

# 博士學位論文

内容の要旨  
および  
審査の結果の要旨

薬学研究科

第43号

令和2年5月

徳島文理大学

## は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

## 目 次

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
乙第48号	富永洋子	膜電位感受性色素を用いた脳神経活動解析法の開発 -海馬神経活動機構の定量網羅解析法の確立-	1
乙第49号	中島健太郎	二つの非相同タンパク質を認識する抗体の分子認識 機構に関する研究 -Bcnt タンパク質と glutamine synthetase とを共通 認識する抗体の解析から-	7

氏名	とみなが ようこ 富永 洋子
本籍	茨城県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	乙第 48 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 2 項該当（論文博士）
学位授与の題目	膜電位感受性色素を用いた脳神経活動解析法の開発 -海馬神経活動機構の定量網羅解析法の確立-
論文審査委員	（主査）教授 伊藤 康一 （副査）教授 宮澤 宏 （副査）教授 岸本 泰司 （副査）教授 種村 健太郎（東北大学大学院）

## 論文の内容要旨

富永 洋子

数千億ともいわれる神経細胞からなる脳の神経回路活動を計測し、その活動を知ることが、「記憶・学習」など、脳の高次機能を理解することにとどまらず、脳活動の変調、異常に起因する各種の精神神経疾患の予防、治療などの薬物開発を行う上で必須である。長寿高齢化社会では、生涯にわたって脳の活動を健全に保つことは、健康寿命の延長にとっても必須であり、高齢化に伴う各種の疾患（アルツハイマー症等の認知症、パーキンソン病等）の治療薬の開発には脳の特に記憶に関連する海馬神経回路等の機能解析が欠かせない。また、複雑化する現代社会では、てんかん等の疾患、発生発達期に顕在化する自閉症スペクトラム等の脳回路の機能変調を計測する手段が必須である。このような機能解析には、従来の点計測である電気生理学手法に代わるイメージング法の必要性が課題となってきた。それを解決しうる手法が、脳の一義的な情報である膜電位を可視化する膜電位光計測法である。その一つに膜電位感受性色素（Voltage Sensitive Dye; VSD）による光計測法がある。

本研究では VSD として Di-4-ANEPPS（分子式： $C_{28}H_{36}N_2O_3S$ ，分子量：480.66）を用いた。Di-4-ANEPPS は、細胞膜の脂質二重層に脂質分子と同方向に配向する分子であり、この分子の発光団からの蛍光量は、細胞膜内外の電位差の変化に応じて変化する。蛍光量の変化は分子内の電荷移動に依存するため、高速の分子プローブとして動作し、サブミリ秒（応答時間はナノ秒オーダー）で膜電位変化を計測することができる。VSD が細胞膜に組み込まれ、個々の VSD が膜電位変化に応じた蛍光量の変化を示すことにより、電位変化を蛍光量変化に置き換えて計測が可能となる。すなわち、VSD が分子プローブとなり、VSD を細胞膜に取り込んだ組織全体、回路全体の動作を計測することを可能とする。

脳神経組織の中でも海馬は記憶学習の中心的な役割を担う器官として非常に多くの研究が行われている。多くの精神神経疾患モデル動物でも、海馬の生理機構を調べることが重要になっており、多くの研究で脳神経回路の生理機構を調べる標本として海馬スライス標本が用いられている。

本研究では VSD で染色したラットやマウスの海馬スライス標本の計測において、長時間安定した計測を実現し、計測データの解析方法を確立して、海馬神経活動への影響の機構解析基盤となる解析法を示した。

本論文において、第一章では定量的光計測法の確立に必要な技術的な課題と解決について示した。神経回路活動を計測するための光計測システムを確立するためには様々な技術要件を満たす必要がある。(1)ダイナミックレンジが広く、高い時間空間分解能を満たすカメラシステムの開発、(2)低倍率で高い開口数を実現し、できるだけ蛍光量を大きく捕捉する顕微鏡システムの開発、(3)長時間生理活性を保って安定して計測を行うためのスライス標本作成法の確立、(4)VSD の検討及び染色手順の確立、(5)計測用チャンバーシステムの開発など、多くの課題を乗り越えて、安定して長時間計測可能なシステムを構築した。この結果、生理活性を良好に保ったまま、信頼性の高い光計測と電気生理学的計測を行い、定量的な計測を行うことが可能となった。光計測で計測された信号は、従来の電気生理学的手法で計測された信号と同じ生理学的状態を反映していた。本研究により、電気生理学的方法に加えて、光計測が脳スライス標本の神経活動を測定するための代替手段となりうることを示し、光計測は電気生理学手法よりも高い時間空間分解能を有した優れた多点同時計測であることを示した。

