

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「光操作によるシナプス可塑性と記憶形
成の因果関係の解明」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者: 柚崎 通介
(慶應義塾大学 医学部 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

ヒトの脳では約 1,000 億個の神経細胞がシナプスを介してお互いに結合して神経回路を構成することによって、認知・記憶・情動・意思などの高次脳機能を担う。シナプス結合は発達期に形成されるのみでなく、環境の変化や学習・経験に応じて生涯にわたって可逆的に変化する。このようなシナプス結合の変化(シナプス可塑性)こそが、精神神経疾患や発達症の病態に深く関与していると考えられている。シナプス可塑性は、シナプスそのものの新生や消失などの構造的な変化のみならず、既存のシナプスの機能が長期的に変化する現象によって担われる。興奮性シナプスでは、シナプス前部から放出されたグルタミン酸が、シナプス後部の AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) に結合することによって、情報が伝達されるが、神経活動が一定期間変化することによって、AMPA 受容体の数が増減しシナプス伝達効率が長期的に増強 (long-term potentiation: LTP) ないし抑圧 (long-term depression: LTD) される。LTP/LTD は神経回路での記憶・学習を担う素過程として、過去 50 年余り世界中の神経科学者が研究を続けてきた。しかし、特定の神経回路のシナプスでの LTP/LTD が、生物個体レベルでの記憶・学習と一体どのような因果関係があるのかという根源的な問いについては、十分に分かっていない。この原因は LTP/LTD に関与する分子をコードする遺伝子を操作すると、分子や回路レベルでの代償作用が起きること、さらに LTP/LTD を誘導する刺激条件が、*in vitro* (脳切片) と、*in vivo* (個体) とで異なっていることが挙げられる。そこで、本研究では、LTP/LTD を光刺激によって急性かつ可逆的に直接的に制御できる光遺伝学ツールを開発することによって、特定のシナプスにおける LTP/LTD と個体レベルの記憶・学習との因果関係についての決定的な解答を得ることを目標とした。

松田グループでは、光照射に応じて AMPA 受容体のエンドサイトーシスを抑制して LTD を阻害するツール (PhotonSABER) を開発した。また LTP が引き起こされる時にリソソームからの分泌が同時に起きることが必要であることを見出し、光照射に応じてリソソーム分泌を抑制することによって LTP を阻害するツール (LysopH-up) の開発を行った。さらに CREST 神取チームとの共同研究によって PhotonSABER の励起波長を青色方向にシフトしたツール (PhotonSABER-blue) を開発し、同じシナプスにおいて LTP/LTD を励起波長によって制御できる可能性を開いた。

浜地グループでは生きた細胞の表面タンパク質を特異的にラベルできるリガンド指向化学法 (LDAI 法) を改良して二段階反応とすることによって、LTP/LTD 時の表面 AMPA 受容体を可視化する技術を開発した。また、パラホルムアルデヒドによる組織固定によって、狙った小分子の局在を可視化する技術 (FixEL 法) や、狙ったタンパク質の近傍分子の網羅的同定技術の開発にも成功した。さらに代謝型グルタミン酸受容体 (mGlu1) を活性化することによって LTD を誘導する化学遺伝学ツールの開発も行った。

柚崎グループでは、松田グループや浜地グループとともに、これらの新しい技術やツールを脳切片や個体レベルに適用することによって最適化を進めた。また PhotonSABER や LysopH-up を用いて、特定の小脳シナプスにおける LTP/LTD と眼球運動学習との因果関係を確立した。さらに AMPA 受容体を初めとするシナプス分子群の局在を超解像度で可視化する技術を確立した。

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 光遺伝学ツール PhotonSABER による LTD と運動学習との因果関係の解明

概要:

LTD は、神経活動依存的に起きるシナプス後部での AMPA 受容体のエンドサイトーシスによって担われる。光照射によってこの過程を阻害できるツール PhotonSABER を開発し、PhotonSABER を小脳プルキンエ細胞のみに発現する遺伝子変異マウスを作成した。このマウスの前庭小脳に光照射を行うと、LTD と連動して眼球運動学習が障害されることから、LTD と運動学習との因果関係を初めて明確に示すことができた (Kakegawa et al., Neuron 99:985-998, 2018)。

2. 中枢神経系における軸索からのライソソーム分泌とシナプス形成の関係の解明

概要:

ライソソームは、不要となった細胞内タンパク質の分解を担う細胞内小器官である。ところがシナプス形成分子の一つである Cbln1 はライソソームに存在し、神経活動が亢進すると、ライソソーム酵素とともに細胞外に分泌されることが初めてわかった。ライソソーム酵素による細胞外環境の分解が、Cbln1 によるシナプス形成と協調して働くことによって、神経活動に応じたシナプスの再編と可塑性が起きる可能性を示した (Ibata et al., Neuron 102:1184-1198, 2019)。

