

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03337

研究課題名（和文）長期記憶における新規合成タンパク質の動態と役割

研究課題名（英文）The dynamics and function of newly synthesized proteins in long-lasting memory

研究代表者

三國 貴康（Mikuni, Takayasu）

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：90786477

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：記憶は、秒から分単位の経過とともに忘れる「短期記憶」と、何時間、何日、あるいは一生続くような「長期記憶」に大別される。短期記憶と長期記憶のメカニズムで異なるのは、タンパク質の新規合成を必要とするか否かである。しかしながら、新規に合成された各々のタンパク質がいつ、どこで、どのように働いて長期記憶を実現しているのかは、ほとんどわかっていない。そこで、本研究では、脳組織内で新規合成タンパク質を可視化するためのハイスループットな方法を確立し、長期記憶における様々なタンパク質の新規合成の動態を解析するための技術基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

何時間、何日、あるいは一生続くような長期記憶の形成には、脳内でタンパク質が新規に合成される必要があることが知られている。しかしながら、脳内で個々の新規合成タンパク質を選択的に観察する良い方法はこれまでなかった。本研究では、一定の時間枠の間に脳内で合成された新規合成タンパク質を脳内で選択的に観察するための方法を開発し、長期記憶の研究の礎を築いた。

研究成果の概要（英文）：Memories can be divided into short-term memory, lasting for seconds to minutes, and long-term memory, lasting for hours, days or even a lifetime. Short-term memory is protein synthesis-independent, while long-term memory is protein synthesis-dependent. However, it is largely unknown when, where and how distinct newly synthesized proteins work for long-term memory. In this study, we established a high-throughput method for imaging newly synthesized proteins in brain tissue, enabling the monitoring of a variety of newly synthesized proteins in the brain in the context of long-lasting memory.

研究分野：神経科学

キーワード：分子イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

記憶は、秒から分単位の経過とともに忘れる「短期記憶」と、何時間、何日、あるいは一生続くような「長期記憶」に大別される (Costa-Mattioli et al., *Neuron* 2009; Redondo and Morris, *Nat Rev Neurosci* 2011)。短期記憶と長期記憶のメカニズムで決定的に異なるのは、タンパク質の新規合成を必要とするか否かである (Klann and Dever, *Nat Rev Neurosci* 2004)。短期記憶では、細胞内で既に発現しているタンパク質の移動や修飾が重要な役割を果たし、タンパク質の新規合成は不要であることがこれまでの研究からわかっている。一方、タンパク質の合成を阻害する薬理実験から、長期記憶ではタンパク質の新規合成が必須であることが古くから知られている (Redondo and Morris, *Nat Rev Neurosci* 2011; Costa-Mattioli et al., *Neuron* 2009; Rogerson et al., *Nat Rev Neurosci* 2014)。しかしながら、新規に合成された各々のタンパク質がいつ、どこで、どのように働いて長期記憶を実現しているのかは、ほとんどわかっていない。

### 2. 研究の目的

これまで、長期記憶における新規合成タンパク質の動態と機能がほとんどわかっていないのは、内在性に発現する新規合成タンパク質を選択的に可視化する良い方法がないからである。また、シナプス伝達や細胞内シグナル伝達に関わる数十種類以上のタンパク質が長期記憶に関わっていると考えられているので、このような様々なタンパク質の新規合成成分を選択的に可視化するための網羅的な研究プラットフォームが必要である。

そこで、本研究では、脳組織内で新規合成タンパク質を高精度に可視化するためのハイスループットな方法を確立し、様々なタンパク質の新規合成の動態を解析するための技術基盤を構築することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノム編集による化学タグノックイン

