

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

博士論文

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

関根宏介

主指導教員 筒井秀和

北陸先端科学技術大学院大学

先端科学技術専攻

[マテリアルサイエンス]

令和6年12月

Study of neuron-microelectrode junction formed via engineered synapse organizer
2120020 Kosuke Sekine

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

目次

第1章

はじめに	4
------	---

第2章

人工シナプスオーガナイザーの分子設計	18
--------------------	----

第3章

人工シナプスオーガナイザーによるシナプス様ニューロン-微小電極接合の誘導	53
--------------------------------------	----

第4章

シナプス誘導因子とグルタミン酸光学センサーを同時に固定化した微小電極の作成	71
---------------------------------------	----

第5章

まとめ	103
-----	-----

謝辞	105
----	-----

第 1 章

はじめに

1.1 神経細胞活動の計測法における技術革新の意義と、本研究の目標設定

精緻に設計されたプログラムに従い高速に動作するコンピュータに比べて、神経回路は多くの異なる特徴を持つ (Fig. 1.1)。例えば、プログラムに相当するものの実体が存在しない、または全く不明なこと、高い対損傷性を有すること、素子動作の素過程（活動電位発生）は比較的低速であること、などが挙げられる[1-6]。神経回路における謎に満ちた情報符号化や処理の基本原理に迫ろうとする試みは今日の科学の主要な挑戦の一つである。回路機能は、構成細胞の膜電位の時空間的動態と深く関与すると考えられており、したがって、神経細胞における電気活動の詳細な計測を可能にする技術の発展は重要である。既存の活動計測法は、「光学的」及び「電氣的」計測法に大別できる。前者では、遺伝子でコードされる膜電位応答性の光学プローブを計測対象となる特定種の細胞に導入する。世界中の研究者により光学プローブ性能の改善が試みられているが、プローブの発生する信号は依然として微弱であり、十分に詳細な活動計測を行うことは容易ではない。後者は、微小電極を用いた方法の総称で、良好なシグナル・ノイズ比のもとで安定した記録が可能である。空間計測が困難であることが欠点であるとされてきたが、近年のフレキシブル多電極アレイなどの発展により、神経細胞活動の大規模多点計測が可能になりつつある。しかしながら、電氣的計測法には、光学計測にあるような細胞種に対する特異性を内在しない、という別の欠点が存在する。神経回路は多様な細胞種で構成されており、回路機能においてこれらは異なる役割を果たしていると一般的に考えられている為、細胞種特異性の欠如は極めて本質的な欠点と言える。本研究では、シナプスオーガナイザーと呼ばれる、近年

明らかにされてきたシナプス形成や維持に関与する分子群に着目し、神経細胞と微小電極との間に特異的な接合構造を形成させ、将来的には上記の欠点を克服した、細胞特異性を備えた電氣的計測法の基本原理に発展させることを目標とした。