3. 特定のシナプスにおける代謝型グルタミン酸受容体を化学遺伝学的に活性化する技術の開発

概要:

薬理学的な方法では、特定のシナプスのみで代謝型グルタミン酸受容体 (mGlu1) を活性化させることはできない。そこで本来の機能を維持したままで、人工化合物投与によって活性化できる変異型 mGlu1 を開発した。変異型 mGlu1 を小脳プルキンエ細胞に発現させ、人工化合物を投与すると、平行線維—プルキンエ細胞シナプス特異的に LTD が誘導できた。この新技術を用いることにより神経回路の理解が加速すると期待される (Ojima K et al., Nat Commun 13: 3167, 2022)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 人工的なシナプス形成技術の開発

概要:

人工シナプスコネクタ CPTX の開発に成功した。CPTX タンパク質を小脳失調、アルツハイマー病、脊髄損傷の病態モデルマウスの局所に直接投与すると、興奮性シナプス形成を強力に誘導し、それぞれの病態モデルマウスにおける病態を改善した。本研究では、CREST 課題で開発してきた AMPA 受容体可視化技術を最大限に活用した。本成果はシナプスに原因がある精神・神経疾患に対する全く新しい治療戦略として注目されている (Suzuki et al., Science 369:6507, 2020)。

2. リガンド指向性 2 段階ラベリング法を用いたグルタミン酸受容体輸送過程の定量

概要:

LTP や LTD の実体はシナプス後部における AMPA 受容体の数が長期的に変化することであると考えられている。しかし、脳切片や個体レベルにおいて、学習・記憶前後において特定のシナプスでの内在性 AMPA 受容体の数の変化を定量することは技術的に困難であった。この論文では内在性 AMPA 受容体や NMDA 受容体の数や局在の変化を可視化・定量できる新しい技術を開発した (Ojima et al., Nat Commun 12:831, 2021)。

3. 標本を膨らませることで AMPA 受容体やシナプス分子のナノ構造を解明

概要:

シナプス分子は約 100~1000 nm の狭い領域に密集しているため、従来の光学顕微鏡の分解能 (約 200 nm) では詳細な分布は観察できない。そこで、標本そのものを等方向性に拡大させる膨張顕微鏡法を改良した x10 Expansion Microscopy (x10 ExM) 法を開発した。本技術はシナプス分子群の異常が示唆されている多くの精神疾患や神経発達症の病態の解明に役立つことが期待される (Nozawa K et al., Neuron 110:3168-3185, 2022)。

< 代表的な論文 >

1. Nozawa K, Sogabe T, Hayashi A, Motohashi J, Miura E, Arai I, Yuzaki M. In vivo nanoscopic landscape of neurexin ligands underlying anterograde synapse specification. Neuron 110:3168-3185, 2022. doi: 10.1016/j.neuron.2022.07.027

概要:

シナプス分子は約 100~1000 nm の狭い領域に密集しているため、従来の光学顕微鏡の分解能 (約 200 nm) では詳細な分布は観察できない。そこで、標本そのものを約 1000 倍の体積に膨張させる x10 ExM 法を開発し、シナプス観察に最適化することに成功した。本技術はシナプス分子群の異常が示唆されている多くの精神疾患や神経発達症の病態の解明に役立つことが期待される。

2. Ojima K, Kakegawa W, Yamasaki T, Miura Y, Itoh M, Michibata Y, Kubota R, Doura T, Miura E, Nonaka H, Mizuno S, Takahashi S, Yuzaki M, Hamachi I, Kiyonaka S. Coordination chemogenetics for activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue. Nat Commun 13: 3167, 2022. doi: 10.1038/s41467-022-30828-0

概要:

LTP や LTD の実体はシナプス後部における AMPA 受容体の数が長期的に変化することであると考えられている。しかし、脳切片や個体レベルにおいて、学習・記憶前後において特定のシナプスでの内在性 AMPA 受容体の数の変化を定量することは技術的に困難であった。この論文では内在性受容体を高効率で選択的にラベル化する技術を開発し、実際に内在性の AMPA 受容体や NMDA 受容体の数や局在の変化を定量することに成功した。

