様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月 １１ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１９３７７

研究課題名（和文）光による核内シグナル制御法の開発と記憶を人為的に書き込む操作への応用

研究課題名（英文）Generation of photoactivatable transcription molecules to control memory formation

研究代表者

実吉　岳郎（Saneyoshi, Takeo）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：００５５６２０１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現調節が核で起こる事を利用して、まず、共通部分として光活性化核移行シグナルの作製に成功した。このモジュールとの融合CREBやCaMKIVは光依存の核内局在を達成できた。ところが、細胞質にあるべき光活性化型CREBの核へのリークによりベーサルな転写活性が問題となった。培養細胞レベルでは発現量をコントロールできれば、光により転写活性制御を達成できる。
一方、マウス個体を用いたウイルスベクターによりタンパク質発現系の構築を行った。外来タンパク質の発現には血液脳関門を通過するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた。眼窩後へのウイルス液注入によりマウス海馬でのタンパク質の海馬での発現を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の光活性化型核内移行シグナルを利用すれば理論的にはどんなタンパク質でも光で核へ局在化できるため、構築にかかる試行錯誤を最小限にできる。この方法論により様々な核内シグナルを人為的に操作でき、新しい転写や染色体制御の発見につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：To control memory formation and its recall, it is important to have tools to manipulate gene expression for memory. We succeeded to generate a photo-inducible module, which allows any protein can be transformed into light-dependent nuclear localized protein. So far, we generated photoactivatable CREB and CaMKIV using the photo-inducible module. Although these photoactivatable molecules behaved as light-dependent nuclear localization, they showed a basal transcriptional activity without light. Because it might be due to leaky localization of overexpressed proteins in nucleus, we needed to reduce expression level by screening promoters or drug-mediated gene expression systems such as the TET-on/off.
We have established a method by which an AAV viral vector-mediated transducing protein into brain tissue through intravenous injection. Using this method, we could manipulate transcription by light after screening the promoter system to control expression for the photoactivatable proteins.

研究分野：記憶学習

キーワード：遺伝子発現制御　記憶　シナプス可塑性

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

## １．研究開始当初の背景

遺伝子発現は、生命活動を継続させるために必須であるため、厳密にコントロールされている。申請者は、初期発生時の体軸形成時にはカルモデュリン依存的脱リン酸化酵素カルシニューリンを介した転写因子 NFAT の活性化が腹側シグナルとして機能すること（Nature 2002）や、神経活動依存的な樹状突起形成にはカルモデュリン依存的リン酸化酵素を介した転写因子 CREB による新規遺伝子産物が関わること（Neuron 2006)、さらにシナプス可塑性に関して LTP 刺激に応じたシナプス構造拡大は、スパインの形態変化とは別に新規タンパク質合成依存的にシナプス後肥厚（PSD）の構造が大きくなること（Neuron 2014）を明らかにしており、神経活動による遺伝子発現制御と細胞やシナプスを形作る仕組みについて研究してきた。現在はこれまでの細胞レベルの研究を個体レベルへと展開し始めている。

記憶の分子メカニズムの理解が十分に進めば、シナプスや細胞でわかったことを統合して個体で記憶を作り出せるはずである。現状はまだ難しいが、「記憶の書き込みと呼び出しの操作」の方法論を思案していた中で、以下のことを思いついた：１　特定の神経細胞に転写因子 CREB を利用して記憶を書き込むことができる（Han et al., 2009)。つまり必要なタイミングでの CREB 活性の操作により任意の記憶を書き込むことができる可能性、２　光遺伝学の適用で記憶の呼び出しが人為的に操作可能であること(Roy et al., 2016)、さらにこの２つを組み合わせれば光で記憶の書き込みと呼び出しが操作可能になるのではないかと思いついた。その実現のため、核内シグナリングの光操作技術の開発、特に光活性化型 CREB が必要不可欠である。

