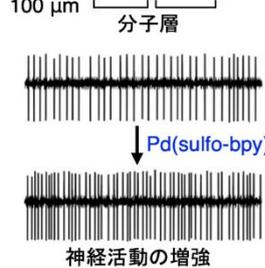
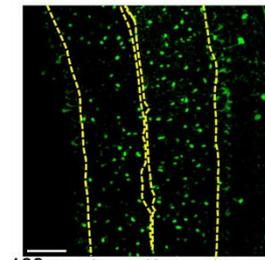
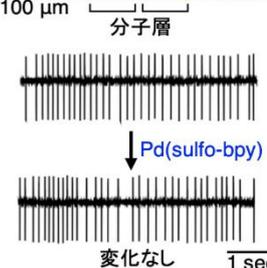
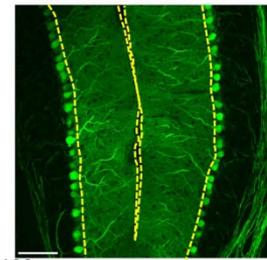


分子層介在ニューロン選択的な変異mGlu1の遺伝子導入



プルキンエ細胞選択的な変異mGlu1の遺伝子導入



脳組織において狙った細胞の神経伝達物質受容体の活性化に成功

—記憶・学習のメカニズム解明に期待—

発表のポイント

- ▶ 脳内の神経回路の働きを理解するために、記憶・学習を司る神経伝達物質受容体であるグルタミン酸受容体を細胞種選択的に活性化する技術が必要とされている。
- ▶ 本研究では、本来のグルタミン酸応答能を維持したままで、人工化合物によって活性化される変異グルタミン酸受容体を開発した。
- ▶ この変異グルタミン酸受容体のある特定の細胞種に発現させたマウスを作製し、人工化合物投与によって細胞種選択的にグルタミン酸受容体を活性化させることに成功した。
- ▶ この新技術「配位ケモジェネティクス法」により、神経回路の理解が加速すると期待される。

概要

東海国立大学機構 名古屋大学大学院工学研究科 清中 茂樹 教授は、京都大学大学院工学研究科 浜地 格 教授、小島 憲人 博士（2021 年度 博士課程卒）、慶應義塾大学医学部生理学教室 柚崎 通介 教授、掛川 涉 准教授らと共に、神経回路の役割を明らかにするために、グルタミン酸受容体を細胞種選択的に活性化できる新たな方法論「配位ケモジェネティクス法」を開発しました。

私たちの脳に存在する 1,000 億個もの神経細胞は、シナプスを介して互いに結合してさまざまな神経回路を形成します。シナプスにおいて主要な情報伝達を担っているのは、神経伝達物質であるグルタミン酸とその受容体（グルタミン酸受容体）です。グルタミン酸受容体は、情報伝達に加えて記憶・学習などの高次機能に必須の役割を果たすと考えられています。しかしグルタミン酸受容体は、さまざまな種類の神経細胞に発現しているため、どの神経回路のどのシナプスに存在する受容体が重要であるのかについては、従来の実験法では解析が困難でした。本研究では、運動機能や運動学習を支える小脳神経回路において重要な役割を果たす代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGlu1) 用語解説 1 に着目しました。まず、本研究グループは、天然リガンド（グルタ

ミン酸)との親和性を維持した mGlu1 変異体を見出し、その変異体を選択的に活性化できる人工化合物 (Pd(bpy)および Pd(sulfo-bpy)) を開発しました。次に、ゲノム編集技術用語解説²により mGlu1 変異体を発現する遺伝子改変マウスを作製し、そのマウスから得られる小脳切片に Pd(sulfo-bpy)を投与することによって、mGlu1 が関わる高次脳機能 (小脳長期抑圧用語解説³) を選択的に誘起できました。さらに、アデノ随伴ウイルス用語解説⁴ を用いて、マウス小脳内の標的とする神経細胞種に mGlu1 変異体を選択的に発現させ、細胞種選択的に mGlu1 を活性化させることにも成功しました。本手法 (配位ケモジェネティクス法) は mGlu1 だけでなく、他のグルタミン酸受容体にも適用可能であり、グルタミン酸受容体が関わる神経回路の解明が大幅に加速すると期待されます。

