

神経可塑性操作を目指した新規光学ツールの開発

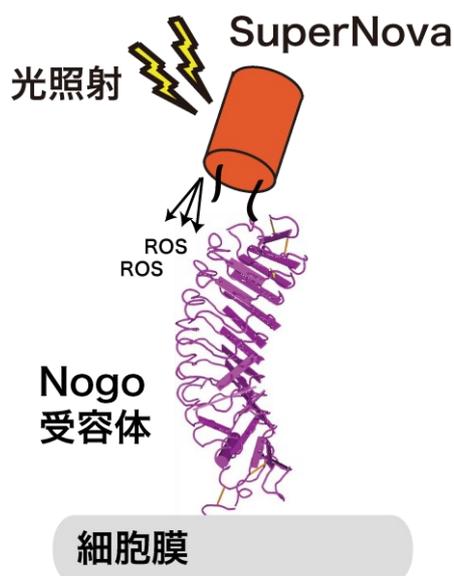
三重大学大学院医学系研究科生化学分野
竹本 研

1. 本研究の目的

神経可塑性は、学習記憶などの脳の高次機能に重要と考えられる。一般的にヒトや実験動物は老化により記憶力が低下するが、これは神経可塑性の低下が原因と示唆される。よって、もし任意の場所で迅速に神経可塑性を回復できる手法が確立できれば、老化に伴う記憶力低下からの迅速な回復が期待できる。我々はこれまでに、神経軸索の伸張を阻害するNogo受容体 (NgR1) の発現を抑制することで、通常は生後発達期に限定される大脳皮質パレル野での神経可塑性の活性化が、成体でも誘導できることを見出した (文献1参照)。この発見により、NgR1の機能を後天的に抑制することで、神経可塑性を人為的に活性化することが可能になると示唆された。そこで本研究では、申請者が開発した単量体光増感蛍光タンパク質であるSuperNovaを用いて、NgR1の機能を光で不活性化する新技術を開発し、機能が低下した脳領域において局所的に神経可塑性を活性化することで、老化動物の脳機能回復に挑戦する。本研究で得る知見は「老化脳」に加え、将来的には各種神経変性疾患における「変性脳」を回復する有効なアプローチになると期待できる。

2. 研究計画の概要

CALI法は、光照射依存的に活性酸素(ROS)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 PNAS 1988)。例えば標的分子に対する抗体をエオシン等の光増感物質でラベル化した分子に反応後に光を照射すると、産生したROSにより近傍の標的分子が酸化・不活性化される。エオシンが産生するROSは主に一重項酸素であるが、その拡散半径は約4nmであり (文献2参照)、標的分子の特異的な不活性化が期待できる。



本研究ではシナプス可塑性を抑制する分子であるNgR1をCALI法で不活性化し、狙った場所のみ可塑性を誘導する光技術の開発を計画した。本研究では光増感物質として遺伝子でコードされた光増感化合物である光増感蛍光タンパク質SuperNovaを、NgR1に融合し神経細胞に発現する。ここでは光照射によりSuperNovaから産生したROSが、近傍に存在するNgR1を酸化・不活性化するという仕組みである (右図参照)。この技術は全て遺伝子でコードされており、トランスジェニックマウスを作製することにより、簡便なシナプス可塑性操作実験が可能になると期待できる。

3. 研究の結果

1) 立体構造形成能が高い新規光増感タンパク質の開発

まずSuperNova-NgR1融合分子の発現ベクターを細胞に導入し、発現の確認を行った。ところが本融合分子では、SuperNovaの発現は免疫染色で確認できるにもかかわらずSuperNovaの蛍光がほとんど

ど観察できなかつた。つまりこの融合分子内のSuperNovaは、立体構造を形成せず恐らく分子活性を持たないものと考えられた。実はSuperNovaのような蛍光タンパク質分子では、こうした現象が特に37°Cで実験する哺乳類細胞においてしばしば問題になる。実際に我々は、細胞骨格タンパク質や転写因子など様々な分子とSuperNovaを融合し同様の実験を行ったが、多くの分子でSuperNovaの蛍光が全く観察されないか、非常に弱い蛍光しか観察されなかつた。またこれまでの研究から、こうした現象は多くが、融合相手分子のターンオーバーが速い場合に特に起こりやすいため、37°CにおけるSuperNovaの立体構造形成が遅いことが原因であると示唆された。Nogo受容体のターンオーバーは不明であるが、おそらく同様のことが生じていると考え、SuperNovaに遺伝子変異スクリーニングを行い、立体構造形成能が高い変異体を取得し、この問題の解決を目指すことにした。その結果、37°Cでの立体構造形成能が高い新規変異体“HyperNova”の取得に成功した。

