

京都大学	博士 (工学)	氏名	小島 憲人
論文題目	Development of chemical and chemogenetic tools for elucidating glutamate receptor function (グルタミン酸受容体機能解明を目指した化学および化学遺伝学的手法の開発)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>グルタミン酸受容体は中枢神経系において興奮性の神経伝達を担い、記憶・学習といった高次脳機能や様々な神経疾患との関連が示唆されている。グルタミン酸受容体の生理機能および疾患との関連を明らかにするためには、その動態解析および機能制御を可能とする手法が必要となる。申請者は博士課程研究において、内在性グルタミン酸受容体の動態解析を可能とする新たなケミカルラベリング法の開発および選択的なアゴニストの存在しないグルタミン酸受容体をサブタイプ選択的に活性化する化学遺伝学的手法の開発を行なった。本論文はこれらの研究結果についてまとめたものであり、序論及び本論（三章）から構成される。以下にその概要を示す。</p> <p>(第一章)</p> <p>AMPA 受容体は神経伝達において中心的な役割を果たすイオンチャネル型グルタミン酸受容体であり、神経細胞上のシナプス表面での発現量の増減が記憶や学習の分子基盤として働くことが知られている。従来法では pH 感受性を有する蛍光タンパク質を AMPA 受容体に融合することで細胞表面での AMPA 受容体の動態解析が行われてきた。しかし、融合タンパク質を外来の遺伝子として導入する必要があるため本来の受容体機能が損なわれるなどの問題を抱えていた。そうした背景の元、内在性の AMPA 受容体を小分子蛍光プローブによりラベル化する方法としてリガンド指向性化学が開発されてきた。リガンド指向性化学を用いることで内在性 AMPA 受容体のラベル化には成功しているが、長時間のラベル化反応によりラベル化された AMPA 受容体が細胞内へ内在化してしまうという問題が明らかとなった。そこで、申請者はリガンド指向性化学と極めて反応性が高い生体直交反応として知られる逆電子要請型 Diels-Alder 反応を組み合わせた「リガンド指向性 2 段階ラベル化法」の開発を行なった。本手法を用いることで HEK293T 細胞に発現させた細胞表層に存在する AMPA 受容体選択的に 5 分以内という短時間で蛍光色素など様々な小分子プローブを修飾することに成功した。</p> <p>(第二章)</p> <p>第二章では「リガンド指向性 2 段階ラベル化法」を用い、細胞表面の AMPA 受容体の局在および動態解析を行なった。長い蛍光寿命を持つことが知られている蛍光色素 SeTau647 を AMPA 受容体へ標識し蛍光寿命顕微鏡を用いた生細胞イメージングを行うことにより神経細胞に内在的に発現する AMPA 受容体の局在の解析を行ない神経細胞の樹状突起とスパインにおける AMPA 受容体の発現比率を求めることに成功した。また、ウエスタンブロッティング解析により細胞膜表面の AMPA 受容体の寿命の詳細な解析にも成功し、HEK293T 細胞に発現させた AMPA 受容体と神経細胞上の AMPA 受容体では寿命が大きく異なることが明らかとなった。さらに細胞内外の AMPA 受容体の存在比やリサイクリングの動態解析にも成功した。今後は、本手法の適用を拡大し超解像イメージングによる詳細な AMPA 受容体の分布解析や一分子イメージングによる受容体ダイナミクスの解析への応用が期待され、記憶や疾患の分子メカニズムの理解につながると期待される。</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	小島 憲人
<p>(第三章)</p> <p>mGlu1 は中枢神経系に広く発現する G タンパク質共役型グルタミン酸受容体であり、活性化に伴う下流のシグナル伝達による遺伝子発現の制御を行うことで神経伝達物質の放出量の制御やシナプス伝達効率の調節などを行う。mGlu1 には配列相同性の高いサブタイプが存在するが、その相同性の高さとは対照的にその細胞応答や脳内での発現箇所や生理機能、関連する疾患には大きな違いがみられる。そのためサブタイプ選択的に受容体を活性化することは、受容体機能を明らかとする上で非常に重要な観点である。しかし、現状では mGlu1 を選択的に活性化可能なアゴニストは存在しない。そのため、mGlu1 を選択的に活性化する手法の開発が望まれる。これまでに、受容体の人為的な活性化法である「配位ケモジェネティクス」が開発されてきた。本手法では、受容体のリガンド結合領域に対して配位性アミノ酸を導入し金属錯体の添加による配位結合で内在性リガンドの結合をアシストすることで、人為的な受容体の活性化が可能となる。従来の「配位ケモジェネティクス」では金属錯体は、内在性のリガンドの結合をアシストするポジティブアロステリックモジュレーターとして機能することが明らかとなったが、ポジティブアロステリックモジュレーターはリガンドの濃度に依存し、受容体の応答を増大させたり親和性を向上させたりする。生体内ではリガンドの濃度が不均一であることを考えると、正しく受容体の機能解析を行うためにはリガンドの濃度に依存せずに受容体を直接的に活性化可能な手法が望まれる。こうした要請の元、申請者は「配位ケモジェネティクス」の適用を拡大し mGlu1 の金属錯体による直接活性化を行いマウス脳組織での mGlu1 機能制御を行なった。</p> <p>まず初めに金属錯体により直接的に活性化可能な mGlu1 変異体を見出すためのスクリーニングを行なったところ Pd(bpy)錯体により直接活性化可能な変異体を見出した。また、得られた変異体の中から Pd(bpy)錯体がポジティブアロステリックモジュレーターとして機能しない変異体が見られた。この変異体と野生型の mGlu1 では、内在性のリガンドであるグルタミン酸の濃度依存性や発現量、細胞膜上での発現量には有意な差は見られず動物組織への導入に適した変異体であることが分かった。また、マウス組織での mGlu1 の活性制御を行うために Pd(bpy)錯体の毒性評価を行った。Pd(bpy)錯体は神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞に対して DNA と相互作用することで細胞増殖阻害を引き起こすことが示唆された。そこで細胞膜透過性を軽減し毒性を軽減するために Pd(bpy)錯体の親水化を行った。その結果、Pd(bpy)錯体にスルホン酸を導入した化合物において細胞増殖阻害能の低減、化合物の水溶性の向上に成功した。最後に CRISPR-Cas9 system を用いて mGlu1 変異体ノックインマウスを作成し、動物個体での mGlu1 の活性制御を行なった。このノックインマウスにおいても野生型のマウスと比べ mGlu1 の発現量や機能には影響がみられなかった。ノックインマウスより小脳組織を単離し低毒性化された Pd(bpy)錯体を処置することで、運動記憶の基盤として知られる長期抑圧が起こることを確認した。本研究によりこれまで選択的なアゴニストの存在しなかった mGlu1 の長期的な記憶形成における寄与を明らかとすることに成功した。</p>			

