

遺伝子の戦いを脳内で実現することに成功

ウイルス v.s.細胞より小さなスケールでの戦いを利用する技術を開発

【本件のポイント】

- 目的に応じた遺伝子の反発・分離・導入を可能に
- シナプスの全体像を光学的、かつ高精細に可視化
- オンデマンド型遺伝子治療開発と神経難病の解明に可能性

学校法人関西医科大学（大阪府枚方市 理事長・山下敏夫、学長・友田幸一、以下「本学」）附属生命医学研究所（所長・木梨達雄）細胞機能部門小原圭吾講師（部門長）は、学校法人大阪滋慶学園（大阪府淀川区 理事長・浮舟邦彦）大阪ハイテクノロジー専門学校（同市淀川区 学校長・近藤雅臣）と本学医学部医化学講座（教授・清水（小林）拓也）、同解剖学講座（教授・北田容章）、国立大学法人群馬大学（群馬県前橋市・大学長 平塚浩士）との共同研究で、遺伝子の戦いをマウスの脳内で実現。その関連新技術を開発し、「BATTLE」と命名しました（詳細は別添資料をご参照ください）。

小原講師らの研究チームは、遺伝子組み換え酵素 Cre リコンビナーゼ^{*1}と FLP リコンビナーゼ^{*2}を遺伝学的に改造することで、“遺伝子の戦い”をマウスの脳内海馬領域において人工的に起こすことに成功しました。これは、ウイルスと細胞の戦いよりさらに小さなスケール（数ナノから数十ナノメートルほど）の戦いです。さらに、人為的に起こした遺伝子の戦いを巧妙に利用した遺伝子反発分離導入^{*3}技術群を開発し、「BATTLE」と命名。そのうちの「BATTLE-1」は、従来型のウイルスによる遺伝子導入技術にあった複数の技術的障壁を克服し、自由度の高い反発分離導入性を実現しています。この結果、今よりもさらに柔軟なオンデマンド型遺伝子治療開発が期待されます。

さらに同チームは、「BATTLE-1」技術をさらに発展させて、脳神経回路接合部であるシナプスの全体像を光学的、かつ高精細に可視化する技術「BATTLE-1EX」の新規開発にも成功しました。アルツハイマー病やパーキンソン病など多くの精神疾患はシナプスに異常が発生していることが知られており、「BATTLE-1EX」技術を用いることで将来的には、精神疾患のメカニズム解明および創薬研究が進展するものと期待されます。

なお、本研究成果は米国科学雑誌「iScience」（Cell Press 社刊）に6月7日（日）付で掲載されました。

【本件取材についてのお問合せ】

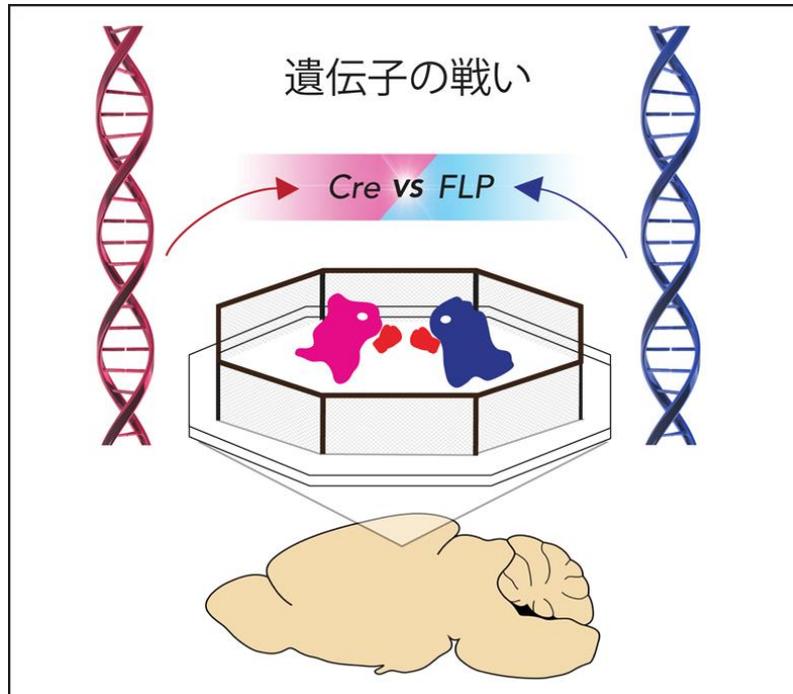
学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