2) HyperNovaの基本的特性

HyperNovaは遺伝子変異スクリーニングの結果、SuperNovaの遺伝子配列に比較して、13個のアミノ酸置換変異を有する。HyperNovaの励起蛍光スペクトルはSuperNovaとほぼ同一であり、極大励起波長は570nmであり、極大蛍光波長は593nmである。またモル吸光度は $37500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であり、極大吸収波長は579nmであった。一方で37°Cにおける立体構造形成速度を大腸菌内で比較したところ、HyperNovaはSuperNovaならびに、以前立体構造形成速度が改善したと報告されたSuperNova-S10R変異体（文献3参照）に比べても、大幅に上昇していることが分かった。さらに実際にNgR1分子と融合したところ、強い蛍光が観察され、CALI実験に用いることが出来ると示唆された。またSuperNovaで標識できなかつた細胞骨格分子や転写因子など様々な分子についてもHyperNovaとの融合分子を作製し比較したところ、HyperNovaでより強い蛍光が観察された。以上からHyperNovaを用いることで、も様々な分子に対してその特性を問わず、37°CにおいてもCALI実験が初めて可能になると期待できる。

3) HyperNovaの光増感活性

ここではまず、37°Cで培養した生細胞においてCALI活性を調べた。本研究では、哺乳類培養細胞のミトコンドリアに各分子を過剰発現し、光照射によりミトコンドリアの破壊と細胞死を誘導する。これは、光増感蛍光タンパク質の性能比較をする上で定番の実験系である。この比較解析により、HyperNovaは他と比べて、顕著にCALI活性が高いことが分かった。またin vitroで精製したタンパク質において、活性酸素の産生能を比較したところ、HyperNovaでは一重項酸素酸性能が上昇していることが分かった。以上から、HyperNovaは37°Cでの活性酸素産生能力とCALI効率も高いことが明らかとなった。

4) HyperNovaを用いた脂肪内シグナル分子に対するCALI法の開発

以上の結果から従来のSuperNovaに比べ、HyperNovaを用いることで、様々な分子を光で不活性化できるのではないかと考えられた。そこで主要な細胞内分子に対するCALI法を、全て開発しようと計画した。まず対象としたのは、細胞増殖や細胞死・発生に重要なリン酸化酵素である、ERK2とJNK1である。CALIの効果を確認するために、KTRというリン酸化酵素指示薬（文献4参照）で対象とする分子の活性を測定した。これは各リン酸化酵素の基質にGFPが融合しており、リン酸化されるとGFPの蛍光が核から細胞質に移動する。従って細胞質と核におけるGFP蛍光の強度比を、蛍光顕微鏡によるライブイメージングで解析することで、様々なリン酸化酵素の酵素活性をリアルタイムに検出できる。

まずJNK1という細胞死や発生に重要なMAPKをモデルに実験を進めた。ここではJNK1とHyperNovaの融合分子をKTR指示薬と共発現し、アニソマイシンによりJNK活性を誘導したところ、光照射によりJNK活性は顕著に低下することが分かった。この効果はHyperNovaを無くしたJNK1のみでは見られず、また同じ局在を示すERK分子の活性には影響しなかつた。以上からHyperNovaを用いることで、JNK1分子特異的に光で不活性化するCALI法の開発に成功した。

さらにERK2という細胞増殖や細胞移動に重要なMAPKをモデルにした。ここではERK2とHyperNovaの融合分子をKTR指示薬と共発現し、EGFによりERK活性を誘導したところ、光照射によりERK活性は顕著に低下することが分かった。この効果はHyperNovaを無くしたERK2のみでは見られず、また同じ局在を示すJNK分子の活性には影響しなかつた。以上からHyperNovaを用いることで、JNK1分子特異的に光で不活性化するCALI法の開発に成功した。

4. 考察、今後の研究について

本研究により37°Cでも素早く立体構造を形成し、CALI実験が可能な光増感蛍光タンパク質HyperNovaの開発に成功した。これにより当初の目的であるNgR1のCALI法にも応用できることが分かり、今後はNgR1のCALI法の確立とシナプス可塑性誘導実験をin vivoで進めていきたい。また別途、抗体を用いたCALI法についても、最近ようやくnativeなNogo受容体を認識するモノクロー抗体が30種類取得できたため、CALIが可能な抗体のスクリーニングを進める予定である。

5. 参考文献

1. Jitsuki S et al. *Cereb. Cortex* 2014
2. Beck S et al. *Proteomics* 2002
3. Gorbachev DA et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020
4. Regot S et al. *Cell* 2014