

論文審査の要旨及び担当者

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	野 澤 和 弥
論文審査担当者 主 査 生理学 柚 崎 通 介 解剖学 仲 嶋 一 範 生理学 岡 野 栄 之 先端研（脳科学）田 中 謙 二 学力確認担当者： 審査委員長：仲嶋 一範 試問日：2022年10月20日				
(論文審査の要旨)				
論文題名：In vivo nanoscopic landscape of neurexin ligands underlying anterograde synapse specification (シナプスの性質を順行性に決定するニューレキシシリガンド分子の生体内でのナノスケール構造)				
神経細胞同士の情報伝達を担うシナプスの形成や機能には、シナプスオーガナイザーと呼ばれる一連の分子群が関わっている。その中でもシナプス前部の膜タンパク質であるニューレキシシンには多数のシナプス分子が結合し、ハブとして機能することが示唆されている。しかしこれらの分子（ニューレキシシリガンド）がin vivoの脳内において互いにどのように競合ないし協調して働くのかはよくわかっていない。本研究ではニューレキシシリガンドをコードする遺伝子に抗原性の高いエピトープタグをノックインしたマウスに対してExpansion microscopy (ExM) という超解像度顕微鏡技術を用いることによって、ニューレキシシリガンドが数10ナノメートルのクラスターを単位として存在し、シナプス後部の性質を順行性に決定することを初めて明らかにした。 審査では、表面を向くシナプスの抽出方法とその妥当性について問われた。これに対して、共焦点顕微鏡ではXY平面に比べてZ軸の解像度が悪いため、三次元構築するのではなく、シナプスが円盤状の形状であることに着目して、XY平面での縦横比が1に近いものを「表面を向く」シナプスとして抽出したと答えた。またこのように分類されたシナプスでのシナプス分子間の距離は過去の超解像度顕微鏡や電子顕微鏡を用いた報告と一致することや、XY平面の縦横比の基準を多少変化させても、ナノクラスターの基本的性質が大きく変化しないことから本方法は妥当であると答えた。次に、PSD-95をシナプスの指標として用いることの妥当性について問われた。95%以上のPSD-95の集積部位はシナプス前部のBassoonを伴っていること、またそれらの面積の間に高い相関がみられることから、PSD-95はシナプスの指標として妥当であると答えた。さらに、エピトープタグを挿入することによる発現量の変化やシナプス分子間結合に対する影響を問われた。これに対し、副論文でのin vitroの実験系において、エピトープタグ挿入によってニューロリギン-1の細胞表面発現量が変わらないこととニューレキシシンに対する結合力が変化しないことを確認していると答えた。ExMの方法論については、過去に報告があった方法からの変更点の有無と、ゲルに包埋することによるサンプル膨張のナノレベルでの等方性はどの程度担保されているのか問われた。これに対し、本研究では過去のX10 ExM (Truckenbrodtら、2018) の方法から、ゲルに包埋された標本の処理条件を改良しており、サンプル膨張の等方性は元論文においてマイクロメートル単位で検証されていること、サンプルを膨張させない誘導放出抑制 (STED) 顕微鏡法においても、同様のナノクラスターの基本的性質が同様にみられていることから、本研究のサンプル膨張のナノレベルでの等方性はある程度担保されていると答えた。 以上、ExMの方法論の妥当性については今後さらなる詳細な検証が求められる一方で、本研究は生体内でシナプスごとにダイナミックに機能が調節される可能性を明らかにし、細胞内局所翻訳などの機構によって神経投射先ごとにその性質を決定する可能性といった今後の展開を期待させる重要な研究であると評価された。				