■書誌情報

掲 載 誌	iSCIENCE (ISCIENCE-D-19-01052R2) DOI: https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101248
論文タイトル	BATTLE: Genetically engineered strategies for split-tunable allocation of multiple transgenes in the nervous system
筆 者	Keigo Kohara ^{1,9,10,*} , Akitoshi Inoue ^{2,9} , Yousuke Nakano ³ , Hirokazu Hirai ^{4,5} , Takuya Kobayashi ^{2,6} , Masato Maruyama ^{3,7} , Ryosuke Baba ¹ , and Chiho Kawashima ^{1,8} 1, Department of Cellular and Functional Biology, Institute of Biomedical Science, Kansai Medical University, Hirakata 573-1010, Japan. 2, Department of Medical Chemistry, Kansai Medical University, Graduate School of Medicine, Hirakata 573-1010, Japan. 3, Department of Anatomy, Kansai Medical University, Graduate School of Medicine, Hirakata 573-1010, Japan. 4, Department of Neurophysiology and Neural Repair, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi 371-8511, Japan. 5, Research Program for Neural Signalling, Division of Endocrinology, Metabolism and Signal Research, Gunma University Initiative for Advanced Research, Maebashi 371-8512, 20 Japan. 6, Japan Agency for Medical Research and Development (AMED), Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), 2-5-1 Shinmachi, Hirakata, Osaka 573-1010, 2 Japan. 7, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Densitry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan. 8, Department of Bioscience, Osaka College of High Technology, Osaka 532-003, Japan.



マウス脳内に実現された遺伝子の戦い

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室 (岡田)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

別添資料

<本研究の背景>

■遺伝子の戦い

自然界において、動物同士やウイルスと細胞の間で戦いが起こるのに対して、それらよりもっと小さなスケールである遺伝子の戦いは、これまで主に文献上においてその概念が論じられていました。

複数の遺伝子が生体内で互いに戦い

合うという状態を、人工的に起こした研究報告はこれまでほとんどありません。

また、本研究で用いられる遺伝子組み換え酵素（遺伝子の一種）である Cre リコンビナーゼ（Cre）や FLP リコンビナーゼ（FLP）は、標的遺伝子を欠失させることで機能を調べる手法、遺伝子ノックアウト技術^{*4}（2007年ノーベル生理学・医学賞受賞）において広く用いられてきました。反面、これまで Cre と FLP を並列的に用いた研究の報告はありましたが、Cre と FLP をお互いに戦い合わせた研究はありません。

■遺伝子導入技術

一方、脳神経科学を含む現代の生命科学において、遺伝子導入技術は極めて重要な基盤技術の一つであり、「ライフサイエンス技術の扇の要」であるといえます。

トランスジェニック技術^{*5}、in utero electroporation 技術^{*6}などを含む、数ある遺伝子導入技術のなかでもウイルスを用いた遺伝子導入技術は、「適用動物種が霊長類を含めて、極めて広範」、「作製・維持コストが低い」、「作製時間が短い」、「高度な手技を必要としない」、「既に作製された数多くの既存ウイルスが簡単に入手可能」「将来的な臨床応用の可能性」といった強力な長所・特徴を多く持つことが知られています。しかし、ウイルスを用いた遺伝子導入技術には、「自在性」の点において以下の3つの技術的障壁が立ちはだかっています。

1. 複数の遺伝子を近傍領域にある別々の細胞に個別に導入することが困難
2. 複数遺伝子の導入比率を簡単にチューニングすることが困難
3. 複数の遺伝子をまばらに分離して別々の神経細胞に導入することが困難

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

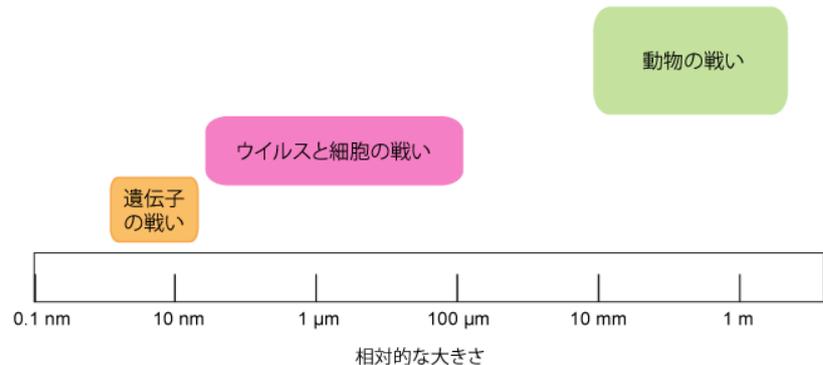


図1 戦いの相対的な大きさ

■光によるシナプス全体の形態の可視化技術

ところで、脳は数百億の神経細胞から構成され、その神経細胞同士がシナプスという接合部を介して連結しています。これを「脳神経ネットワーク」といい、その神経活動が認知、記憶、学習、行動、感動、社会活動などの日常生活に欠かせない機能を担っています。