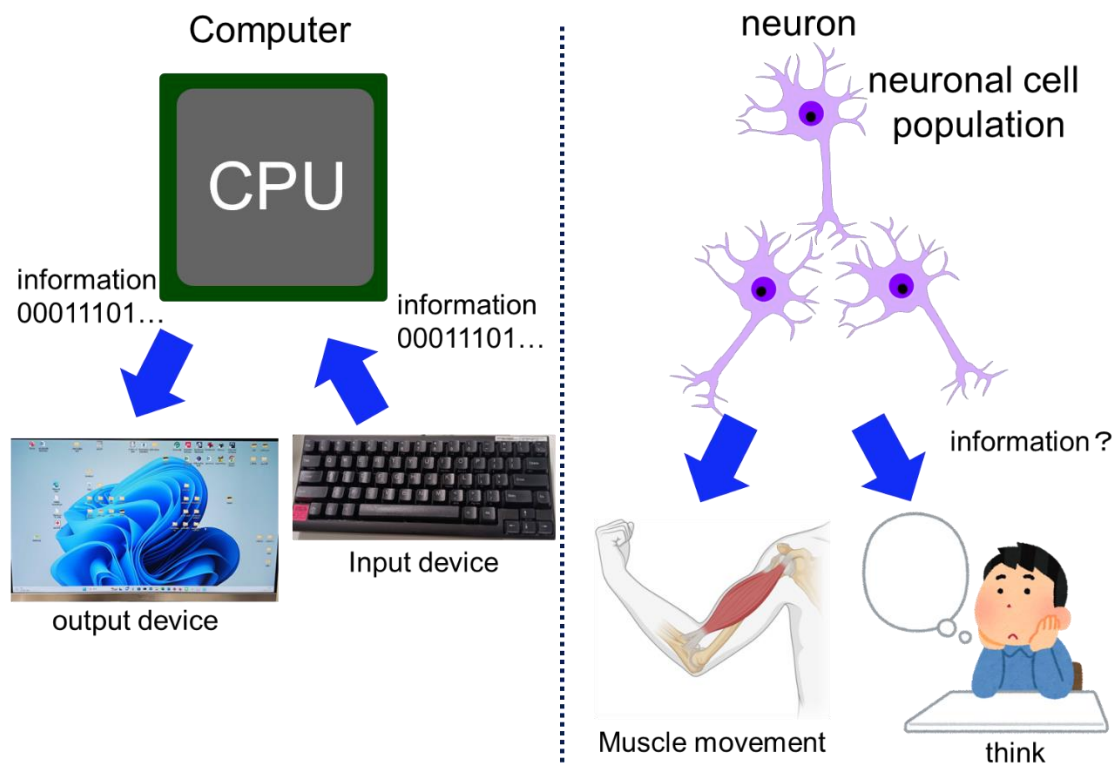


Fig1.1 コンピュータ（左）及び神経回路（右）における情報表現のイメージ図

1.2 興奮性膜の生理学的特徴

脂質二重膜で構成される細胞膜はキャパシタとしての性質を持ち、電荷を蓄積し、内部には膜電場が生じる。細胞膜を介する電位差は膜電位と呼ばれる[1-3]。一般的な細胞においては、細胞膜に存在する Na^+/K^+ ATPase などの働きにより細胞内外で非対称なイオン環境が保持され、なおかつ、細胞膜は K^+ チャネルなどのたんぱく質などの働きにより背景漏洩カリウムコンダクタンスを持ち、これらを要因として恒常的に数十ミリボルトの膜電位が生じている。これは静止膜電位と呼ばれる。興奮性細胞の細胞膜はこれらに加えて電位依存性 Na^+ チャネルや K^+ チャネルなどを含む結果、シナプス入力のような小さな脱分極を引き金とし、活動電位と呼ばれるパルス状の膜電位変化を生じる特徴を持つ(Fig1.2)。

典型的には、最初に Na^+ チャネルが開くことで脱分極が進み、その後、 Na^+ チャネルが不活性化するとともに K^+ チャネルが開いて再分極する。このほか、電位依存性 Ca^{2+} チャネルが主要な要因となる活動電位なども知られている。

