

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19311

研究課題名（和文）シナプス分子の光操作に資する革新的技術プラットフォームの創生

研究課題名（英文）A technical platform for optical manipulation of synaptic molecules

研究代表者

竹本 研（Takemoto, Kiwamu）

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80466432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：CALI法とは、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。CALI法は、*in vivo*でも高い特異性を有する分子操作技術であるが、分子ごとにCALIが可能な抗体をスクリーニングする必要があり、その開発には経験上約1年を要する。よって様々な神経伝達物質受容体に対するCALI法を次々に開発することは、現在のところ極めて困難である。本研究ではこの解決を目指し、我々が開発したCALI効率を迅速に最適化する新手法（ハイスループットCALI法）を様々な分子に適用したところ、主要な膜タンパク質に対するCALI法をハイスループットに開発できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のCALI法は、分子ごとにCALIが可能な抗体をスクリーニングする必要等の制約があるため、様々な分子に対するCALI法を次々に開発することは極めて困難であった。主要な受容体に対するCALI法をハイスループットに開発できることが実証された本技術により、将来的にはシナプス～脳領域レベルのマルチスケールに対応したシナプス分子解析のための技術プラットフォームの確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The CALI method is a molecular function inactivation method using photosensitizers that release reactive oxygen species in a light-irradiation-dependent manner. It is currently extremely difficult to develop CALI methods for various neurotransmitter receptors one after another. In this study, we applied our new method for rapid optimization of CALI efficiency (high-throughput CALI method) to various molecules and successfully demonstrated the development of high-throughput CALI methods for major membrane proteins.

研究分野：神経科学

キーワード：光操作

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CALI (Chromophore-assisted light inactivation) 法とは、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, Takemoto K et al. Proc Jpn Acad Ser B Phys., 2021)。例えばエオシン (Takemoto K et al. ACS.Chem.Biol. 2011) 等の光増感物質で標識したモノクローナル抗体を、標的分子と反応後に光を照射する。その際に発生した活性酸素により、ごく近傍の標的分子が迅速に酸化・不活化される。エオシンは主に1重項酸素を産生するが、その拡散半径は3-4nmと短く (Beck S et al. Proteomics 2002) 標的分子の特異的な不活性化が期待できる (Takemoto K Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2022)。

申請者はこれまでに、シナプス表面に発現するAMPA受容体GluA1ホモマーのCALI法の開発に成功し、GluA1ホモマーが記憶の獲得に機能することを発見した (Takemoto K et al. Nat. Biotechnol. 2017, Trusel M et al. Neuron 2019)。さらに我々が開発した単量体光増感蛍光タンパク質 SuperNova を用いて、記憶貯蔵に関する解析の結果も発表されている (Goto A et al. Science 2021)。このようにCALI法は、in vivoでも高い特異性を有する分子操作技術であるが、分子ごとにCALIが可能な抗体をスクリーニングする必要があり、その開発には経験上約1年を要する。よって他の様々な神経伝達物質受容体に対するCALI法を次々に開発することは、現在のところ極めて困難である。

2. 研究の目的

そこで本研究ではこの解決を目的に、我々が開発したCALI効率を迅速に最適化する新手法 (ハイスループットCALI法) を様々な分子に適用する。これにより、特に主要な神経伝達物質受容体に対するCALI法をハイスループットに開発することを目的とする。本研究が成功すれば、シナプス~脳領域レベルのマルチスケールに対応したシナプス分子解析の技術プラットフォームが、世界で初めて実現すると期待できる。

3. 研究の方法

(3-1) CALI法の光学系の改良

CALIの効果を解析するには、定量的な分子機能解析法が必要である。CALI効率の評価は、光照射前後の標的分子の活性変化により算出する。我々が従来CALI効率の評価に用いたイメージングや電気生理学的解析を用いてきたが、これらで評価可能な分子は限られるのが現状である。一般的に広く用いられた分子機能解析法として、ウエスタンブロットがある。例えばリン酸化酵素の場合、リン酸化抗体により分子活性を簡便に定量測定することができるが、サンプル量が多く必要であるため、大きな培養dishで広範囲に光を照射しCALIを行う新しい光学系が必要である。そこで本研究ではまず、広範囲CALI用光照射装置を開発した。

