

細胞内現象の時空間ダイナミクス
2020 年度採択研究代表者

2021 年度 年次報告書

林 康紀

京都大学 大学院医学研究科
教授

記憶を司るシナプス微小構造の時空間ダイナミクス

§ 1. 研究成果の概要

アクチン結合タンパク質コフィリンは LTP 誘導と共にスパインに集積し、アクチンを安定化させる。今回、光増感タンパク質 SuperNova を用いコフィリンを光不活化する実験を行った(Goto et al., Science, 2021)。コフィリンと SuperNova 融合タンパク質(CFL-SN)を海馬神経細胞に発現し、LTP 誘導後、光照射すると LTP が解除された。この効果は LTP 誘導前や誘導後 20 分以降にはなかった。次に CFL-SN を記憶形成の場である海馬に発現させた上で、記憶成績を評価した。その結果、学習後 20 分以内に光照射した時には記憶が消去された。このことから学習時に起こった海馬 LTP が CALI により消去されたと考えられた。さらに、睡眠中に再度 LTP が起こっているのではないかと考え、学習後 2 時間以降睡眠した時に同様にコフィリンを不活化したところ、同様に記憶が消去された。ホームケージと IA チェンバーでの神経細胞の発火を観察すると、記憶形成に伴い、ホームケージあるいは IA チェンバーのみで選択的に発火する細胞の数が増加し、さらに発火同期性が向上した。LTP を記憶形成時に消去すると、発火選択性と同期性が失われたが、睡眠中の消去では同期性のみが失われた。つまり同じ LTP が海馬で起こるタイミングによって、異なる機能があることが示唆された。以上の結果から、LTP は記憶時にのみならず、睡眠中にも再度起こること、またそれらは異なる機能を持っていた。

大友らは二光子スピニングディスク顕微鏡法と単一分子局在化法の双方を適用できる相関顕微鏡システムを構築した。二光子スピニングディスク顕微鏡法は、数百点に分割した励起スポットを高速並列走査することから、微細形態のライブ追跡における低光毒性が期待される。概念実証のために、培養細胞中の細胞小器官について、多色三次元タイムラプス($xyzt$ -)イメージングを実施し、分裂過程の進行阻害について評価した。その結果、有意に一光子励起共焦点顕微鏡法よりも低い光毒性が認められたことから、成果報告を行った (Kamada et al., Sci. Rep. 2022)。

§ 2. 研究実施体制

(1) 林グループ

- ① 研究代表者: 林 康紀 (京都大学大学院医学研究科 教授)
- ② 研究項目
 - ・In vitro での LLPS 実験
 - ・AMPA と NMDAR ナノドメインの可視化とそのシナプス可塑性による再構成
 - ・活性帯の可視化とシナプス下の AMPAR 再分布による可塑性の解明

(2) 松田グループ

- ① 主たる共同研究者: 松田 知己 (大阪大学 産業科学研究所 准教授)
- ② 研究項目
 - ・光増感蛋白質 SN を用いた CaMKII 機能阻害による LLPS 制御
 - ・光による CaMKII 12 量体構造の制御法の開発

(3) 大友グループ

- ① 主たる共同研究者: 大友 康平 (自然科学研究機構 生命創成探究センター 助教)
- ② 研究項目
 - ・ナノボディと IRIS を用いた超高解像度顕微鏡法
 - ・高解像二光子顕微鏡システムによるスパイン構造可塑性の観察
 - ・グルタミン酸センサー蛋白質を用いた CaMKII による受容体局所でのグルタミン酸濃度測定

(4) 浦久保グループ

- ① 主たる共同研究者: 浦久保 秀俊 (自然科学研究機構 生理学研究所 特任助教)
- ② 研究項目
 - ・IRIS イメージングの最適化の数理モデル化からの支援
 - ・CaMKII LLPS の計算モデルの開発

(5) 細川グループ

- ① 主たる共同研究者: 細川 智永 (名古屋大学 理学研究科 講師)
- ② 研究項目
 - ・In vitro での LLPS 実験
 - ・モデリングの元データとなる LLPS 実験

【代表的な原著論文情報】

Goto, A., Bota, A., Miya, K., Wang, J., Tsukamoto, S., Jiang, X., Hirai, D., Murayama, M., Matsuda, T., McHugh, T.J., Nagai, T., and Hayashi, Y. (2021). Stepwise synaptic plasticity events drive the early phase of memory consolidation. *Science* 374, 857–863.

- Kamada, T., Otomo, K., Murata, T., Nakata, K., Hiruma, S., Uehara, R., Hasebe, M., and Nemoto, T. (2022). Low-invasive 5D visualization of mitotic progression by two-photon excitation spinning-disk confocal microscopy. **Sci Rep** *12*, 809.
- Takahashi, T., Zhang, H., Otomo, K., Okamura, Y., and Nemoto, T. (2021). Protocol for constructing an extensive cranial window utilizing a PEO-CYTOP nanosheet for in vivo wide-field imaging of the mouse brain. **STAR Protoc** *2*, 100542.
- Urakubo, H., Yagishita, S., Kasai, H., Kubota, Y., and Ishii, S. (2021). The critical balance between dopamine D2 receptor and RGS for the sensitive detection of a transient decay in dopamine signal. **PLoS Comput Biol** *17*, e1009364.