他方、多くの精神・神経疾患においてシナプスの形態に異常が発生していることが知られています。また、シナプス前・後部を含むシナプス全体の形態観察には電子顕微鏡が主に用いられてきましたが、標本作成に多くの時間（サンプルにもよるが予備実験も含めて通常数週間から～数ヶ月）がかかることや、多くの場合タンパク質の局在性を同時に調べるのが困難です。その上シナプスは複数の神経細胞の突起が連結した構造物であるため、光学顕微鏡を用いた従来型の技術では、シナプス前部と後部を区別して全体の形態を高精細に可視化することは難しいという現状がありました。

<本研究の概要>

研究チームは、遺伝子組み換え酵素である Cre リコンビナーゼと FLP リコンビナーゼの、それぞれの標的配列の遺伝子配置を改変し、Cre リコンビナーゼと FLP リコンビナーゼがお互いに戦い合うような遺伝学的な設計を行いました。そして、これらの新しく設計された戦略手法を「BATTLE-1」と命名。レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスを用いた「BATTLE-1」技術により、マウス脳海馬領域に黄色蛍光タンパク質 YFP^{*7} と赤色蛍光タンパク質 mCherry^{*8} の導入を行いました。その結果、従来型のウイルスを用いた遺伝子導入方法では、YFP と mCherry が多くの場合同じ細胞へ同時に導入されますが、「BATTLE-1」技術を用いた場合、ほとんどの場合で YFP と mCherry は反発分離して別々の細胞へ導入することに成功。さらに、あらかじめ Cre リコンビナーゼと

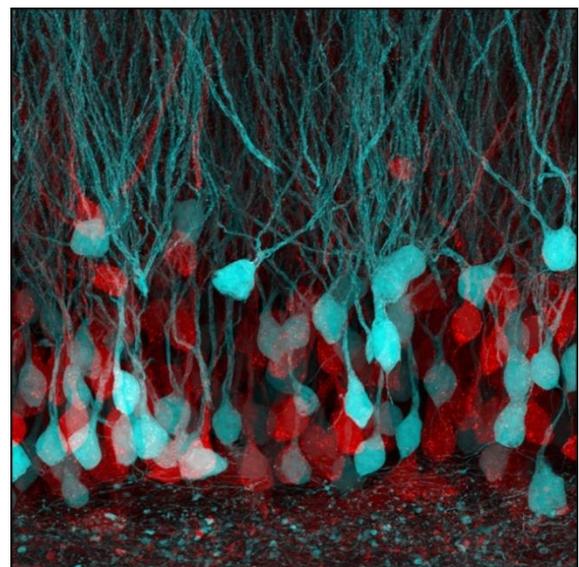


図2 BATTLE-1による遺伝子の反発分離導入
mCherry(赤)とYFP(シアン)で可視化された海馬歯状回神経細胞

FLP リコンビナーゼの比率を変えることで (Cre : FLP = 100 : 1)、YFP と mCherry の反発分離導入比率を容易に変えられることが判明しました。つまり、「BATTLE-1」技術によって複数の遺伝子の反発分離導入と、その比率を自在に変えうることが明らかになりました。

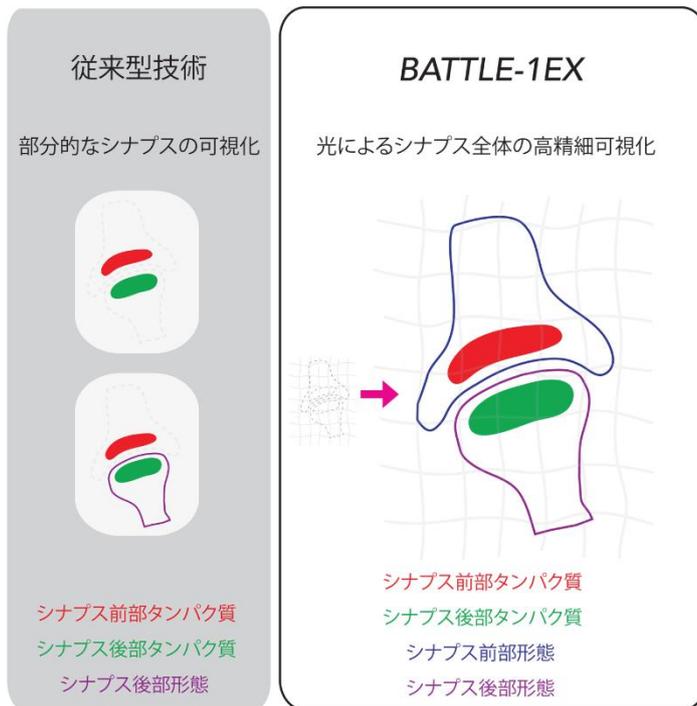
さらに研究チームは、「BATTLE-2」、「BATTLE-2.1」の開発に成功。「BATTLE-2」技術によって複数の遺伝子をまばらに導入することが可能となり、その結果従来困難だった近傍に位置する複数の神経細胞の、それぞれの樹状突起・軸索の形態を光学的に可視化することができるようになりました。また

