

生きた脳組織における RNA 計測イメージングの開発

京都大学物質-細胞統合システム拠点 拠点特定准教授
王 丹

1. はじめに

私たちは生涯を通して日々の経験から学習して一人一人違う人間に成長していく。学習にともなう脳内の神経ネットワークにおける構造的、機能的な変化は、活動依存的に起こり、高度に組織化された遺伝子間の発現調節によって触媒されている。つまり、神経機能の発揮、脳の発達や学習・記憶形成などには、様々な環境要因に応答した精密な遺伝子発現制御が必須である。これまでの先行研究では、記憶の形成に伴い細胞内でRNA及びタンパク質が新規に合成されることが明らかになってきたが、それらがどのように誘起され、神経機能調節をどのようにして行うか明らかにされていないため、その解明には新規イメージング技術の開発が必要である。

従来のRNAライブイメージング法では、ノイズの高さや検出感度などの問題から、脳組織内の生細胞における目的RNAの可視化が困難であった。そのため、RNAが体内でどのように振る舞い、どのように神経機能調節を行うか明らかにできず、「RNA」と「記憶」の間には大きなギャップが存在していた。申請者らは世界さきがけてシナプスでの翻訳および長期記憶形成をイメージングし、遺伝子情報を活用した記憶情報の時・空間制御が重要かつ可能なことを示した(Wang et al., Science, 2009)。本申請課題で「生きた」脳で「1細胞」でのRNAの振舞を観察するイメージングツールを構築し、「学習」と「ゲノム」の相互作用によって長期記憶や脳の個性形成などが形成される神経回路可塑性の仕組みを解明するために、空間および時間の中で神経回路の中での遺伝子発現がどのように制御されているかを測定する。つまり、生きた脳組織におけるRNA計測イメージングの開発を通して、運動学習に伴う神経細胞内のRNAのダイナミックな発現変化および局在変化を生体内で細胞集団レベル、一細胞レベルのマクロ視点とミクロ視点両方で定量的に追跡・計測し、学習と関連付けたRNA発現パターンの動態解析を行うことで、記憶形成の分子メカニズムの解明を目指す。その目標のために、以下の研究計画を立て実施した。

- (1) 運動学習時における脳内 RNA 蛍光測定のシステムを構築する。
- (2) 神経細胞における RNA のライブ蛍光測定をするためのプローブ導入システムを構築する。
- (3) 項目 1, 2 を基に、運動学習時活動依存的な RNA 発現変化を測定する。

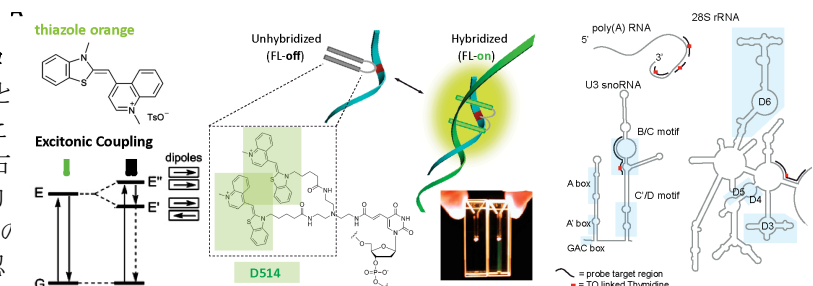
2. 方法

近年、我々は光化学に立脚した新規分子デザイン消光型核酸プローブを用いて、生きた細胞におけるRNAの発現パターン変化のライブイメージング方法を開発してきた(Wang et al., RNA, 2012, Wang and Okamoto, Methods Mol. Biol., 2015, Sato et al., 2015, Oomoto et al., 2015)。さらに、市販のviewFISH増幅型プローブを用いて、1分子マイクロRNAの細胞内での検出を試み成功している (Goldie BJ, 2017)。

本研究課題では、これまでに開発したRNA蛍光プローブを直接成体マウス脳の大脳皮質に導入することと、京都大学医学研究科林康紀先生のご協力で林研究室に設置されている2光子蛍光顕微鏡システムとVRN (Virtual Reality Navigation)を用いたマウスの運動学習のシステムで観察する実験系を駆使することで、運動学習時におけるRNAのライブ計測イメージングシステムの構築を試みた。こちらのVRNシステムでは、マウスが目の前に設置されたスクリーンに投影された迷路を見ながら、迷路と連動するローラーを足で転がして運動学習を行うものである。

3. 結果 研究成果

3-1. 本研究課題で作製されたプローブに用いる色素 (Thiazole Orange) と消光原理および本研究で作成されたRNA特異的に認識するプローブ例 (右図1)。ターゲットRNAを配列特異的に認識して発光することを試験管での蛍光測定(514ナノメートル励起)で確認してから生体内に導入する。



