

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02527

研究課題名(和文) 記憶をつくるシナプス・細胞集団の光技術による可視化と動態解析

研究課題名(英文) Analysis of synaptic and neuronal population for memory formation by light-techniques

研究代表者

川口 真也 (Kawaguchi, Shin-ya)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：00378530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：動物の記憶・学習を実現する神経回路の機能変化の実体は、未だに良く分かっていない。本研究では、申請者が独自開発を続けている学習の細胞基盤であるシナプス可塑性を検出する蛍光プローブと細胞膜電位の蛍光イメージングを組み合わせ、シナプス可塑性がいかに個々の神経細胞の情報処理を変化させ、それが神経回路レベルでどのような演算変化を生み出すかを明らかにすることを目指した。本研究により、長期抑圧が発現した部位を生きたマウスで蛍光標識する技術が整い、また長期抑圧の発現に関する空間情報を精緻に明らかにできつつある。一方で、当初予想していない新たな神経細胞の機能的可塑性が、大きな時空間枠で起こることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物における記憶や学習の仕組みを理解するには、複雑な神経回路の中でどのような機能変化の集合体が重要か、を明らかにする必要がある。その実現には幅広い時空間スケールで神経細胞集団の精緻な機能解析を行わなければならない。本研究で確立した、神経細胞の電気活動や記憶・学習の基礎過程であるシナプス可塑性を光で捕捉する技術は、そうした記憶・学習が実際の生きた動物の中でどのように起こり、それが神経回路の情報の流れをどのように変化させるのかについて理解することを可能にする。したがって、本研究成果は、動物の状況に応じた環境適応の根本メカニズムの理解に繋がる重要な意義をもっている。

研究成果の概要(英文)：The nature of memory engrams in animal brain remains unclear. Using the leading-edge fluorescent imaging techniques for synaptic plasticity and membrane potential, this project has aimed to clarify the population of activity-dependent synaptic plasticity encoding memory through changing information processing in individual neurons and circuits. Several lines of live-imaging experiments enabled by our own technical improvements have succeeded in unraveling the spatial information about the functional plasticity in neurons, which will eventually make it possible to fluorescently label the LTD synapses during learning in live animals. In addition, I unexpectedly found a novel long-term plasticity of neuronal information processing at axonal regions after the induction of plasticity at dendrites.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 可塑性 学習 蛍光イメージング 長期抑圧 プルキンエ細胞 軸索 活動電位

## 1. 研究開始当初の背景

動物の記憶・学習能力は神経系の情報処理変化により生まれる。神経細胞間の情報伝達に変化するシナプス可塑性が素子となり、その集合体：シナプス・アセンブリによりセル・アセンブリが形成されて個々の記憶がコードされると推測されるが、シナプス可塑性から記憶・学習に至る神経回路レベルの仕組みは不明である。この原因として、膨大な数の神経細胞が複雑につながりあった神経回路を研究する上で、高精度に時空間情報を取得することが難しい技術的限界が挙げられる。個々の細胞では、1ミリ秒以下の活動電位により情報がコードされ、1 μm 程の微小なシナプスで他細胞へ情報伝達されるため、微細空間での高速情報処理を見る必要がある。一方、記憶・学習の基盤となる機能変化は数時間から数日以上にわたる長期安定性を有し、空間的にも複数細胞・シナプスを跨る分散的なものとなる。したがって、シナプス機能変化が記憶・学習に至る過程を論理ギャップなく理解するには、幅広い時空間スケールで神経細胞機能とその変化を非侵襲的に制御・観測する技術が求められ、それが研究の進展の大きな障壁となっている。

## 2. 研究の目的

上述した技術的障壁により理解が難しい記憶を実現する神経回路の実体を明らかにするため、神経活動の膜電位感受性蛍光タンパク質による多点観測と、シナプス可塑性を個々のシナプスレベルで長時間標識する蛍光プローブを開発することが有用である。そして、光技術を駆使して神経細胞の活動操作、活動計測、可塑的变化の可視化を実現し、「見る」だけで神経細胞・回路機能の柔軟性を捉える新手法を確立する。最終的には、それら光技術を生きた動物個体に適用し、運動学習を実現する神経回路の機能変化の可視化へ繋げることが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

