

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15183

研究課題名（和文）空間記憶の符号化を担うシナプス前性分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Presynaptic molecular correlates of memory encoding

研究代表者

坂本 寛和（Sakamoto, Hirokazu）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：10837397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：海馬は記憶の形成に重要な働きを持つ脳部位である。記憶はある特定の神経細胞集団から成る神経回路の活性変化として符号化される。その符号化の過程においてシナプス伝達効率の変化（シナプス可塑性）が重要な役割を果たすと考えられているが、その分子メカニズムはよく分かっていなかった。本研究では、学習時に活性化した海馬のシナプスで生じたプレシナプス分子（Munc13-1, RIM1, 電位依存性カルシウムチャンネルなど）の量およびナノレベルの局在変化を系統的に定量するための超解像顕微鏡解析技術を構築し、記憶符号化に関わるプレシナプスの分子メカニズムを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、記憶の形成に関わる海馬のシナプスに注目し、記憶形成時に生じるシナプス内の分子（タンパク質）の変化に焦点を当てて研究を行った。シナプスはマイクロメートル以下の非常に微小な構造であり、また脳組織中に高密度に存在しているため、その中のタンパク質に注目して解析を行うことは容易ではない。最先端の超解像顕微鏡技術と独自のシナプス標識技術を組み合わせることで、記憶形成時に活性化したシナプスを膨大な数のシナプスの中から抽出し、そこに集積するタンパク質群の量や局在を精密に定量する技術を構築することに成功した。今回の成果は、記憶の形成という脳の高度な機能を分子の観点から理解する上で大きな意義を持つ。

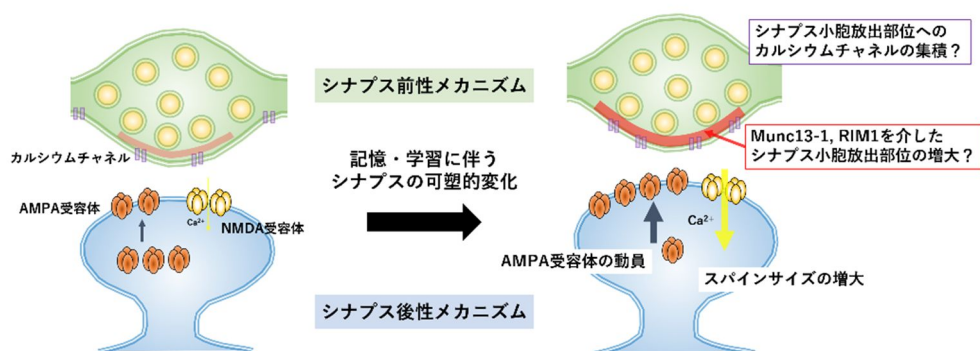
研究成果の概要（英文）：The hippocampus plays important roles in memory formation. It has been widely assumed that long-lasting synaptic changes (synaptic plasticity) within the neuronal network mediate memory. However, the molecular mechanisms especially presynaptic regulations underlying memory encoding remains poorly understood. In this study, we established a systematic super-resolution imaging analysis method for quantifying presynaptic proteins (including Munc13-1, RIM1, and voltage-gated calcium channels) at hippocampal synapses in the brain sections. Using this method, we successfully detected changes in the amount and the nanoscale spatial distribution of presynaptic proteins at hippocampal synapses activated during memory encoding.

研究分野：生物学

キーワード：シナプス プレシナプス シナプス可塑性 記憶 学習 海馬 超解像顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

海馬はエピソード記憶の形成に重要な働きを持つ脳部位である。記憶はある特定の神経細胞集団から成る神経回路の活性変化として符号化され、シナプス伝達効率の長期増強現象 (long-term potentiation, LTP) や長期抑圧現象 (long-term depression, LTD) などのシナプス可塑性が符号化の過程において重要な役割を果たしていると考えられている。興奮性シナプス後部のグルタミン酸受容体数増加による LTP が記憶に関与するという報告は多く、シナプス後性のメカニズムと記憶との関連は広く受け入れられている。一方、シナプス前部の可塑的な変化と記憶の関連は報告が少なく、特にその分子メカニズムはよく分かっていない。シナプス前部の構造は、シナプス後部の構造変化に伴ってスケールアップされることから、記憶形成に際してシナプス前部でも可塑的な変化が生じると考えるのは妥当である。記憶という脳高次機能を神経回路の素子であるシナプスのレベルで理解するためには、シナプス後性だけでなくシナプス前性の分子メカニズムを詳細に明らかにする必要がある。



