

老化動物の脳機能回復を誘導する光学技術の開発と応用

所属： 三重大学 大学院医学系研究科生化学分野

助成対象者：竹本 研

概要

老化に伴う記憶力の衰えは神経可塑性の低下が原因と考えられる。そこで、神経可塑性を人工的に低下あるいは増強することが可能になれば、老化に伴う脳機能低下のメカニズムの解明や、迅速な脳機能回復を確立できる可能性がある。本研究では、申請者がこれまで研究を進めてきた光による分子機能操作技術・CALI法を応用し、人工的に神経可塑性を制御する新技術を開発することで、将来的な老化脳の機能回復に役立つ技術基盤を確立する。本研究で開発を目指す新技術は、老化や神経変性疾患など神経可塑性に関わる研究分野において、有力な研究手法になると期待できる。

abstract

The decline in memory associated with aging is thought to be caused by a decrease in neuroplasticity. Therefore, if it becomes possible to increase neuroplasticity locally at necessary locations, it may be possible to establish a method for rapid recovery of brain function decline associated with aging. In this study, we will establish the technological basis for the future functional recovery of the aging brain by developing a new technology to artificially control neuroplasticity by applying the CALI method, a light-based molecular function manipulation technology that the applicant has been studying. The new technology that we aim to develop in this research is expected to become a powerful method in the field of research on aging and neurodegenerative diseases.

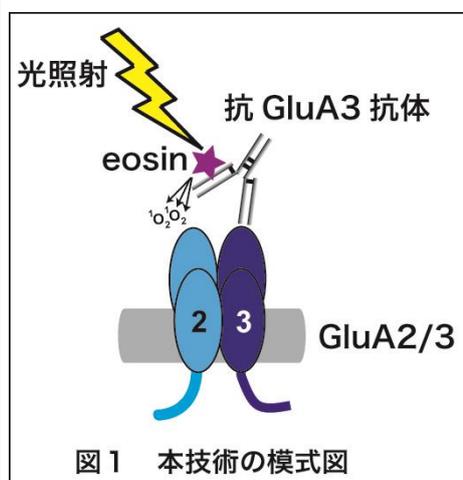
研究内容

1. 背景

学習記憶に重要な AMPA 受容体には GluA1~4 サブユニットが存在するが、成体では GluA1~3 のうち 2 種類のサブユニットが組み合わさることで 4 量体を形成し、GluA1/1・GluA1/2・GluA2/3 の 3 種の複合体が発現する。また GluA1 を含む複合体は学習・経験依存的にシナプス移行するが、GluA2/3 複合体は恒常的にシナプス移行を繰り返すことが知られている (Takahashi T et al. Science 2003 など)。我々のグループではこれまでに、GluA1/1 に対する CALI 法を開発し、GluA1/1 が記憶の獲得に機能することを見出した (Takemoto K et al. Nat. Biotechnol. 2017)。そこで本研究では GluA2/3 の CALI 法を開発し、より多くのシナプス機能を制御するための技術開発を進める。

2. 方法

CALI 法は、光照射依存的に活性酸素を放出する光増感物質を用いた分子機能不活化法である (Jay DG et al. PNAS 1988)。例えば、エオシン等の光増感物質で標識した抗体を標的分子と反応後に光照射すると、産生した活性酸素によりごく近傍の標的分子が特異的かつ迅速に酸化・不活性化される。本研究では、シナプ스에서機能する GluA2/3 を複合体特異的に光不活化するために、GluA3 の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体を取得し、その中から複合体特異的に CALI が可能な抗体のスクリーニングを行う計画を立てた (図 1)。さらに同定したモノクローナル抗体について、CALI の分子特異性などを検討した。

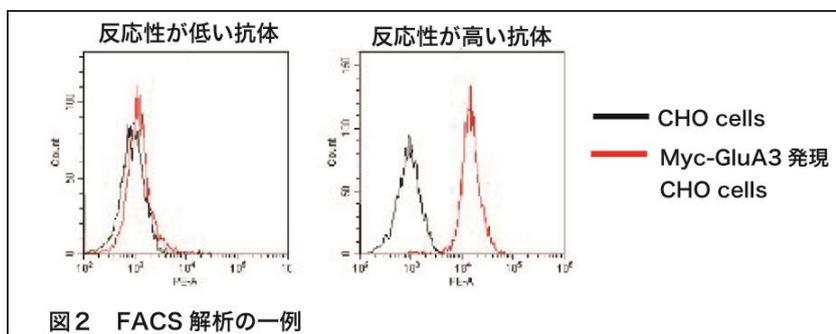


3. 結果

3-1 CALI に適したモノクローナル抗体の取得

我々のこれまでの研究から、標的分子の配列の一部を免役して得たペプチド抗体では、立体構造を認識する抗体の取得が難しく、native な分子を認識する抗体が必要な CALI 法の開発には不向きなことが分かっていた。そこで本研究では、DNA 免疫法による native な GluA3 に対する抗体の取得を進めた。その結果、抗体価が十分に高いモノクローナル抗体として 78 種類を取得でき、FACS によるスクリーニングの結果、候補抗体として 25 種類