第二章では、第一章において確立させた計測方法を元に、海馬 CA1 野での光信号の性質を明らかにした。海馬 CA1 野での光計測では、数 10 mV のシナプス電位に対応する放射状層の計測値が大きく、100 mV に及ぶ活動電位を反映すると思われる錐体細胞層の計測値がそれよりも小さいことは、それまで十分に説明されていなかった。新規にタイムラプスによる計測法を開発することにより、電位感受性ナトリウムチャンネル阻害薬 (TTX) により活動電位発生を抑制した状態で高カリウム ACSF 溶液の還流を行うと、スライス全体においてほぼ一様な光信号が生じることを見出した。この結果、VSD 感度には部位・層依存性はなく、どの層の膜においても、膜電位に比例した蛍光強度が得られることが明らかになった。

さらに、NEURON シミュレーターを用いた計算結果との比較により、海馬 CA1 野への入力線維であるシャッフアー側枝への電気刺激で生じる光信号が、多数の錐体細胞の膜電位応答の集合として説明できることを示した。

また、この海馬 CA1 野信号伝播における GABA<sub>A</sub> 作動性フィードフォワード抑制、フィードバック抑制の影響を解析し、その応答分布を明らかにした。フィードフォワード抑制は細胞体近位部、先端樹状突起遠位部に顕著に影響を与えるのに対して、フィードバック抑制は錐体細胞全長にわたって影響を与えていることを示した。

続く第三章においては、海馬スライス標本の VSD を用いた本光計測法において、長時間(12 時間以上)の計測が可能となり、海馬 CA1 野における後期長期増強(L-LTP)を伴う神経信号伝播パターンの網羅的解析を可能としたことを示した。光学系と高速光計測システム、計測制御ソフトウェアの開発や改良により、CA1 野全体を、60 秒ごとに最大フレーム速度 0.1 ms で 12 時間以上測定することができた。また、異なるスライス標本間で、CA1 野における回路活性の変化を回路の機能的形態的差を超えて網羅的に評価する方法を開発した。この結果、2 種類の LTP 誘導における空間的不均一性を明確に示した。1 つめの不均一性は、刺激部位からの距離とともに LTP が増加したこと、2 番目の不均一性は、LTP が放射状層 (SR) よりも錐体細胞層 (SP)、上昇層 (SO) 領域で高いことである。また、シータバースト刺激 (TBS) または高周波刺激 (HFS) による LTP 誘導など、誘導プロトコルに従って LTP パターンが不均一に変化することも示した。さらに、不均一性の一部は、回路要素の I / O 応答に依存することも実証した。

VSD による光計測法は、遺伝的改変、薬理的治療、海馬可塑性の変化に影響を与える可能性のある化学物質投与、薬物治療など、様々な要因による LTP の変化を調べるのに有効である。海馬 LTP は、アルツハイマー型認知症 (AD) や自閉症スペクトラム症候群 (ASD) を含む神経精神疾患の動物モデルの神経機能を評価するための重要な指標である。LTP の時空間的差異は、回路の興奮/抑制 (E / I) バランスを反映している。AD、ASD などの精神神経疾患は、回路の E / I バランスと密接に関係しており、LTP 誘導時の時空間パターンの変化は、疾患の病理を測定するための重要なターゲットである。