本研究成果は、2022 年 6 月 16 日に国際学術誌「Nature Communications」オンライン版で公開されました。

1. 背景

脳内には 1,000 億個もの神経細胞が存在し、それらが複雑につながりあって神経回路を形成しています。記憶や学習などの脳高次機能は神経回路によって生み出されるため、脳機能を理解するためには、神経回路の配線の理解が重要です。また、脳内には異なる種類の神経細胞が存在して、それらが固有の機能を有しているため、神経回路における各細胞種の機能解明が強く求められています。一方、神経細胞の種類が異なっても同じ種類の受容体を用いて情報のやり取りをしています。そのため、受容体に対する従来の選択的な活性化剤を用いる「薬理的な方法」では、各神経細胞種の機能解明は行えない状況でした。

そのような背景の下、標的とする細胞種を選択的に活性化する方法の開発が進んでいます。その代表例が光で活性化されるイオンチャネルタンパク質を標的細胞に発現させて、光照射のタイミングで神経活動を誘起するオプトジェネティクス用語解説⁵です。この手法は、時間および空間分解能が高いという特長があります。しかし、その操作を動物個体で行うためには、光ファイバーを動物脳内に埋め込む必要がありました。これを解決するため、化合物投与のタイミングで神経活動を制御できるケモジェネティクスの開発も進んでいます。ケモジェネティクスでは、生体内のタンパク質には作用しない人工リガンドで選択的に活性化される人工受容体タンパク質を標的とする神経細胞に発現させます。それにより、この人工リガンドを動物に投与するタイミングで標的とする細胞種の神経活動を制御できます。オプトジェネティクスおよびケモジェネティクスは、標的とする神経細胞種を任意のタイミングで活性制御できるため、神経回路研究において不可欠な方法になりつつあります。一方、いずれの方法も本来神経細胞には存在しない人工タンパク質を発現させて、神経細胞の活性を制御しているため、脳内で起こっている神経伝達とは異なってしまうという大きな問題点も抱えています。脳内において各種受容体の発現量や発現場所は厳密に制御されているため、神経細胞に元々存在する受容体を細胞種選択的に制御することが理想的です。しかしながら、そのような方法論はまだほとんど知られていません。

本研究では、運動機能や運動学習を担う小脳に豊富に発現するグルタミン酸受容体である mGlu1 に着目しました。mGlu1 は、さまざまな脳部位に発現しています。特に小脳において mGlu1 の高い発現が見られますが、複数種類の神経細胞に発現しており、それぞれの細胞種の mGlu1 の機能解明が望まれています。そこで、mGlu1 を細胞選択的に活性化する方法論を開発し、小脳における細胞種選択的な mGlu1 の活性化および機能解明を目指しました。

2. 研究成果

(1) mGlu1 を選択的に活性化させるための変異導入および人工リガンド (Pd(bpy)) の開発

mGlu1 は、7 回膜貫通構造と細胞外に大きなグルタミン酸結合部位を有する G タンパク質共役型受容体の一種です。細胞外においてグルタミン酸が結合すると、貝の口が閉じるかのようにグルタミン酸結合部位の構造が変化し、その構造変化が膜貫通領域に伝播して G タンパク質が結合することにより細胞内に情報が伝達されます (図 1a)。本研究では、グルタミン酸結合部位の入り口の上下に金属配位性のアミノ酸であるヒスチジンの変異導入を行い、金属錯体を加えるタイミングで mGlu1 を活性化させる方法を考案し、配位ケモジェネティクス法と名付けました (図 1b)。この方法では、グルタミン酸の結合位置には変異導入を行いませんので、従来のケモジェネティクス法とは異なり、受容体本来の機能は維持されることを期待しました。実際に、候補となる変異体と金属錯体の組み合わせを探索したところ、複数の mGlu1 変異体とパラジウムビピリジル錯体 (Pd(bpy)) (図 2)) の組み合わせを見出しました。最適化した mGlu1 変異体においては、mGlu1 に元々存在する上部 55 番目のヒスチジン残基をそのまま用いるため、アミノ酸変異導入は、下部に存在する 264 番目のアスパラギン残基に対してのヒスチジンへの 1 アミノ酸変異 (N264H) で十分でした。期待したとおり、この変異体 mGlu1 (N264H) は、グルタミン酸に対する応答に影響を与えることなく、1~3 μM の Pd(bpy) により活性化されました (図 1c)。

