

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00519

研究課題名（和文）学習依存的に合成されるタンパク質の同定と記憶の長期化における動態の解明

研究課題名（英文）Translational regulation enhances distinction of cell types in the nervous system

研究代表者

谷本 拓 (Tanimoto, Hiromu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：70714955

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,800,000円

研究成果の概要（和文）：記憶の長期化には学習後のタンパク質合成が重要だが、翻訳されるべきタンパクが何であり、どの細胞でどのように機能するのは未だ明らかでない。本研究では、ショウジョウバエの匂い報酬記憶をモデルに、細胞種特異的なリボソームプロファイリング法を確立し、神経活動に依存して翻訳される候補タンパク質を網羅的に同定した。さらに比較トランスラトーム・トランスクリプトーム解析により、細胞種ごとに翻訳効率の差異を生み出すmRNA上の構造を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のシングルセルRNA-seq法の普及により、ショウジョウバエにおいても標的細胞のトランスクリプトーム解析が報告されてきた。一方で、トランスラトーム解析については発展の途上であり、その解像度は器官・組織レベルで留まっていた。本研究の高精度な翻訳活性測定とタンパク動態解析により、細胞種特異的な翻訳制御の実体が分子・細胞レベルで初めて明らかとなり、記憶の長期化における翻訳制御メカニズムの解明に向けて先駆的なモデルを確立した。

研究成果の概要（英文）：Multicellular organisms are composed of specialized cells with distinct proteomes. While recent advances in single-cell transcriptome analyses have revealed differential expression of mRNAs, cellular diversity in translational profiles remains to be understood. In this study, by performing RNA-seq and ribo-seq in genetically-defined cells in the *Drosophila* brain, we revealed substantial posttranscriptional regulations that augment the cell-type distinctions. Overall, these findings underscore the profound impact of translational regulation in shaping cell identity and provide new insights into the molecular mechanisms driving cell-type diversity.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

インパクトのある記憶情報は、我々の脳に生涯にわたって刻まれる。1963年、Flexnerらは、タンパク質翻訳阻害剤をマウスの海馬領域に注入することで、迷路課題における長期記憶の形成が阻害されることを報告した (Flexner, Science, 1963)。その後の研究で、学習後のタンパク質合成は記憶痕跡であるシナプスの可塑的変化の安定化に重要であること、その重要性は哺乳類だけでなく、鳥類、魚類、軟体動物、昆虫など様々な種で保存されることが明らかとなった (McGaugh, Science, 2000)。

これまでに学習依存的に mRNA 発現が変化する遺伝子の同定や、CREB といった遺伝子発現変化を制御する転写因子はさかんに解析されてきた。しかし、転写活性の変化は記憶の安定化の中でも最も後期のプロセスであり、既存の mRNA から新規タンパク合成を必要とする記憶の固定化初期とは区別されるべきである (例: Menzel, Nature Rev Neurosci, 2012)。アルツハイマー型認知症は最もよく見られる記憶障害の一つであるが、最初に影響を受けるのは近時記憶であり、新規タンパク合成を伴う記憶の保持時間とよく一致する。

ショウジョウバエの嗅覚連合学習では、特定の匂いを砂糖報酬あるいは電気ショック罰と共に提示することで匂いに対して相反する行動を発現する。特に砂糖報酬の記憶は、わずか1分間の対提示により新規タンパク合成が必要とされる長期記憶が形成されることが報告されている (Krashes, J Neuroscience, 2008)。連合記憶の形成は、報酬あるいは罰情報と匂い刺激からの神経入力がキノコ体と呼ばれる脳構造で出力を修飾することと捉えることができる。つまりこのキノコ体の細胞で、学習依存的に翻訳されるタンパクの機能により記憶が長期化されると考えられる。ショウジョウバエ頭部の細胞が約15万個であるのに対し、キノコ体は約5,000個の神経細胞で構成されることを鑑みると、極めて局所的な事象であることが分かる。