本研究により、VSD 光計測法による脳神経活動解析法を確立し、化学物質の影響、病態モデルに対する薬物投与の効果など、海馬神経活動への影響の機構解析基盤を築いた。

## 論文審査結果の要旨

脳の高次機能をよりよく理解することは、人間の行動や精神さらに脳神経精神疾患の発症機構を解明することには必要不可欠である。しかし、脳の機能はあまりに複雑で、その機能解明には多くの困難がある。本学位論文では、神経科学研究で広く使用されているラットとマウスの海馬切片を用い、脳の神経活動を従来の電気生理学的手法に代わって、膜感受性色素を用いた光計測法を駆使して解明することを目的とした。本学位論文では、測定機器の開発、光計測法と電気生理学的手法との比較検討、そして、最後に、脳機能解明への有用性を明らかにした。

- 1) 膜感受性色素 (VSD) を用いた光計測法の確立のために (1) 海馬切片の *in vitro* 計測のための顕微鏡 (光学系) の確立とそれに接続したカメラの開発、(2) 最適な VSD 選択と海馬切片への適用法、(3) 海馬切片そのものの作成法と長期間の保持法の改良、(4) この計測法により得られた膨大なデータの解析用のソフトウェアの開発を行い、完成させた。
- 2) 海馬 CA1 領域を中心とした神経回路網の動態を光計測法と電気生理学的手法を用いながら、光反応と神経活動の正確性を評価し、その有用性を明らかにした。
- 3) 記憶と学習の研究において、古くから海馬での長期増強 (LTP) という神経活動の現象が用いられている。この LTP を本測定法で検出することに成功した。さらに、この LTP 現象の定量的長期計測 (L-LTP) を可能にした。このことは、海馬での記憶・学習の神経回路網形成機構において、新しい知見を得ることができた。

本学位論文は、脳の高次機能を解明するために広く用いられている電計生理学的手法とは異なり、広範囲の脳部位 (例えば海馬全体) での神経回路網を網羅的に長時間安定して測定することが可能となる、膜感受性色素 (VSD) を用いた光計測法を確立した過程を、詳細に明らかにした。特に、この VSD 光計測法の注目する点は、胎児脳から成獣脳を使用することができ、年齢依存的な脳神経系に対する薬物の効果を、

神経回路網形成機構との関係から網羅的に解明することができることである。また、遺伝子改変マウスを使用することができるため、神経回路網形成と遺伝子の関係についても検討できることは大変有意義な方法である。さらに、サンプル間の変動、相違を均一化することができることで、神経活動情報を定量的に評価できることは、薬物の効果を評価する上で重要である。

以上のことから、VSD 光計測法の開発に成功したことは、脳の神経回路網を介した高次脳機能を研究するための新しい道を開くものであると評価した。よって、本論文は博士（薬学）の学位に値する。

上記の者は、関連する最終語学試験（英語）に合格し当該学位取得の資格を有し、提出された学位論文を審査した結果、博士（薬学）の学位に値する者と認めた。

論文審査委員	主査（教授）	伊藤	康一
	副査（教授）	宮澤	宏
	副査（教授）	岸本	泰司
	副査（教授）	種村	健太郎（東北大学大学院）



氏名	<small>なかしま けんたろう</small> 中島 健太郎
本籍	広島県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	乙第 49 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 2 項該当（論文博士）
学位授与の題目	二つの非相同タンパク質を認識する抗体の 分子認識機構に関する研究 -Bcnt タンパク質と glutamine synthetase とを 共通認識する抗体の解析から-
論文審査委員	（主査）教授 大岡 嘉治 （副査）教授 富永 貴志 （副査）教授 野地 裕美 （副査）教授 伊藤 悦朗（早稲田大学）

## 論文の内容要旨

中島 健太郎

臨床応用可能な高品質の抗体の開発には、標的分子に対して極めて特異的な免疫反応性を示す抗体を生成できる免疫原を設計するだけでなく、副作用を引き起こす可能性のある標的外分子に対する交差反応性を正確に予測し、排除することも重要である。本論文では、構造的・機能的に全く異なる二つのタンパク質 Bcnt と glutamine synthetase とを共通に認識する抗体のエピトープ解析を通して、抗体の分子認識機構におけるエピトープの立体化学的・物理化学的環境の重要性について報告する。

