

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24240059

研究課題名(和文) 脳の“センサス”：記憶解明の分子基盤構築

研究課題名(英文) Toward Brain Census: Construction of a method for revealing the memory mechanism at the molecular level

研究代表者

西垣 功一 (NISHIGAKI, Koichi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10107378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：記憶の解明には、神経細胞のネットワーク形成やその活動を調べるだけでなく、分子レベルでの動的システムの解析が必要であるが、これまでその技術がなかった。我々はゼブラフィッシュ等の脳の微小領域(一辺1mmの立方体)を更に微細な数100のマイクロキューブ(mc)に切断し、整序して、位置情報を保存しながらシステム的に解析するMMVマイクロアレイ技術を開発した。一方、極微量なmc中のDNAやタンパク質を多並列かつ高感度に検出する系として、抗体では実現できない、ペプチドELISAアレイ(通常、ELISAは抗体を用いる)を開拓し、それに必要な5種のペプチドペアを創製し、解析系全体の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：For understanding the memory mechanism, not only neuron cell networks and their activities but also dynamic molecular systems should be elucidated. However, the latter could not be performed due to the lack of methodology. We have developed a novel approach to clarify the molecular system within an extremely small region (1mm³ of zebrafish brain) by dissecting it into minute masses and orderly arranging them in an MMV microarray, enabling them to be subjected to parallel and multistep analysis. On the other hand, a highly sensitive and parallel detection method was developed by employing the peptide ELISA (ELISA is usually antibody-based detection method) facilitated with an MMV microarray. Five pairs of novel peptides for each of MGMT, A 42, p38, CREB1a and NM23 were identified and implemented to make up pepELISA array. Thus, we have succeeded in building up a novel methodology for the analysis of brain molecular systems, expecting future fruits.

研究分野：分子生物物理学

キーワード：ペプチドエライザ MMVマイクロアレイ 脳内分子 マイクロキューブ タンパク質発現 ペプチドアブタマー 試験管内淘汰 ゲノムプロファイリング

1. 研究開始当初の背景

2012年の時点で、fMRI などにより脳全体の神経活性化状態を cm レベルの分解能でマッピングすることができるようにはなっていた。一方、分子レベルでは、特定の分子の活性と記憶現象などとの関係が、チャンネルドプシンなどを用いる光遺伝学により、生きた脳のダイナミックな活性を測定可能になってきていた。しかし、脳全体を分子システムレベルで解析することはできなかつた。本研究開発は、この状況で“脳のセンサス”と称し、i) 脳を多数の微小画分(マイクロキューブ; mc) に整然と分割し、取り扱う技術の開発、ii) 分画された mc (= 標準は、一辺が 0.1mm の立方塊) に含まれる分子群 (DNA, RNA 群 [= トランスクリプトーム]、タンパク質群 [= プロテオーム]) 中の微量な各要素分子を検出するための高感度分析系の確立、iii) 微量多並列な試料を多段階に処理し、高感度に検出するための多並列多段階解析系の確立、iv) ゼブラフィッシュ、マウスなどの高次脳機能の発達した実験材料に対して、特に記憶学習を实践する実験系の確立と解析などを实践することを目指した。このことにより、予備的研究段階ではあっても、初めて“脳のセンサス”(換言すれば、4 次元分子マッピング) が実現することが期待された。偶々、我々が本研究を開始した直後に世界では、類似する大規模なシステムの研究開発が開始している(2013 年から米国では BRAIN Initiative ; 同年、欧州では HBP ; 日本では 2014 年から Brain/MINDS)。偶然、我々は科研費の基盤研究(A)という形で独自に開始したことになる。