学習依存的に合成されるタンパクを同定する上で、これまでのアプローチは状態依存的に変化するトランスクリプトーム解析が主流であった。しかし、長期記憶には、新規転写に依存しないが、タンパク質合成が必要な記憶要素が存在すること (Menzel, Nature Rev Neurosci, 2012) さらに翻訳の段階での活性調節がタンパク質の発現に重要であることが報告されている (Chen, PLOS Genet, 2017)。しかし神経刺激に応じて翻訳されるタンパク質が何であり、どのように機能することで可塑的変化を生じるかについての知見は未だ断片的なものに留まっている。多数の細胞種が複雑に配線される脳のような組織において、記憶痕跡の長期化に重要な因子は少数の標的細胞に保存されるため、選択的に新規合成タンパクを標識し、注目する細胞を特異的に可視化、操作する技術が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエの匂い報酬記憶をモデルに記憶の長期化を司る分子メカニズムを解明することを目指した。この目的のため、神経活動に依存して翻訳されるタンパク質を細胞・時期特異的にプロファイルし、候補タンパクを網羅的に同定する。さらに、内在性の標的タンパクの動態を細胞種特異的に可視化する遺伝学的技術を用いて、候補タンパクの神経活動依存的な動態変化を定量する。これにより、記憶の長期化に寄与する可能性のある実行分子を網羅的に探索する。

本研究のアプローチは、これまでの遺伝子転写産物に基づいた遺伝子同定と異なり、翻訳中のタンパク質を細胞種特異的に同定し、その動態を解析することに主眼を置く。また本研究では、過剰発現系によるアーティファクトを避けるため、ゲノム編集技術を用いて生体内における内在性のタンパクを直接標識する手法をとる。抗体染色など従来の方法では、多くの細胞種で発現しているタンパク動態の解析が困難であった。そのため、細胞種特異的に新規合成された内在性タンパクを蛍光標識する技術を応用し、一細胞レベルで標的因子の動態を明らかにする。

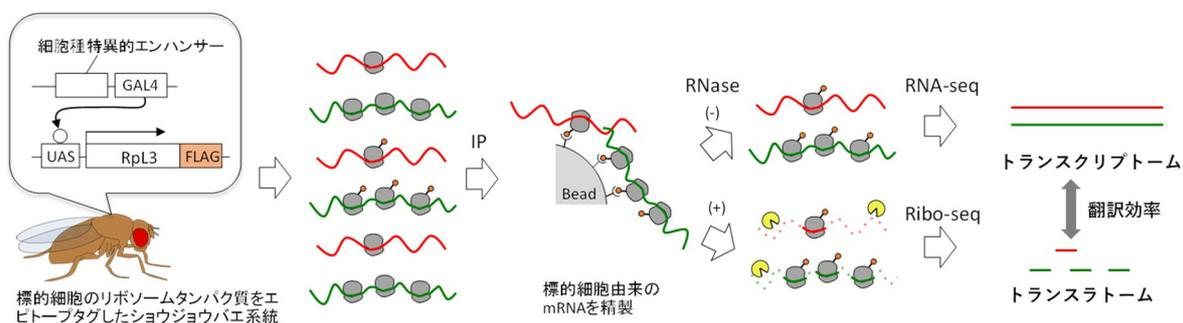


図1 細胞種特異的なリボソームプロファイリングの原理

3. 研究の方法

(1) 細胞種特異的なリボソームプロファイリング法の確立

リボソームプロファイリング (Ribo-seq) は、リボソームに結合した mRNA 領域が RNase からの分解を免れるという性質を利用し、その配列を次世代シーケンサーで決定することでリボソームの結合箇所を 1 コドン解像度で明らかにする手法である。ショウジョウバエ脳を構成する細胞から純度よく翻訳中の mRNA を精製するため、我々がこれまでに構築した頭部全細胞のうち~10%~2%という少数の標的細胞を操作できるドライバーリソースを用いて、細胞種特異的 Ribo-seq 法の実験条件を最適化する (図 1)。

(2) 神経活動依存的に変化する候補タンパクの同定

先行研究により、学習後から数時間程度で記憶が固定化されることが判明している (Tully, Cell, 1994)。そこで、キノコ体を構成する内在性神経であるケニオン細胞において、光感受性イオンチャネルであるチャンネルロドプシンを発現させ、光刺激による脱分極に伴う転写・翻訳の変化をプロファイルする。光刺激後の異なるタイミングで神経刺激後 10 分、30 分、90 分、270 分のタイミングで各遺伝子の翻訳活性を定量し、神経刺激にตอบสนองして翻訳活性が変化する遺伝子を網羅的に同定する。