3. Suzuki K, Elegheert J, Song I, Sasakura H, Senkov O, Matsuda K, Kakegawa W, Clayton AJ, Chang VT, Ferrer-Ferrer M, Miura E, Kaushik R, Ikeno M, Morioka Y, Takeuchi Y, Shimada T, Otsuka S, Stoyanov S, Watanabe M, Takeuchi K, Dityatev A, Aricescu AR, Yuzaki M. A synthetic synaptic organizer protein restores glutamatergic neuronal circuits. Science 369:eabb4853, 2020. doi: 10.1126/science.abb4853

概要:

人工シナプスコネクタ CPTX の開発に成功した。CPTX タンパク質を小脳失調、アルツハイマー病、脊髄損傷の病態モデルマウスの局所に直接投与すると、興奮性シナプス形成を強力に誘導し、それぞれの病態モデルマウスにおける病態を改善した。本研究では、CREST 課題で開発してきた AMPA 受容体可視化技術を最大限に活用した。本成果はシナプスに原因がある精神・神経疾患に対する全く新しい治療戦略として注目されている。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 柚崎グループ

研究代表者: 柚崎 通介 (慶應義塾大学・医学部・教授)

研究項目

・LTP/LTD と記憶・学習との因果関係の解明

松田グループ・浜地グループで作成されるツールに対して脳切片標本を用いて性能評価を行い、その結果をフィードバックしながら性能改善を進めた。in vitro での性能評価が終わった光遺伝学ツールについては、個体レベルでの記憶・学習課題を用いて、特定の神経回路に

における LTP/LTD との因果関係の確立を進めた。

②松田グループ

主たる共同研究者: 松田 信爾 (電気通信大学・大学院情報理工学研究科・准教授)

研究項目

・光遺伝学的制御ツールの開発と培養神経での検証

LTP/LTD の基礎過程である AMPA 受容体の輸送を担う分子機構の解明を進めるとともに、その知見に基づいて LTP/LTD を光制御できるツールを細胞株および培養神経細胞を用いて開発した。得られたツールについては光感受性、波長特性、可逆性など基本的な性能評価を行うとともに、柚崎グループ・浜地グループとの相互フィードバックによって改良を進めて最適化を進めた。

③浜地グループ

主たる共同研究者: 浜地 格 (京都大学・大学院工学研究科・教授)

研究項目

・化学修飾による LTP/LTD 光制御ツールの開発

生来の生化学プロセスを妨害することなく、生体内の分子を化学反応させる生体直交化学法を用いて内因性 AMPA 受容体および関連分子群をラベリング化する技術開発を行った。得られた成果は松田グループ・柚崎グループと相互フィードバックすることによって、改良を進めて最適化を行った。

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

光遺伝学ツール PhotonSABER や LysopH-up ベクターやノックインマウスを以下の研究室に供給した。

- ① 東京大学・柳原研究室 (四肢の協調運動学習)
- ② 筑波大学・柳沢研究室 (REM 睡眠中のエンGRAM形成)
- ③ 山梨大学・喜多村研究室 (レバー押しオペラント学習)
- ④ オランダ Erasmus 大学・De Zeeuw 研究室 (小脳運動学習)
- ⑤ アメリカ Stanford 大学・Raymond 研究室 (小脳運動学習)
- ⑥ アメリカ Washington 大学・小島研究室 (Saccade 眼球運動学習)
- ⑦ 京都大学・今吉研究室 (神経幹細胞の Notch シグナリングの制御)
- ⑧ アメリカ Harvard 大学・Beth Sevens 研究室 (ミクログリアによるシナプス貪食過程の制御)
- ⑨ アメリカ Max Planck Institute Florida・安田研究室 (TrkB のエンドサイトーシス制御)

CREST オプトバイオを契機として、本領域の中では以下のような共同研究を進めた。

- ⑩ 伊佐チーム (霊長類におけるシナプス形成ツール CPTX の効果の検討)
- ⑪ 小澤チーム (Cry2-CIBN を用いた AMPAR と mGlu1 のエンドサイトーシス誘導阻害ツールの開発と実装)
- ⑫ 神取チーム (PhotonSABER, LysopH-up の元となる ASR および PoXeR の結晶構造に基づくポンプ活性と波長最適化)
- ⑬ 永井アドバイザー (SuperNova によるシナプス除去)

研究目的を達成するために、以下の共同研究を CREST チーム以外の研究者とも進めた。

- ⑭ イギリス MRC-LMB・Aricescu 研究室 (オプトケモプロテオミクス用の nanobody の開発)
- ⑮ 沖縄科学技術大学院大学・楠見研究室 (シナプスでの AMPA 受容体の可視化)
- ⑯ 東京大学・津本研究室 (シナプス関連分子の可視化・操作作用の nanobody の開発)