我々が見出した Bcnt 遺伝子は、種を越えて普遍的に存在しており、反芻動物においてはさらに、遺伝子の重複と転移因子の一つであるレトロトランスポゾン由来配列のタンパク質コーディング領域への挿入により生み出された p97Bcnt 遺伝子と p97Bcnt-2 遺伝子の二つの側系遺伝子を有している。転移因子により創出されたこれらの Bcnt 遺伝子ファミリーの機能およびファミリー分子間の相互関係は、分子進化の観点から非常に興味深い。遺伝子重複による分子進化において、重複遺伝子の安定性とゲノムへの固定・保持は、その遺伝子が有益な機能を獲得するかどうかにかかっており、パラログ遺伝子同士が同一機能を保持する場合、リボソームやヒストンのような遺伝子産物の量的有益性が得られなければ、重複した遺伝子は偽遺伝子となる可能性が非常に高いと考えられている。反芻動物において、Bcnt と p97Bcnt 遺伝子が発現可能な遺伝子として保存されている事実と、その遺伝子構造が大きく異なることから、遺伝子重複により生み出された遺伝子 (p97Bcnt) が、元の遺伝子 (Bcnt) と異なる機能を獲得した可能性が非常に高いと考えられる。近年、酵母やショウジョウバエ、ヒト由来培養細胞を用いた研究から、Bcnt が、クロマチン構造の動的変動を調節するクロマチンリモデリング複合体の 1 つでヒストン H2A とそのバリエーションであるヒストン H2A.Z との交換反応に関与する SRCAP complex (Snf2-related CBP activator protein complex) の構成因子との相互作用が示唆されているが、その詳細な機能的役割は未だ明らかになっていない。Bcnt の機能解析を目的とし、Bcnt の高度に保存さ

れた C 末端領域由来の抗原ペプチドを用いて作製したポリクローナルペプチド抗体（抗 BCNT-C 抗体）を用いた解析では、その免疫活性は脳のアストロサイトと精巢のライディッヒ細胞の細胞質に局在していた。一方、p97Bcnt の N 末端領域を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた解析では、抗 p97Bcnt 抗体の免疫活性は、反芻動物であるヤギの多くの臓器に認められ、脳の神経細胞と精巢の成熟の進んだ精子の核に局在していた。これらファミリー分子間での発現臓器とその細胞内局在の明らかな違いから、p97Bcnt 遺伝子は転移因子由来配列の挿入により、Bcnt とは異なる機能的を獲得したと推察された。しかしながら、マウス脳の *in situ* hybridization による発現解析では、Bcnt mRNA の発現はアストロサイトではなく神経細胞に認められたことに加え、抗 BCNT-C 抗体とは異なる領域のペプチドを免疫原とした他の 2 つの Bcnt に対する抗体では、動物培養細胞を用いて調製した Bcnt 組換えタンパク質は同等に認識するにもかかわらず、脳のアストロサイトでの免疫活性が認められなかった。これらの矛盾する結果から、抗 BCNT-C 抗体の免疫活性は標的外分子との交差反応である可能性が示唆された。そこで、抗 BCNT-C 抗体と交差反応する分子を単離精製し、LC-MS/MS 解析により同定した結果、その分子は Bcnt とは全く異なる glutamine synthetase (GS) であった。GS は、脳に主に存在し、グルタミン酸の代謝制御に関与していることが知られている。動物培養細胞により調製したマウス Bcnt と GS の組換えタンパク質を用いて抗 BCNT-C 抗体との交差反応性を確認したところ、抗 BCNT-C 抗体は、Bcnt と全く相同性のない分子にもかかわらず、標的外分子である GS に対して、Bcnt と同様の非常に強い免疫活性を示した。GS は、グルタミン酸とアンモニアの縮合によりグルタミンを合成する酵素で、脳では主にアストロサイトに、精巢では主にライディッヒ細胞に局在することが報告されており、抗 BCNT-C 抗体を用いた免疫組織学的解析結果と一致する。これらの結果から、抗 BCNT-C 抗体の非常に強い免疫活性は、標的外分子である GS との交差反応であると結論付けた。この非常に強い免疫活性と高い特異性を示す抗 BCNT-C 抗体と標的外分子である GS との分子認識機構を明らかにするため、この抗原抗体反応のエピトープ解析を行った。その結果、Bcnt の抗原ペプチドに含まれる『GYIE』と類似性の高い、GS の C 末端領域に存在する