2. 研究の目的

脳活動がニューロン(神経細胞)のネットワークにより実現していることが示されてきており、特定の脳活動を担う脳の部位が fMRI 法などにより、マッピングされてきているが、その単位は神経細胞をブラックボックスとしたものである。しかし脳活動は、現実には様々な分子が関与してダイナミックに作用している。細胞内のカルシウム濃度の変化、脂質 Raft などでの脂質膜タンパク質変化、スパインでのアクチンの離合集散や特定のタンパク質 (CREB など) の発現量変化などの研究が進んでいる。しかし、いわば“点”としての解析であり、種々様々な脳機能に関して分子のネットワークがいかに作用しているということは別の解析が必要である。「記憶」という現象を捉えるに際しても、多くの分子群がシステムの動的に変動していることは今や当然といえるが、それを調べる方法がこれまで存

在しなかつた。すなわち、点ではなく、3 次元的に、さらにはその時間変化を含めた 4 次元的な解析を可能とする実験系の構築が求められている。本研究はこの未開の分野に足を踏み入れるものである。

3. 研究の方法

研究は次の 6 種の要素技術の確立とそれらの統合的応用からなる。

- 1) 安定的実験材料(ゼブラフィッシュ、マウス、線虫)の調達
- 2) 脳の微小画分(mc)の作製と整序アレイ化
- 3) DNA の多並列高感度検出系の確立
- 4) タンパク質の高感度検出系の創成
- 5) 微量試料の多並列多段階解析系の創成
- 6) 実験材料の記憶実験系の検討

具体的に、主として、ゼブラフィッシュを試料とした研究の流れを述べる。

1 ゼブラフィッシュ養殖条件: ゼブラフィッシュは 26-27°C において、明期 14 時間 - 暗期 10 時間の明暗サイクルのもとで飼育した。胚を得る際は、明期終了数時間前に雌雄の成魚を数匹ずつガラス玉の敷き詰められた交配用水槽に移し、翌日の点灯後 1-2 時間でサイフォンを用いて胚を吸い上げてネットで回収した。産卵直後の卵に顕微注入を行う場合は、交配用水槽を予めプラスチック板で半分仕切り、明期終了 2-3 時間前に雌雄を数匹ずつ仕切りの両側に入れた。翌日、点灯の 1-2 時間後に仕切りを外し、その 15 分後にサイフォンを用いて胚を吸い上げ、ネットで回収した。得られた胚は 25°C、28.5°C あるいは 32°C で飼育した。必要な場合、回収した胚を、0.03 g/mL 1-phenyl-2-thiourea (PTU, Nacalai tesque) の存在下で飼育して色素形成を阻害した。本研究には、飼育期間 2 か月(体長 6cm)前後のものを用いた。

(以上、要素技術 1相当)

2 ゼブラフィッシュやマウスの脳から 1 mm 角の小領域を取り出し、mc) を作製した(要素技術 2相当)。

これについては、結果の節で記述する。

次に、これを新型マイクロアレイ MMV (Microarray with Manageable Volumes) に特製のニードルを用いて整序し、元の試料中での mc3 次元的位置情報を保存しながら、この後に続く微量・多並列・多段階処理を可能とした。mc の MMV マイクロアレイ(以下、mc アレイと略称する)を作製したことになる(以上、要素技術 2、結果の部分の図 2 参照)。

マウスの海馬についても基本的に同様に、mc アレイを作製した。

3 DNA解析として、既に開発した GP[ゲノムプロファイリング]法を応用して mc アレイ解析を開拓した(“mc アレイ DNA 解析”)。MMV の1つのウェル(直径0.6mmで2mmの深さ)の中で、細胞溶解とDNA抽出、PCR反応、増幅 DNA の検出を行い、量的に不足する場合は各々について再増幅し、得た DNA 断片群を μ TGGE 解析した(以上、要素技術 3相当)。

4 タンパク質の高感度検出系の確立は、本研究の中心的課題である。実験での微量試料(全体で 10^{-6} g 以下)かつ多並列(25~1000 平行)を克服するために我々が挑戦したのが pepELISA (抗体の代わりにペプチドを用いた高感度検出系)法の新規開発である。

多くの分子に対する抗体は既に市販されているが、その‘強度’、‘エピトープの異なる2種の提供’、‘操作性’(MMV 中にチャージしたり、固定したりすること)に問題があり、本技術には適用不可能であった(現実的にはコスト的にも桁違いに難しい)。

