

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19356

研究課題名（和文）光による有芯小胞の動態制御技術の開発とその応用

研究課題名（英文）Development of Optogenetic Tools for Manipulating Dense-Core Vesicle Dynamics

研究代表者

大塚 稔久（Ohtsuka, Toshihisa）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：40401806

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）：プレシナプスに局在する光活性化アデニルシクラーゼ（bPAC-Syn1a）と光駆動型ホスホリパーゼC（opto-PLC）を開発した。開発した改良型bPAC(bPAC-Syn1a)を用い、マウス脳の腕傍核から扁桃体までのプロジェクションと扁桃体における光依存的短期増強が確認された。一方、opto-PLC に関しては、扁桃体で発現させて、電気と光のペアリング刺激による強い長期増強が観察された。これらの成果は、光ツールで有芯小胞の動態を操作できる可能性を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス小胞の放出において、光を用いた操作・介入できる新たな技術・ツールの開発に成功した。本研究の成果によりシナプス可塑性の人為的な介入が可能となり、神経機能における細胞制御および高次機能制御のメカニズムの解明に寄与し、将来的には、学習・記憶障害、神経変性疾患、糖尿病、肥満などの治療法の開発に貢献する可能性がある。また、細胞生物学全般に大きなインパクトを与え、新たな生命科学の分野を開拓する可能性を秘めている。これらの成果は、科学的知識の進歩だけでなく、社会全体の健康と福祉の向上にも寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have newly developed a bacterial photoactivatable adenylate cyclase (bPAC-Syn1a) that localizes to presynapses, and a light-controlled phospholipase C (opto-PLC). Using bPAC-Syn1a, we observed light-dependent short-term potentiation in the projection from the parabrachial nucleus to the central amygdala in the mouse brain. With opto-PLC expressed in the amygdala, we observed strong long-term potentiation induced by a pairing protocol. This protocol involved pairing excitatory postsynaptic potentials, triggered by presynaptic stimulation of thalamic afferents, with mild post-synaptic depolarization. These findings suggest the potential for manipulating dense-core vesicle dynamics using these optogenetic tools.

研究分野：神経科学

キーワード：光遺伝学 シナプス 光ツール 有芯小胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2013年のノーベル医学生理学賞受賞を契機に、細胞内小胞の輸送や融合に関する研究は大きく進展した。特に、神経系におけるシナプス小胞の融合・分泌制御の研究は、その後も目覚ましい進歩を遂げている。しかしながら、中枢神経系におけるドーパミンやセロトニン、末梢系におけるインスリンやアディポカインといったモジュレーター分子を内包する有芯小胞の動態については、依然として多くの謎が残されている。これらのモジュレーター分子は、神経伝達や内分泌機能を様々な形で修飾することが知られており、学習や記憶、情動の発現、代謝や内分泌系の制御、ひいては個体の恒常性維持とその機能低下など、様々な生理機能を担うと考えられている。しかし、これらのモジュレーター分子を内包する有芯小胞の動態を自在に操作・介入できる技術・ツールがなければ、その詳細なメカニズムを解明することは困難である。

### 2. 研究の目的

本研究では、分泌因子を内包する有芯小胞の動態を自在に操作・介入できる技術・ツールを開発することを目的としている。この技術開発により、モジュレーター分子が細胞機能を制御するメカニズムを解明し、学習・記憶障害、神経変性疾患、糖尿病、肥満などの治療法の開発に貢献することが期待される。さらに、細胞生物学全般に大きなインパクトを与え、新たな生命科学の分野を開拓する可能性を秘めている。

### 3. 研究の方法

(1) 有芯小胞の標識ツールの開発：開発したツールを用いて、有芯小胞の分泌が実際に誘導されるかどうかを確認するため、有芯小胞の挙動をモニターできるツールの開発も行った。有芯小胞のマーカーとして知られる chromograninB および secretogranin などの C 末端に pH 感受性蛍光タンパク質 pHluorin と Halo タグを融合したマーカータンパク質を作製した。