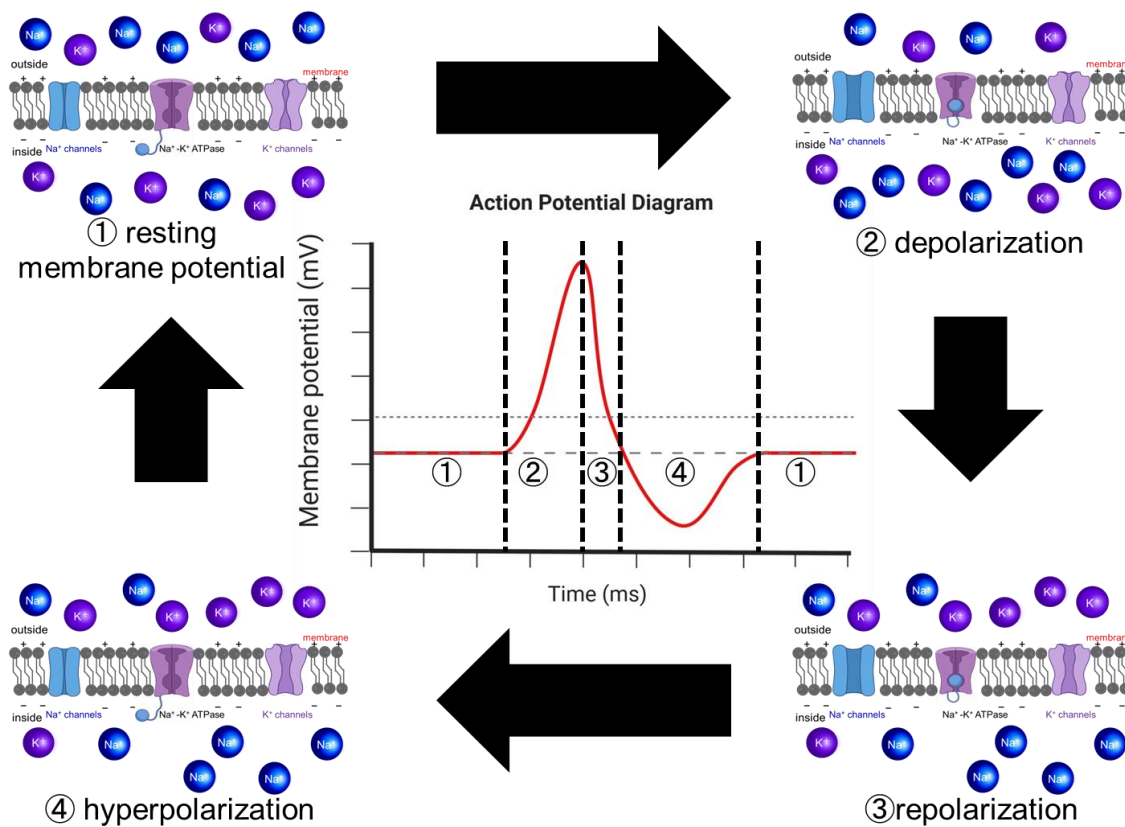


Fig1.2 チャンネルと神経細胞の電気信号の関係性

Table 1.1 細胞内外のイオン状態[2]

	Intracellular (mM)	Extracellular (mM)
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Ca ²⁺	0.0005	1-2

1.3 神経細胞の形態

神経細胞は、核のある細胞体から星型の樹状突起が分かれているのが特徴である。細胞体からは太く長い軸索が伸びており、その先端にシナプス終末がある（Fig. 1.3）。神経軸索は大別すると髄鞘を持つ有髄神経と持たない無髄神経の2種類がある。髄鞘とは、軸索のまわりを複数回包み込む膜構造であり、中枢神経の軸索においてはオリゴデンドロサイト、末梢神経ではシュワン細胞とよばれるグリア細胞がその形成に主要な役割を果たす。有髄神経において髄鞘が途切れる部位をランビエ絞輪がある。ランビエ絞輪には電位依存性チャンネルが集積していることが知られ、髄鞘部を跨いで活動電位が伝導するという跳躍伝導が起きることにより、無髄神経よりも高速に電気信号の伝達が起きることが明らかにされている[6]。