『GYFE』が、抗 BCNT-C 抗体との抗原抗体反応のエピトープを構成する重要なアミノ酸配列（コアアミノ酸）であることが明らかとなった。さらに、GS 由来の合成ペプチドを用いたアフィニティ精製により単離した GS の『GYFE』と交差反応性を示す抗 BCNT-C ポリクローナル抗体の重集団を単離したところ、この抗体重集団は、1 アミノ酸の違いにもかかわらず、GS の『GYFE』と Bcnt の『GYIE』の両方を同程度の親和性で認識することが明らかとなった。両分子のコアアミノ酸は、親水性アミノ酸に囲まれており、これによりエピトープのコアアミノ酸が分子表面へ露出されていると考えられる。また、GS の『GYFE』のチロシン（Y、Tyr）とグルタミン酸（E、Glu）は、GS 活性部位において ATP と GS の基質であるグルタミン酸との結合にそれぞれ関与している一方で、隣接するフェニルアラニン（F、Phe）は反対側の分子内側に位置しており、Bcnt のイソロイシン（I、Ile）と同程度のアミノ酸分子の高さにより、エピトープの立体構造が維持されたため、このような交差反応が引き起こされたと考えられた。これらの結果から、抗 BCNT-C 抗体の GS との交差反応が、構造的・機能的に異なる Bcnt と GS のエピトープの立体化学的・物理化学的環境の類似性により引き起こされたと結論付けた。

これらの結果は、標的分子の非常に特異的なアミノ酸配列を免疫原として用いた場合でも、エピトープの立体化学的・物理化学的環境についても考慮しない限り、標的外分子との交差反応を回避できないことを示唆している。したがって、高い特異性を持ち、副作用のない治療用抗体やワクチンの開発には、標的分子だけでなく、標的外分子を含めたエピトープ-パラトープ境界面の物理化学的環境の包括的な理解とデータの蓄積が極めて重要であると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

近年、抗体医薬品はがんや自己免疫疾患など様々な疾患の治療に利用され、今後、その開発は最も成長が期待される分野である。一方、これら抗体医薬品においても副作用の報告がなされ、その要因の一つとして標的外分子に対する交差反応が挙げられている。従来、標的分子に対する抗体の特異性は、抗体が認識する抗原のエピトープのアミノ酸配列が主要な決定因子として考えられてきたが、最近の研究では、エピトープ-パラトープ間の相互作用における物理化学的環境が重要とされ、その総合的な理解には標的分子と抗体間の特異性に関するデータのさらなる蓄積とバイオインフォマティクス分析が必須である。

本研究で筆者は、Bcnt タンパク質の発現解析の過程において、使用した抗 BCNT-C 抗体が構造的・機能的に全く異なるタンパク質 glutamine synthetase (GS)を認識することに気づき、GS のエピトープ解析により抗体の分子認識機構におけるエピトープの立体化学的・物理化学的環境の重要性について明らかにした。これらをまとめた本論文は、次の2つの章から構成されている。

第1章では、冒頭で著者を含むグループが同定した Bcnt 遺伝子（酵母のクロマチンリモデリングに関わる Swc5 の相同分子種）と、主にウシなどの反芻動物に存在しているファミリー遺伝子 p97Bcnt 遺伝子の構造と遺伝子重複機構について、分子進化的な考察を含めわかりやすく説明している。次に、Bcnt タンパク質の生理的な機能を明らかにするために、Bcnt 特有の C 末端領域のペプチドに対するモルモットポリクローナル抗体（抗 BCNT-C 抗体）を作製し、ラット各臓器における発現を解析している。その結果、Western blot 解析ではラットの脳や精巣で Bcnt の強い発現が観察され、さらに免疫組織学的解析により、脳ではアストロサイトの細胞質に、精巣ではラディッヒ細胞の細胞質に存在することを明らかにした。しかしながら、マウス小脳において、Bcnt 遺伝子 mRNA の発現を *in situ* hybridization により解析した結果、アストロサイトではなく神経細胞に主に発現しており、筆者が作製した抗 BCNT-C 抗体を用いた解析の結果と矛盾することが明らかになった。そこで、筆者は、作製した抗 BCNT-C 抗体が標的外分子と交差反応する可能性を想定した。

