

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間	2020年度～2024年度
課題番号	20H05685
研究課題名	大脳スパイン形態可塑性からシナプスメカノバイオロジーの建設と光操作
研究代表者氏名（ローマ字）	河西春郎（KASAI Haruo）
所属研究機関・部局・職	東京大学・大学院医学系・教授
研究者番号	60224375

研究の概要：

学習刺激を与えるとスパインシナプスは増大運動をするが、その短期相では軸索終末に作用することにより、誘発性開口放出が増し、その効果が20分続くことを報告した(*Nature* 2021)。この力学伝達の成因と結果を更に調べる。長期増大が誘発されたスパインを単一細胞で標識し操作するプローブを開発して、学習シナプス分布と機能の関係を明らかにする。

研究分野：神経科学一般、生物物理学

キーワード：シナプス、2光子励起、学習、記憶、細胞運動、メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

スパイン増大の長期相はグルタミン酸受容体の発現と平行しており、長期記憶との関係が考えられているが、スパイン増大の短期相の機能は不明であった。当該研究では、この作用が軸索終末の開口放出を即時的及び持続的に促進することを報告し、その分子細胞基盤を明らかにする。また、長期相については、蛋白質合成に依存するので、これを使ってスパインを標識することができる。しかし、この方法の原法は、単一細胞レベルで記憶シナプスの分布を標識することができない。この標識の基本的特性を上げる工夫をし、また、圧力効果も操作できるようにする必要がある。

2. 研究の目的

A) 我々は新しい光学的方法論を開拓して、スパイン増大がシナプス前部を力学的に押すことにより増強する、力学伝達、という新しい知見に至っており、その発表を急ぐ(図1)。また、その圧力効果には即時相と20分続く持続相があるので、それぞれについて機構の解明を進め、それに基づき操作的介入法を探る。

B) 増大スパインを標識するASプローブの改良を進め、単一神経細胞において長期的増大スパインを標識し、その分布を観察し操作する方法を改良する。この新ASプローブを利用することにより、シナプス前終末を標識できるプローブ(BSプローブ)や軸索圧効果を操作的に解除することができるプローブの開発を進め、スパイン増大だけでなく力学伝達の生理的機能の調査を可能にする。

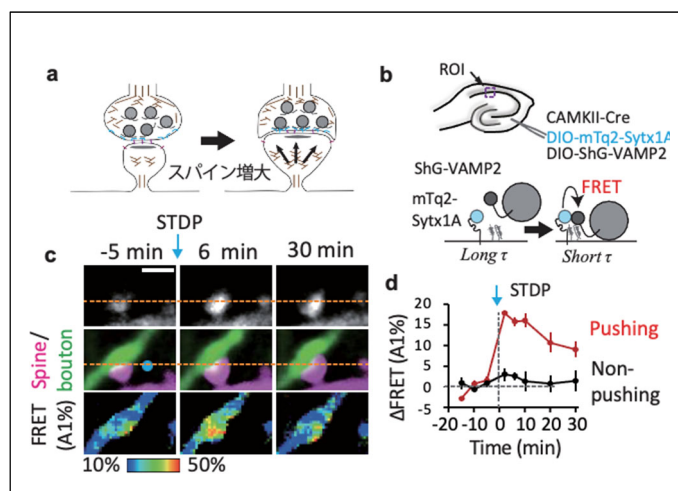


図1 軸索の圧感覚応答(PREST, 論文2から) a, シナプスの力学応答. b, 海馬CA3へのウイルス導入の図. t-SNARE (Sytx1A)とv-SNARE (VAMP2)の会合によるFRETを測定する. c, 樹状突起スパインの蛍光イメージ(上), 終末イメージとの重ね(中), 軸索のFRET画像(下). スケールバー, 1 μ m. ダッシュラインは増大前のスパイン先端の位置を表示. d, 軸索FRETの時間経過. 軸索が押された場合(赤), 押されなかった場合(黒).