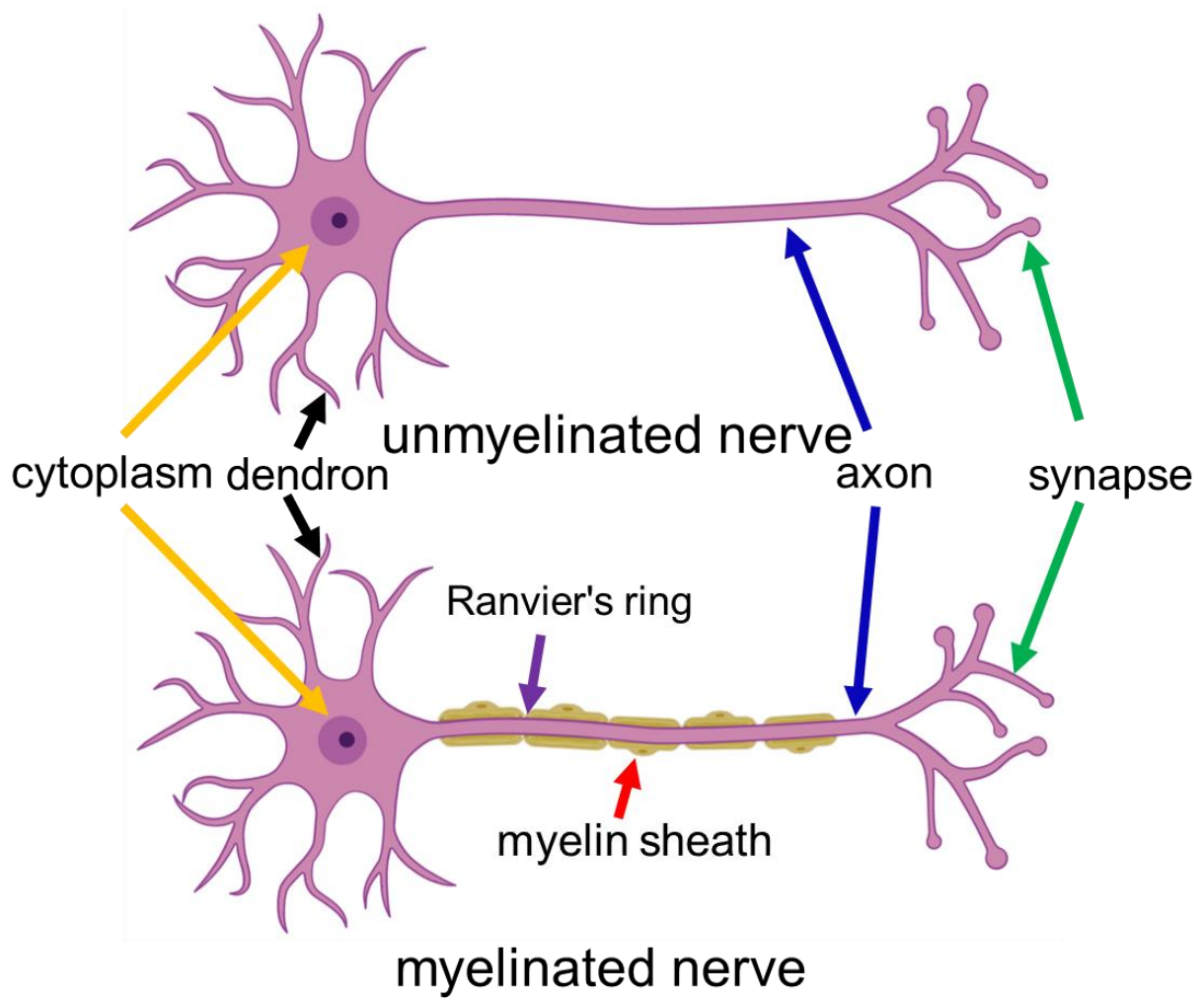


Fig 1.3 神経細胞の形態

上図が無髄神経、下図が有髄神経である。細胞体から軸索が伸びていき、神経細胞の先端がシナプスである。有髄神経は無髄神経とは違い、ミエリン鞘とランビエ絞輪があることで、素早く電気信号を伝達できる。

1.4 シナプスの構造

ある細胞の膜電位変化はシナプスを介して、隣接する細胞に伝播する。シナプスは電気シナプスと化学シナプスに大別される。電気シナプスでは、コネキシンとよばれる蛋白質が形成するギャップ結合を介して、細胞内のイオンが双方向に移動することにより膜電位変化の伝達が生じる[6]。化学シナプスでは、最も一般的には、神経終末に活動電位が到達すると電位依存性カルシウムチャネルが開口してカルシウムイオン流入が起きることにより、神経伝達物質が放出される。主な神経伝達物質はアセチルコリン、カテコールアミン、ガンマアミノ酪酸（GABA）、アミノ酸（グリシン、アスパラギン酸、グルタミン酸）である。これらの神経伝達物質は、およそ 20 nm のシナプス間壁を拡散し、シナプス後膜の受容体を活性化、直接的なイオン流入や細胞内代謝の変化を誘起し、膜電位変化を引き起こす。シナプス後細胞に誘起される脱分極性の膜電位変化を興奮性シナプス後電位（EPSP）、過分極性の膜電位変化を抑制性シナプス後電位（IPSP）と呼ぶ。