運動学習の基礎過程である小脳プルキンエ細胞での長期抑圧(LTD)発現を可視化する蛍光プローブ分子として、リン酸化酵素 PKC を改変して蛍光タンパク質と融合したものを独自開発・改良してきた。また、細胞膜電位蛍光プローブ分子についても、膜電位依存性脱リン酸化酵素の膜電位感受性部位と蛍光タンパク質を融合させたタンパク質(文献 )を、独自改変して S/N 比を向上させてきた。本研究では、これら光技術を駆使した細胞機能の時空間情報について妥当性と精緻化を担保するため、蛍光イメージングと軸索・樹状突起・シナプスなど微小部位からの直接パッチクランプ記録を組み合わせ検証した。これら 2 種のプローブを分散培養およびスライス培養下のプルキンエ細胞に発現させ、樹状突起でのグルタミン酸入力による細胞膜電位変化を蛍光強度の変化として記録し、それが LTD 発現によりどのように変化して細胞体まで伝わるかを調べた。

神経細胞に局所的な刺激を与えるために、ケージドグルタミン酸など紫外光(405 nm)により活性化する分子を用いて、レーザースポット照射(径 1-2 μm)による局所刺激をシステム実装し、初代分散およびスライス培養標本を用いて、光で刺激し、光で神経活動と可塑的機能変化を捕捉することで、神経細胞活動とその可塑性の時空間パターンを解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 膜電位変化を蛍光変化として捉える膜電位イメージング蛍光プローブの改良

さらなる変異導入により、膜電位変化をより高速に捉えることができる時間追従性の飛躍的向上と、蛍光強度の変化をより高感度にする遺伝子改変に成功した(図 1)。また、そのプローブ分子をより高輝度で小脳プルキンエ細胞に発現させるため、TET システムで発現 ON/OFF 切り替えと発現強度の増幅を兼ね備える AAV ベクターを設計し、その組み合わせに応じてプローブを発現する細胞の割合の

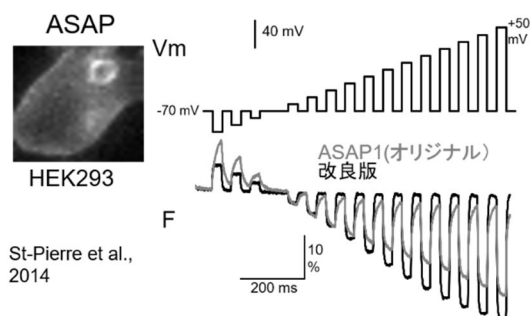


図 1 HEK 細胞に発現させた改良型膜電位感受性タンパク質  
膜電位(Vm)変化に応じて蛍光(F)が変化する

調節と蛍光輝度上昇に成功した。

こうした基盤的な技術改良を施した蛍光イメージングプローブを小脳プルキンエ細胞に発現させた機能解析から、下記(2)~(4)のユニークな知見を得ることができた。

## (2) プルキンエ細胞における長期抑圧の光による制御と捕捉の自在化

樹状突起で長期抑圧(LTD)を多くのプルキンエ細胞で一括して誘導するため、分散培養下のプルキンエ細胞を高濃度 K<sup>+</sup>とグルタミン酸を含む溶液で2分間処理し、元の培養液に戻す操作を行った。その結果、長期抑圧の発現部位の細胞膜周辺に集積するようにデザインした PKC を改変した蛍光融合タンパク質プローブが、数時間以上にわたり膜近傍に集積した後に、細胞内膜系に集積の場を変遷させながら、次第に元の細胞内分布状態に回復するという一連の経過が明らかになった。また、この蛍光プローブ分子は比較的 cDNA 配列が長いために AAV ベクターを作成するのが難しいが、TET システム導入によるプロモーター領域の短縮と発現増幅を達成し、十分なプローブ発現を確立した。

405nm レーザーを高速・多点で照射してケージドグルタミン酸を光活性化することで長期抑圧を誘導し、プルキンエ細胞の自発的活動がどのように変化するかを、膜電位イメージングにより観察した(図2)。その結果、細胞での長期抑圧に伴い、その活動パターンが持続的かつ大規模に変化し続けることを蛍光イメージングで見ただけで判別できた。したがって、長期抑圧の発現に伴う膜電位変化パターンの長期的変化を光技術により捕捉し、さらに、長期抑圧が発現した状況を蛍光プローブの細胞膜近傍への持続的な集積として、高い S/N 比で可視化する技術確立に成功した。

