

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19355

研究課題名（和文）脳組織内1細胞での転写・翻訳産物の局在の同時イメージング

研究課題名（英文）Simultaneous imaging of the localization of transcription and translation products in single cells in brain tissue

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：複雑で長い突起を持つ神経細胞では、外部からの入力に機動的に対応するために樹状突起でタンパク質を局所合成するが、局所合成の実体には不明な点が多い。とくに、脳組織内の樹状突起内のどこにmRNAが存在し、翻訳されたタンパク質が樹状突起内のどこに局在するかという情報は、既存の技術では得ることは難しい。本研究では、生体脳内ゲノム編集・分子観察技術を駆使して、脳組織内で内在性のmRNAおよびタンパク質の細胞内局在を同時イメージングする方法を開発した。本研究は、多くの脳内プロセスや機能のメカニズムを転写・翻訳のレベルで統合的に理解するための新たな技術基盤を提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一細胞における遺伝子の転写および翻訳の空間情報は、様々な生命プロセスの分子メカニズムを理解する上で極めて重要である。本研究では、脳組織内の神経細胞で内在性に発現するmRNAとタンパク質の樹状突起での局在を1細胞のコントラストで同時にイメージングする方法を開発した。この方法は、様々な脳内プロセスや機能のメカニズムを転写・翻訳のレベルで統合的に理解するための技術プラットフォームを提供する。

研究成果の概要（英文）：Proteins are locally synthesized in neuronal dendrites to dynamically respond to external inputs. However, little is known about this local protein synthesis in the brain. Specifically, current technologies struggle to visualize the exact localizations of mRNA and the translated proteins within dendrites in brain tissue. In this study, we developed a method that leverages in vivo genome editing and molecular labeling techniques to simultaneously image the intracellular localization of endogenous mRNA and proteins in brain tissue. This research provides a new technological platform for understanding the mechanisms of various brain processes and functions at the transcriptional and translational levels.

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

ヒトや動物の脳内でのシナプスの変化は、神経回路の機能的な発達や学習・記憶に不可欠である。シナプスの構造や機能が変化する際には、シナプス部位のプロテオームがダイナミックに変化する。細胞体由来のタンパク質が遠く離れたシナプスまで輸送されるには時間がかかるので、シナプス部位へのタンパク質の機動的な供給機構として樹状突起での局所合成がある。これまでに局所合成がシナプスの可塑性に重要な役割を果たしていることはわかっているが、局所合成の実体には不明な点が多い。

複雑で長い突起を持つ神経細胞では、外部からの入力に機動的に対応するために樹状突起でタンパク質を局所合成する。樹状突起内のどこに mRNA が存在し、翻訳されたタンパク質が樹状突起内のどこに存在するのかという空間情報は、局所合成を理解する上で必須の情報であるが、既存の技術ではこのような情報を得ることは難しい。

神経細胞では、細胞体から遠く離れた樹状突起に重要分子の mRNA が豊富に存在しているので、mRNA とタンパク質を同時に観察できれば樹状突起・シナプスの理解が飛躍的に進むと考えられる。しかしながら、これまでに、脳組織内で内在性に発現する mRNA とタンパク質の樹状突起での局在を 1 細胞のコントラストで同時にイメージングした例はない。-Actin や Arc にタグ配列を付加したマウスの系統を作製して内在性の mRNA をイメージングした例はあるが (Park et al., Science 2014; Das et al., Science Adv 2018) 組織内の全ての細胞において mRNA が標識されるので樹状突起での局在の解析は難しく、さらに、マウス系統の作製に時間とコストがかかるためスループットが低いという欠点がある。タグ配列を付加した遺伝子配列を外来性に発現させる研究は多いが、内在性の遺伝子発現制御とは関係なく発現させるため大抵は過剰発現になってしまい、非生理的な実験系と言える。ゆえに、脳組織内で内在性に発現する mRNA とタンパク質のサブセラーレベルでの局在を 1 細胞のコントラストで同時にイメージングするための方法が求められていた。

研究代表者はこれまでに、生体脳内ゲノム編集・分子標識技術「SLENDR」および「vSLENDR」を開発し、脳組織内 1 細胞で内在性に発現するタンパク質の局在や動態を観察してきた (Cell 2016, Neuron 2017)。この方法により、複雑な形態を示す神経細胞が高密度にひしめく脳組織において、1 細胞のコントラストで内在性タンパク質の局在・動態を高い S/N 比と解像度でイメージングできる。SLENDR/vSLENDR は、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術に基づいており、遺伝子産物としてタンパク質のみならず mRNA も原理的には標識できる。タンパク質よりもコピー数の少ない mRNA を高感度に可視化するために、最新の高感度 RNA 標識法と組み合わせることで、mRNA と内在性タンパク質を脳組織内 1 細胞で高精度に同時イメージングできると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、脳組織内で内在性の mRNA およびタンパク質の細胞内局在を同時イメージングする方法を開発し、mRNA およびタンパク質の局在を単一シナプスレベルの解像度で理解できるようにすることを目的とした。本研究で開発する方法は原理的に様々な分子にスループット良く適用できるので、局所合成に関わる多くの脳内プロセスや機能のメカニズムの解明が飛躍的に進むようになる。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集によるタグ配列ノックイン