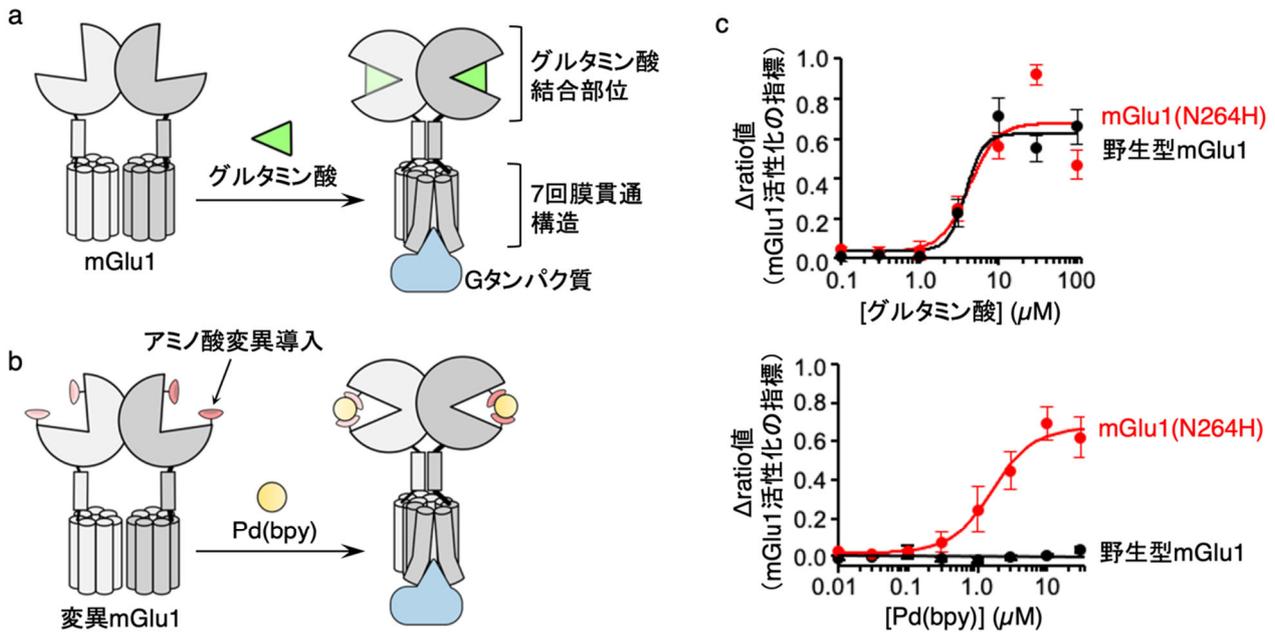


図1 配位ケモジェネティクスによるmGlu1の活性化 (a) mGlu1の構造およびグルタミン酸結合による活性化の模式図 (b) 配位ケモジェネティクスによるmGlu1活性化の模式図 (c) グルタミン酸およびPd(bpy)の濃度依存性。mGlu1(N264H)はPd(bpy)で活性化される。また、グルタミン酸の濃度依存性は野生型mGlu1と比較してほとんど変化しない。