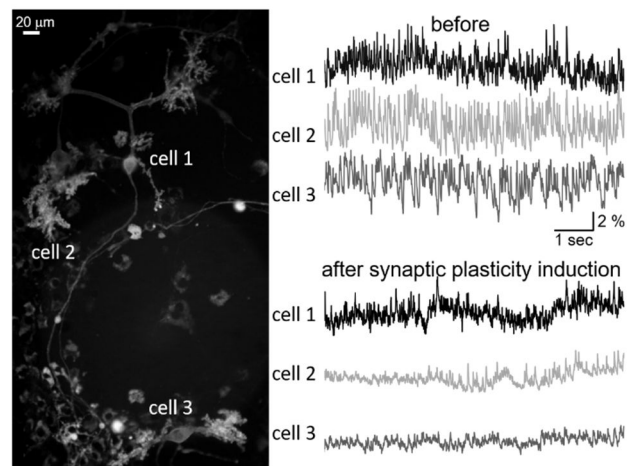


図2 膜電位イメージングによる複数プルキンエ細胞の活動記録  
多点グルタミン酸光活性化を用いた長期抑圧による活動変化

## (3) 軸索及びその終末における情報伝播及び伝達を調節する新規メカニズム

前述した LTD 誘導処理を行った培養プルキンエ細胞の膜電位変化を蛍光イメージングにより非侵襲的に計測する中で、当初想定していなかった意外な変化に気づいた。それは、プルキンエ細胞の軸索終末部位での膜電位変化に対応した蛍光変化として、活動電位に相当する鋭い蛍光輝度変化だけでなく、樹状突起で見られる興奮性シナプス後電位と似た緩慢な蛍光輝度変化が頻繁に発生する、ということである。僅か2分間の LTD 誘導処理により、以後24時間以上もの長時間にわたり対照群の細胞と比較して有意に脱分極性膜電位応答が増加すること、その応答が軸索終末部の GABA<sub>A</sub> 受容体により引き起こされること、その結果軸索部への局所的 405nm レーザー照射により惹起したケージド GABA 光活性化に応じて軸索部位での活動電位発生が頻発することが分かった。こうした結果は、樹状突起および細胞体で他細胞から受けるシナプス入力を統合し、軸索で活動電位発火に変換して終末から次の細胞へ情報伝達をする、という神経細胞の基本的な1方向性情報処理の理解を修正するもので、活動依存的な出力部位の軸索終末部に入力受容能が生じて状況により活動電位発火に至る、という斬新な仕組みを示唆する。この新規性の高い長期可塑性メカニズムについて、分子機構をさらに追究した結果を合わせ学術誌での論文公開に向けて結果を総括している。

上記に加えて、代謝型受容体による Gq タンパク質活性化から生じる IP<sub>3</sub> シグナルについて、軸索及び終末においても重要な役割を担うことを見出した。局所 405nm レーザー照射によるケージド IP<sub>3</sub> の光活性化を切片標本および初代分散培養プルキンエ細胞に適用し、軸索部位での IP<sub>3</sub> シグナルがどのような影響を生じるかについて、仏国 CNRS の Alain Marty および Isabel Llano らとの共同研究により検討した。その結果、プルキンエ細胞の軸索起始部での IP<sub>3</sub> 受容体活性化による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は、局所的な膜抵抗低下を引き起こし活動電位の発生確率を低下させることが分かった。一方、軸索終末部での IP<sub>3</sub> 受容体活性化は、シナプス小胞の活動非

依存的な膜融合を強め、プルキンエ細胞が投射する小脳核細胞における自発的な微小シナプス後電流の頻度上昇が起こった。終末部の細胞外で同様にケージド ATP を光活性化した場合にも、微小シナプス後電流の頻度増加が起こったことと考え合わせ、P2Y 受容体などの活性化に応じて軸索部位でも細胞内 IP<sub>3</sub> 濃度が上昇して小胞体からの Ca<sup>2+</sup>放出が起こり、活動電位発火確率や自発的シナプス出力が調節されることが明らかになった。これらの研究成果については、米国の PNAS 誌に論文を発表した(文献 )。また、こうしたシナプス前部機能における動的機能調節によるシナプスの可塑性の性質について、自身の研究に焦点をあてながら分子レベルでその仕組みを考察して今後の見通しを議論したレビューを公刊した(文献 )。

#### ( 4 ) 海馬錐体細胞の樹状突起における興奮伝播の非対称性

膜電位蛍光イメージングプローブの性能向上を達成した技術的成果を、プルキンエ細胞から海馬錐体細胞へも展開し、興奮性入力応答が樹状突起でどのように処理されるかを検討した。ケージドグルタミン酸の局所光活性化による興奮性シナプス後電位を樹状突起に惹起し、その脱分極が細胞内でどのように空間的に広がるかをイメージング解析すると、通常閾値に達しない脱分極性の膜電位変化はその部位から周囲へ次第に減弱しながら伝播すると考えられているが、驚くべきことに刺激部から細胞体とは反対方向へ脱分極応答が増大しながら伝わることを示唆された。この興味深い現象について、分子メカニズムについての追究を続けつつ計 4 回学会発表し、論文公刊の準備も進んでいる。