2. 研究の目的

記憶の符号化を担うシナプス前性分子メカニズムの解明を目指して、記憶形成時に海馬シナプスのシナプス前部で生じる分子変化を定量するための技術を開発することを本研究の目的とする。具体的には、脳組織切片内を用いた免疫組織化学染色法と超解像顕微鏡観察技術を改良・発展させることで、海馬のシナプス前部における機能分子の発現・分布をシナプスレベル・ナノレベルで系統的に定量する技術を確立する。

3. 研究の方法

新規環境の学習課題を課した動物 (実験群) と学習課題を課していない動物 (対照群) の凍結脳標本を作製し免疫組織化学染色を行い、シナプス前部の分子発現・分布を比較解析することで、学習によって生じるシナプス前部の分子変化を定量した。解析対象の分子として神経伝達物質の放出量を決める Munc13-1 と電位依存性カルシウムチャネル (Cav2.1) シナプス前部の LTP への関与が示されている RIM1 を選択した。シナプスレベル・ナノレベルでの解析を行うために、計測には超解像顕微鏡 (STED・STORM) を用いた。電気生理学的にシナプス前部の LTP が報告されている苔状線維シナプス (歯状回から CA3 野へ入力) および貫通線維シナプス (嗅内皮質から海馬へ入力) の二種に加えて、理論モデルから学習時にシナプス伝達効率の再編が行われることが予測されている CA3-CA3 シナプスを含めた計三種類の興奮性シナプスに焦点を当て解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、記憶符号化に関わるシナプス前部 (プレシナプス) の分子メカニズムを解明するために、海馬のシナプスで生じるプレシナプス分子の量的変化およびナノスケールの局在変化を系統的に定量するための技術を構築した。

- (1) まず、脳組織切片における蛍光免疫組織化学染色法を改良・発展させることで、シナプス前部の可塑性に関与することが推定される分子群 (Munc13-1、RIM1 およびカルシウムチャネルなど) の定量的な超解像顕微鏡 (STED・STORM) 計測・解析法を確立した (Sakamoto et al., 2022)。この技術では先鋭化フィルタ法およびデコンボリューション法を用いて、超解像顕微鏡画像からプレシナプス (アクティブゾーン) の位置やプレシナプス内の分子クラスターを推定する。これらの画像解析処理を自動化することによって、一度に数千～数万のシナプスを対象として任意のシナプス分子の総量や分子間の位置関係を定量することを可能となった (図 1)。

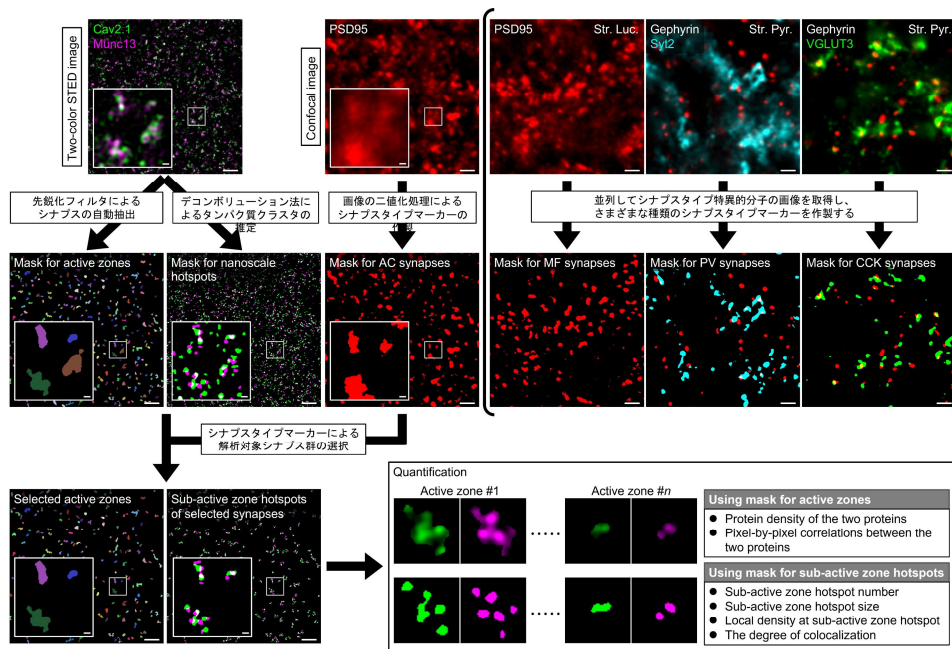


図1 系統的なシナプス分子の定量解析を可能にする超解像画像解析法の構築

多色のシナプス分子超解像顕微鏡画像から先鋭化フィルタ法とデコンボリューション法を用いて、個々のシナプス(ここではシナプス前部アクティブゾーン)の局在位置を推定し、シナプス分子の総量や分子間の位置関係を定量する。自動化することで、一度に数千~数万のシナプスを解析することが可能となる。