(2) 人工リガンド (Pd(bpy)) の低毒性化

Pd(bpy)により mGlu1 (N264H) の活性化に成功しましたが、Pd(bpy)は疎水的であり、その化学的な特性は抗癌剤として知られるシスプラチンに類似するため、細胞内に入ると DNA に結合して細胞増殖を阻害するなどの副作用が懸念されました。実際に、神経のモデル細胞株として用いられるラット由来 PC12 細胞を用いて Pd(bpy)の細胞毒性を評価したところ、神経突起伸長には影響を与えないものの、細胞増殖を抑制してしまいました。そこで、細胞膜の透過性低下が期待できる親水的な Pd 錯体を複数合成して毒性を評価したところ、Pd(sulfo-bpy)は細胞増殖、神経突起伸長に影響を与えることなく、Pd(bpy)と同様に mGlu1(N264H)を活性化できることが確認されました (図 2)。よって、脳組織を用いた実験では、低毒性 Pd(sulfo-bpy)を用いることにしました。

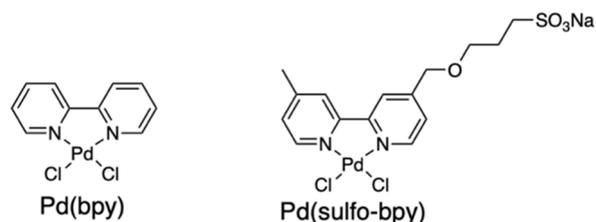


図2 Pd(bpy)およびPd(sulfo-bpy)の構造

(3) Pd(sulfo-bpy)による脳組織内の mGlu1 の活性化

神経モデル細胞株に対して低毒性な Pd(sulfo-bpy)が得られたので、次にマウス脳組織に発現する mGlu1 の人為的な活性制御について検討しました。変異導入は、ゲノム編集 (CRISPR/Cas9 システム) を用いて mGlu1(N264H)の 1 アミノ酸変異導入がされたノックインマウスを作製しました。mGlu1 は、小脳においてプルキンエ細胞^{用語解説 6}の樹状突起に多く発現して運動機能や運動学習に重要な役割を果たし、mGlu1 の機能を損失させたマウスは重篤な運動失調を示すことが知られております (図 3a)。まず、その変異導入マウスを詳細に解析して、mGlu1 に N264H の変異導入を加えても mGlu1 の発現や機能に影響が及ぼされず、マウスの運動機能も正常であることを確認しました (図 3b)。次に、mGlu1(N264H)ノックインマウスから調製した小脳急性スライスを用いて Pd(sulfo-bpy)の効果を検討したところ、mGlu1 の活性化に伴って引き起こされる高次脳機能である小脳長期抑圧(シナプス電流応答(EPSC)の持続的な減弱)が確認されました (図 3c)。Pd(sulfo-bpy)の効果は野生型マウスでは見られないことから、脳組織レベルにおいても変異 mGlu1 の活性化および Pd(sulfo-bpy)による高次脳機能の制御を実現できたとと言えます。

