

氏 名 Luo, Wenshu(罗 雯姝)

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1803 号

学位授与の日付 平成27年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Development of single-cell analysis systems for discerning
neural circuits in the mammalian brain

論文審査委員 主 査 教授 相賀 裕美子
教授 荒木 弘之
教授 平田 たつみ
准教授 鈴木 えみ子
教授 平田 普三 青山学院大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

The assembly of neural circuits that is responsible for higher brain function relies on tightly interconnected neurons, which are diverse in molecular, morphological, physiological and functional properties. Approaches for imaging isolated single neurons would help researchers to characterize the complex organization of neural circuits in the mammalian brain. For this purpose, the Supernova system was developed (Mizuno, Luo et al., 2014). This system consists of two vectors: tetracycline response element (TRE)-Cre and CAG-loxP-STOP-loxP-RFP-ires-tTA-WPRE. In the cells transfected with the Supernova vector set, leakage of TRE drives the weak expression of Cre and, subsequently, RFP and tTA in a very small population of cells. Then only in these cells, the expression of RFP was facilitated by the positive feedback of the tTA-TRE cycles. I evaluated sparseness and brightness of the Supernova-mediated labeling. I quantitatively examined the sparseness of the Supernova labeling and showed that Supernova vectors introduced by in utero electroporation labeled less than 10% of transfected neurons in the cortex at postnatal day 16. I also revealed that more than half of Supernova-labeled neurons exhibited high intensity of neuronal labeling, by which I could clearly observe the whole dendritic morphologies.

In the subsequent studies, I refined and expanded the Supernova system in several aspects. First, I developed the Flpe/FRT-based Supernova system, which consists of TRE-Flpe and CAG-FRT-STOP-FRT-RFP-ires-tTA-WPRE. By comparing the Flpe/FRT-based and original Cre/loxP-based Supernova systems in cortical neurons transfected, I found that the Flpe/FRT-based system shows much more excellent properties in sparseness and brightness than the Cre/loxP-based one. Importantly, the Flpe/FRT-based system achieved neuronal labeling with essentially no background (few darkly labeled neurons). By taking advantage of these features, I was able to image the whole cellular morphology of a single callosal projection neuron in the intact young adult mouse brain. In addition to the Flpe/FRT-based

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

Supernova system, I constructed a Dre/Rox-based Supernova system. I showed that both of these two systems could be used for neuronal labeling even in Cre expressing transgenic mice. Second, I developed an adeno-associated virus (AAV)-based Supernova system and successfully used it to visualize isolated single hippocampal CA1 pyramidal neurons. This system makes the Supernova labeling even more flexible to use than the in utero electroporation-based system, because the AAV-based system has no brain region limitation and is suitable for labeling in cells in elder mice.

The original Cre/loxP-based Supernova system was designed to enable labeled-cell-specific gene knockout when it is combined with floxed mouse lines, in which the essential region of each of target genes was flanked by two loxP sites. To evaluate the efficiency, I transfected the Cre/loxP-based Supernova vectors into hippocampal CA1 neurons in $\alpha 2$ -Chimaerin ($\alpha 2$ -Chn) flox/flox mice by in utero electroporation. I found that almost all of Supernova-labeled neurons showed a deletion of $\alpha 2$ -Chn protein expression and this deletion was observed only in Supernova-labeled neurons. These results indicate the high-efficiency of the Supernova system for labeled-cell-specific knockout of endogenous genes.

In order to save time and efforts for generating floxed mice, methods that can manipulate target gene expression in individual cells in wild-type mice would be required. For the purpose, I combined the RNA interference technique with the Supernova system. By electroporation of constructed Supernova-mediated expression vectors carrying shRNA against target genes, I efficiently reduced the expression level of reporter genes in sparsely labeled cortical neurons in two lines of Cre-reporter mice. Moreover, I also adapted target transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-based genome editing technology to Supernova system and successfully inhibited the expression of an endogenous gene, $\alpha 2$ -Chn, in wild-type hippocampal CA1 pyramidal neurons. To my knowledge, this is the first report for manipulation of an endogenous gene in isolated individual cells in wild-type individuals.