氏名	小島 憲人
----	-------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、内在性グルタミン酸受容体の動態解析を可能とする新たなケミカルラベル化法の開発および選択的なアゴニストの存在しないグルタミン酸受容体をサブタイプ選択的に活性化する化学遺伝学的手法の開発についてまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. AMPA 受容体は神経伝達において中心的な役割を果たすイオンチャネル型のグルタミン酸受容体である。その発現量の増減が記憶や学習の基盤として働くことが知られている。従来、蛍光タンパク質を AMPA 受容体に融合することでその動態解析が行われてきたが本来の受容体機能が損なわれるなどの問題を抱えていた。そこでリガンド指向性化学と逆電子要請型 Diels-Alder 反応を組み合わせた「リガンド指向性 2 段階ラベル化法」の開発を行なった。本手法を用いることで HEK293T 細胞に発現させた細胞表層 AMPA 受容体に対して 5 分以内という短時間で様々なケミカルプローブを修飾することに成功した。
2. 「リガンド指向性 2 段階ラベル化法」を用い、HEK293T 細胞に発現させた AMPA 受容体と内在的に AMPA 受容体を発現する培養神経細胞での動態解析を行なった。その結果、従来法ではなし得なかった AMPA 受容体の詳細な局在解析および寿命解析やリサイクリングなどの動態解析に成功した。
3. mGlu1 は G タンパク質共役型のグルタミン酸受容体であり、活性化に伴う下流のシグナル伝達による遺伝子発現の制御を行うことで神経伝達物質の放出量の制御やシナプス伝達効率の調節などを行う。mGlu1 には配列相同性の高いサブタイプが存在するため選択的なアゴニストが存在しない。そのため、mGlu1 を選択的に活性化する手法の開発が望まれる。そこで「配位ケモジェネティクス」法を用いることで金属錯体の添加によって配位性アミノ酸を導入した mGlu1 を直接的に活性化することに成功した。また、マウス組織での mGlu1 の活性制御を行うために金属錯体の低毒性化にも成功した。さらに mGlu1 変異体ノックインマウスを作成し、小脳組織へ低毒性化を行なった錯体を処置することで運動記憶の基盤として知られる長期抑圧が起こることを明らかとし、mGlu1 と運動記憶の形成の関連を明らかとすることに成功した。

その結果本論文は、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 4 年 1 月 7 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。