3-2. 運動学習時における脳内 RNA 蛍光測定システムの構築した。

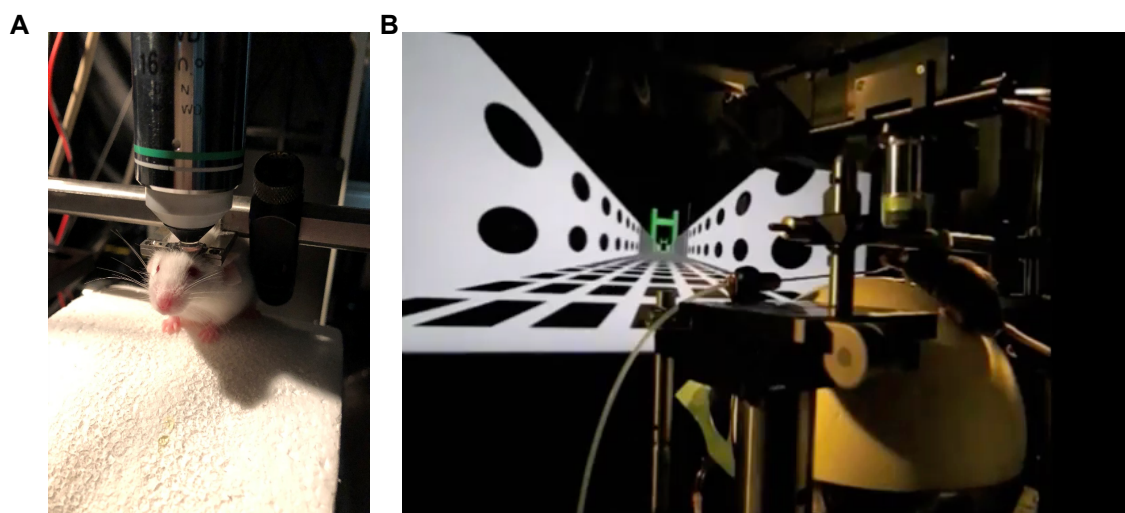


図 2 本研究課題で構築した運動学習時における脳内 RNA 蛍光測定システム。A. 生後 3-6 週間のマウス脳に手術でプローブを導入した後に、レンズの直下に頭部を固定し、運動しながら蛍光測定をする装置設定。B. マウス用仮想現実空間セット（マウスの前に設置したスクリーンに迷路ナビゲーション投影の様子）。

3-3. 神経細胞における RNA のライブ蛍光測定をするためのプローブ導入システムを構築した。

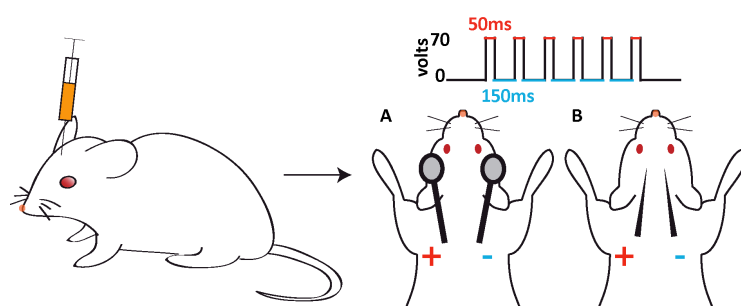
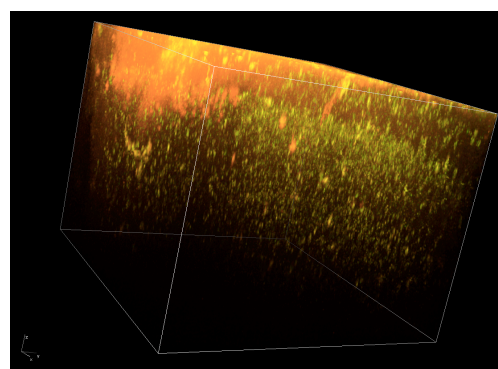


図 3 生きたマウス脳へのプローブ導入方法。ECHO プローブを麻酔下のマウス脳内に注射した後、ピンセット型電極を使用 (A) もしくは細い白金電極を脳に挿して (B) in vivo エレクトロポレーションを行い、細胞内にプローブを導入した。

図 4 学習マウス脳での RNA イメージング実験の様子。A. 2 光子共焦点顕微鏡を用いたイメージング実験の様子。B. ECHO プローブを使用して観察された生きた脳内での mRNA。C. 2 光子共焦点顕微鏡を用いて得られた三次元画像。標識された RNA はオレンジ色で示されている。赤色のシグナルは手術野を固定したデンタルセメントの自家蛍光。



4. 考察

本研究課題で当初予定していた実験項目を全て実行し、消光型 RNA プローブを生きたマウス成体脳に導入することに成功したとともに、仮想空間 VRN による運動学習時におけるマウス脳内 RNA 蛍光測定システムを構築することに成功した。今後、学習による遺伝子発現の誘導および神経機能調節のメカニズムを明らかにするために学習時におけるマウス脳内 RNA イメージング法の開発を引き続き完成を目指したい。そのために、カルシウムイメージングなど神経の発火などの活性マーカーとの同時観測ができるシステムを構築し、「環境-遺伝子の相互作用」を蛍光イメージングで測定し明らかにする。

5. 発表論文、参考文献

Wang DO, Hitomi Matsuno, Shuji Ikeda, Hiroyuki Yanagisawa, Yasunori Hayashi, and Akimitsu Okamoto. A quick and simple FISH protocol with hybridization-sensitive fluorescent linear oligodeoxynucleotide probes. *RNA* (2012) Jan;18(1):166-75

Wang DO, Okamoto A. Visualization of nucleic acids with synthetic exciton-controlled fluorescent oligonucleotide probes. *Methods Mol Biol.* 2015; 1262:69-87

Oomoto I, Hirano-Suzuki A, Umeshima H, Han YW, Yanagisawa H, Carlton P, Harada Y, Kengaku M, Okamoto A, Shimogori T, and Wang DO. ECHO-liveFISH: in vivo RNA Labeling Reveals Dynamic Regulation of Nuclear RNA Foci in Living Tissues. *Nucl Acids. Res* doi:10.1093/nar/gkv614 (2015)