

光によるシナプス機能マッピング技術の開発

Optical inactivation of synaptic molecules by chromophore-assisted light inactivation

(日本神経科学学会推薦)

代表研究者 三重大学 竹本 研 Mie University Kiwamu Takemoto

Acute inactivation of synaptic molecules *in vivo* with spatio-temporal precision should be a powerful tool to understand their roles in cognitive functions. Among many molecules in synaptic function, AMPA type glutamate receptor is an especially known as important molecules for memory acquisition which is delivered into synapses in response to many types of learning and experience. The CALI method is a promising technique to induce the localized and acute inactivation of target molecules by using photosensitizers that generates reactive oxygen species in a light-dependent manner. We have developed elemental technologies for the CALI and established methods for molecular analysis at various levels from *in vitro* to *in vivo* (Takemoto K et al. *ACS.Chem.Biol.* 2011, Takemoto K et al. *Sci. Rep.* 2013 etc.). In addition, we have been analyzing the mechanism of learning and memory through manipulation of GluA1 homomeric AMPA receptors using the CALI technology (Takemoto K et al. *Nat. Biotechnol.* 2017, Trusel M et al. *Neuron* 2019). Here, we report new CALI method to inactivate other AMPA receptors, GluA2/3. Our optical technology will permit their physiological roles in memory acquisition and formation to be analyzed with high spatio-temporal resolution, such as individual spines, and ultimately enable us to map out “the functional synapses” in memory system.

研究目的

動物はいかにして記憶を維持するのだろうか？興奮性シナプス活動に重要な AMPA 受容体には、GluA1~4 サブユニットが存在する。成体の海馬ではこれらが組み合わさり、GluA1/1 (GluA1 ホモマー)・GluA1/2・GluA2/3 複合体が発現する。中でも GluA1 を含む複合体は神経活動依存的にシナプスに移行し機能するが、GluA2/3 は恒常的に存在する (Takahashi T et al. *Science* 2003 等)。さらに、*in vitro* では長期増強誘導後に GluA1 ホモマーと GluA1/2 がまずシナプスへ移行し、その後 GluA2/3 に置き換わることから、GluA1 ホモマー・GluA1/2 が記憶の獲得、GluA2/3 が記憶の維持を行うとの仮説が立てられた (Malinow R et al. *Curr Opin Neurobiol.* 2000 等)。申請者の所属研究室ではこれまでに、AMPA 受容体の迅速な光不活性化技術の開発や機能解析を進めてきた。他のグルー

プからは、AMPA 受容体の光不活性化化合物 ANQX が報告されたが (England PM et al. *Sci. STKE* 2006)、*in vivo* での使用実績はなく、その他の AMPA 受容体にも結合する CNQX を元にした薬剤であるため複合体特異性は低いと示唆される。さらにこれまでに多数の AMPA 受容体欠損マウスが作製されたが、遺伝子相補が原因で表現系の解釈に困る場合が非常に多い (Jia et al. *Neuron* 1996 等)。また遺伝子改変技術では迅速な機能阻害が難しく、本研究目的の達成には不向きと考えられた。よって従来法では、そもそも記憶の獲得が出来ないのか？維持が出来ないのか？という重要なポイントを区別して解析することは極めて困難であった。即ち今後の記憶研究には、シナプス～脳領域レベルのマルチスケールにおいて、局所かつ迅速に AMPA 受容体を不活性化する操作的手法が重要であると考えられた。

CALI 法 (chromophore-assisted light inactivation) とは、光でタンパク質分子を局所かつ任意のタイミングで不活性化する、光操作技術の一つである。CALI 法は 30 年以上前に開発された、いわば古典的な手法であるものの、初期の技術は不活性化効率の低さや技術導入の難しさから普及は進んでいなかった。一方で近年、高効率かつ簡便に CALI 法を利用できる様々な要素技術が整備されるとその有用性が見直され、光操作技術として再び普及しつつある。CALI 法では、光照射に応じて活性酸素種 (ROS) を産生する光増感剤が重要である。例えば、標的タンパク質に対する抗体をイソチオシアネート等の反応基が付加された光増感剤で化学標識する。次に、標識された抗体と標的タンパク質を反応後、光を照射し光増感剤から活性酸素を発生させる。この時、活性酸素が標的タンパク質を攻撃し、標的タンパク質は酸化により立体構造が破壊され、その結果分子の不活性化が起こる。ここでの活性酸素の拡散半径は非常に短いため (一重項酸素で約 3-4 nm)、標的分子の特異的な不活性化が期待できる。従って、光増感剤と標的分子の間の距離や方向といった、相対的な位置関係は、CALI の特異性や分子不活性化効率に重要な要素と考えられる。このことから CALI 実験を効果的に行うためには、まずは光増感剤を標的分子の近傍に配置することが重要である。もちろん酸化されると立体構造が壊れるアミノ酸残基の近傍であれば良いが、そのアミノ酸残基は多くの場合予測不可能である。従って現状では、次項に示す方法を用いて光増感剤を標的分子の近傍に配置し、CALI が可能かを個々に確認する必要がある。

