

## 凍結切断レプリカ標識法とゲノム編集技術を組合せた高感度膜分子局在解析法の確立と応用

研究代表者： 黒田 一樹 (医学部・准教授)

共同研究者： 謝 敏カク (子どものこころの発達研究センター・助教)

概要	特異抗体の制作無しに種々の分子種を一定の感度で定量的に検出できる新規分子局在解析法の確立
	全ての生命現象の素過程は、生体分子の連続的な相互作用により担われ、しかも極めて限局された空間で起きている。従って、各生命現象の素過程を正確に理解するには、現象が起こる空間内の複数の関連分子種の分布を可視化して定量的に明らかにすることが重要である。生体分子の微細な局在解析には、特異抗体による電子顕微鏡レベルでの解析が行われるが、既存の手法には特異的抗体の作製において技術的な不確定要素が存在する。本研究では、この特異的抗体作製の不確定要素をゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9 法) により対象分子に免疫タグを導入することで解決し、特異抗体の制作無しに種々の分子種を一定の感度で定量的に検出できる新規分子局在解析法の確立を目指す。神経細胞における $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の局在をこの新規手法を用いて可視化し、本新規分子局在解析法の有用性を確認した。
関連キーワード	膜分子局在解析、ゲノム編集技術、免疫タグ、凍結切断レプリカ標識法

### 研究の背景および目的

受容体、イオンチャネルやポンプなどの膜分子は多種類のサブユニットで構成されたヘテロ複合体として発現し、そのサブユニット構成の多様性が細胞の応答やシグナル伝達の特異性を決める分子基盤の一つとして重要な役割を果たしている。静止膜電位の形成と維持に深く関わっている  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NAK ポンプ) は 3 種類のサブユニット (NAK  $\alpha/\beta/\gamma$ ) から構成され、各サブユニットには複数のアイソフォームが同定されている。神経細胞では NAK  $\alpha 1$  と  $\alpha 3$  が発現しているが、その発現比や神経細胞種毎の違い、更には NAK  $\beta/\gamma$  サブユニットのアイソフォームとの対応関係など、

未解明な点が多く、NAK のサブユニット構成の違いと神経機能との関わりは不明なままである。これは、免疫組織学的解析に利用可能なアイソフォーム特異的な抗体を作製することが困難であることが原因の一つである。そこで我々は、遺伝子編集技術 (CRISPR/Cas9 法) を用いて標的分子の任意の部位に免疫タグを挿入し、NAK  $\alpha 3$  を含む NAK ポンプの神経細胞膜上の分布を定量的に解析する技術基盤の確立を目指す。

### 研究の内容および成果

1) ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いて FLAG-NAK  $\alpha 3$  サブユニットを発現するマウスの作成を行った。① NAK  $\alpha 3$  のエクソン 1 (開始 Met) を含む領域を効率よく切断する標的配列を HEK293T 細胞と pEGxxFP ベクターを組み合わせる方法で検索を行った。② 決定した標的配列を含む crRNA を合成し、tracrRNA と Cas9 タンパク質を混合し、*in vitro* アッセイ法で標的 DNA の切断効率を確認した。③ ライフサイエンス支援センター・生物資源部門の協力を得て、FLAG 配列を含む NAK  $\alpha 3$  のエクソン 1 を含む 200bp の合成一本鎖 DNA と crRNA/tracrRNA/Cas9 タンパク質の複合体をマウスの受精卵に注入し、疑似妊娠マウスの子宮に受精卵を移植することにより FLAG-NAK  $\alpha 3$  マウス

の作成を行った。

2) NAK  $\alpha 3$  の N 末端に FLAG タグが導入されたマウスを PCR 法により選別し、FLAG-NAK  $\alpha 3$  タンパク質の神経細胞における発現を生化学及び免疫組織学的解析により確認を行った。① ウェスタンブロット解析において FLAG タグが導入されたマウスで約 100kDa の FLAG-NAK  $\alpha 3$  タンパク質が脳及び小脳で発現していた。② 還流固定を行った脳及び小脳から凍結切片を作成し、抗 FLAG タグ抗体で染色を行ったところ、海馬の CA1 錐体神経細胞や小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞において FLAG-NAK  $\alpha 3$  タンパク質の発現を確認した。一般的に発売されている抗 NAK  $\alpha 3$  抗体と比較して、抗

FLAG抗体により非常に明確にNAK $\alpha$ 3の発現を免疫組織学的に解析することが出来た。

3)凍結切断レプリカ標識法 (SDS-FRL 法) により大脳の海馬 (CA1 と歯状回を含む) と小脳の神経細胞の細胞膜上に発現する FLAG-NAK $\alpha$ 3 タンパク質の検出を行った。①*in situ*ハイブリダイゼーションの結果と同じく、FLAG-NAK $\alpha$ 3 は海馬 CA1 の錐体神経細胞、歯状回の顆粒細胞や小脳のプルキンエ細胞で発現が認められた。得られたシグナルの特異性に関しては、海馬 CA1 錐体神経細胞で NAK $\alpha$ 3 タンパク質のシグナルが検出され、GLAST 陽性のグリア細胞では検出されず (図 1)、*in situ*ハイブリダイゼーションの結果と一致した。また FLAG タグが NAK $\alpha$ 3 の細胞内領域に位置するので、SDS-FRL 膜の P-face 側のみで検出されていることも確認している (図 1)。②FLAG-NAK $\alpha$ 3 タンパク質の検出効率は KI ヘテロマウス (KI/+) と比較して KI ホモマウス (KI/KI) で増加していることをも確認している。

以上の結果より、SDS-FRL 法と免疫タグノックインを組み合わせた本法は細胞膜上の複合体タンパ

ク質の局在解析に有用であることが示され、今後定量解析を行って神経細胞における NAK $\alpha$ 3 サブユニットを含む NAK ポンプの局在を詳細に解析する。

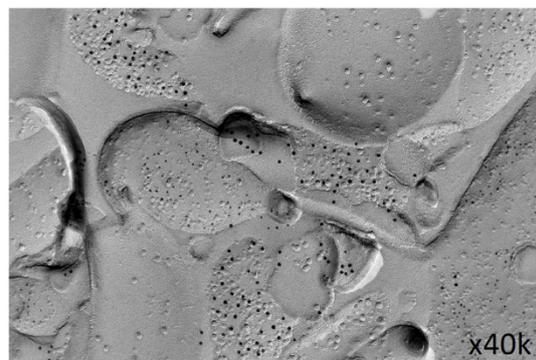


図 1. SDS-FRL 法による海馬 CA1 錐体神経細胞に発現する FLAG-NAK $\alpha$ 3 の検出：5nm の金標識は FLAG-NAK $\alpha$ 3 を 12nm の金標識はグリア細胞に発現する GLAST を示している。5nm の金標識は海馬 CA1 錐体神経細胞の樹状突起とスパインの P-face 側に認められた。

## 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

「凍結切断レプリカ標識法と免疫タグノックインを組み合わせた神経細胞における Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 3 の定量的膜状分布解析」、黒田一樹、石川達也、村田航志、深澤有吾、第 124 回日本解剖学会総会全国学樹集会、ポスター発表

### 「特記事項」

特に無し

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

日本学術振興会、科学研究費助成事業、基盤研究 C、平成 31 年度-平成 33 年度、「グルタミン酸受容体の 1 分子内サブユニット構成の同定と細胞膜上局在の解明」、申請中