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

In summary, the original and improved Supernova systems are general methods to label a sparse population of cells with high fluorescent intensity and essentially little background, and enables simultaneous gene manipulation in these labeled cells. Thus, Supernova system is a promising tool to elucidate the cellular and molecular mechanisms underlying neural circuit development and function at single cell level.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

哺乳類脳の高次機能は性質の異なった多くの神経細胞の緊密な相互作用によって形成される神経ネットワークに依存している。このように複雑な脳の構造を正確に理解するためには、単一の神経細胞をラベルして解析する技術開発が求められる。このために、Luoさんの所属する研究室では、Supernova systemという、単一細胞ラベル系を開発した。Luoさんは初代のベクター系の開発にも貢献したが、博士課程のテーマとして、この系をさらに改良し、単に細胞をラベルするのみならず、その細胞における遺伝子発現を操作することを可能にするベクター開発を目指し、研究を行った。

このSupernova系は、基本的に2つのベクターによって構成される。1つはテトラサイクリン感受性のプロモーターの下流にCreリコンビナーゼを発現するベクター(*TRE-Cre*)で、もう1つがCreリコンビナーゼによる組み換え依存的に、蛍光タンパク質RFPとtTA(テトラサイクリンプロモーター活性化因子)を発現するベクター(*LSL-RFP-tTA*)である。このベクター系のトリックは、tTA非存在下でもわずかに発現するCreリコンビナーゼが、非常に低い確率でもう一つのベクターのloxP配列を偶発的に組換えることに起因する。ひとたび、組換えが誘導された細胞では、tTAが発現し、その結果Creリコンビナーゼのさらなる強力な発現が誘導される。このCreの誘導は、細胞内に複数コピー含まれるレポーターベクター(*LSL-RFP-tTA*)のさらなる組換えを引き起こし、ひいてはRFPの発現を増幅する。結果として、両ベクターが導入された細胞のうち極一部のみがRFPにより明瞭に標識され、単一細胞由来の樹状突起の数や、その形状が解析可能になった。またLuoさんは、Creリコンビナーゼの代わりにFlpリコンビナーゼを用いたベクター(*FSF-RFP-tTA*)を開発して、その有効性を検討した。その結果、Creリコンビナーゼで観察されたバックグラウンドが解消され、より明瞭なシグナルが検出できることを発見した。またこの遺伝子導入は、主に胎児期の脳にエレクトロポレーション(電気穿孔法)を用いておこなっていたが、アデノ随伴ウイルス(AAV)系を用いることにより、胎児期のみならず、また他の組織への導入が可能になった。さらに彼女は、単一細胞における遺伝子ノックダウンを可能にするため、shRNAを発現するベクターを構築し、その有効性を証明した。さらに、遺伝子を完全にノックアウトするために、TALENによる遺伝子破壊を検討した。この際には、計4種類のベクター(*TRE-Flp*, *FSF-RFP-tTA*, *FSF-TALEN left*, *FSF-TALEN right*)を導入することになるが、モデル系としてマウス $\alpha 2$ -chimaerin遺伝子に対するTALENベクターを導入し、RFPでラベルされた細胞でのみ $\alpha 2$ -chimaerin遺伝子の発現が失われていることを証明した。

以上、Luoさんは、Supernova systemの改良と開発により、単一の細胞のラベルとその細胞における遺伝子発現操作やゲノム編集を可能にするベクター系を確立しその有効性を実験的に証明した。今後、この系を用いて神経回路の単一細胞レベルの解析が実現すると共に、この系は、マウスのみならず多くの動物に、また脳神経系のみならず、他の組織への応用も可能であり、Luoさんの研究成果は今後の多くの研究に貢献すると評価され、学位取得の条件をみたすと、審査委員全員で判断した。