#### ( 5 ) 海馬錐体細胞の樹状突起における局所的 RNA 修飾メカニズムの役割

神経細胞において、RNA のメチル化修飾が樹状突起での局所的な機能変化を実現する可能性が着目されており、それを海馬の錐体神経細胞においてパッチクランプ記録により検証した。具体的には、メチル化修飾を調節する分子のひとつである YTHDF1 の発現を RNAi 法により抑制すると、興奮性シナプス後部の足場タンパク質が減少するとともに、自発性微小シナプス後電流が小さくなることを見出した。したがって、神経細胞のシナプス部における mRNA 修飾が、シナプス機能を動的に調節する局所メカニズムが存在することが明らかとなった。本研究は、当時京都大学の特定准教授であった王丹博士との共同研究として実施したもので、研究成果は Nature Neuroscience 誌に発表した ( 文献 )。

#### < 引用文献 >

St-Pierre et al. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. Nat. Neurosci., 17, 2014, 884-889

Gomez et al. Influence of spatially segregated IP<sub>3</sub>-producing pathways on spike generation and transmitter release in Purkinje cell axons. Proc Natl Acad Sci U S A. 117, 2020, 11097-11108.

Kawaguchi SY. Dynamic Factors for Transmitter Release at Small Presynaptic Boutons Revealed by Direct Patch-Clamp Recordings. Front Cell Neurosci. 13, 2019, 269.

Merkurjev et al. Synaptic N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) epitranscriptome reveals functional partitioning of localized transcripts. Nat Neurosci. 21, 2018, 1004-1014.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Gomez Laura C., Kawaguchi Shin-ya, Collin Thibault, Jalil Abdelali, Gomez Maria del Pilar, Nasi Enrico, Marty Alain, Llano Isabel	4. 巻 117
2. 論文標題 Influence of spatially segregated IP <sub>3</sub> -producing pathways on spike generation and transmitter release in Purkinje cell axons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 11097 ~ 11108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2000148117	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 該当する
1. 著者名 Kawaguchi Shin-ya	4. 巻 13
2. 論文標題 Dynamic Factors for Transmitter Release at Small Presynaptic Boutons Revealed by Direct Patch-Clamp Recordings	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00269	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 Trigo Federico F., Kawaguchi Shin-ya	4. 巻 13
2. 論文標題 Editorial: Control of Presynaptic Function by Axonal Dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00543	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 Merkurjev Daria, Hong Wan-Ting, Iida Kei, Omoto Ikumi, Goldie Belinda J., Yamaguti Hitoshi, Ohara Takayuki, Kawaguchi Shin-ya, Hirano Tomoo, Martin Kelsey C., Pellegrini Matteo, Wang Dan Ohtan	4. 巻 21
2. 論文標題 Synaptic N6-methyladenosine (m6A) epitranscriptome reveals functional partitioning of localized transcripts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1004 ~ 1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41593-018-0173-6	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森田 雅登、平野 丈夫、川口 真也
2. 発表標題 膜電位感受性蛍光プローブを用いた神経活動の時空間解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田 雅登、平野 丈夫、川口 真也
2. 発表標題 Spatio-temporal integration of synaptic inputs in hippocampal neurons studied by membrane potential imaging
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田 雅登、川口 真也
2. 発表標題 海馬神経細胞における興奮性シナプス入力方向依存的調節の膜電位イメージングによる可視化
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田雅登、平野丈夫、川口真也
2. 発表標題 海馬神経細胞におけるシナプス入力統合の膜電位イメージングによる時空間解析
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口 真也
2. 発表標題 小脳神経回路における軸索・シナプス前部での動的情報処理
3. 学会等名 第41回 日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ya Kawaguchi
2. 発表標題 Control of Synaptic Outputs by Dynamic Axonal Excitability
3. 学会等名 9th FAOPS Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 Modulation of synaptic outputs of a cerebellar Purkinje cell by cannabinoid revealed by bouton recordings
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 古川 慧、川口 真也
2. 発表標題 cAMP attenuates action potential conduction in cerebellar Purkinje cell axons
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 川口 真也	4. 発行年 2021年
2. 出版社 公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院	5. 総ページ数 4ページ/92ページ
3. 書名 生体の科学 [特集]小脳研究の未来	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究代表者の研究室HP <a href="http://www.nb.biophys.kyoto-u.ac.jp/research.html">http://www.nb.biophys.kyoto-u.ac.jp/research.html</a>
--

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		
フランス	CNRS	Universite de Paris	
ウルグアイ	IIBCE		