本研究では脳の mc におけるタンパク質発現解析のモニター分子群として、CREB1a、p38、MGMT、A 42、NM23、カテプシン E、SOD1 を選定し、特に、前3者に関しては新規に標的親和性ペプチドの2種をスクリーニングした。これらの代表として、p38 親和性ペプチドの取得のために実施した技術について記すと次のようになる。

p38 親和性ペプチドスクリーニング法：
本ペプチドの取得のために、全く新しいペプチドスクリーニング技術(“MMV-Clop 法”)が開拓された(図1)。

Close/Openコンパートメント(Clop)法(= R1 23のR23段階)

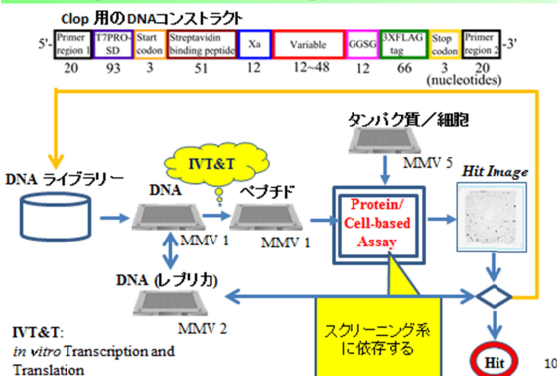


図1 . MMV-Clop コンパートメント方式
機能性ペプチドをスクリーニングするための方式で、MMV 中に異なる 1024 種の配列のペプチドを入れ、所定の機能を有するペプチドを選び出す方式で、2ラウンドの操作で100万種のペプチドからスクリーニングできる。

NM23-pepELISAの基本構成

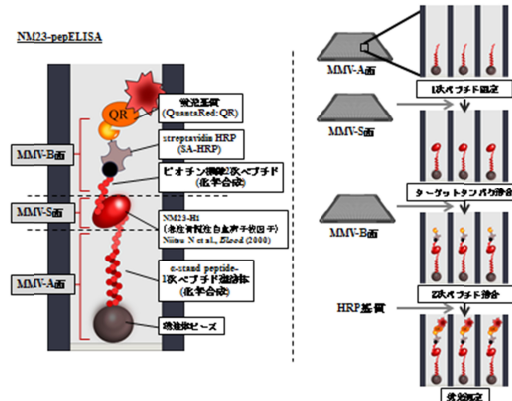


図2 . pepELISA アレイの調製方法.

NM23 の検出を例にして、系全体は3層(MMV-A、-S、-B)からなり、MMV-A と-B は、NM23 の異なるエピトープに対するペプチドアダプターを示し、それぞれが標的タンパク質 NM23 (MMV-S 層になる)をサンドイッチしている。全体はビーズに固定されるために、MMV のウェル間を行き来して、吸着のない新しい MMV へ移送することで、壁面の非特異的結合から隔離される。MMV-A、-B の層は NM23 検出用に予め作成可能でサンプル層(MMV-S 層)のみ、新規に用意すれば、多並列の pepELISA が実現する。本研究では、mc アレイがサンプル層となる。

5 微量試料の多並列多段階解析系の開発は、“pepELISA アレイ”として実現した。この作製方式の概要を図2に示す。この図のように多並列(100 など)に、微量試料を対象として、高感度な pepELISA が形成されることがしめされた。

6 実験材料(ゼブラフィッシュやマウス)の学習記憶試料の作製に関しては、研究の進捗から、方法の検討と予備的試料の作製にとどまったが、その検討した方法の一部を簡潔に記す。

【ゼブラフィッシュの学習実験】2つの部屋とそれらをつなぐ連絡通路からなる水槽システムの中に、Ca センサー蛍光タンパク質の遺伝子が導入された魚個体を準備する。この遺伝子導入魚では、IP 蛍光の強度変化により神経活動を測定・可視化することができる。実験に当たっては、一方の部屋にいる魚に赤色ランプを提示し、反対側の部屋に逃げなければ軽い電気ショックを与えるという試行を繰り返して回避行動を学習させる。そうした上で、回避行動プログラムを思い出していると考えられる魚個体の脳での神経活動を Ca イメージング法により解析する。これについて、岡本仁(理研)らの先行実験結果として学習成立から短時間では(30分後)