マウス個体の脳細胞で目的タンパク質をコードする遺伝子座に化学タグ配列を正確にノックインするために、SLENDR 法あるいは vSLENDR 法を用いた (図 1)。SLENDR 法では、胎生 12-14 日齢のマウス胎児の脳室に、ゲノム編集に必要なコンポーネント (ガイド RNA および SpCas9 発現ベクター、相同組換え用の鋳型 DNA) を子宮内電気穿孔法で導入した (電圧 33-50 V, 50 msec のパルス を 1 秒おきに 4 回。NepaGene エレクトロポレーターを使用)。スライス培養を行う場合は、生後 5-7 日齢のマウスの海馬からスライス培養を作製し、培養 12 - 15 日にイメージング実験を行った。大脳皮質組織イメージングを行う場合は、生後 1 ヶ月齢のマウスの脳を固定し、薄切切片を作製してイメージング実験を行った。vSLENDR 法では、マウス海馬から作製したスライス培養に、ゲノム編集に必要なコンポーネント (ガイド RNA および SpCas9 発現カセットおよび相同組換え用の鋳型 DNA) を搭載したアデノ随伴ウイルスベクターを培養 5 - 7 日に添加し (1 スライス当たり約 1010 ゲノムコピー)、培養 12 - 15 日にイメージング実験を行った。

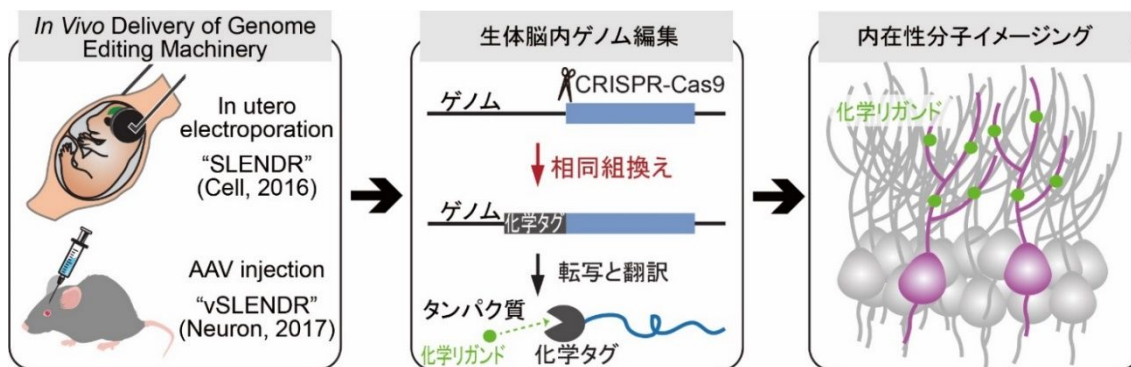


図 1. SLENDR および vSLENDR 法による内在性タンパク質のラベリング

#### (2) スライス培養の作製

先行論文の方法に準拠して、マウス海馬あるいは大脳皮質からスライス培養を作製した。生後 5-7 日齢のマウスの海馬を切り出し、チョッパーで 325  $\mu\text{m}$  の厚さでスライスを作製し、培地を添加した膜上に置いて、37 度 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。培地は 2 - 3 日に 1 回交換した。

#### (3) 固定脳薄切切片の作製

先行論文の方法に準拠して、1 ヶ月齢のマウスの脳を 4%PFA で灌流固定を行った後、50 $\mu\text{m}$  厚の脳切片をビブラトームで作製した。

#### (4) 様々な内在性タンパク質の標識

様々な内在性タンパク質をイメージングするために、SLENDR 法および vSLENDR 法で様々な遺伝子をターゲットするゲノム編集コンストラクトを構築し、化学タグによるラベル方法を組み合わせた。化学タグは、低分子リガンドが特異的かつ不可逆的に結合する「受け皿タンパク質」であり、低分子リガンドとして波長の異なる様々な蛍光リガンドを使用できる。この化学タグの性質を利用して、脳組織において、SLENDR/vSLENDR 法により化学タグを付加した特定の内在性タンパク質に対し、蛍光リガンドで染色した。

