

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650216

研究課題名(和文) 記憶形成に伴う脳内遺伝子発現変化の可視化技術基盤の開発

研究課題名(英文) 4D Gene Analysis in Functional Neuronal Circuits

研究代表者

王丹(Wang, Dan Ohtan)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：50615482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：長期記憶の形成に遺伝子発現の動員が必要であるがその動態が解明されていない。本研究は、記憶形成に伴う脳内遺伝子発現変化の可視化技術基盤の開発を目的とし、ON-OFF制御可能な新規RNAプローブを生体内への高効率・低侵襲性デリバリー法の最適化；線虫やマウスをモデル動物として用いたin vivo定量的・動的RNA計測法の確立；記憶形成に伴う遺伝子発現制御を特定の神経細胞で検出できる画期的な技術の開発を行った。本研究で確立した新規RNAイメージング法は既存技術と比較しても、RNAターゲットにおける遺伝子操作の必要がないや検出感度が高いなど記憶時のRNAイメージングに適する技術である。

研究成果の概要(英文)：De novo transcription is required for long-term plasticity and lasting memory formation. We are developing live-cell RNA imaging techniques to visualize RNA dynamics in a living and functional neuronal circuit where memory information is stored. To do so, we have delivered light-on probes into the living mouse cerebella and imaged RNA molecules at single cell level. Curiously, we have observed spatial organization of RNA molecules that are concentrated at specific intranuclear foci. We are currently optimizing the system to apply the imaging method to memory studies.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：融合基盤脳科学

キーワード：イメージング RNA 空間分布 転写 小脳

## 1. 研究開始当初の背景

長期記憶形成に伴って発現される遺伝子は数多く報告されてきたが、その同定には、脳の記憶関与部位における遺伝子群の変化を microarray などの網羅的手法が用いられてきた。しかし、このような手法は多くの細胞をサンプルに必要とするため、「平均化された」遺伝子群の変化しか解析できず、**個々の細胞に関する情報を得ることは困難**である。ところが、個々の細胞は精神・記憶活動に対してそれぞれ異なる応答を示し、「平均化された」遺伝子群の変化は**特定の神経細胞における遺伝子発現や神経回路の改変機構を反映していない**。また、記憶形成には転写後制御が盛んにかつ動的に行われることが示されているが、このような制御機構を時・空間的に評価できる実験手法を確立し、詳細を明らかにする二層に応える背景に本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究は、記憶形成に伴う脳内遺伝子発現変化の可視化技術基盤の開発を目的として設定した。そのために、ON-OFF 制御可能な新規 RNA プローブを生体内への高効率・低侵襲性デリバリー法の最適化；線虫やマウスをモデル動物として用いた *in vivo* 定量的・動的 RNA 計測法の確立；記憶形成に伴う遺伝子発現制御を特定の神経細胞で検出できる画期的な技術の開発を行うという3つのステージを順番に達成していく計画を立てられた。

## 3. 研究の方法

これまでに申請者が化学者達と共同開発してきた高特異性・高感度で RNA 検出可能な蛍光プローブを用い (Wang et al., 2011; Ikeda, Wang et al., 2011a, b, c) RNA 検出技術をより発展させ、***in vivo* 脳で単一細胞レベルでの RNA 制御の可視化に**焦点を当てた。モデル系として生きたマウスの小脳を用い、光化学と分子生物学実験をハイブリッドさせることによって、**RNA の「時・空間」制御を生きた組織で観察、計測**ができる蛍光イメージング手法を開発した。具体的には4項目について研究を進め、以下の成果が得られた。

## 4. 研究成果

4-1. プローブの安定性や合成の簡易さについて改良が行われた (Okamoto et al., *Org Biomol Chem*, 2012)。

4-2. 生体内への高効率、低侵襲性のデリバリー法を樹立した。一般的に DNA/RNA オリゴの生体内への導入は血液の循環システムを利用する。しかし、この方法で導入された核酸オリゴは脳内に到達できないので、本研究では、発生生物分野で普及した *in vivo* electroporation (電気穿孔法)を導入して

麻酔したマウスの小脳へプローブを導入した。この場合、プローブは>30%の確率で顆粒細胞への導入ができた。この確率はセルラインで樹立した導入法に及ばないが、電気穿孔法で DNA を導入した場合よりは高い。

4-3. *in vivo* ラベルの正確さ、ターゲット RNA に対する機能の影響、導入された細胞への悪影響を検討した。ターゲット RNA の発現レベルや機能を定量的に確認したところ、いずれにおいても障害が認められなかった。つまり、プローブによるターゲット RNA の機能障害がない。さらに、生体内での RNA labeling 実験データを解釈するためにラベリングの正確さは蛍光が発せられる場所とターゲット RNA が存在すべき場所と一致した観察結果から示唆された。

本研究で確立した新規生体内 RNA イメージング法を記載した論文は現在投稿中である。世界的にみても、生体内あるいは組織における1細胞の RNA イメージング技術が極めて少ない。本研究は既存する RNA ライブイメージング技術と比較しても、いくつかの優位性が挙げられる。1. ターゲット RNA にラグなどをつける必要がない。したがって、タグによる予期せぬ影響やつけるに必要な実験ステップの必要がない；2. S/N 比が高い。プローブの消光効果によって、ノイズが大幅に軽減されている。3. 簡単にほかの動物モデルや違う種類の RNA 分子へ汎用できる。4. 発光のスイッチオン時間が短く、発光が長く持続する。5. 導入細胞における細胞毒性が低い(ない)。