- (2) 次に、構築した超解像顕微鏡解析システムを用いて、シナプス可塑性に伴うプレシナプス分子の量的変動を捉えられるのかを実証するために、海馬の急性スライス標本を用いて光遺伝学によって苔状線維シナプスに LTP を誘導する実験を行った。その結果、プレシナプスの LTP を誘導した苔状線維シナプスでは Munc13-1、RIM1 などのプレシナプス分子の量が選択的に上昇することが明らかとなった (Fukaya et al., 2023)。
- (3) 神経活動依存的に活性化するプロモーターシステム (Robust Activity Marking; RAM) を用いてシナプス分子マーカーを発現させることで、新規環境の学習課題を課して学習を成立させた際に活性化したシナプスを選択的に標識するための可視化技術を構築した。この技術と超解像顕微鏡を用いた(1)の解析システムを組み合わせることによって、学習により選択的に活性化したシナプスにおけるプレシナプス分子の量や局在をナノレベルで定量することが可能となった。特に、新規環境の学習課題を課した動物の脳標本では、海馬の苔状線維シナプスにおいてプレシナプス分子の量的変動が生じることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshida Tomofumi, Takenaka Koh-ichiro, Sakamoto Hirokazu, Kojima Yusuke, Sakano Takumi, Shibayama Koyo, Nakamura Koki, Hanawa-Suetsugu Kyoko, Mori Yasunori, Hirabayashi Yusuke, Hirose Kenzo, Takamori Shigeo	4. 巻 26
2. 論文標題 Compartmentalization of soluble endocytic proteins in synaptic vesicle clusters by phase separation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106826 ~ 106826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106826	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 Fukaya Ryota, Hirai Himawari, Sakamoto Hirokazu, Hashimotodani Yuki, Hirose Kenzo, Sakaba Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased vesicle fusion competence underlies long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	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) 10.1126/sciadv.add3616	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 Miyano Rinako, Sakamoto Hirokazu, Hirose Kenzo, Sakaba Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 RIM-BP2 is required for rapid neurotransmitter release through regulation of Ca ²⁺ channel clustering at hippocampal mossy fiber terminals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2022.08.29.505728	査読の有無 無
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 Sakamoto Hirokazu, Kimpura Naoya, Namiki Shigeyuki, Hamada Shun, Ohtsuka Toshihisa, Hirose Kenzo	4. 巻 -
2. 論文標題 Synapse type-specific molecular nanoconfigurations of the presynaptic active zone in the hippocampus identified by systematic nanoscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2022.03.11.483942	査読の有無 無
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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島 佑介、坂本 寛和、並木 繁行、廣瀬 謙造
2. 発表標題 シナプス小胞放出サイトの形成に寄与するMunc13-1とRIMの相互作用
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西 泰地、坂本 寛和、大久保 洋平、並木 繁行、廣瀬 謙造
2. 発表標題 恐怖記憶形成に関するシナプスの検出法の開発
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 寛和、大西 泰地、廣瀬 謙造
2. 発表標題 超解像顕微鏡システムによる シナプス分子の系統的可視化解析
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Kojima, Hirokazu Sakamoto, Shigeyuki Namiki, Kenzo Hirose
2. 発表標題 Identification of interactions between Munc13-1 and other active zone proteins vital for the formation of synaptic vesicle release sites
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taichi Onishi, Hirokazu Sakamoto, Yohei Okubo, Shigeyuki Namiki, Kenzo Hirose
2. 発表標題 Development of a labeling method for fear memory synapses
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島 佑介、坂本 寛和、並木 繁行、廣瀬 謙造
2. 発表標題 Interactions of active zone proteins with Munc13-1 that contribute to the formation of synaptic vesicle release sites
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西 泰地、坂本 寛和、大久保 洋平、廣瀬 謙造
2. 発表標題 Development of a method to identify synapses associated with memory formation
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坂本 寛和、廣瀬 謙造	4. 発行年 2022年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 -
3. 書名 蛍光分子局在化法によるシナプス分子の可視化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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