## ２．研究の目的

光は幅広く生物学的な実験に広く使われている。その理由として、組織への侵襲がほぼ無視できるため生体に使える事、時空間分解能が高い事、組織に適度な吸光が有る事、また何よりも、空間的な情報が得やすい点などが上げられる。光の特性を考えるに、光による細胞の制御の応用範囲は広い。ところが光を使って遺伝子の発現、さらには記憶を制御する技術は未だ不十分である。もし光依存的に遺伝子発現制御が可能となれば、様々な応用が可能であるが、汎用性のある方法は未だ見当たらない。本研究ではこれを解決し、<u>光依存的な遺伝子発現制御法の開発とその応用としての人為的な記憶の書き込み、読み込みを可能にする方法論の確立を目的</u>とする。

## ３．研究の方法

特にここでは *Avena sativa* phototropin 由来の LOV2 ドメインに着目する。LOV2 は、青色光照射により立体構造変化をもたらす。光照射を止めると、この過程は、数秒から数分以内に自発的に逆転する。この構造変化を利用して、光活性化可能なタンパク質が開発されてきた。しかし、僅小な構造変化に依存するため、融合しているタンパク質がすべてに適用可能な方法はなく、機能するものを得るために何百もの構築を試す必要がある。これを最小限にするために、遺伝子発現調節が核で起こる事を利用して、まず、共通部分として光活性化核内移行シグナル（PA-NLS）を作製する。それができたら PA-NLS を遺伝子発現調節因子の機能的ドメインに融合させる。機能的ドメインは変異を入れ常時活性型にすることで、核へ移行したらすぐさま機能するようにする。

研究計画１　光活性化核内移行シグナルモジュールの作成

核外移行シグナル(NES)、LOV2 ドメイン、核内移行シグナル(NLS)、及び mCherry を融合させる事により、光活性化核移行シグナルの作成を試みる。NES、NLS の場所と種類を変えたものを幾つか作成する。すでに光活性化核移行シグナルの作成にはある程度のめどが付いている。転写制御因子 CREB と PA-NLS を融合した場合、光活性型で特異的に核への移行が認められた。これを CREB の恒常的活性型と融合させることにより PA-CREB 候補を得た。PA-CREB は暗黒下では細胞質ゾルにとどまり、光照射により核内に分布する。実際、PA-CREB は細胞内局在に応じた転写活性を示す。

研究計画２　光活性化核機能タンパク質の作成と機能解析

我々は既に PA-NLS を得ているため、このアプローチは、CREB だけでなく、他の転写因子、CREB の核内キナーゼである CaMKIV および Cre リコンビナーゼなどの様々な核タンパク質でも機能する筈である。そのため、これらのタンパク質と PA-NLS との融合タンパク質を作成する。その上で、それぞれのタンパク質の機能を解析していく。CREB ならびに CaMKIV に関しては、細胞株に CRE-レポーター構築を共導入し、光照射によりレポーター遺伝子が誘導されるかを検討する。もしバックが高ければ、光制御型ミトコンドリア局在タグの LOVTRAP 法（Wang et al., 2016）を適用し、光での細胞内局在制御を厳密化することで対処する。

研究計画３　光活性化核機能タンパク質の神経細胞での利用

作成された光活性化核機能タンパク質が神経細胞で実際に機能するかをテストする。この目的のために、光活性化タンパク質がシナプス可塑性の一つである長期増強現象(LTP)を増強し得るか試験する。培養海馬スライスに光活性化タンパク質を発現させ、光活性化し、LTP を測定する。これまで CREB や CaMKIV の過剰発現は LTP を亢進することが知られているため、光照射により LTP が増大することが期待される。

研究計画４　光活性化 CREB による記憶の貯蔵と想起

最後に PA-CREB による記憶の書き込み、想起の制御を試みる。記憶学習の行動レベルの評価法として恐怖文脈条件付け学習を行なう。PA-CREB と橙色光で活性化するチャネルロドプシン ReaChR（Lin et al., 2013）を海馬もしくは扁桃体に共発現させる。学習時に PA-CREB を 478 nm の光で活性化させ記憶を書き込む。その後任意のタイミングで文脈や条件提示によらず 617 nm の光を照射し ReaChR による神経細胞の活性化を起こし、恐怖記憶によるすくみ行動を誘発するか検討する。