明瞭な脳活動は検出されなかったのに対し、長時間(24時間)経過後は、終脳背側野(外套)にスポット状の神経活動パターンが見られており、長期的に記憶された回避行動プログラムがまさに読み出される過程を可視化できたとされている(Aoki et al., *Neuron*, 2013) この実験により、学習したゼブラフィッシュが得られ、我々の実験試料としうることを確認した。

【マウス行動テスト】オープンフィールド(新奇環境、直径60cm)にマウスを入れ、30分間の探索行動を行わせ、その探索行動の様子を調べる方法を開発し実践した。

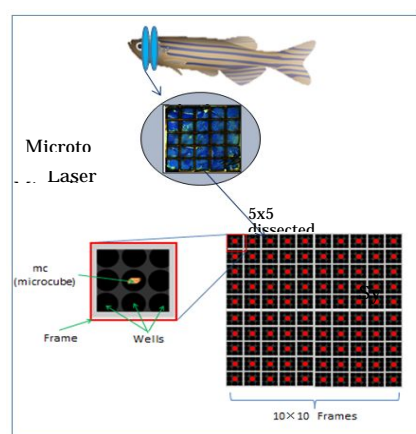


図3. ゼブラフィッシュ脳の mc アレイの作製方法

実験試料ゼブラフィッシュを OCT コンパウンドに包埋・凍結し、マイクロームで 50 μm 厚みにスライスし、さらに LMD(レーザーマイクロダイセクター)で 200 μm 角に細断し、それらの 1 つ 1 つ (1 μg) を 100 フレームの MMV (元々、2.5cm 角に 1024 のウエルがあるが、その 1024 ウエルを 9 ウエルずつで 1 フレームとし、全体で 10 × 10 のフレームに粗視化したもの) にニードルで移送したもの。

4. 研究成果

成果 1) mc アレイの作製と DNA 解析

ゼブラフィッシュの脳領域のスライス(0.05mm 厚)を作製し、さらに縦横 0.2mm 間隔で分画したものを、100 フレーム MMV に移送整序したものが図3に示してある。この状態で並列的に、細胞融解、DNA 抽出、PCR 増幅して得た DNA 断片を GP 法で解析し、近縁性をクラスター解析したものが図4に掲げてある。この結果から、MMV-GP 法で脳の微小領域の系統的ゲノム変化を解析できることが示された。本研究に関連して、GP 法で識別されるゲノム間の差異が塩基配列の変異によるか、あるいは DNA メチレーションの差(エピゲノム効果)かを別途調べる研究(Diwan, D. et al., *BMC Genomics*, 2014)

から、脳内の近接した神経細胞において、ゲノム塩基配列に検出可能な変異があることを初めて証明したことになる。これはこれまでの暗黙知としての細胞ゲノムの同一性に対して疑問を呈するとともに、ゲノムの系統の変異から、細胞間の系統を明らかにする手段を提供したことにもなる(Diwan et al., *FEBS Lett.* 2016(in press))。今後、実験量を増すことにより、脳を DNA のレベルで系統的に理解する可能性が拓けたことになる。

成果 2) 標的タンパク質検出用ペプチド群のスクリーニング結果

pepELISA 法で微量なタンパク質を検出するためには抗体を用いた通常の(サンドイッチ)ELISA 法で必要とする 1 次、2 次抗体に相当するエピトープの異なる 2 種のペプチドアダプターを必要とする。しかも pepELISA 法の特徴は検出に使用するペプチドそのものを用意する必要はなく、それをコードする DNA があればよい。表1にこのために新規に用意された 7 種のタンパク質に対するペプチドアダプターペアをリストしてある。これらの内、p38、CREB1a、MGMT に対する親和性