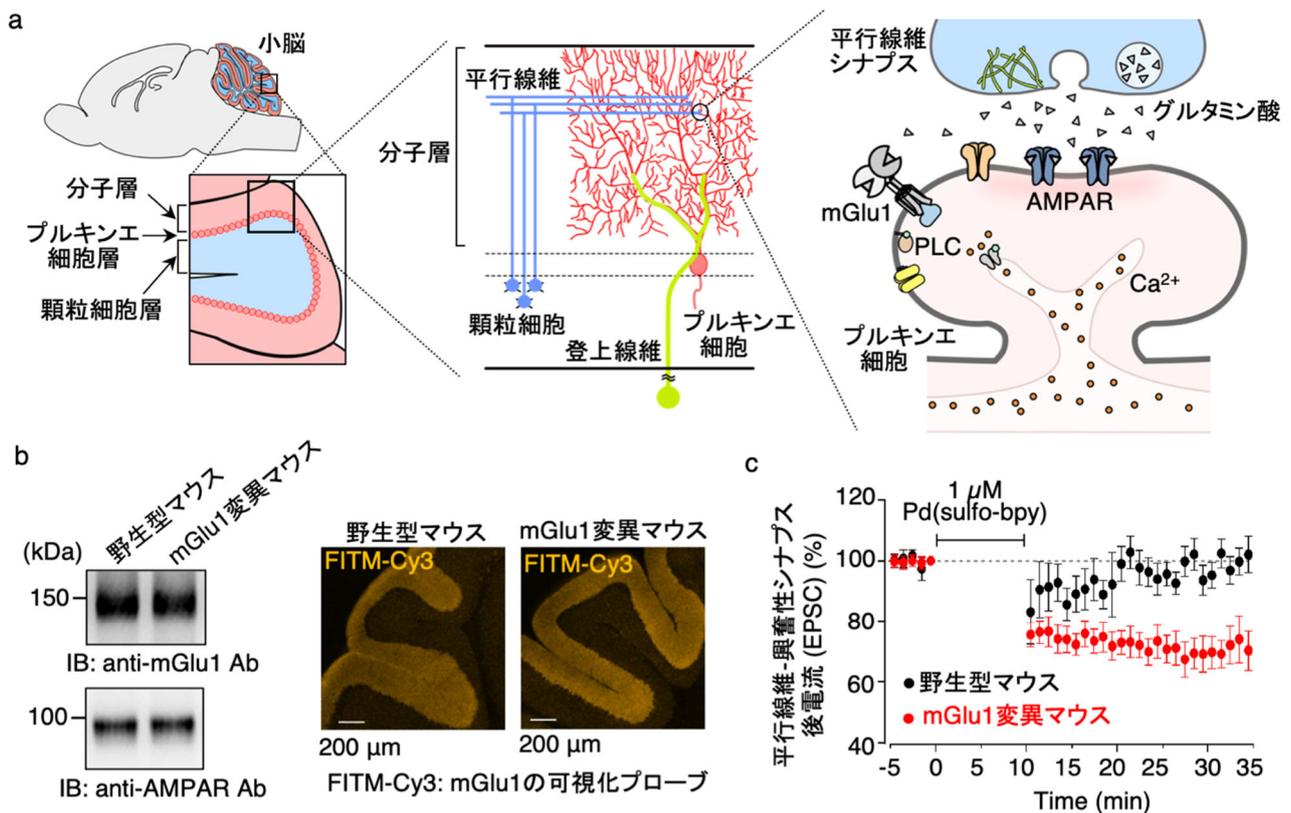


図3 配位ケモジェネティクスによるmGlu1の活性化 (a)小脳の構造の模式図 (b) mGlu1変異マウスにおけるmGlu1の発現確認。左; mGlu1タンパク質の発現量、右; mGlu1の発現分布 (c) Pd(sulfo-bpy)処置前後のEPSC値の変化

(4) 脳内における細胞種選択的な mGlu1 変異体の発現および Pd(sulfo-bpy)による活性化

小脳において、mGlu1 は複数種類の神経細胞に発現することが知られています。上記のとおり、mGlu1 はプルキンエ細胞に豊富に発現しますが、プルキンエ細胞の機能を調節する役割を担う顆粒細胞および分子層介在神経 (MLI) ^{用語解説7}にも mGlu1 が発現することが知られています (図 4a)。MLI においては、mGlu1 の活性化剤である DHPG を小脳急性スライスに投与した際に MLI の神経活動が亢進することが報告されていました。しかし、これまではどの神経細胞 (顆粒細胞、MLI、プルキンエ細胞) の mGlu1 活性化が MLI の活動亢進に重要な役割を担っているかを確認する術がありませんでした。そこで、アデノ随伴ウイルスと細胞種選択的な遺伝子発現プロモーターを駆使して、マウス脳内のプルキンエ細胞および MLI に対して、それぞれ mGlu1(N264H)を選択的に発現させました (図 4b)。これらのマウス由来の小脳急性スライスに対して Pd(sulfo-bpy)を投与したところ、MLI に mGlu1(N264H)を発現させた小脳スライスにおいては、MLI の神経活動の亢進が確認されたのに対して、プルキンエ細胞に mGlu1(N264H)を発現させた標本では、そのような変化は見られませんでした (図 4c)。すなわち、これらの結果は、MLI の活動亢進が MLI 自身に発現する mGlu1 の活性化によって引き起こされていることを示唆しており、MLI に発現する mGlu1 の重要性を、本手法を用いることではじめて明確に示すことができました。図 3a に記載した通り、神経細胞内において mGlu1 の発現場所は厳密に決められています。従来的人工受容体を用いた方法では、その発現場所を制御することは困難で、かつその人工受容体を活性化させているので、mGlu1 の機能とは言えません。一方、本手法では mGlu1 自体を本来の機能を保ったま