3. 研究の方法

- A) スライス、単離培養を共用して、圧効果の即時相の性質をグルタミン酸センサーiGluSnFRと電気刺激それにSNARE-FRET/FLIM法を用いて調べる。持続相においては小胞クラスターの変形とそれによる動員の亢進をSTEDによる膜画像を用いて調べる。
- B) 単離培養標本を用いて標識の根幹に関わる分子フレームの最適化を行う。開発されたプローブを個体に適用し、活動依存性や光操作の検証をする。最終的には記憶行動の操作的改変ができた動物の脳各部の神経細胞の標識シナプスの分布を精細に調べる。また、同様手法を軸索側に応用して、圧効果の脳各領域における機能を調べる。

4. これまでの成果

- A) 目標としていた基本的な力学的伝達の論文を *Nature* 2021 に発表した (論文 2, 図 1)。それに続いて、単離培養で方法論を確立することにより、即時相と持続相の成因について意外な仮説を持つに至っている。
- B) 分子プローブについて、樹状突起標的配列について抜本的な改善が為され、刺激反応性が数倍上がった。一方、スパインへの分子標識についても沢山の標的法をスクリーニングする中で、alpha-fold2を用いた独自のデザインのプローブにおいて、高いスパイン集積性、輝度、低毒性、操作プローブの感受性の改善が得られた。これをレンチウイルスで個体の皮質にスパースに発現することを確認した。

5. 今後の計画

- A) 新しい仮説の検証を進めながら、更に、分子機転について理解を深め、操作性が入れられる可能性を探る。
- B) 個体への適応の段階まで進んだので、ここでの実験系の構築を進め、定量性に富む単離培養の結果を個体の結果と関連させながらスクリーニングを進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Hao Wang, Kouichi Mizuno, Noriko Takahashi, Eri Kobayashi, Jun Shirakawa, Yasuo Terauchi, Haruo Kasai, Katsuhide Okunishi, Tetsuro Izumi (2020.11) Melanophilin Accelerates Insulin Granule Fusion Without Predocking to the Plasma Membrane, *Diabetes* 69, 2655-2666. DOI: 10.2337/db20-0069
2. Ucar, H., Morimoto, Y., Watanabe, S., Noguchi, J., Iino, Y., Yagishita, S., Takahashi, N. & Kasai, H. (2021). Mechanical actions of dendritic-spine enlargement on presynaptic exocytosis. *Nature* 600: 686-689. DOI: 10.1038/s41586-021-04125-7
3. Kasai, H. & Ucar, H. (2021) Forceful synapses reveal mechanical interactions in the brain. *Nature* online 24 November 2021. DOI:10.1038/d41586-021-03516-0.
4. Kasai, H., Ziv, N. E., Okazaki, H., Yagishita, S. & Toyozumi, T. (2021) Spine dynamics in the brain, mental disorders and artificial neural networks. *Nature Reviews Neuroscience* 22: 407-422. DOI:10.1038/s41583-021-00467-3
5. Shimizu, G., Yoshida, K., Kasai, H. & Toyozumi, T. (2021) Computational Roles of Intrinsic Synaptic Dynamics, *Current Opinions in Neuroscience* 70:34-42. DOI:10.1016/j.conb.2021.06.002
6. Urakubo, H., Yagishita, S., Kasai, H., Kubota, Y. & Ishii, S. (2021) Molecular concentrations required for dopamine dip-detection in D2 striatal-projection neurons. *PLoS Computational Biology* 17: e1009364. DOI:10.1371/journal.pcbi.1009364
7. Yamaguchi, K., Maeda, Y., Nakazato, R., Iino, Y., Sawada, T., Tajiri, M., Ishii, S., Kasai, H. & Yagishita, S.* (2022). A behavioural correlate of the synaptic eligibility trace in the nucleus accumbens. *Scientific Reports* 12:1921. DOI:10.1038/s41598-022-05637-6
8. 恩賜賞・日本学士院賞 (2022. 3. 14) 「大脳シナプスの形態可塑性法則の発見」

7. ホームページ等

<https://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp/>