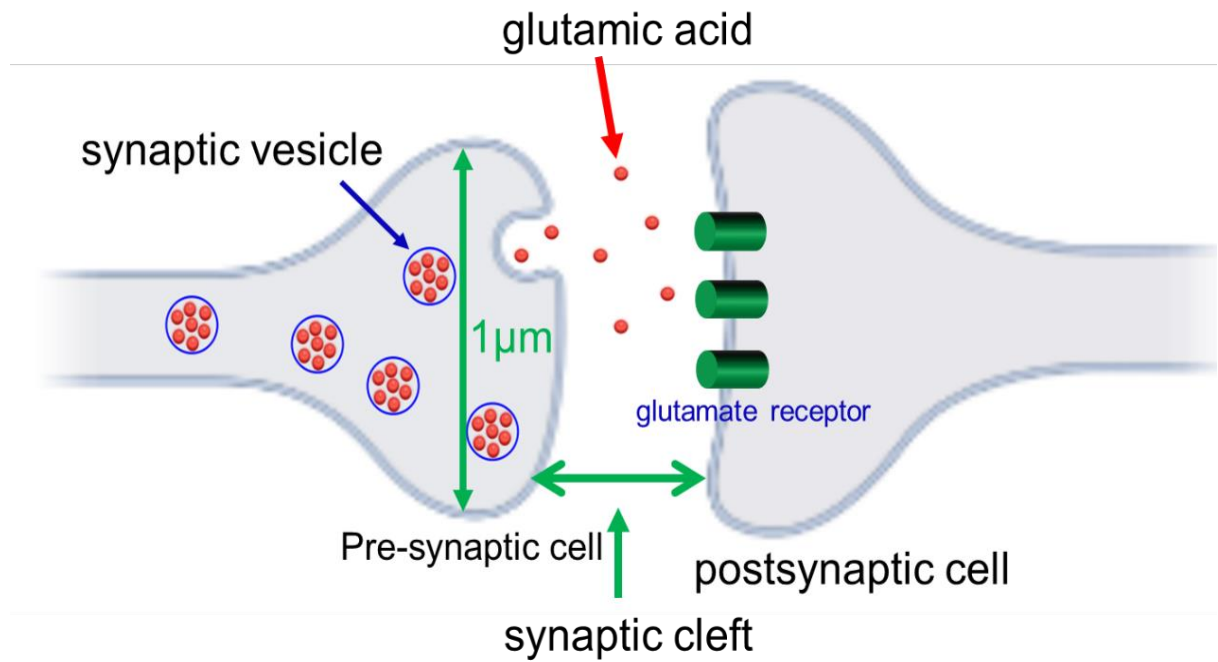


Fig 1.4 化学シナプスの構造

シナプス前細胞とシナプス後細胞の間にシナプス間隙が存在しており、中枢神経において典型的なグルタミン作動性の場合には、シナプス前細胞がグルタミン酸をシナプス間隙に放出する。このグルタミン酸がシナプス後細胞の表面上にあるグルタミン酸レセプターと結合することで、シナプス電位を生じる。

1.5 シナプスオーガナイザーの分子基盤

2000 年以降、シナプスオーガナイザーに関与する分子群が明らかとなってきた [7-11]。

例えば、ニューレキシン (NXRN) やニューロリジン (NLGN) といった膜蛋白質の相互作用はシナプス形成や維持に重要な役割を果たしている (Fig 1.4)。ニューレキシンとは、シナプス前ニューロンの表面に存在するシングルパス I 型膜タンパク質ファミリーに属している。哺乳類は 3 つのニューレキシン遺伝子を持ち、これらは長い α -neurexin と短い β -neurexin アイソフォームに転写される。ニューロリジンは、ニューレキシンの内因性リガンドとして同定されたシングルパス I 型膜タンパク質のファミリーで、シナプス後ニューロンの表面に存在する。ニューレキシン 1 α が持つ LNS ドメインはシナプス誘導活性に必須ではないことなどが示されている [11]。