まで人為的な制御が可能であるため、mGlu1 の細胞選択的な機能解明が可能となったと言えます。

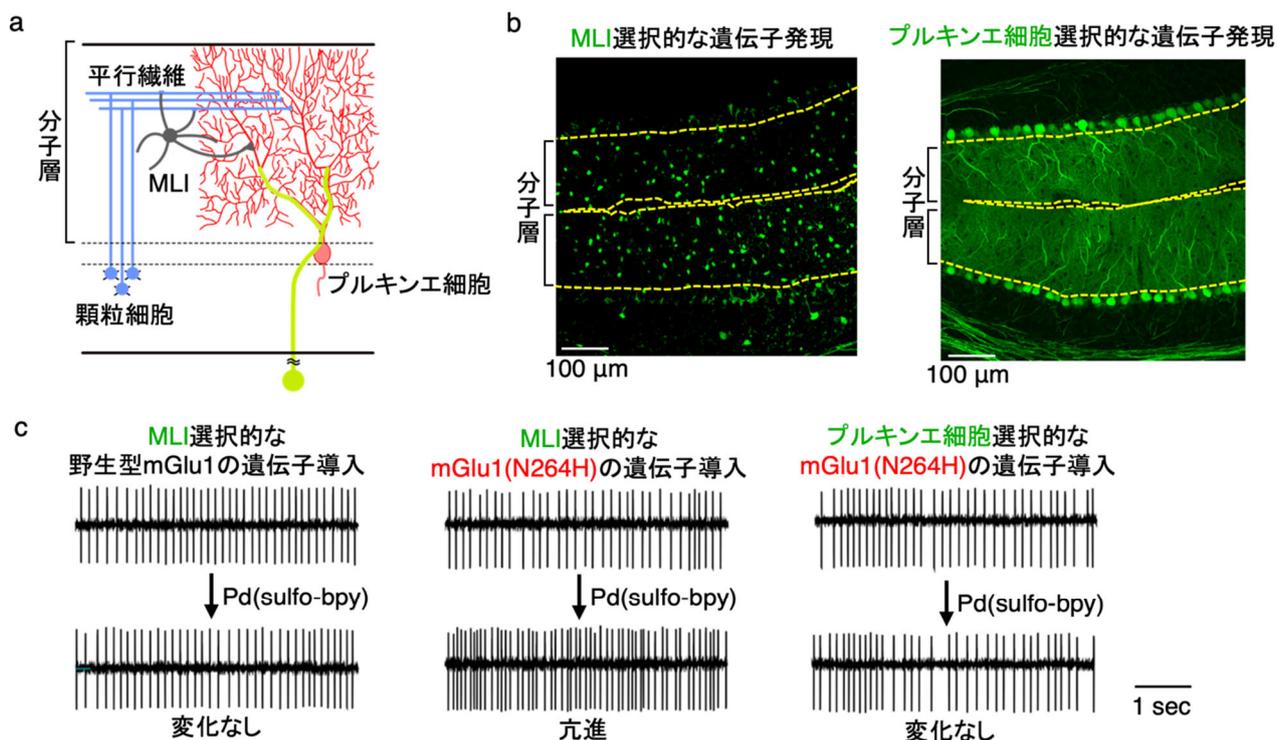


図4 配位ケモジェネティクスによる細胞種選択的なmGlu1の活性化 (a)小脳の神経回路の模式図 (b) アデノ随伴ウイルスを用いたMLIおよびプルキンエ細胞選択的な遺伝子発現の確認(緑色蛍光タンパク質で確認) (c) MLIの自発的な神経活動。MLIのmGlu1をPd(sulfo-bpy)で活性化させた際に、神経活動の亢進が確認された。

