

京都大学	博士（工学）	氏名	美野 丈晴
論文題目	Spatial Mapping of Molecular Interactions in Fixed Mouse Brain by Covalent Chemistry (固定されたマウス脳における共有結合化学を用いた分子間相互作用の空間マッピング)		
(論文内容の要旨)			
分子間相互作用は脳内の情報伝達において極めて重要な役割を果たし、その精密かつ複雑なシグナル伝達を支えている。従来、培養細胞系を用いた実験手法は、外部環境の制御が容易で高いスループット性を有する一方で、生体内の自然な細胞環境を忠実に再現することは困難であった。そのため、生体組織に適用可能な相互作用解析手法の開発が求められていた。本論文では、マウス脳内に適用可能な小分子－タンパク質間相互作用解析法およびタンパク質－タンパク質間相互作用の解析手法をそれぞれ開発し、その有用性を実証した。以下にその概要を示す。			
第一章 小分子リガンドは基礎研究から医療応用まで幅広く用いられるツールであるが、その生体内動態を解析する手法は限られていた。本研究では、マウス脳内での小分子－タンパク質間相互作用を可視化可能な <i>FixEL</i> (fixation-driven chemical cross-linking of ligands) 法を開発した。従来のパラホルムアルデヒド (PFA) 固定技術を発展させ、外因的に投与された小分子を標的タンパク質との相互作用に基づいて組織内に灌流固定と同時に止めおくことを実現した。 <i>FixEL</i> 法では、PFA 固定の化学的原理に基づき、求核性官能基（アミノ基）を標的小分子リガンドに導入することで、PFA 固定の過程で小分子と標的タンパク質の架橋を可能にした。この手法は、培養細胞およびマウス小脳を用いた実験でその有効性が検証された。さらに、本手法を内因性代謝型グルタミン酸受容体と小分子リガンドの相互作用解析に適用し、マウス全脳領域での特異的および非特異的な相互作用の可視化、およびその時間変化の解析に成功した。また、組織透明化手法と組み合わせることで、小分子－タンパク質間相互作用の三次元的な分布解析も可能であった。本手法は、医薬品開発および基礎研究における小分子プローブ開発への貢献が期待される。			
第二章 生体内でのタンパク質間相互作用を解析するための近傍ラベル化手法 PhoxID (photooxidation-driven proximity labeling for protein identification) は、これまで生きたマウス脳や急性脳切片に適用されてきた。本研究では、この PhoxID を拡張し、PFA 固定組織標本においても網羅的なタンパク質間相互作用解析が可能であることを実証した。 具体的には、マウス小脳において AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) を標的とした近傍ラベル化を行い、質量分析 (MS) によりラベル化タンパク質を同定した。その結果、AMPA および AMPA の補助サブユニット群、さらに AMPA が分布する興奮性シナプス後部の足場タンパク質群が検出された。加えて、本手法を P/Q 型電位依存性カルシウムチャネルにも適用し、その近接タンパク質リストの取得に成功した。			

京都大学	博士（工学）	氏名	美野 丈晴
この手法の適用により、生体組織固定後の標本を用いた相互作用解析が可能となり、操作の簡便化および実験の再現性向上が期待される。また、PFA 固定された長期保存病理切片などのサンプルにも応用可能であり、疾患メカニズムの解明にも貢献しうる。 第三章 タンパク質は、組織内の解剖学的位置に応じて異なる相互作用相手を持ち、多様な機能を担う。本研究では、光照射の精密な空間制御を可能にするデジタルマイクロミラーデバイス（DMD）システムを PhoxID と組み合わせ、空間分解能を光制御できるタンパク質解析手法を開発した。 申請者は、固定組織における PhoxID の近傍ラベル化反応を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で可視化する手法を確立した。また、DMD システムとの統合により、任意の形状パターンに沿った固定組織への光照射および選択的ラベル化が可能であることを実証した。さらに、マウス小脳の分子層および顆粒細胞層の形状パターンを標的サンプルに合わせてその場で生成するプログラムを作成し、解剖学的領域選択的なタンパク質—タンパク質間相互作用解析の原理実証を行った。 本手法を用いて、小脳分子層および顆粒細胞層でそれぞれ独立に PhoxID の近傍ラベル化反応を活性化できることを示し、得られたラベル化タンパク質を MS 解析により同定した。その結果、小脳分子層および顆粒細胞層に特異的なタンパク質群が明確に区別され、小脳の形態学的特徴と一致することが明かとなった。 本論文では、FixEL および PhoxID を基盤とした解析手法を確立し、固定組織標本を用いた分子間相互作用解析の新たな可能性を示した。これにより、生体組織における小分子—タンパク質およびタンパク質—タンパク質間相互作用の可視化・網羅的解析が可能となり、基礎研究および疾患研究の発展に貢献することが期待される。			