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室 (岡田)

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp



「BATTLE-2.1」技術を用いることにより、3つの遺伝子の反発分離導入が可能となります。

加えて、「BATTLE-1」と従来の膨張顕微鏡とを組み合わせることで、複合技術「BATTLE-1EX」を開発。これにより、シナプス前部と後部の全体構造およびシナプス前部特異的タンパク質 Basson^{※9}、シナプス後部特異的タンパク質 Homer1^{※10}の局在を、光を用いて同時にかつ高精細に観察することが可能となりました。

図3 BATTLE-1EX 技術によるシナプス蛍光の特徴

<本研究の意義>

“遺伝子の戦い”という新しい戦略を元に開発された「BATTLE」技術は、多くの細胞が連結した多細胞生物である哺乳類の体組織において、隣り合った細胞が結合している様子を高精細に観察することや、光遺伝学などによるより精密な選択的操作を可能とするので、生命科学の進展に基盤的に貢献することが期待されます。「BATTLE-1」は、従来型のウイルスによる遺伝子導入技術が持つ複数の技術的障壁を克服でき、さらに柔軟なオンデマンド型の遺伝子治療技術開発にも可能性が広がります。また、多くの精神疾患はシナプスの形態に異常を伴っていることから、将来的にこの「BATTLE-1EX」技術を用いて、精神疾患のメカニズム解明や創薬研究の進展が加速されると考えられます。

<今後の展開>

「BATTLE」技術を用いれば、記憶中枢である海馬や脳全体の神経回路の機能および微細構造の詳細が明らかになることも夢ではありません。また小原講師らは、「BATTLE」技術をさらに進化させた「次世代 BATTLE」技術の開発を目指しています。なお、「BATTLE」技術は特許出願（特願 2019-238481、出願日 2019年12月27日）されており、今後機会があれば同技術の産業活用も志向していきたいと考えています。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

<研究チーム>

学校法人関西医科大学 附属生命医学研究所 細胞機能部門

講師：小原 圭吾（代表責任著者）

学校法人関西医科大学 医学部 医化学講座

助教：井上 明俊

国立大学法人群馬大学大学院 医学系研究科

基礎・基盤医学領域 脳神経再生医学分野

教授：平井 宏和

用語解説

1.Cre リコンビナーゼ

バクテリオファージ由来の遺伝子組み換え酵素。標的配列 loxP を認識して、loxP を挟みこむように配置された遺伝子を欠失させたり、反転させたりして、遺伝子組み換えを起こすことができる。

6

2.FLP リコンビナーゼ

出芽酵母由来の遺伝子組み換え酵素。標的配列 FRT を認識して、FRT を挟みこむように配置された遺伝子を欠失させたり、反転させたりして、遺伝子組み換えを起こすことができる。

3.遺伝子反発分離導入

生体組織において隣接する細胞群に複数の遺伝子を、個別に混ざらないように遺伝子を導入すること。

4.遺伝子ノックアウト技術

特定の遺伝子を選択的に欠失させることによって、その遺伝子の機能を調べる技術。

5.トランスジェニック技術

生物に遺伝子や RNA などを導入する技術。

6.in utero electroporation 技術

動物の子宮内の胎児に対して、子宮の外側を電極で挟むことで電気穿孔して、遺伝子を導入する技術

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp

PRESS RELEASE

7.緑色蛍光タンパク質 YFP

オワンクラゲ由来の黄色の蛍光タンパク質。

8.赤色蛍光タンパク質 mCherry

サンゴ由来の赤色蛍光タンパク質。

9.シナプス前部特異的タンパク質 Basson

シナプス前部の前終末に局在するタンパク質。シナプス前終末から、シナプス分泌顆粒に含まれる神経伝達物質が放出される。

10.シナプス後部特異的タンパク質 Homer1

シナプス後部に特異的に局在する代謝性グルタミン酸受容体に結合するタンパク質。シナプス後部の代表的な構造体としてスパインがある。

【本件取材についてのお問合せ】

学校法人 関西医科大学 広報戦略室（岡田）

〒573-1010 大阪府枚方市新町2-5-1

電話：072-804-2128 ファクス：072-804-2638 メール：kmuinfo@hirakata.kmu.ac.jp