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タグ配列を正確にノックインするために、SLENDR 法を用いた (図 1)。SLENDR 法では、胎生 14-15 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、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)。生後 1 ヶ月のマウスを灌流固定し、イメージングのための大脳皮質組織切片をピプラトームで作製した。

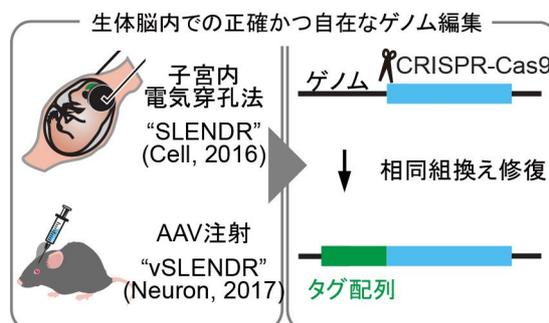


図 1. SLENDR 法によるタグ配列のノックイン

(2) 脳組織での転写・翻訳産物の同時イメージング

上記により、個体マウスの脳内の一部の細胞において、SLENDR 法により CaMKII の遺伝子座に GFP タグ配列を挿入し、ゲノム編集したマウスを灌流固定し、脳薄切切片を作製した。そのうえで、CaMKII の mRNA を GFP 配列プローブによる高感度 RNA in situ hybridization (Wang et al., J Mol Diagn 2012)、さらにタンパク質を抗 GFP 抗体による免疫組織化学法を用いて蛍光標識し (図 2)、共焦点顕微鏡で mRNA およびタンパク質の樹状突起での局在を観察した。

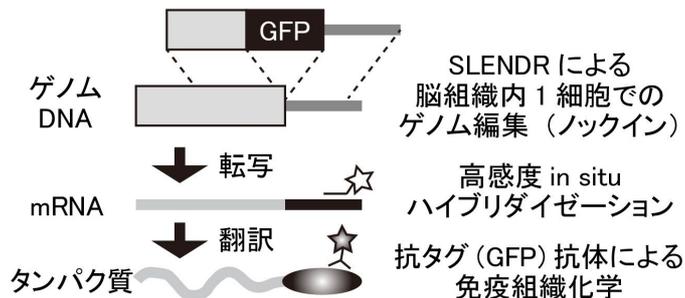


図 2 . 脳組織での内在性 mRNA とタンパク質の同時イメージング

4 . 研究成果

(1) CaMKII の内在性 mRNA とタンパク質の同時顕微鏡イメージング

上記の方法で作製したマウスの大脳皮質薄切切片を使用して、ノックインした CaMKII の mRNA を GFP 配列プローブによる高感度 RNA in situ hybridization で、さらにタンパク質を抗 GFP 抗体による免疫組織化学法を用いて蛍光標識し、共焦点顕微鏡で mRNA およびタンパク質の細胞体および樹状突起での局在を観察した (図 3)。その結果、内在性に発現する mRNA およびタンパク質の局在をサブセラーレベルで観察できることがわかった。

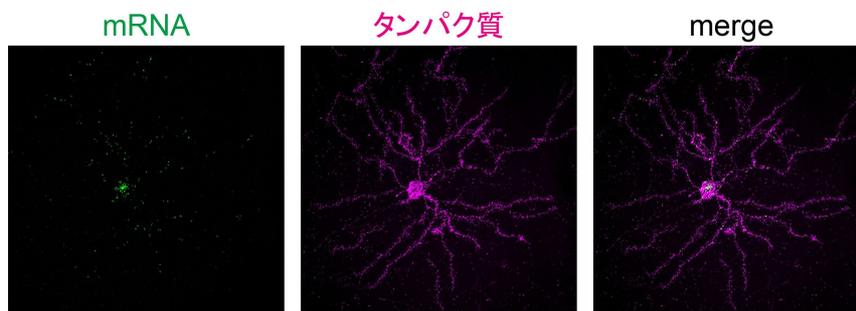


図 3 . 大脳皮質 2/3 層細胞における mRNA (緑) とタンパク質 (マゼンタ) の同時イメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5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在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 三國貴康
2. 発表標題 脳での1細胞シナプトームイメージング
3. 学会等名 第46回日本神経科学学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 劉 シンイ, 内ヶ島 基政, 阿部 学, 崎村 建司, 田井中 一貴, 三國 貴康
2. 発表標題 SeeThrough頭蓋骨透明化による生体脳イメージング技術
3. 学会等名 第46回日本神経科学学会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内ヶ島 基政, 井口 理沙, クーマー プラティック, 劉 シンイ, 阿部 学, 野住 素広, 五十嵐 道弘, 崎村 建司, 備瀬 竜馬, レイピス ルーク, 三國 貴康
2. 発表標題 哺乳類脳における内在タンパク質の単一細胞・時空間・定量的マッピング法の開発
3. 学会等名 第46回日本神経科学学会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内ヶ島 基政, 三國 貴康
2. 発表標題 哺乳類脳における1細胞シナプトームマッピング技術の開発
3. 学会等名 第129回日本解剖学会（招待講演）
4. 発表年 2024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
---------	---------