## ４．研究成果

研究計画１　光活性化核内移行シグナルモジュールの作成　遺伝子発現調節が核で起こる事を利用して、まず、共通部分として光活性化核移行シグナル（PA-NLS）の作製に成功した。このモジュールを使って、融合タンパク質を作成すると転写因子 CREB も CREB kinase として知られる CaMKIV 共に核内局在を達成できることがわかった。

研究計画２　光活性化核機能タンパク質の作成と機能解析　計画１で作成した光依存的核内移行モジュールを用いた光活性化型 CREB は、光変異体を用いると光照射型変異で高い転写活性を示した。高い発現量だと転写活性が強く影響を受けることがわかった。これを改善するため、別の光依存的細胞内局在制御の方法である LOVTRAP（Wang et al., 2016）を光活性化型 CREB に追加した。LOVTRAP ではミトコンドリアへの局在が光依存的に解除され核内へ移行することを期待した。ところが、光照射だけでなく光照射変異でもミトコンドリア局在が解除されなかった。これは CREB のみならず CaMKIV でも同様

であった。問題は細胞質にあるべき光活性化型 CREB の核へのリークである。実際培養細胞レベルでは発現量をコントロールできれば、光により転写活性制御を達成できる。
研究計画３　光活性化核機能タンパク質の神経細胞での利用　計画２が未達成であるため、研究期間内に試すことはできなかった。
研究計画４　光活性化型 CREB による記憶の書き込みと呼び出し　マウス個体を用いたウイルスベクターによりタンパク質発現系の構築を行った。外来タンパク質の発現には血液脳関門を通過するアデノ随伴ウイルスベクター（Chan et al., 2017）を用いた。この実験系では、眼窩後へのウイルス液注入によりマウス海馬でのタンパク質の海馬での発現を確認できた。
今後の展開として、光活性化型 CREB の発現量をコントロールするプロモーター、TET などの薬物依存的発現系をマウス個体を用いて試み、適切な発現量を実現させ計画を遂行して行きたい。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

| １．著者名 | ４．巻 |
|---|---|
| Kojima Hiroto、Rosendale Morgane、Sugiyama Yui、Hayashi Mariko、Horiguchi Yoko、Yoshihara Toru、Ikegaya Yuji、Saneyoshi Takeo、Hayashi Yasunori | 166 |
| ２．論文標題 | ５．発行年 |
| The role of CaMKII-Tiam1 complex on learning and memory | 2019年 |
| ３．雑誌名 | ６．最初と最後の頁 |
| Neurobiology of Learning and Memory | 107070～107070 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） | 査読の有無 |
| 10.1016/j.nlm.2019.107070 | 有 |
| オープンアクセス | 国際共著 |
| オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | － |

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　3件）

| | |
|---|---|
| １．発表者名 | Takeo Saneyoshi, Yasunori Hayashi |
| ２．発表標題 | Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying persistence of structural LTP |
| ３．学会等名 | 第42回 日本神経科学大会（国際学会） |
| ４．発表年 | 2019年 |

| | |
|---|---|
| １．発表者名 | Takeo Saneyoshi, Yasunori Hayashi |
| ２．発表標題 | Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying persistence of structural LTP |
| ３．学会等名 | Current Trends and Future Directions of Synapse-Circuit Plasticity Research (JUSSCPR)（国際学会） |
| ４．発表年 | 2019年 |

| | |
|---|---|
| １．発表者名 | 實吉　岳郎 |
| ２．発表標題 | シナプス機能の増強を維持する記憶のメカニズム |
| ３．学会等名 | 「脳構築の時計と場」「スクラップビルド」「マルチスケール脳」合同若手シンポジウム |
| ４．発表年 | 2019年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>Takeo Saneyoshi |
| ２．発表標題<br>A regulatory mechanism of persistence of LTP and memory |
| ３．学会等名<br>UK-Japan Neuroscience Symposium（国際学会） |
| ４．発表年<br>2020年 |

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|