(2) 有芯小胞の動態を操作する技術・ツール開発：セカンドメッセンジャーである細胞内  $Ca^{2+}$ 、cAMP、ジアシルグリセロール(DAG)の増加やそれに伴うリン酸化の亢進によって有芯小胞の放出が制御されていることが知られている。そこで、本研究では、シグナルの代表的なセカンドメッセンジャーである cAMP と DAG、イノシトール 3 リン酸 (IP3) 産生に重点を絞り、bPAC の改良と、新規光ツールである光駆動型ホスホリパーゼ C (opto-PLC )を開発した。

(3) 光ツールの機能評価：改良型 bPAC においては、神経細胞におけるシナプス局在の焦点を絞り改良しており、海馬ニューロン初代培養および、腕傍核 (PB) から扁桃体中心核 (CeA) のプロジェクトンにおける局在を評価した。さらに、扁桃体中心核での光照射によるシナプス電位を計測した。

Opto-PLC に関しては、照射による  $Ca^{2+}$  上昇を既存の opto-1AR と比較した。また、蛍光プローブを用い、光依存的 DAG とホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP2) の変動を可視化した。具体的には、DAG は PKC の C1A ドメインを mScarlet に融合したプローブを、PIP2 は PLC の pleckstin homology ドメインを mRFP670nano3 に融合したプローブを用い、照射後細胞質側のの蛍光強度を計測した。神経機能においては、扁桃体における発現と光依存的シナプス電位を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 有芯小胞の標識ツールの開発: chromograninB および Secretogranin の C 末端にそれぞれ pH 感受性蛍光タンパク質 pHluorin、または Halotag を融合した発現コンストラクトを作製した。コンストラクトは AAV システムにより海馬ニューロンに発現させた。Halotag のリガンド R110 で標識した場合は、有芯小胞と思われる小胞構造が観察された。しかし、シナプスマーカー Synapsin1a と共局在する小胞は 1 割程度であった。刺激依存的放出をモニターするために作製した chromograninB-pHluorin および secretogranin-pHluorin では、シグナルとノイズの比率が悪く、効率良い計測ができなかった。これらの結果から、Halotag の pH 依存的なリガンドが開発されれば、計測可能と予想され、今後の課題となった。

(2) 有芯小胞の動態を操作する技術・ツール開発: 細胞内シグナル伝達を空間的に限定して操作することは、シナプス可塑性などの神経機能を制御するのに有用である。しかし、チャンネルロドプシン-2 のような光感受性チャンネルは、局在タグを用いて細胞内ターゲティングが向上しているが、セカンドメッセンジャーを制御する光感受性シグナル分子は十分に開発されていない。そこで、本研究では、プレシナプス分子である Synapsin1a を bPAC の C 末端に融合することで、プレシナプスに局在する光活性化アデニルシクラーゼ (bPAC-Syn1a) を開発した。

さらに、直接にホスホリパーゼ C を制御できる光ツールとして、マウスホスホリパーゼ C 3 と光誘導ダイマーモジュール (iLID) を用い、光駆動型 PLC を作製した。具体的には、PLC 3 (1-847) から自己抑制に關与する X-Y リンカーを SspB に置換した。iLID には KRas4B の CAAX 配列を加え細胞膜へ局在させ、PLC の光依存的な膜移行を可能にした。

(3) 光ツールの機能評価: 海馬ニューロンにおける bPAC-Syn1a の局在解析のため、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用い発現させた後、プレシナプスマーカー Bassoon と共染色し、Pearson's correlation を計測した。比較検定のために、既に報告されている Synaptophysin-bPAC (syp-bPAC) およびノntag bPAC を用いた。その結果、ノntag bPAC は細胞体や樹状突起に拡散する分布を示したが、bPAC-Syn1a と Syp-bPAC は樹状突起に

