

研究課題別評価書

1. 研究課題名

記憶形成の脳内イメージング

2. 氏名

石本 哲也

3. 研究のねらい

記憶の分子メカニズムが、培養神経細胞や脳スライスを用いた実験でだんだん明らかになってきた。しかし神経伝達物質受容体や転写因子など、シナプス可塑性に関連すると考えられる分子の挙動や、それらによって引き起こされる長期増強現象と、個体レベルでの記憶形成の連関が直接証明されているとは言いにくい。その原因は、生きたマウスを用いた実験では、内部の特定の蛋白質の挙動を捕らえることが、今まで不可能だったからである。本構想では神経活動に関係の深い蛋白質の挙動を、生体内で発光を用いて捉えるプローブ蛋白質を開発する。対象となるのは、神経活動に依存した蛋白質同士の結合や、蛋白質の構造変化などである。プローブ完成後、トランスジェニックマウスを作成する。得られたトランスジェニックマウスを用い、生きたマウスの記憶形成を観察しつつ、同時に脳内の特定の蛋白質の挙動を計測する方法を確立することを目標としている。目標の達成により、記憶のメカニズムの解明に向けた、有用な手段となることが期待される。

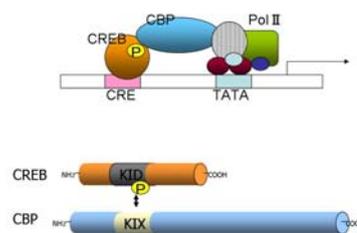
4. 研究成果

(1) CREB 活性化を計測するためのプローブ蛋白質作成

CREB (cAMP response element binding protein) はシナプス可塑性に深く関わっているとされる転写因子である。長期記憶が形成される際には CREB によって、必要な遺伝子の発現が誘導されると考えられている。神経活動など CREB を活性化する刺激は、CREB のリン酸化を誘導し、CBP (CREB binding protein) との結合を介して、CRE 配列の下流の遺伝子発現を増強させる。CREB と CBP の結合ドメインは同定されており、それぞれ KID, KIX ドメインと呼ばれている。

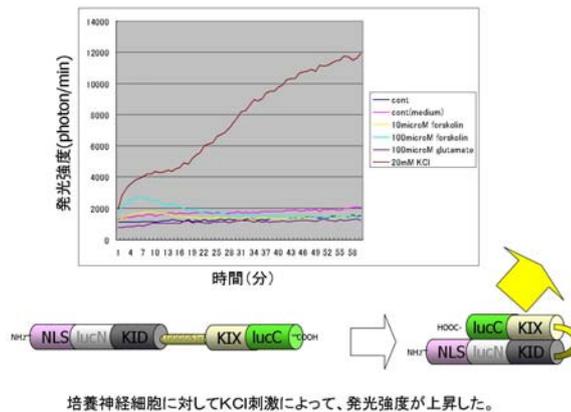
今回、この CREB の活性化を発光で検知するため、スプリットルシフェラーゼといわれる手法を用いた。ルシフェラーゼはホタルにおいて発現している発光蛋白質であるが、スプリットルシフェラーゼでは、その蛋白質を N 末端側ポリペプチドと C 末端側ポリペプチドに分離させることで発光能をなくしている。これら発光能のないポリペプチドを、あらかじめ結合することがわかっている蛋白質 A, B と融合させ、細胞内に発現させると、蛋白質 A, B の結合依存的に、N 末端と C 末端のスプリットルシフェラーゼが会合し、ルシフェラーゼとしての活性を回復する。

この原理を、KID ドメインと KIX ドメインの結合の計測に応用することを試みた。今回まず試したのは、N 末端と C 末端のルシフェラーゼの間に KID, KIX のドメインを挿入し、KID, KIX 間をリンカーで接続したものである。KID と KIX の位置関係やリンカー配列など条件を変えつつ、細胞株を用いてスクリーニングを行った。スクリーニングは、細胞内の cAMP 量を上昇させるフォルスコリン添加に対して、発光上昇を示すかどうかを指標とした。その結果、一つのコンストラクトを候補として得た。この融合蛋白質を、培養した海馬神経細胞に発現させ、フロンカウンターでリアルタイム観察しつつ、培地中へ KCl を添加し、神経細胞を脱分極刺激させることで、発光量が上昇することが観察された。つまり、神経細胞の興奮に応じて発光が上昇する蛋白質を作ること成功した。



KIDがリン酸化され、KIXに結合し、転写を促進することが知られている。シナプス可塑性、記憶形成に重要なことが報告されている。

この発光上昇は、KID と KIX が結合することで、ルシフェラーゼの活性が上昇したことによると考えられる。今現在、課題となっているのは、この発光上昇率が安定しないことと、発光量にばらつきがあることである。これは神経細胞に対する遺伝子導入の不安定さが関係していると考えられるので、ウイルスベクターなどの使用することで解決できる可能性がある。また、今回観察された発光上昇は KCl 刺激後数十分で観察されたが、これは、刺激後数分で誘導される CREB のリン酸化と数時間かけて誘導される CRE 配列依存的転写との中間に当たり、時間的なつじつまがあう。

