

研究テーマ： 構造解析に基づく次世代シナプスコネクターの開発

英国医学研究局分子生物学研究所 鈴木邦道

本海外留学研究では、抑制性シナプスに着目した構造的分類と新たな制御系確立を目指した研究を進めている。この研究の基盤となっている研究として、シナプス形成・成熟を担うシナプスオーガナイザー分子、Cerebellin 1 (Cbln1)と Neuronal pentraxin1 (NP1)の構造情報をもとにした人工シナプスコネクターCPTX を設計し、興奮性シナプスの形成を制御する研究が既に進行しており、この研究を飛躍させるために留学先でシナプスおよびシナプス分子の構造解析法確立と新規の抑制性人工シナプスコネクターの設計・開発を行っている。

MRC-LMB において、【課題1】として、シナプスオーガナイザー分子が構成するシナプスの構造を *in situ* でとらえるために、抑制性シナプスコネクターの開発に先立ち、既にその性質がよく調べられている人工シナプスコネクターCPTX および内因性シナプスオーガナイザー分子 Cbln1 に着目して、低温電子顕微鏡トモグラフィ法を使った実験系の構築を試みた。シナプスオーガナイザー分子を発現した培養細胞やリコンビナント分子をコートしたビーズ、および培養神経細胞を用いて人工的なシナプス様構造を誘導し、電子顕微鏡トモグラムの取得までの一連の実験プロトコールの最適化を行っている。細胞を電顕用グリッド上で培養→細胞間接着の構築→非晶質氷を保持する急速凍結→凍結蛍光顕微鏡による相互作用部位のマッピング→収束イオンビーム走査電子顕微鏡による凍結サンプルの薄切化(ラメラの取得)→凍結透過電子顕微鏡を用いたトモグラムの取得→画像の3次元再構成と画像解析、という多くの段階を経て結果が得られる。各段階の最適化を進めている段階であり、特にトモグラム取得や画像解析についてはより状態のよいサンプルを取得したのちにさらに技術習得していく予定である。また研究課題の一つであるマウス個体の組織切片を用いたシナプスの微細構造分類のための準備を進めており、脳の化学固定標本や急性スライス標本からのサンプル作成を試み、いくつかの条件でシナプス構造の電顕画像の取得に成功している。しかし、分子を再構築するほどの高解像度トモグラムを得るにはまだ課題が多い。特に厚みのあるサンプルの急速凍結においては、単粒子解析や培養細胞の凍結で用いる **Plunge freezing** 法とは異なり、高圧凍結法を用いた装置が必要なため、新しい機器の導入や改造を含めて各種メーカーと連携して装置の最適化を進めている。

【課題2】として、申請者らが開発した第一世代シナプスコネクターと同様な概念を応用した抑制性シナプスコネクターの設計は進行中であるが、現時点では機能の性状解析や動物病態モデルへの治療応用までは至っていない。一方で、第一世代シナプスコネクターCPTX を小脳性運動失調モデルマウス、家族性アルツハイマー病モデルマウスへ治療薬として投与する実験に加えて、脊髄損傷モデルマウスへの投与が共同研究者である愛知医科大学・武内恒成教授とともに進められ、シナプスコネクター分子のさらなる応用方法について検討を行った。腰椎を半切断または挫滅したマウスは後肢が麻痺して運動機能が極度に低下するが、CPTX を脊髄に直接投与したマウスでは顕著な運動機能の回復を示した。特筆すべきことに、脊髄損傷から1週間経過した場合のCPTX投与は、損傷直後の投与と同様に非常に効果的であり、少なくとも8週間にわたる効果の継続により運動機能は正常

の 80%程度の指標まで回復した。投与された CPTX の脊髄損傷部位での局在やシナプスを接続させたかどうかの定量的評価を組織免疫染色にて行い、CPTX が興奮性介在神経のシナプス間隙に観察されること、CPTX 投与によりそのシナプス接続が増加することが確かめられた。この成果を論文として投稿し、revision に必要な実験のいくつかは MRC-LMB で進められ、また慶應義塾大学の顕微鏡装置をリモートコントロールする方法でも遂行した。第一世代シナプスコネクターCPTX についての論文は 2020 年 8 月に論文として発表され¹、新聞やテレビなど各種のメディアにおいてもその成果が取り上げられた。

本報告は 2019 年 9 月から 2020 年 9 月までの研究経過・成果をまとめたものであるが、12 か月間のうち、コロナ禍によるロックダウンの影響で 3 月末から 6 月までの約 3 か月は MRC-LMB には立ち入りが制限され、wet な実験を進めることが極めて困難であった。この期間、ドイツ・日本の共同研究者と連携し、必要な実験と解析を各国で同時並行して昼夜進めることで、研究室へのアクセスが制限される中であっても効率よく研究を遂行することができた。申請内容にある研究課題について直接取り組むことができなくなってしまったが、一方で研究課題の基盤となる第一世代シナプスコネクター分子の性状解析を深めることに繋がっていることから、本報告書ではその成果も記載している。第一世代シナプスコネクター分子から得られた知見を次世代シナプスコネクターの設計や開発に応用し、新しい創薬のかたちとしての応用可能性を見出していくことを目指していきたい。

おわりに、本研究留学をご支援してくださったアステラス病態代謝研究会様に深く感謝申し上げます。新しく始めた研究が芽吹くには長い時間を必要としますが、本海外留学補助金によるご支援により、円滑にその最初の一步を踏み出すことができました。今後とも新しい可能性を得られるよう研究に従事していきたいと思っております。

論文発表

¹Kunimichi Suzuki†, Jonathan Elegheert†, Inseon Song†, Hiroyuki Sasakura†, Oleg Senkov, Keiko Matsuda, Wataru Kakegawa, Amber J. Clayton, Veronica T. Chang, Maura Ferrer-Ferrer, Eriko Miura, Rahul Kaushik, Masashi Ikeno, Yuki Morioka, Yuka Takeuchi, Tatsuya Shimada, Shintaro Otsuka, Stoyan Stoyanov, Masahiko Watanabe, Kosei Takeuchi, Alexander Dityatev*, A. Radu Aricescu*, Michisuke Yuzaki* († Equal contribution, * Co-corresponding authors)
Science 28 Aug 2020: Vol. 369, Issue 6507, eabb4853