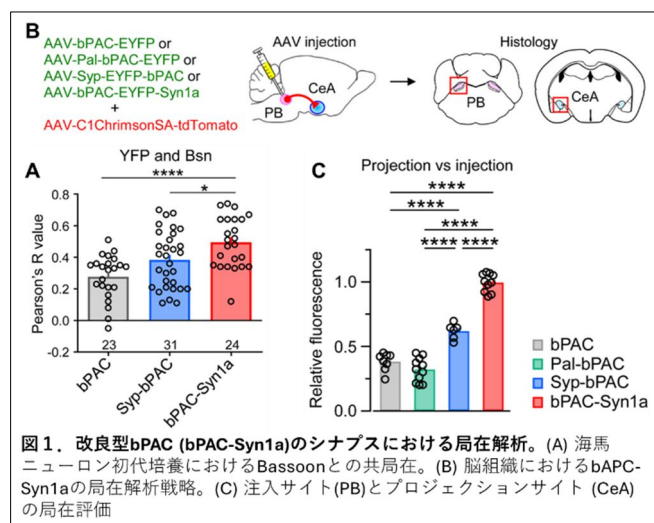


図1. 改良型bPAC (bPAC-Syn1a)のシナプスにおける局在解析。(A) 海馬ニューロン初代培養におけるBassoonとの共局在。(B) 脳組織におけるbPAC-Syn1aの局在解析戦略。(C) 注入サイト(PB)とプロジェクションサイト(CeA)の局在評価

Bassoon と共局在を示した。Pearson's correlation においては bPAC-syn1a が Syp-bPAC より有意に高く、Bassoon と共局在により高い相関性を認めた(図 1A)。さらに、脳組織において、AAV を PB に注入し CeA projection での蛍光強度を計測した結果(図 1B)においても、Synapsin1a 融合 bPAC が最もプレシ

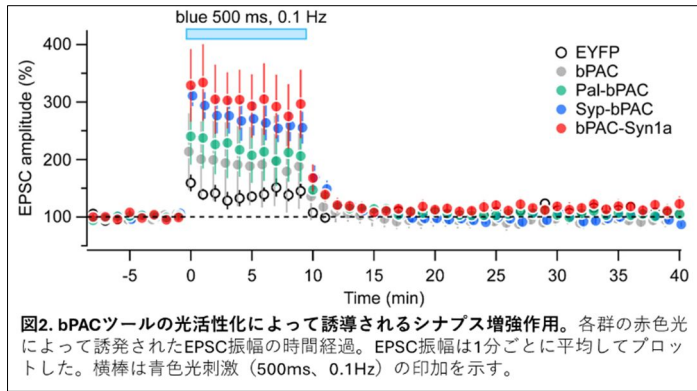


図2. bPACツールの光活性化によって誘導されるシナプス増強作用。各群の赤色光によって誘発されたEPSC振幅の時間経過。EPSC振幅は1分ごとに平均してプロットした。横棒は青色光刺激(500ms, 0.1Hz)の印加を示す。

ナプスに効率よく局在することが解った(図 1C)。CeA における EPSC を計測した結果、短期増強が観察され、プレシナプス局在と矛盾しない結果を示した(図 2)。

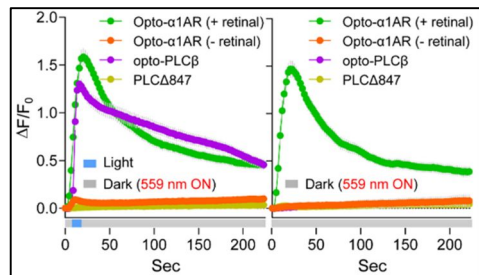


図3. HEK293T細胞におけるopto-PLCβ介した光依存的な細胞内カルシウムの動員。opto-α1ARが介在するカルシウム応答には、シス-レチナルアルデヒド(+レチナル)の補充が必要である(左)。opto-α1AR発現細胞では、559nmのレーザーでカルシウム応答をモニタリングしても、強固なカルシウム応答が観察された(右)。