#### (5) 新規合成タンパク質の標識

ある時間枠に新規合成された特定のタンパク質をイメージングするために、SLENDR 法および vSLENDR 法と、化学タグによるラベル方法を組み合わせた。脳組織において、SLENDR/vSLENDR 法により化学タグを付加した特定の内在性タンパク質に対し、まずある色の蛍光リガンドで染色する。その後、任意の時間が経った後、異なった色の蛍光リガンドで染色することで、新規合成されたタンパク質を特異的に染色した。

### 4. 研究成果

#### (1) 様々な内在性タンパク質のイメージング

SLENDR、vSLENDR 法と化学タグラベリング技術を組み合わせることで、シナプス分子やシグナル伝達分子を中心に 10 種類以上の様々な内在性タンパク質の局在や動態を脳内の 1 細胞でコントロール良くイメージングできるようになった。記憶に重要なシグナル伝達分子 CaMKII や、興奮性および抑制性シナプスの代表的なマーカー分子である PSD95 や Gephyrin のイメージング例を示す(図2)。

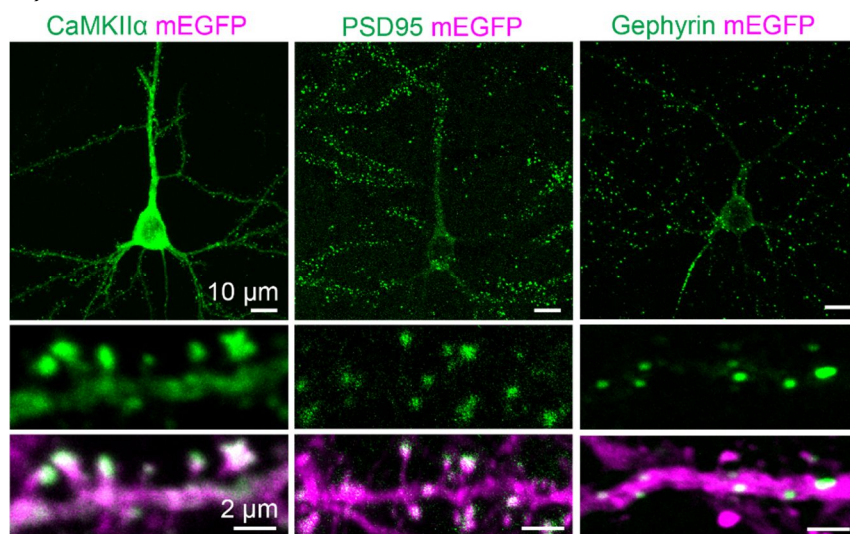


図2 . SLENDR 法によるマウス大脳皮質での内在性タンパク質イメージング例

#### (2) 新規合成タンパク質のイメージング

海馬スライス培養において、vSLENDR 法により化学タグで標識した CaMKII タンパク質に、まず、ある色の化学リガンドを添加した。そのうえで、2 時間後に別の色の化学リガンドを添加し、2 時間内に新規に合成された

CaMKII タンパク質を選択的にイメージングした。タンパク質合成阻害薬であるアニソマイシン存在下では、2 回目のラベルシグナルはほとんど検出できなかったの、コントロールにおいて検出した2回目ラベルシグナルは確かに2時間内に新規に合成された CaMKII タンパク質であることが示された(図3)