3. 今後の予定および波及効果

本研究(配位ケモジェネティクス法)により、mGlu1の細胞種選択的な活性制御法を実現しました。本手法では、mGlu1の機能を失うことなく低毒性なPd(sulfo-bpy)による活性制御ができるため、小脳に限らずさまざまな脳部位の神経細胞種選択的なmGlu1の活性化および機能解明が実現できると期待されます。本研究においては、標的タンパク質としてmGlu1に焦点をあてましたが、本手法は他のグルタミン酸受容体に対しても適用可能と考えられます。今後、神経回路における各種グルタミン酸受容体機能の細胞別分類に応用でき、グルタミン酸受容体に関わる記憶や学習などの高次脳機能の解明が加速すると期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究成果は、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業 総括実施型(ERATO)の研究領域「浜地ニューロ分子技術」(研究総括:浜地 格 京都大学 教授)の一環として行われました。

<論文タイトルと著者>

タイトル Coordination chemogenetics for activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue
(脳組織内において GPCR 型グルタミン酸の活性化を実現する配位ケモジェネティクス法)

著者 小島 憲人、掛川 渉、山崎 世和、三浦 裕太、伊藤 政之、道簀 友紀子、窪田 亮、堂浦 智裕、
三浦 会里子、野中 洋、水野 聖哉、高橋 智、柚崎 通介、浜地 格、清中 茂樹

掲載誌 Nature Communications

DOI 10.1038/s41467-022-30828-0

URL <https://www.nature.com/articles/s41467-022-30828-0>

<用語解説>

1. 代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGlu1): 7 回膜貫通構造と細胞外に大きなグルタミン酸結合部位を有する G タンパク質共役型受容体の一種。主に Gq タンパク質と結合することが知られ、細胞内でホスホリパーゼ C 経路を活性化する。mGlu1 は、脳内において、主に、小脳、海馬、嗅球、視床などにも発現する。
2. ゲノム編集技術: ゲノム編集とは、生物が持つゲノム DNA 上の特定の塩基配列を狙って変化させる技術の総称。その代表例として CRISPR/Cas9 システムが挙げられる (2020 年ノーベル化学賞の受賞研究)。
3. 小脳長期抑圧: 神経活動に依存して神経細胞間の情報伝達効率に変化するシナプス可塑性の一種。小脳の長期抑圧は、平行線維とプルキンエ細胞間のシナプスの伝達効率が長期に渡って低下する現象。
4. アデノ随伴ウイルス: アデノ随伴ウイルスはヒトや霊長類の動物に感染する小型ウイルス。複数種類の血清型が同定されており、その違いにより導入される組織の種類が変わる。非常に弱い免疫反応しか引き起こさないため、遺伝子治療用のウイルスベクターとして臨床応用されはじめている。
5. オプトジェネティクス: 光によって活性化されるタンパクを特定の細胞に発現させて、その機能を光で操作する技術。その代表例として、光で活性化されるイオンチャネルであるチャンネルロドプシンが挙げられ、神経活動の光制御に広く用いられる。
6. プルキンエ細胞: プルキンエ細胞は γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性の抑制性神経細胞であり、非常によく発達した樹状突起を有する。プルキンエ細胞は、小脳顆粒層と分子層の間に規則正しく並び、プルキンエ細胞層と呼ばれる領域を形成している。
7. 分子層介在神経細胞 (MLI): 介在神経細胞とは、比較的短い軸索を持ち、近傍の神経細胞のみと情報交換を行う神経細胞。MLI は、小脳分子層に存在する介在神経細胞であり、プルキンエ細胞に対して抑制性の出力を行う。