(3) 標的タンパク質の局在の可視化と機能的意義の解明

候補タンパクの細胞種特異的な動態を明らかにするため、我々がこれまでに開発した GFP 再構成に基づく新規標識手法、および「交換可能ベクター」を CRISPR/Cas9 法を用いて挿入したノックインリソースを用いて (Kondo, Cell Rep, 2020) 特定細胞における標的タンパク質の局在変化を高解像度で可視化する。これらの技術を組み合わせ、ケニオン細胞において標的タンパク質の動態を解析し、神経刺激前後での発現量と局在の神経活動依存的な変化を観察する。

4. 研究成果

まず、本研究の基盤となる細胞種特異的 Ribo-seq 法を確立した。ショウジョウバエ脳において、エピトープタグを付したリボソームタンパク質 (RpL3-FLAG) を特定の細胞に発現させ、RNase 処理と FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により翻訳中の mRNA 断片を回収する。この mRNA 断片を網羅的に解読して得られたトランスクリプトームを同一サンプル由来のトランスクリプトーム (RNA-seq) と比較することで、転写産物の量に依存しない高精度な翻訳活性の測定が可能となった (図 1)。

この細胞種特異的 Ribo-Seq 法と光遺伝学技術を組み合わせることで、各遺伝子に対する翻訳活性の検出に成功した (Ichinose, eLife 2024; 図 2)。自由行動下の八に光刺激を与え、神経活動依存的な転写・翻訳応答を RNA-seq/Ribo-seq により網羅的に測定した。その結果、神経刺激にตอบสนองして翻訳活性が上昇するタンパク質群を同定し、わずか 3 秒間の光刺激で 150 を超える遺伝子の翻訳活性が有意に変化することを見出した。驚くべきことに、その過半数は翻訳に関わるタンパク質をコードし、共通して 5'末端にシトシン (C) とウリジン (U) が連続するオリゴピリミジンモチーフをもつことから、刺激応答性を司る翻訳シス配列の有力な候補を突き止めた。