Opto-PLC に関しては、HEK293 細胞において、光依存的な強いカルシウム反応が見られた。既存の Gq-PLC 経路を活性化する opto-1AR と比較すると、アクチュエーターである cis-retinal を添加しなければ作動しない opto-1AR の短所と光波長特異性を大きく改善した(図 3)。また、opto-PLC を発現させた HEK293 細胞において、光照射による PIP2 の分解と DAG の形成を可視化した(図 4)。

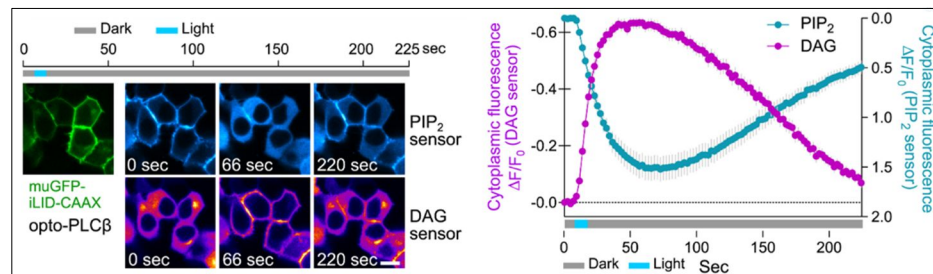


図4. 光刺激による膜PIP<sub>2</sub>、DAGの動態。光刺激後、opto-PLCβを発現する細胞において、脂質動態のタイムラプスイメージングを行った。PIP<sub>2</sub>とDAGのデュアルイメージングは、miRFP670nano3と融合したPLCδのPHドメイン(PIP<sub>2</sub>センサー)とmScarletと融合したPKCγのC1Aドメイン(DAGセンサー)を用いてモニターした。スケールバー、10 μm(左)。波長473nmのレーザーで5秒間刺激した後、細胞質蛍光強度を測定し、DAG(マゼンタ)とPIP<sub>2</sub>(シアン)の動員動態をプロットした(右)。

マウス脳の扁桃体に opto-PLC 発現 AAV を注入し、4 週間後、急性スライスカルチャーを作製し、電気と光のペアリング刺激により EPSC を計測した結果、opto-PLC を発現させた切片で強い長期増強が観察された(図 5)。

