもとに作成した。EGFPをレポーターとして搭載するプラスミドはpEGFP-C1をもとに作成した。2つのレポータープラスミドは内在するプロモーターを取り除いた上、TetRの結合配列(tetO配列)を複数持つ遺伝子をプロモーター部位として導入した。なお、ElucはC末にペスト配列を追加したものを使用した。

【トランスフェクション】

BHK細胞を96wellプレート、または3.5mmディッシュに培養し、その翌日に作成した人工遺伝子の発現ベクターをEGFPの蛍光やEluc(Emerald Luc Luciferase:ブラジル産ヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼ)をレポーターとするレポータープラスミドとともにLipofectamine2000によってトランスフェクションした。

【発現解析】

レポーターであるEGFPの蛍光は、Carl Zeiss製のコンフォーカル顕微鏡(LSM700)により観察した。また、Elucの発現は、100mMルシフェリンを含む培地で細胞を培養し、コロナ社製の発光プレートリーダー(SH-9000)、およびATTO社の発光リアルタイム測定装置(Kronosシリーズ)を用いて解析した。

3. 結果 研究成果

人工遺伝子(CaTF)がカルパイン活性依存的に、レポーター遺伝子の発現を誘導するかを調べるために、CaTFを挿入した発現ベクターとtetO-Elucレポータープラスミドを共にBHK細胞へ導入した。その結果、tetO-Elucレポーター単独を空の発現ベクターと共にトランスフェクションした場合に比べて、約2.5倍の発光が確認された。この結果は、CaTFの発現によって、レポーター遺伝子の発現が誘導されていることを示している。細胞内のカルパインは常にバックグラウンドレベルでの活性を持つことが知られているので、次にカルパイン特異的阻害剤であるinhibitor IIIの作用を検討した。その結果、CaTFの発現によって増加した発光分がinhibitor IIIの処理により、完全に阻害されることが確認された。この結果は、CaTFによるレポーター遺伝子の発現は、カルパイン活性に依存して行われることが明らかになった。さらに細胞内カルシウムのキレーターであるBAPTA-AMを処理した場合にも、CaTFによって誘導されるレポーター遺伝子の発現が著しく阻害された。これらの結果から、CaTFは、カルシウム、さらにカルシウムによって活性化されたカルパインの活性依存的にレポーター遺伝子を発現させる活性を持つことが確認された。さらに、ドキシサイクリンを用いてTetRの核移行を阻害することによっても、CaTFによるレポーター遺伝子の発現増加を抑制できたことから、CaTFの核移行の過程がレポーター遺伝子の発現誘導を実際に制御していることが確認できた。加えて、CaTFによる細胞内カルシウム活性依存的なレポーター遺伝子の発現は、Elucだけではなく、EGFPをレポーターとして使用した場合にも確認できた。この結果から、CaTFが複数のレポーター系と接続可能であること、そして、発光蛋白質をレポーターとして個々の細胞における細胞内カルシウムの上昇を検出可能であることが確認できた。

次に、CaTFの安定性を確認するために、ElucをレポーターとしたCaTFの継時的な活性測定を行った。カルパイン活性をinhibitor IIIで阻害した場合との比を比べたところ、トランスフェクション1日後から4日後までの間、CaTFは阻害剤作用群に対して約4倍のレポーター発現を安定的に誘導することが明らかになった。最後に、細胞内カルシウムの上昇を誘導する作用があることが知られて

いるEGFを用いることによって、生理的条件下において、実際にCaTFが細胞内カルシウム活性をモニタリングできるかを調べた。その結果、EGF処理によって、レポーターであるEGFPの発現が約2倍に増加することが確認された。さらにこの上昇はinhibitor IIIによって完全に抑制されたため、EGFが細胞内カルシウム上昇を誘導し、これがカルパイン活性を通じてCaTFに作用し、その結果、レポーター遺伝子が発現されたことが確認できた。

これらの結果から、CaTFが細胞内カルシウムの活性をレポーターに伝達できる人工蛋白質として、少なくとも株化培養細胞では機能することが確認できた。

4. 考察 まとめ

以上の実験の結果、今回作成したCaTFが、細胞内カルシウム、またそれに伴ったカルパイン活性依存的にレポーター遺伝子を発現させることを確認した。しかし、バックグラウンドに対するシグナルの強度は強くないため、神経細胞の活性化をin vivoでモニタリング可能にするためには、CaTFのシグナル伝達効率を今後、より改善する必要がある。特に、カルパインの基質となる蛋白質配列の最適化や蛋白質ドメイン間のリンカーの長さの調整、さらにレポーター遺伝子の改変などが必要になると考えられる。また、今回の研究ではCaTFの機能解析を株化細胞で行っていることから、今後は実際の神経細胞を用いて、CaTFが神経活動依存的にレポーター遺伝子を誘導することを確認する必要がある。

5. 発表論文、参考文献

- 文献1 Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice. Chen Q, Cichon J, Wang W, Qiu L, Lee SJ, Campbell NR, Destefino N, Goard MJ, Fu Z, Yasuda R, Looger LL, Arenkiel BR, Gan WB, Feng G. *Neuron*. 2012 Oct 18;76(2):297–308.
- 文献2 Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. Wang X, Chen X, Yang Y. *Nat Methods*. 2012 Feb 12;9(3):266–9.
- 文献3 Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance energy transfer. Vanderklish PW, Krushel LA, Holst BH, Gally JA, Crossin KL, Edelman GM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 29;97(5):2253–8.