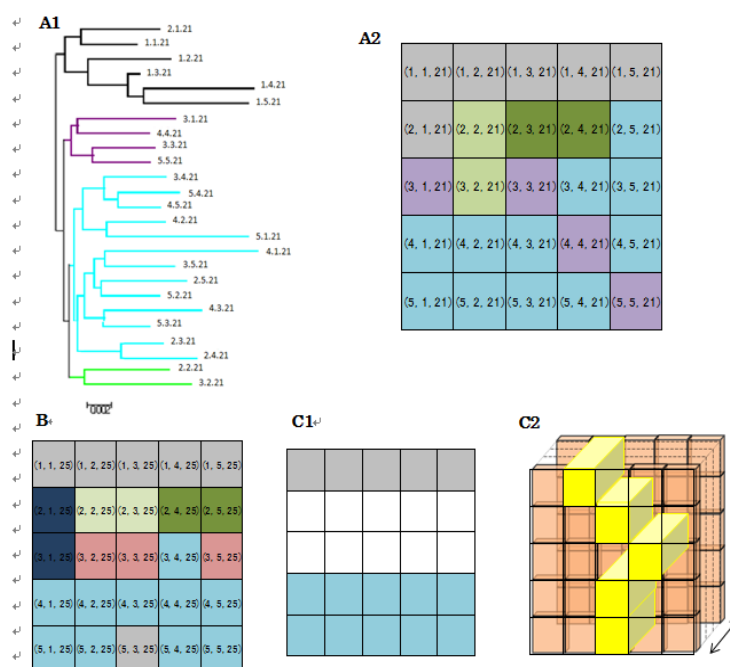


図4. ゼブラフィッシュ脳の微小画分 mc に関するゲノム DNA 近縁性解析

5 × 5 の微小画分の各々を GP 法で DNA 解析し、得られた spiddos を用いてクラスター解析したものが A1 であり、その近縁性をマッピングしたものが A2 である。(B) 同じゼブラフィッシュ脳の尾部側に 0.2mm 離れたスライスのマッピング解析。(C1) 上記 2 結果に共通するパタンの模式化 (C2) 特に前後のスライス間で、近縁性が高い mc を黄色で表示したものの。

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

ペプチドのペア(1次、2次抗体相当のペプチド)は新しい迅速淘汰法 MMV-Clop によって実現した。この方法が有効であることを示すと同時に、目的のペプチドのスクリーニングに成功している。準備されたこれらのペプチドのうち、3種(p38、CREB1a、NM23)を用いて以下のmcアレイ解析を行った

成果 3) pepELISA アレイを用いたゼブラフィッシュ脳のタンパク質発現解析

図5に示す方式で、MMV-pepELISAを実践した。その結果、図6に示すように、この実験系で標的タンパク質の濃度を検出できることが示された。ゼブラフィッシュ脳内の特定タンパク質(ここではNM23)濃度を検出した結果、図7に示すものとなった。これは、以下のような限界はあるものの、本研究のねらいとする脳の微小画分mcの位置情報を保持しながら、微量成分タンパク質を多並列に検出できる可能性を初めて示したことになる。

ここでの限界は、再現性を得ていない。ノイズを完全に除去している保証がない。検出感度がnM程度である、ということが挙げられる。については、成果1)で隣接するスライスの解析から有効性が示唆されている(200µmの隔たりでもパターンに類似性がある)こと、すなわち、隣接スライスの結果から再現性を推定できることや、今後行われる繰り返し実験を通じて信頼性が確認されると期待される。についても明らかになる信頼性から、ある程度、定量されることが考えられる。については、nMのオーダーの検出は抗体ELISA等では十分合格点であるが、今後、ペプチドアダプターの高品質化を通じて高感度化を達成可能である。既に、ペプチドアダプターの高品質化(進化)の一般法として発達ライブラリー法(PLM法)が提案され、有効性が示されている(Kitamura et al., *J. Mol. Biol.*, 2009; Tsuji et al., *Prot. Pep. Lett.*, 2011; Ghimire et al., *Chem. Biol. Drug Des.*, 2014)。従って、本研究開発で採用しているペプチドを用いたELISA法は、従来の抗体法に比べて発展性がより高く、有望である。