神経活動を測定する手法は今までに開発されているが、*in vivo* 内在性 RNA 制御をイメージングする手法は神経科学に止まらず皆無であることを強調したい。現状の神経科学の分野においては、**複雑な神経回路での遺伝子発現解析が非常に困難な**ことが問題となっている。申請者は本研究で樹立した RNA イメージング法を用いてアメフラシ由来の感覚細胞-運動細胞神経回路で記憶関連遺伝子 *sensorin* の検出を試みたところ、プローブのターゲット認識の特異性が認められなかった。つまり、ターゲット RNA 以外の分子に反応してプローブが光り出すことが観察された。正確にターゲット遺伝子を検出するためにより高い S/N 比が要求されることが明らかになった。

今後の研究の方向性としては、学習に伴い発現が変化する遺伝子ターゲットを認識するプローブを複数種類作成して線虫やマウスの神経回路で検出特異性や効率について検証していく予定である。本研究は光化学に立脚した最新鋭のプローブ技術を明確な神経回路における特定した神経細胞で可視化するという斬新なアプローチで今まで極

めて困難とされてきた技術の実現に着実に近づいたが、記憶に関わる RNA 可視化基盤技術として、実用するためにはシステムの最適化が必要であることも明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Wang DO and Akimitsu Okamoto "ECHO probes: fluorescence emission control for nucleic acid imaging". Journal of Photochemistry and Photobiology, C: Photochemistry Reviews 13(2): 112-123 (2012)

Okamoto A, Sugizaki K, Yuki M, Yanagisawa H, Ikeda S, Sueoka T, Hayashi G, Wang DO. "A nucleic acid probe labeled with desmethyl thiazole orange: a new type of hybridization-sensitive fluorescent oligonucleotide for live-cell RNA imaging." Org Biomol Chem 11(2): 362-71 (2013)

[学会発表](計 12 件)

**2012.4** "RNA Regulation in Space and Time" Dan Ohtan Wang. CLS-iCeMS Joint Symposium in Beijing, China

**2012.6** "In vivo RNA Imaging with Hybridization-sensitive Fluorescent Oligonucleotide Probes" Dan Ohtan Wang. The 22nd CDB Meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II", 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター(神戸市)

**2012.9** 「ECHO プローブによる細胞内 RNA イメージング」林 剛介、池田 修司、王 丹、杉崎 香織、末岡 拓馬、岡本 晃充. 第6回 バイオ関連化学シンポジウム

**2012.9** "シナプス可塑性に關与する空間的遺伝子制御/Spatial gene expression in neurons during long-term neuronal", 第35回日本神経科学大会

**2012.11** "Imaging Spatiotemporal RNA Regulation with Photochemical Probes". Dan Ohtan Wang. 6th Annual Symposium on Nanobiotechnology

**2012.11** "Live-cell RNA imaging through advanced ECHO probes" 岡本晃充 第39回国際核酸化学シンポジウム

**2012.12** "Imaging Spatiotemporal RNA Regulation with Photochemical Probes" Dan Ohtan Wang 第35回 日本分子生物学会年

会

**2013.2** "Imaging Spatiotemporal RNA Regulation with Photochemical Probes" Dan Ohtan Wang. Stem Cell Australia Joint Symposium.

**2013.3** 「核酸プローブを駆使した生体内 RNA 時空間制御の蛍光イメージング」王丹・平野明日香・大本育美・梅島宏樹・見学美根子・下郡智美・岡本晃充 日本化学会第93回春季年会

**2013.3** "Imaging Spatiotemporal RNA Regulation with Photochemical Probes" Dan Ohtan Wang. RSC-iCeMS International Symposium

**2013.7** "RNA Imaging in Living Tissues with Excitation-controlled Fluorescent Probes" Dan Ohtan Wang. 10th International Conference on Intracellular RNA Localization and Localized Translation

**2013.9** "Live-cell Imaging of Endogenous RNA with Exciton-controlled Hybridization-sensitive Fluorescent Probes", Ikumi Oomoto, Asuka Hirano, Hiroki Umeshima, Mineko Kengaku, Akimitsu Okamoto, Tomomi Shimogori, Dan Ohtan Wang 15th annual meeting of RNA society

**2014.3** "Mesoscopic Regulation of RNA dynamics in Neurons", Dan Ohtan Wang. RIKEN WiSE UP Symposium

[その他]

ホームページ等

[http://www.ohtan.icems.kyoto-u.ac.jp/?page\\_id=10](http://www.ohtan.icems.kyoto-u.ac.jp/?page_id=10)

<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/e/pp1/grp/wang.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

王 丹 (おう たん)

研究者番号：50615482

##### (2) 研究分担者

該当 なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

岡本 晃充 (おかもとあきみつ)

研究者番号：60314233

杉 拓磨 (すぎ たくま)

研究者番号: 25840124