第2章では、初めに筆者は作製した抗 BCNT-C 抗体が交差反応するタンパク質を同定するため、ウシ大脳抽出物から抗 BCNT-C 抗体を用いて免疫沈降させた物質の LC-MS/MS 解析により、交差反応タンパク質が主に脳に存在し、グルタミン酸代謝に関与する glutamine synthetase (GS)であることを明らかにした。次に筆者らは抗 BCNT-C 抗体による GS との交差反応のメカニズムを明らかにするため、GS の C 末端欠損変異体を作製し、その交差反応性が C 末端の 42 アミノ酸中に存在する事を明らかにした。次に、合成ペプチドを用いた競合実験、欠損変異体での解析により、抗 BCNT-C 抗体による GS 認識部位が GS の『RTVGQEKKGYFE』配列に限局する事を見出した。さらに筆者は、この配列中に抗 BCNT-C 抗体の作製時に用いた抗原ペプチド中の『GYIE』配列と類似した配列『GYFE』が存在することに着目し、実際にエピトープ解析により GS の『GYFE』配列がこの交差反応に必須なアミノ酸残基であることを示すとともに、『GYFE』配列中のフェニルアラニン (F、Phe) を様々なアミノ酸に置換する実験を行い、共通エピトープのイソロイシンとフェニルアラニンの違いにもかかわらず同等の反応性を示すこの交差反応が、アミノ酸側鎖の立体的嵩高さに起因する、共通エピトープの立体化学的環境の類似性により引き起こされたことを明らかにした。抗 BCNT-C 抗体との交差反応において、GS のエピトープに含まれるフェニルアラニン (F、Phe) の側鎖は内向きに配置され、エピトープ-パラトープ境界面に直接関係せず、むしろその立体化学的嵩高さによりエピトープの立体構造が維持されるという筆者の考察は、GS の X 線構造解析データを元に描かれた GS の『GYFE』配列周辺の 3 次元配置図からも強く支持された。

論文審査委員による査読の結果、指摘された点に基づき、タイトルおよび表記の統一、引用文献の修正がなされた。また、分子進化における Bcnt 遺伝子の位置付け、本論文の結果がもたらす抗体医薬品への影響についてより明示的説明が求められ、それらについて加筆された。

本研究では、構造的・機能的に全く異なる二つのタンパク質 Bcnt と glutamine synthetase (GS)とを共通に認識する抗体のエピトープ解析を行うことにより、抗体の分子認識機構における立体化学的・物理化学的環境の重要性について考察した。その結果、抗体の標的分子の特異的な配列を抗原として用いた場合でも、抗原を構成するアミノ酸

による立体化学的・物理化学的環境の特性により、標的外分子との交差反応を排除できない事を明らかにした。近年、高い特異性を持ち副作用のない抗体医薬品やワクチンの設計開発が期待されているが、本論文により得られた知見は、抗原性や交差反応性の評価・予測に重要なエピトープ-パラトープ境界面の立体化学的・物理化学的環境の理解に貢献し、薬学分野の創薬領域に寄与するものと判断できる。また、既に、筆頭著者として査読付き学術論文1報をはじめ他に関連論文2報を発表しており、業績としても十分である。したがって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員 主査（教授） 大岡 嘉治  
副査（教授） 野地 裕美  
副査（教授） 富永 貴志  
副査（教授） 伊藤 悦朗（早稲田大学）

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第43号)

---

令和2年5月 発行

編集・発行

徳島文理大学大学院薬学研究科  
徳島市山城町西浜傍180  
〒770-8514 TEL 088-602-8210

印刷

原田印刷出版株式会社  
徳島市西大工町4丁目5  
〒770-0903 TEL 088-622-2356  
FAX 088-622-2357  
E-mail: haradapp@khf.biglobe.ne.jp