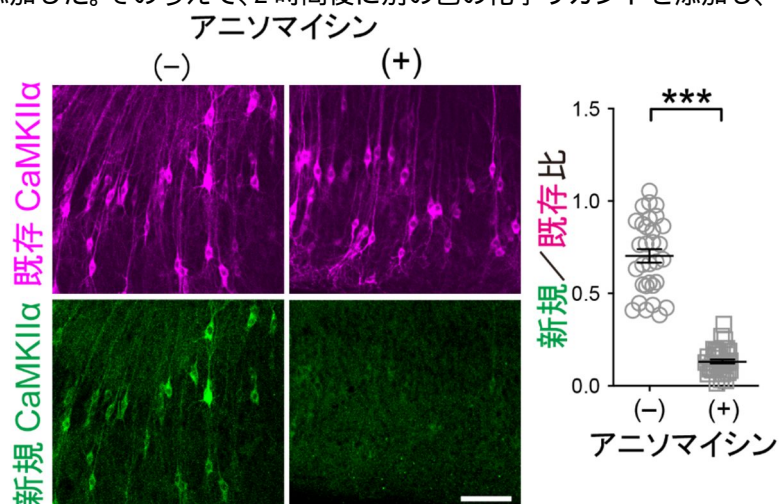


図3 . 新規合成タンパク質の選択的イメージング例

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hanaoka Kenjiro, Iwaki Shimpei, Yagi Kiyoshi, Myochin Takuya, Ikeno Takayuki, Ohno Hisashi, Sasaki Eita, Komatsu Toru, Ueno Tasuku, Uchigashima Motokazu, Mikuni Takayasu, Tainaka Kazuki, Tahara Shinya, Takeuchi Satoshi, Tahara Tahei, Uchiyama Masanobu, Nagano Tetsuo, Urano Yasuteru	4. 巻 144
2. 論文標題 General Design Strategy to Precisely Control the Emission of Fluorophores via a Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) Process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 19778 ~ 19790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c06397	査読の有無 有
オープンアクセス 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	国際共著 -

1. 著者名 三國貴康	4. 巻 2022
2. 論文標題 生体脳内ゲノム編集による脳組織内1細胞での分子イメージング	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ブレインサイエンス・レビュー	6. 最初と最後の頁 61 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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	国際共著 -

1. 著者名 三國貴康	4. 巻 51
2. 論文標題 生体脳内ゲノム編集技術とその分子標識への応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床精神医学	6. 最初と最後の頁 1319 ~ 1323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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	国際共著 -

1. 著者名 Mikuni Takayasu, Uchigashima Motokazu	4. 巻 54
2. 論文標題 Methodological approaches to understand the molecular mechanism of structural plasticity of dendritic spines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6902 ~ 6911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14734	査読の有無 有
オープンアクセス 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	国際共著 -

1. 著者名 Sun Ye, Thomas Connon, Mikuni Takayasu, Guerrero-Given Debbie, Yasuda Ryohei, Kamasawa Naomi	4. 巻 155
2. 論文標題 Correlative Ultrastructural Analysis of Functionally Modulated Using Automated Tape-Collecting Ultramicrotome and SEM Array Tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Volume Microscopy	6. 最初と最後の頁 121 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0691-9_7	査読の有無 有
オープンアクセス 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	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takayasu Mikuni
2. 発表標題 Imaging synaptic activity and molecular dynamics in single neurons in vivo
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回日本神経科学大会) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三國貴康
2. 発表標題 生体脳内1細胞でのシナプス活動と内在性タンパク質の時空間的動態のイメージング
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takayasu Mikuni
2. 発表標題 Large-scale imaging of synaptic activity and molecular dynamics in single neurons
3. 学会等名 ACC国際シンポジウム2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内ヶ島 基政、井口 理沙、劉シンイ、藤井 和磨、阿部 学、崎村 建司、備瀬 竜馬、三國 貴康
2. 発表標題 ゲノム編集を介した化学タグノックインによる脳内内性タンパク質の定量的時空間プロファイリング
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回日本神経科学大会) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内ヶ島 基政、井口 理沙、劉シンイ、藤井 和磨、阿部 学、崎村 建司、備瀬 竜馬、三國 貴康
2. 発表標題 Development of Single-Cell, Spatiotemporal, Quantitative Imaging Method for Endogenous Proteins in Mammalian Brains
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mikuni Takayasu
2. 発表標題 脳でのゲノム編集
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三國貴康
2. 発表標題 小児神経臨床と基礎脳科学研究
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikuni Takayasu
2. 発表標題 Genome editing-based approaches for single-cell molecular imaging in brain tissue
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三國貴康
2. 発表標題 生体脳でのゲノム編集技術の開発と脳病態の理解への応用
3. 学会等名 第62回小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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

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