光増感剤を標的分子の近傍に配置するには、抗体を化学的に光増感剤で標識する方法と、遺伝子的にコード化された「光増感タンパク質」を標的分子と融合・発現させる方法がある。前者の方法は、細胞内分子への適用はマイクロインジェクションが必要となり簡易的な実験は難しいが、内因性の膜表面分子をターゲットにできるという大きな利点がある。後者は、抗体を必要としないため CALI 実験が容易であるが、内在性分子に適用するためには光増感タンパクの遺伝子ノックインが必要である。いずれの場合でも、光増感剤と標的分子の相対的な位置関係を自在に制御することは困難である。そこで CALI の効率や特異性は、個々の実験において例えば標的分子と局在が同じ他のタンパク質は機能破壊されてい

ないか等の陰性対照実験や、標的分子の変異細胞あるいはそのレスキュー実験などにより確認する必要がある。

申請者は最近、モノクローナル抗体を用いた CALI 法を AMPA 受容体に適用し、シナプス性 AMPA 受容体 GluA1/1 ホモマーをエオシン CALI 法により光で acute かつ複合体特異的に光不活化する新技術の開発に成功し、*in vivo* において海馬恐怖記憶の消去に成功した (Takemoto K et al, *Nat. Biotechnol.* 2017)。さらに *in vivo* の CALI 解析と行動科学実験により、GluA1 ホモマーは記憶の獲得に機能することを見出した。本手法は、AMPA 受容体において複合体特異的な光不活化操作が可能な新技術であり、次世代の脳機能解析法としても注目された (Humeau Y et al. *Nat. Neurosci.* 2019, Frank JA et al. *Nat. Biotechnol.* 2019 等)。そこでこの特性を生かし、AMPA 受容体の各複合体を特異的に不活性化する技術を揃えることができれば、これまで困難であった記憶解析・シナプス解析が詳細に可能になると期待される。そこで本研究ではこれまでの研究を元に、GluA2/3 複合体を CALI 法により迅速かつ特異的に光不活化する革新的光操作技術の開発を進める。本技術が実現すれば、GluA1 ホモマー CALI 法で操作可能となった活性化したシナプスに加えて、定常状態のシナプス活動をマッピング解析できることになり、シナプス~脳領域レベルのマルチスケールで AMPA 受容体を介したシナプスマッピング解析を行う技術が初めて実現すると期待できる。

研究経過

我々のこれまでの研究で、あるシナプス分子に対してペプチド抗体を取得したが、**native** な分子を認識する特異性の高い抗体は得ることができなかった。従って標的分子の配列の一部を免役して得るペプチド抗体では、標的分子の立体構造を認識する抗体の取得が難しいことがわかっている。よって CALI 実験に必要な、**native** な標的分子を認識する抗体の取得には、ペプチド抗体は不向きと言える。そこで本研究では、**native** な GluA3 に対する抗体の取得を目指し、DNA 免疫法によるモノクローナル抗体の取得を進めた。

DNA 免疫法では、標的分子の cDNA をクローニングした発現ベクターを、ジーンガン等で免疫動物の筋細胞や線維芽細胞に標的分子を発現し免疫する。

導入された細胞で発現した標的分子が細胞表面分子の場合、その細胞外領域が液性免疫を惹起する。すなわち DNA 免疫法を用いることで、native な標的分子の細胞外領域に対する抗体を多数取得できる。我々はこのストラテジーにより、抗体価が十分に高いモノクローナル抗体として 78 種類を取得し、FACS によるスクリーニングの結果、native な GluA3 を認識する候補抗体として 25 種類の陽性抗体を取得した。今回の抗体のエピトープである GluA3 の細胞外ドメインは、GluA1 や GluA2 といった他の AMPA 受容体と一部の領域で一定の相同性があり、取得した抗体が GluA3 以外も認識する可能性もある。そこで各抗体を用いて、GluA1-3 をそれぞれ発現する CHO 細胞を生細胞染色したところ、25 種類中 11 種類が GluA3 を特異的に認識できることが分かった。

次にこれら 11 種類の中で、抗体産生量が十分高く今後の実験に支障がないと示唆された 9 種類のモノクローナル抗体を対象に、CALI 効率を検討した。まず各抗体をエオシンイソチオシアネートにて標識し、GluA2/3 発現 CHO 細胞において CALI が可能なモノクローナル抗体の同定を行った。ここではグルタミン酸を添加して検出される GluA2/3 由来の AMPA 電流に関し、光照射前後での AMPA 電流を比較し、CALI 効率を算出した。その結果、11 種類の抗体候補の中から CALI 効率が最も高い 2 種類のモノクローナル抗体の取得に成功した。以下では、この内一種類について実験を進めた。