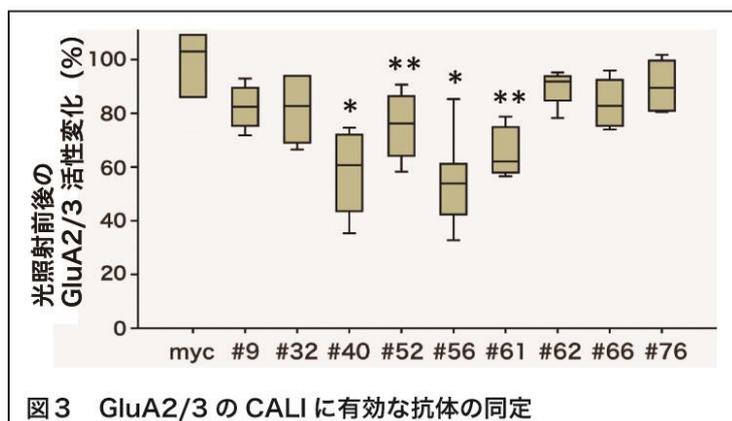
の抗体を取得した。抗体のエピトープである GluA3 の細胞外ドメインは、GluA1 や GluA2 といった他の AMPA 受容体と一定の相同性があるため、取得した抗体が GluA3 以外を認識する可能性もある。そこで各抗体で GluA1-3 をそれぞれ発現する CHO 細胞を生細胞染色



したところ、25 種類中 11 種類が GluA3 に特異的であることが分かった (図 2)。

次に 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、各抗体をエオシンでラベル化し、GluA2/3 発現 CHO 細胞において CALI が可能な抗体クローンの同定を進めた。ここではグルタミン酸を添加し



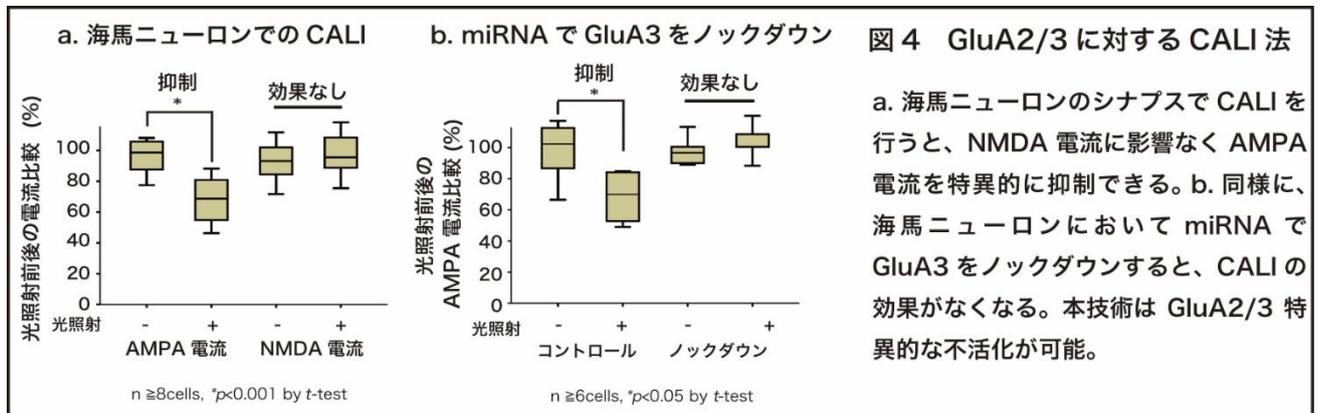
て検出される AMPA 電流に関し、光照射により AMPA 電流が抑制される抗体クローンの選択を進めた。その結果、最も CALI 効率が高いモノクローナル抗体の取得に成功した (#40 と #56、図 3)。

3-2 CALI の分子特異性に関する検証

CALI 法の開発においては、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、シナプス表面に発現し機能する分子である。また一般的に抗体は細胞内に透過しないことから、CALI の標的になるのはシナプス表面に提示された機能性の GluA3 であると考えられる。そこで海馬初代培養ニューロンのシナプスにおいて、同じくシナプスに提示される NMDA 受容体をコントロールに CALI の分子特異性の評価する実験を進めた。ここでは図 1B の #40 抗体を使用し、同様に光照射の前後においてグルタミン酸電流を比較することで CALI 効率を算出した。その結果、本抗体は局在が同じシナプス表面である 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することを見出した(図 2A)。

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ことがわかっている。そこで海馬初代培養ニューロンにおいて miRNA を用いて GluA3 をノックダウンし 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となった(図 2B)。



3-2 CALI の光照射特異性に関する検証

CALI 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「機能中和抗体」も存在する。そこで同定した # 40 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 の活性が変化しない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。

4. 本研究の考察およびまとめ

本研究では可塑性を様々な分子を通じて光制御することを目指し、GluA2/3 分子の CALI 法の開発を進めた。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 *in vivo* において CALI を行う準備を進めており、GluA2/3 の機能、特に加齢に伴う可塑性低下における機能の解明を目指したいと考えている。また本技術は性能の良いモノクローナル抗体を取得できれば、様々な細胞表面分子に適用することが可能である。今後の計画として、シナプス可塑性の制御に関わるより多くの受容体分子・膜表面分子に対する CALI 法の開発を進め、神経科学研究の発展にも貢献したい。

5. 本助成に関わる成果物

[論文・総説発表]

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**

[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、招待講演)
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、招待講演)

[ポスター発表]

1. **竹本 研**、高橋 琢哉「AMPA 受容体 GluA2/3 に対する光操作技術の開発」. *Optical inactivation of technology for GluA2/3 AMPA recepto.* (第43回日本神経科学会, Online, 2020年)

[その他]

なし