本研究により、細胞種特異的な翻訳制御の実体が分子・細胞レベルで初めて明らかとなり、記憶の長期化における翻訳制御メカニズムの解明に向けて先駆的なモデルを確立した。

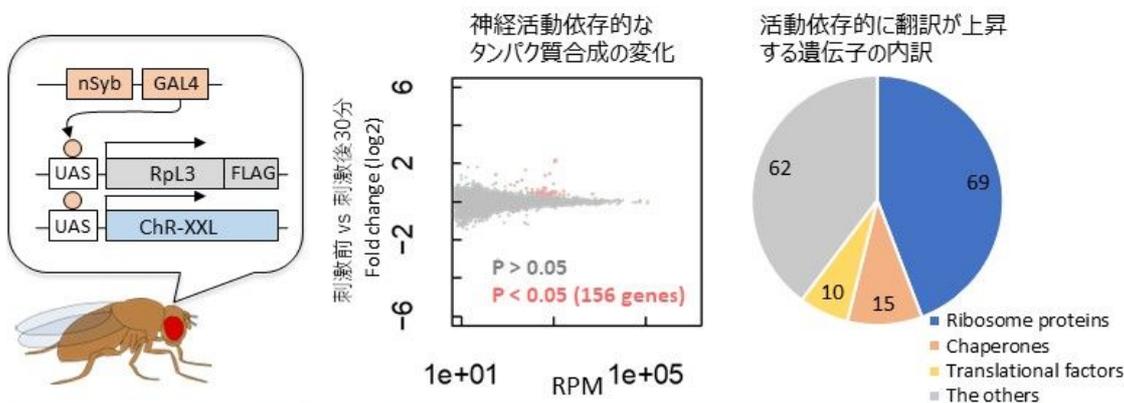


図 2 チャンネルロドプシンの光刺激による脱分極に伴う転写・翻訳応答の変化

<文献>

Ichinose T, Kondo S, Kanno M, Shichino Y, Mito M, Iwasaki S, Tanimoto H. Translational regulation enhances distinction of cell types in the nervous system. *eLife*. In Press. (2024) DOI: 10.7554/eLife.90713.1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ichinose Toshiharu, Kondo Shu, Kanno Mai, Shichino Yuichi, Mito Mari, Iwasaki Shintaro, Tanimoto Hiromu	4. 巻 -
2. 論文標題 Translational regulation enhances distinction of cell types in the nervous system	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.90713.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Thoma Vladimirov, Sakai Shuhei, Nagata Koki, Ishii Yuu, Maruyama Shinichiro, Abe Ayako, Kondo Shu, Kawata Masakado, Hamada Shun, Deguchi Ryusaku, Tanimoto Hiromu	4. 巻 120
2. 論文標題 On the origin of appetite: GLWamide in jellyfish represents an ancestral satiety neuropeptide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2221493120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2221493120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fuse Naoyuki, Hashiba Haruka, Ishibashi Kentaro, Suzuki Takuro, Nguyen Quang-Dat, Fujii Kiho, Ikeda-Ohtsubo Wakako, Kitazawa Haruki, Tanimoto Hiromu, Kurata Shoichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Neural control of redox response and microbiota-triggered inflammation in Drosophila gut	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1268611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1268611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamagata Nobuhiro, Imanishi Yasuhito, Wu Hongyang, Kondo Shu, Sano Hiroko, Tanimoto Hiromu	4. 巻 16
2. 論文標題 Nutrient responding peptide hormone CCHamide-2 consolidates appetitive memory	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 986064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2022.986064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamagata Nobuhiro, Ezaki Takahiro, Takahashi Takahiro, Wu Hongyang, Tanimoto Hiromu	4. 巻 10
2. 論文標題 Presynaptic inhibition of dopamine neurons controls optimistic bias	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e64907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.64907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichinose Toshiharu, Kanno Mai, Wu Hongyang, Yamagata Nobuhiro, Sun Huan, Abe Ayako, Tanimoto Hiromu	4. 巻 31
2. 論文標題 Mushroom body output differentiates memory processes and distinct memory-guided behaviors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1294 ~ 1302.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.12.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanno Mai, Hiramatsu Shun, Kondo Shu, Tanimoto Hiromu, Ichinose Toshiharu	4. 巻 11
2. 論文標題 Voluntary intake of psychoactive substances is regulated by the dopamine receptor Dop1R1 in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82813-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tanimoto H
2. 発表標題 Tuning the reward intensity.
3. 学会等名 The 3rd Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ichinose T
2. 発表標題 Translational regulations for cell type distinction and neuronal adaptation
3. 学会等名 The 3rd Asia Pacific Drosophila Neurobiology Conference (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tanimoto H
2. 発表標題 Regulation of vesicle pools for distinct memory phases.
3. 学会等名 2023年度生理学研究所記憶学習研究会 “Diverse approaches to understanding learning and memory” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Thoma V, Sakai S, Nagata K, Ishii Y, Maruyama S, Abe A, Kondo S, Kawata M, Hamada S, Deguchi R, Tanimoto H
2. 発表標題 On the origin of appetite: GLWamide in jellyfish represents an ancestral satiety neuropeptide
3. 学会等名 EMBO/COB workshop 'Trans-Scale Biology' using exotic non-model organisms (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tanimoto H
2. 発表標題 Terminal activity of dopamine neurons controls reward signals in the fly
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「多様なドーパミン神経伝達から脳を探る」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷本 拓
2. 発表標題 細胞種特異的な合成タンパク質のプロファイリング
3. 学会等名 第1回東北大学 & 理化学研究所連携シンポジウム「計測科学が拓く生命科学の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 周 (Kondo Shu) (90408401)	東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・准教授 (32660)	
研究分担者	市之瀬 敏晴 (Ichinose Toshiharu) (20774748)	東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教 (11301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岩崎 信太郎 (Iwasaki Shintaro) (80611441)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員 (82401)	
研究協力者	七野 悠一 (Shichino Yuichi) (40748365)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------