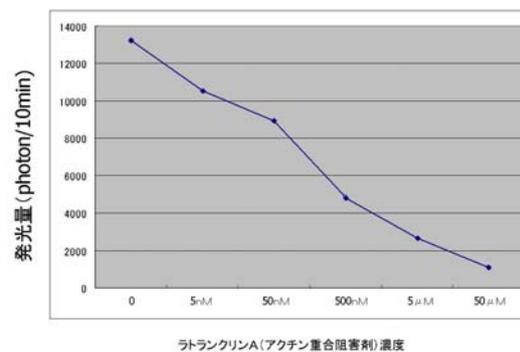
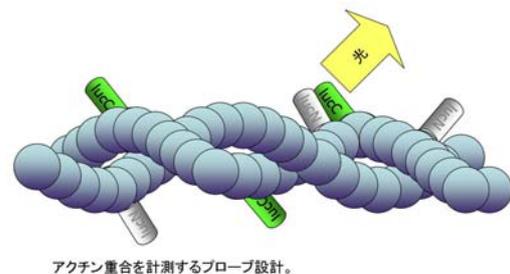


なお、1 分子型のプローブ蛋白質以外に、2 分子型スプリットルシフェラーゼも設計し、KID、KIX の結合が発光で計測できることも確認した。この蛋白質では発光量が 1 分子型に比べ少ないため、培養神経細胞で発現させ、リアルタイムで観察することは現時点では困難であるが、HEK293 細胞に発現させた場合、フォルスコリン刺激に対して発光の上昇を示す。

(2) アクチン重合を計測するためのプローブ蛋白質設計

アクチンは細胞骨格を形成する蛋白質で、さまざまな細胞で発現している。神経細胞においては、特にスパインと呼ばれる構造に集積していることが知られ、そこでの重合、脱重合がシナプスの活動に深く関わっていることがわかっている。このアクチンの重合、脱重合を計測することは神経研究のみならず、他の組織や細胞の研究を行ううえでも、有用な実験手法となりうる。今回スプリットルシフェラーゼを用いて、アクチンの重合を計測するプローブ蛋白質の作成を試みた。

アクチンに、ルシフェラーゼの N 末端もしくは C 末端を融合させた蛋白質を設計し、それぞれ異なる組み合わせで HEK293 細胞に遺伝子導入した。内在性のアクチン重合体中に、発現させたスプリットルシフェラーゼとの融合蛋白質が取り込まれる場合、ある確率でスプリットルシフェラーゼの N 末端と C 末端が会合することが起きうと考えられる。すなわちこれらの融合蛋白質が、重合アクチンの中に取り込まれることで、重合の度合いに応じて発光強度が変化することが期待される。それらの細胞の発光強度を光子カウンターで計測することで、最も効率よく発光する組み合わせを探索した結果、アクチンの N 末端側に、ルシフェラーゼの N 末端、C 末端をそれぞれ融合させた組み合わせが、最も発光強度が高いことがわかった。また、このプローブ蛋白質を発現させた状態で、アクチンの重合阻害剤であるラトランクリン A を培地中に添加すると、濃度依存的に発光強度が弱まっていくことが確認された。このことは、今回設計したプローブ蛋白質が アクチンの重合を計測できることを示している。また、ラトランクリン A を培地中に加えることで、単量体のアクチンの量が変化しないことも確かめられている。



本構想では、トランスジェニックマウス作成を念頭においており、アクチンに関してもトランスジェニックマウス作成を予定している。その際、2 つのアクチンプローブを同時に発現させる必要があるため、IRES 配列を用いて両者のコーディン

グ領域を接続したプラスミドを構築し、HEK293 細胞で発現させた。発現した蛋白質はプローブとして正常に機能したため、この配列を基にしてトランスジェニック作成用ベクターの構築を行う予定である。

(3)トランスジェニックマウス作成

CREB 活性化計測用のプローブを用いて、トランスジェニックマウス作成を試みたが、現在までにプローブ蛋白質を発現しているマウスは得られていない。サザンブロット法でゲノム DNA を解析すると、トランスジーンがゲノムに挿入されていることは確認できるので、何らかの転写抑制がかかっているものと考えられる。現在、引き続きトランスジェニックマウス作成を行っている。

5. 自己評価

当初の目標であったトランスジェニックマウスでの実験を行う段階まではたどり着けなかった。これは最初に要素技術として使用する計画だった、一本鎖可変領域抗体がうまく得られず、プローブ蛋白質の作成が遅れたことが大きな原因の一つである。その後一本鎖可変領域抗体の作成をあきらめ、天然に存在する蛋白質の配列とルシフェラーゼの配列を用いてプローブ蛋白質の開発を行った。その結果、CREB の活性化、アクチン重合を計測できるプローブを作ることができた。ようやく当初の計画の第一段階が終了し、トランスジェニックマウス作成に取り掛かかっている状態である。これは当初の目標と比べて 50%程度の達成率であると判断する。今後特許申請も終えたので、学会発表や論文投稿を積極的に行っていきたい。

6. 研究総括の見解

脳内イメージングという大変チャレンジングな研究課題であり、困難な問題に遭遇することが予想された。事実要素技術の一つの達成に難渋し途中で変更を余儀なくされた。しかしながら、イメージング用スプリットルシフェラーゼを用いてシナプス可塑性にかかわる転写因子である CREB の活性化やスパインに集積しているアクチンの重合を計測出来るプローブまでは出来た。目的としていた記憶すると脳が光るマウスの作製にはまだ距離があるが、トランスジェニックマウスの作製に成功していただきたい。今後とも粘り強く頑張っていきたい。

7. 主な論文等

(A)さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表 なし

(2)特許出願

・発明者:石本哲也、森寿、和泉宏謙

発明の名称:記憶形成の神経活動を可視化するプローブ(出願公開前)

出願人:富山大学

出願日:平成 20 年 8 月 12 日

(3)学会発表

学会発表(国内)

・石本哲也、和泉宏謙、小澤岳昌、森寿、“スプリットルシフェラーゼを用いたアクチン重合の検出”、日本薬理学会第82回年会(2009/3/16-18)

(B)その他の主な成果 なし