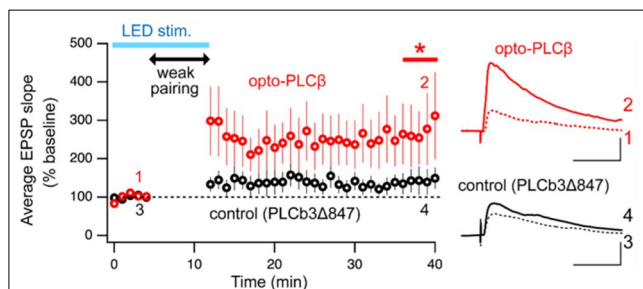


図5. opto-PLCβを介した光誘導性シナプス増強作用。光刺激と弱いペアリングによるEPSPスロープの変化(左)。0-2分(点線)と35-37分(実線)における同じ細胞のEPSPの代表的なトレース。スケールバーは5mVと50msを表す(右)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kim Yeon-Jeong, Tohyama Suguru, Nagashima Takashi, Nagase Masashi, Hida Yamato, Hamada Shun, Watabe Ayako M., Ohtsuka Toshihisa	4. 巻 -
2. 論文標題 A light-controlled phospholipase C for imaging of lipid dynamics and controlling neural plasticity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2024.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagase Masashi, Nagashima Takashi, Hamada Shun, Morishima Mieko, Tohyama Suguru, Arima-Yoshida Fumiko, Hiyoshi Kanae, Hirano Tomoha, Ohtsuka Toshihisa, Watabe Ayako M.	4. 巻 4
2. 論文標題 All-optical presynaptic plasticity induction by photoactivated adenylyl cyclase targeted to axon terminals	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100740 ~ 100740
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2024.100740	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hagiwara Akari, Mizutani Ayako, Kawamura Saki, Abe Manabu, Hida Yamato, Sakimura Kenji, Ohtsuka Toshihisa	4. 巻 24
2. 論文標題 Critical Role of the Presynaptic Protein CAST in Maintaining the Photoreceptor Ribbon Synapse Triad	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7251 ~ 7251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24087251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hamada S, Mikami K, Ueda S, Nagase M, Nagasima T, Yamamoto M, Bito H, Takemoto-Kimura S, Ohtsuka T, Watabe AM.	4. 巻 16
2. 論文標題 Experience-dependent changes in affective valence of taste in male mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-023-01017-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe M, Nakatsukasa E, Natsume R, Hamada S, Sakimura K, Watabe AM, Ohtsuka, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel technique for large-fragment knock-in animal production without ex vivo handling of zygotes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29468-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Cao Y., Fajardo D., Guerrero-Given D., Samuel AM., Ohtsuka T., Boye SE., Kamasawa N., Martemyanov KA.	4. 巻 32
2. 論文標題 Post-developmental plasticity of the primary rod pathway allows restoration of visually guided behaviors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 4783-4796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.09.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimozono, K., Nan, H., Hata, T., Saito, K., Kim, YJ., Nagatomo, H., Ohtsuka, T., Koizumi, S., Takiyama, Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Ubp1 knock-in mice reproduced the phenotype of SPG80.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 679-686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-022-01073-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nan, H., Kim, YJ., Tsuchiya, M., Ishida, A., Haro, H., Hiraide, M., Ohtsuka, T., Takiyama, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel SLC9A6 Variation in Female Carriers With Intellectual Disability and Atypical Parkinsonism.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurology Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXG.0000000000000651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Yeon-Jeong Kim, Suguru Tohyama, Takashi Nagashima, Masashi Nagase, Yamato Hida, Shun Hamada, Ayako M. Watabe and Toshihisa Ohtsuka.
2. 発表標題 Optogenetic Control of Basolateral Amygdala Plasticity and Fear Memory Formation via Engineered Phospholipase C.
3. 学会等名 Neuronal Circuits Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yeon-Jeong Kim, Shun Hamada, and Toshihisa Ohtsuka.
2. 発表標題 Optogenetic engineering of light-controlled phospholipase C: metabolic dynamics of phosphoinositide.
3. 学会等名 ゴードンリサーチカンファレンスMolecular and Cellular Biology of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kim Yeon-Jeong, Hida Y, Ohtsuka T.
2. 発表標題 Live cell-imaging of CAST/ELKS-mediated liquid-liquid phase separation regulates protein complexes in presynaptic active zone.
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sota Sawada, Ryo Kozawa, Masataka Yamamoto, Yuhei Mizunoe, Ryo Goitsuka, Toshihisa Ohtsuka, Hiroshi Takemura, and Akari Hagiwara
2. 発表標題 Depletion of LKB1 at cerebellar synapses causes progressive locomotion dysfunction linked to the reduced neuromuscular transmission.
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toshihisa Ohtsuka
2. 発表標題 The future of Japan brain initiatives: BRAIN/MINDS and BRAIN/MINDS Beyond
3. 学会等名 ヒューマンブレイン プロジェクト(HBP)サミット(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Saki Kawamura, Toshihisa Ohtsuka, Yamato Hida, Akari Hagiwara
2. 発表標題 Morphological examination of the role of LKB1 in retinal horizontal cell remodeling using the AAV-based labeling system.
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayu Kitamura, Akari Hagiwara, Shun Hamada, and Toshihisa Ohtsuka
2. 発表標題 Depletion of LKB1 in the cerebellar granule cells induces locomotor dysfunction in aged mice.
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会(国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学医学部生化学講座第一教室ホームページ  
<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/>



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
---------	---------