CALI 法の技術開発においては、機能破壊の分子特異性を示すことが重要である。今回の標的分子である GluA3 (GluA2/3) は、シナプス膜表面に発現し機能する。また一般的に抗体は細胞内に透過しないことから、今回の場合 CALI の標的となるのはシナプス表面に提示された GluA2/3 であると期待できる。そこでまず、海馬初代培養ニューロンのシナプスにおいて、同じくシナプス表面で機能する NMDA 受容体を陰性対照に CALI の分子特異性を電気生理学的に評価した。ここでは CALI が可能なモノクローナル抗体のスクリーニングと同様に、光照射の前後においてグルタミン酸電流を比較解析することで本抗体の CALI 効率を算出した。その結果、本抗体は陰性対照の NMDA 受容体を機能破壊することなく GluA2/3 を分子特異的に機能破壊できることを見出した。

他方 AMPA 受容体には、GluA3 以外にも GluA1・

2 といったサブユニットが発現している。生体の海馬では、こうした 3 種類のサブユニットが組み合わさることで、GluA1/1・GluA1/2・GluA2/3 といった 3 種類の複合体が発現する。本抗体を用いた CALI 法が GluA2/3 に特異的かを確認するために、海馬初代培養ニューロンにおいて miRNA を用いて GluA3 をノックダウン後、同様に CALI を行ったところ、ノックダウン細胞では CALI の効果が消失した。以上から、本抗体はシナプスにおいても GluA2/3 特異的に光不活性化が可能なことが明らかとなった。

CALI 法では、光照射により初めて分子活性が低下することが重要である。一方で、抗体の中には標的分子との結合により分子活性を抑制する、いわゆる「機能中和抗体」も存在する。そこで本抗体がそれに該当しないか確認するために、抗体の添加前後において GluA2/3 の活性が変化するかを電気生理学的に確認した。その結果、AMPA 電流値は抗体添加により変化しなかった。従って、本抗体には中和活性はないと考えられた。

本研究では、シナプス活動を光制御することを目指し、GluA2/3 分子の CALI 法の開発を進め、モノクローナル抗体のスクリーニングから、十分な特異性を有する抗体の同定に成功した。現在は、*in vivo* において CALI を行う準備を進めており、GluA2/3 の機能、特に記憶の貯蔵や維持における生理機能の解明を目指したいと考えている。

考察

以上のように多数のモノクローナル抗体から CALI 効率の高い抗体をスクリーニングすることで、*in vivo* でも効率よく受容体機能を操作し、記憶への介入が可能になった。光操作技術は光を用いるため、光学イメージングと同時に使用することができる。よって例えば pH 感受性 GFP である SEP (Super-ecliptic pHluorin) を用いて AMPA 受容体のシナプス移行を指標にシナプス可塑性を可視化することも可能である。よって今後の研究では記憶時のシナプス機能をイメージングしつつ、因果的な解析を行うといった、シナプス機能のマッピングが可能になると期待できる。これにより原理上、脳領域レベルから最小 1 シナプスにいたるまで、詳細な記憶解析が技術的に初めて可能になると期待できる。

一方本項で記したような、モノクローナル抗体の開発からスクリーニング・特異性解析に至るまでに

は、我々の研究の経験上約 1 年を要する。従って、多数のシナプス機能分子に対し、網羅的に CALI 法を開発することは、現在のところ極めて困難である。従って CALI 法における今後の課題として、開発スピードの短縮化を可能にする、要素技術の開発が重要と考えられる。モノクローナル抗体の作製と CALI が可能な抗体のスクリーニングは、多くの時間を要するが、これは CALI 効率の最適化を行っているに等しい。従って、分子ごとに抗体を作製することなく CALI 効率を迅速に最適化できる全く新しい概念の手法が開発できれば、原理上ゲノムワイドな分子の光操作が実現すると期待できる。例えば現在一年を要する CALI 法の開発時間を、原理上 2 週間程度に短縮できれば、CALI 法はより広く使用される、神経科学や細胞生物学領域における標準技術になると期待できる。我々のグループでは今後はこうしたハイスループットな技術開発を可能にする、CALI 法の要素技術の確立も進めていきたいと考えている。

研究の発表

口頭発表

1. 竹本研「光によるシナプス分子不活性化技術の開発とその応用」(第 94 回日本薬理学会シンポジウム「分子機能の操作とイメージングによる脳機能研究の新展開」、2021 年 3 月 9 日)
2. 竹本研「光による分子操作技術の開発と記憶研究への応用」(東京医科歯科大学 CBIR セミナー、2021 年 2 月 18 日)

誌上発表

1. **Takemoto K** "Optical manipulation of molecular function by chromophore-assisted light inactivation." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, 97(4):197-209, 2021