(3-2) 光増感タンパク質 SuperNovaの改良

SuperNovaは申請者が開発した世界初の単量体光増感蛍光蛋白質 (Takemoto K et al. Sci. Rep. 2013) であり、様々なin vivo実験で用いられている (Goto A et al. Science 2021等)。本技術を将来的に細胞内分子に適用するために、SuperNovaを利用する予定である。一方で本分子は37での立体構造形成が遅く、哺乳類細胞では発現したSuperNovaの多くが非活性型となりCALI効率が低い場合があった。そこで今回、SuperNova遺伝子の変異スクリーニングを進めた。

(3-3) 受容体分子をモデルとしたハイスループットなCALI法開発

様々な膜タンパク質への本技術の適用を進めた。モデル分子としてAMPA受容体やNMDA受容体、インスリン受容体やTrkAやTrkB受容体を用意した。光照射とCALIの評価系については、3-1項で開発した広範囲CALI用光照射装置とウエスタンブロット、ホールセルパッチクランプ装置と顕微鏡用の水銀ランプ、さらにタイムラプスイメージング顕微鏡と顕微鏡用の水銀ランプも使用した。

4. 研究成果

(3-1) CALI法の光学系の改良

光強度分布を解析したところ、10cm dishでも均一に光照射が可能であった。これによりCALI効率の評価としてウエスタンブロットやあるいは酵素活性の直接測定が可能となった。

(3-2) 光増感タンパク質 SuperNovaの改良

ランダム変異導入による変異 SuperNova 遺伝子の発現スクリーニングを 37 °C において進めた。これにより 37 °C での立体構造形成能が顕著に改善された新規変異体、HyperNova の開発に成功した。また HyperNova により細胞内シグナル分子の CALI 法も新たに開発できた。現在論文投稿の準備中である。

(3-3) 受容体分子をモデルとしたハイスループットな CALI 法開発

これまでのところ、TrkA 受容体等の CALI 法の開発に成功し、これまでのように標的分子に対する抗体を毎回作製することなく、迅速かつ簡便に CALI 法の開発が可能となった。またその研究過程で、元々使用した結合ペプチドは分子によっては中和活性が出ることも見出した。この点を改良すべく様々な検討を進めたところ、結合ペプチドのサイズ改変により中和活性が顕著に抑制されることを見出した。以上の成果により、まず膜タンパク質に対する CALI 法を迅速かつ簡便に開発する実証実験に成功した。

さらに本技術の細胞内分子への適用のために重要な、結合ペプチドの改良を進めた。例えば、本結合ペプチドと SuperNova との融合分子を細胞内に発現すると凝集体を形成することが分かっている。それに対して我々は結合ペプチドのアミノ酸配列に一部変異を導入することで、凝集体形成を顕著に抑制できることを見出した。これにより細胞内分子への適用への道も開かれた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jahan Azmeree, Akter MST Tahmina, Takemoto Kiwamu, Oura Tai, Shitara Akiko, Semba Shingo, Nezu Akihiro, Suto Satoshi, Nagai Takeharu, Tanimura Akihiko	4. 巻 108
2. 論文標題 Insertion of circularly permuted cyan fluorescent protein into the ligand-binding domain of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor for enhanced FRET upon binding of fluorescent ligand	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102668 ~ 102668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceca.2022.102668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 實木亨、高橋琢哉、竹本研
2. 発表標題 GluA2/3 AMPA受容体に対する光不活性化技術の開発と応用
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 實木亨、高橋琢哉、竹本研
2. 発表標題 GluA2/3 AMPA受容体複合体に対する光不活性化技術
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 實木亨、高橋琢哉、竹本研
2. 発表標題 GluA2/3 AMPA受容体複合体に対する光不活性化技術
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takemoto K
2. 発表標題 A light manipulation technology by CALI that provides localized and arbitrarily timed perturbations.
3. 学会等名 日本生物物理学会シンポジウム「シンギュラリティ生物学を導くイメージング技術」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takemoto K
2. 発表標題 Optical inactivation of synaptic molecules using chromophore-assisted light inactivation.
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takemoto K
2. 発表標題 Optical inactivation of molecular functions by CALI and its application for memory analysis.
3. 学会等名 日本生理学会シンポジウム「神経・シナプス機能の理解に向けた革新的ニューロ分子技術」(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 立体構造形成能が高い光増感タンパク質	発明者 竹本研	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-103027	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------