

Title	人工シナプスオーガナイザーを介した神経細胞と微小電極の接合に関する研究
Author(s)	関根, 宏介
Citation	
Issue Date	2024-12
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/19689
Rights	
Description	Supervisor: 筒井 秀和, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	関根 宏介		
学位の種類	博士 (マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 593 号		
学位授与年月日	令和 6 年 12 月 24 日		
論文題目	人工シナプスオーガナイザーを介した神経細胞と微小電極の接合に関する研究		
論文審査委員	筒井 秀和	北陸先端科学技術大学院大学	准教授
	大木 進野	同	教授
	平塚 祐一	同	准教授
	山口 拓実	同	准教授
	阿部 秀樹	名古屋大学	准教授

論文の内容の要旨

While the basic principles of information encoding and processing in neural circuits have not been uncovered, it is generally believed that the membrane potential dynamics of the constituent cells are closely involved. It is thus significant to develop techniques that enable detailed measurement of electrical activity in neurons in order to gain insight into the basic principles of circuit operation. Existing activity measurement methods can be classified into “optical” and “electrical” measurement methods. In the former, genetically encoded voltage indicators are expressed in the cells of a specific type to be measured. In order to achieve sufficiently precise measurements, it is essential to further improve the performance of optical probes, and many researchers are continuing their efforts for this direction. The latter uses microelectrodes, which generally enable stable recording with a good signal-to-noise ratio. The drawback has been the difficulty of spatial measurement, but recent developments such as flexible multi-electrode arrays are making it possible to measure neuronal activity at multiple points on a large scale. On the other hand, electrical measurement methods do not have the specificity for cell types that optical measurement methods have. The lack of cell type specificity is a critical disadvantage, since neural circuits are composed of diverse cell types, which are generally thought to play different roles in circuit function.

This study focuses on synapse organizers, a group of molecules involved in synapse formation and maintenance that have recently been identified, with the goal of forming specific junction structures between neurons and microelectrodes and developing them into basic principles for cell-specific electrical measurement methods that overcome the above drawbacks in the future. Chapter 1 describes the background of my research, and Chapter 2 discusses the molecular design of the synapse organizer using a molecular biological approach, resulting in the development of a compact engineered synapse organizer. In Chapter 3, it is demonstrated that the engineered synapse organizer can actually form specific junction structures between a metallic microelectrode and a neuron. The details of the function of the synapse-like neuron-microelectrode junction induced by this principle are not yet clear. Therefore, in Chapter 4, I developed microelectrodes simultaneously immobilized with glutamate fluorescent probes to analyze the function of this junction in terms of transmitter release. Thus, these research would serve as a basis for proof-of-principle experiment of the specific formation of neuron-microelectrode junctions via artificial synaptic organizers and physiological analysis of their properties, and this point is summarized in the last chapter.

Key word: neuron, electrical activity, synapse organizer, extracellular recording, cell type specificity

論文審査の結果の要旨

シナプスオーガナイザーとは、ニューロン間の接合であるシナプスの形成や維持に重要な役割を果たす分子群の総称である。人工設計したシナプスオーガナイザーを用いることで、遺伝的に規定された特定ニューロンの電気活動を選択的に記録する新たな微小電極技術を開拓できる可能性がある。本学位論文は、こうした計測原理を将来的に実証することを目標に据えた三部の研究から構成される。

第 I 部はコンパクトな人工シナプスオーガナイザーの設計について検討している。トランスジーンは一般的にサイズが小さいほうが高い導入・発現効率を得られ、また、ウィルスベクター粒子にパッケージングする際にも有利である。天然シナプスオーガナイザーの一つである Neurexin-1 β に注目し、N末端に人工ペプチドタグを挿入し、細胞内外の異なる部分領域を削除した複数のコンストラクトを遺伝子工学的に作成し、初代培養ニューロンに発現させた。ペプチドタグに対するナノボディで修飾したマイクロビーズと接触させることにより、シナプス分化誘導シグナルの生成・伝達に必要な部分領域の同定を試みた。結果は意外なものであり、全てのコンストラクト、さらに非シナプス蛋白質である PDGFR（血小板由来増殖因子受容体）をもとに作成したコンストラクトもシナプス誘導活性を持つことを見出した。ナノボディ非修飾のマイクロビーズでは、シナプス誘導は見られなかった。これらのことから、ニューロンには、物体との接着を検知してシナプス形成の少なくとも初期段階を促進する機構を内在すると結論している。第 II 部では、第 I 部で設計したオーガナイザーの一つを用いて、ニューロンと金属微小電極との間に細胞種特異的なシナプス状接合の形成が可能かどうかを検証した。金微小電極-細胞培養チャンバーを製作し、電極部にリガンドとなるナノボディを固定化、初代培養ニューロンを培養した。数日後、人工シナプスオーガナイザーを発現するニューロン軸索と電極との間に特異的な接合構造の形成を認めた。37 度の培養環境下で金電極上のリガンドが数日間以上にわたり、シナプス誘導に必要な密度と構造が保たれていることを示しており、今後の計測原理の実証にむけた重要な知見を得ている。しかしながら、人工シナプスオーガナイザーにより形成したシナプス状接合の生理機能はこれまで明らかにされていない。そこで、第 III 部では、活動依存的な伝達物質の放出の有無を検出することを目的とした、グルタミン酸の蛍光センサーとシナプスオーガナイザーを同時に固定化した金属微小電極の開発に成功している。

これらの成果は、将来的に、細胞タイプに対する特異性を備えた微小電極技術の開発に向けた重要な足掛かりとなるものであり、学術的な貢献は大きい。よって、博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。