最後に：

以上、本研究で目指した中心テーマ「脳のセンサス」を実現する基盤技術が整ったと考えられる。一方、実際の記憶現象解明はここで導いた方法によるなどして今後進めていくことになる。

表1. MMV-pepELISAのためにスクリーニングしたペプチド群 (160301現在)

標的タンパク質	取得ペプチド	取得法と取得者(年)*	コメント
p38α	p38-P8: P\$PFQ\$PFK\$PC\$STI (16) p38-P4: K\$PYILLPGCIQSPL (16)	MMV-Clop法 / Funakawa, T. (2016.2)	MMV-pepELISAを構成
CREB1a	P609: QYSQNQCQ (8) P201: KTF\$R\$HEH (8)	MMV-Clop法 / Takeuchi, N. (2016.2)	MMV-pepELISAを構成
MGMT	MGMT-Inh1: GIHIPIT (8) MGMT-Inh2: KCPSSYYG (8)	MMV-Clop法 / Saiki, T. (2015.2)	親和性ではなく、活性でスクリーニングしたもの
Aβ42	P84: CGLDPIPWGGSGGSCGLDPWPW(24) P13: GCPOGIGGSGGSDCCSSDLTPS(23)	PLM(3)法 / Ghimire, G.S. (2014)	重合阻害活性を確認済み(Ghimire et al. <i>Chem. Biol. Drug. Design</i> 2014)
カタレプシンE	MP9: GCPODFKVEVQVEVAEALLSALS\$PGW (29) T11: LLSGGAGAC\$VRIVDD\$DFDCG (21)	PLM(3/4)法 / Manish, M. & Kuroda, T. (2012/15)	MP9=T4IEGRGCP CIDFMVEVQVEVA EALLTALS\$PGS の5'の存在異
SOD1	peptide #1: LSLFWRER peptide #2: TSPRLSPI	PLM(2)法 / Kitamura, K. (2011)	第3の候補: peptide #3: SLENTSLT
NM23-H1	ASAC1: RRLTPSSP (8) ASAC2: IRNGPSSP (8)	PLM(2)法 / Kitamura, K. (2011)	MMV-pepELISAを構成

* : 2012以降は本プロジェクトのために、プロジェクト期間中に取得したもの。
: PLM(Progressive Library Method)法は in vitro selection を基本とし、進化的にペプチドの機能を向上させる技術 (Kitamura, K et al., *J.Mol.Biol.* 2009)

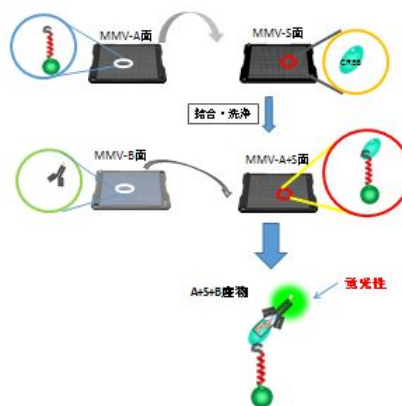


図5. MMV-pepELISA.

MMV-A、-B、-Sの3つのMMVそれぞれに、1次ペプチド、2次ペプチド、および試料を用意し、順次重ねて検出を行う。

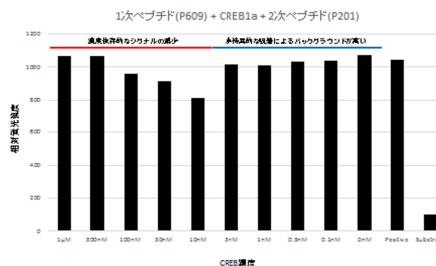


図6. 調製した pepELISA の感度テスト
MMV-A、-B、-Sのうち、S層の試料(ここではCREB1a)濃度を変えて検出限界を調べたもの。この実験から、このシステムでは10nMの感度を得られることがわかった。

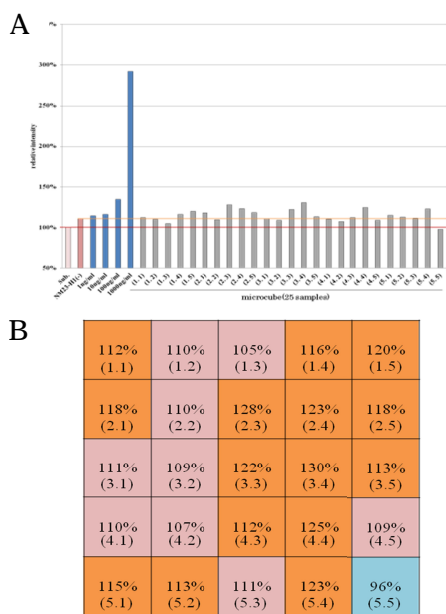


図7. セブラフィッシュ脳のNM23-H1発現テストとそのマッピング。(A:上) 定量 MMV の25画分のウエル中のNM23-H1発現レベルを定量したもの。左部分の対象試料の結果から、約1 nMの感度が認められる。一方、試料中には10nMレベルの発現が認められる。(B:下) マッピング: それぞれのmcの発現量に合わせ色づけしたもの。橙色はバックグラウンドより高いもの。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 14件)

Deepti Diwana, Yuki Masubuchi, Tatsuya Furukawa, and Koichi Nishigaki, (2016) Ordered genome change of plant and animal body cells revealed by the genome profiling method, *FEBS Lett.*(in press) (査読有)

Kawamura A, Ovara H, Ooka Y, Kinoshita H, Hoshikawa M, Nakajo K, Yokota D, Fujino Y, Higashijima S, Takada S, Yamasu K. (2016) Posterior-anterior gradient of zebrafish *hes6* expression in the presomitic mesoderm is established by the combinatorial functions of the downstream enhancer and 3'UTR. *Dev Biol.* **409**(2):543-54. (査読有)

Monai H, Ohkura M., Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J., Iwai Y, Hirase H (2016) Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. *Nature Communications*, **7**:11100 1-10 (査読有)

Sawada K, Saito S, Horiuchi-Hirose M, Sato C, Aoyama J, Kobayashi T. (2015) Brain volumetry: a quantitative approach for detecting region-specific structural abnormalities. *Congenit Anom*, **55**,71-72 (査読有)

【学会発表】(計 111件)

Koichi Nishigaki, Tatsuya Furukawa, Naoki Takeuchi, Takuto Saiki, Aya Hongo, Motoki Iwano, Yuuki Masubuchi, and Miho Suzuki, First success in selection of functional peptides using a novel concept microarray MMV - A breakthrough for cell-based screenings, 第53回日本生物物理学会年会 金沢大学角間キャンパス (石川県、金沢市) 2015年9月13日~15日(他110件)

【図書】(計 6件)

西垣功一 「分子ライブラリーの作製と高度化」(伏見謙編『進化分子工学の最前線』(2013)、総466ページ(株)エヌ・ティー・エス、(他5件)

【産業財産権】

出願状況(計 6件)

「機能性ペプチドをコードするDNAの探索方法及び機能性ペプチドの調製」発明者:西垣功一、齊木拓人、本江彩、神山諒平、鈴木美穂、北村幸一郎、権利者:埼玉大学、ジェナシス、種類:特許、番号:特願2015-17843 出願年:2015年9月10日国内外の別:国内(他5件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西垣 功一 (NISHIGAKI, Koichi)
埼玉大学 理工学研究科 教授
研究者番号: 10107378

(2)研究分担者

小林 哲也 (KOBAYASHI, Tetsuya)
埼玉大学 理工学研究科 教授
研究者番号: 00195794

弥益 恭 (YAMASU, Kyo)
埼玉大学 理工学研究科 教授
研究者番号: 60230439

中井 淳一 (NAKAI, Junichi)
埼玉大学 理工学研究科 教授
研究者番号: 80237198

大倉 正道 (OHKURA, Masamichi)
埼玉大学 理工学研究科 准教授
研究者番号: 70369172