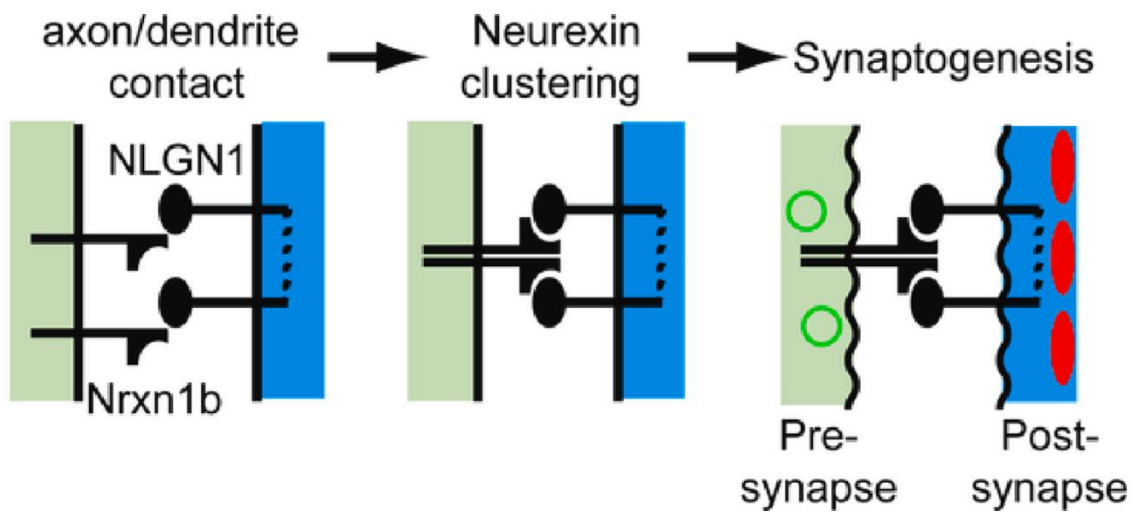


Fig 1.5 シナプスオーガナイザーの概念図

シナプスオーガナイザーにおいて、ニューレキシンとニューロリジンが結合し、クラスタリングすることで、シナプス形成する[11]。

1.6 参考資料

- ¹ Akimichi Kaneko, Kimiro Akagawa, Satoru Kawamura, Shuichi Watanabe (1998) "From Neuron to Brain" Tokyo: Hirokawa Shoten
- ² 池田和正 (2011) "とことんわかる基礎神経科学", Tokyo: Ohmsha Publishing Co.
- ³ 杉 晴夫(2015) "神経とシナプスの科学", 株式会社講談社
- ⁴ Yasuo Mori, Haruhiko Odo (2018) "Neuroscience: How Much Can the Brain Now Say in the Language of Chemistry", Kyoto: Sinano Publishing Press
- ⁵ Hiroshi Ueno, Ikuo Kageyama, Ryuzo Moriguchi (2020) "Textbook of Pain and Analgesia " Tokyo: Natsumesha
- ⁶ Eric Kandel (2014.4) "Kandel Neuroscience" Medical Science International
- ⁷ O. Gokce, and T.C. Südhof, "Membrane-tethered monomeric neurexin LNS-domain triggers synapse formation," Journal of Neuroscience 33(36), 14617–14628 (2013).
- ⁸ T.C. Südhof, "Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease," Nature 455(7215), 903–911 (2008).
- ⁹ H. Takahashi, and A.M. Craig, "Protein tyrosine phosphatases PTP δ , PTP ζ , and LAR: Presynaptic hubs for synapse organization," Trends Neurosci 36(9), 522–534 (2013).
- ¹⁰ T. Yoshida, T. Shiroshima, S.J. Lee, M. Yasumura, T. Uemura, X. Chen, Y. Iwakura, and M. Mishina, "Interleukin-1 receptor accessory protein organizes neuronal synaptogenesis as a cell adhesion molecule," Journal of Neuroscience 32(8), 2588–2600 (2012).

¹¹ M. Sm. Ahasanul Hamid, Imayasu, T. Yoshida, and H. Tsutsui, “Epitope-tag-mediated synaptogenic activity in an engineered neurexin-1 β lacking the binding interface with neuroligin-1,” 658 (2023) 141–147.

第 2 章

人工シナプスオーガナイザーの分子設計

Key points

- ニューレキシンに基づいて設計された人工シナプスオーガナイザーは、そのリガンドとの相互作用を通じてシナプス様構造の分化を誘導する能力を有する。
- 人工シナプスオーガナイザーにおいて、ニューレキシン由来の配列を血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）に置換しても、シナプス様構造の分化誘導活性は維持された。

2.1 研究背景

神経回路における情報の符号化、処理、保存の原理は、今日の科学における未解決の難問のひとつである。その基本過程は、回路内のニューロンの膜電位の動態にあると考えられている。したがって、神経細胞の電気活動を詳細に検出するための技術開発が不可欠である[1-7]。現在、膜電位の光学センサーと微小電極という 2 つの主要なアプローチが用いられている。前者は、膜電位依存的に蛍光を発するように設計されたたんぱく質である。このようなたんぱく質インジケータはシグナルの起源を確実にするために、特定の遺伝子プロモーターを用いて目的の細胞タイプに導入することができる[3,6]。最新のインジケータはプロトタイプと比較して、レスポンスとスピードで大きく進歩してきた。さらに開発が進んでいるが、光学イメージングの原理に起因する様々な限界もある[8]。後者は、パッチクランプや細胞内・細胞外記録などの技術を指す[7,9]。微小電極技術は、もともと単一部位あるいは数部位での記録に適していたが、最近のフレキシブル・アレイ電極により、大規模な並列記録も可能になり始めている。しかしながら、微小電極技術には、この原理から生じる限界がある。ひとつは、細胞タイプの特異性の欠如である。神経回路は異なるタイプの細胞で構成され、それぞれが回路機能において特定の役割を果たすため、これは極めて重要である。したがって、計測対象の細胞はマーカー遺伝子の発現の有無などといった間接的な手段により同定する必要がある。然しながら、このような同定は手間がかかり、大規模な並列記録には非現実的である。そこで私は、シナプスオーガナイザーを利用することで、細胞タイプに特異性のある微小電極技術の開発に取り組んだ。シナプス

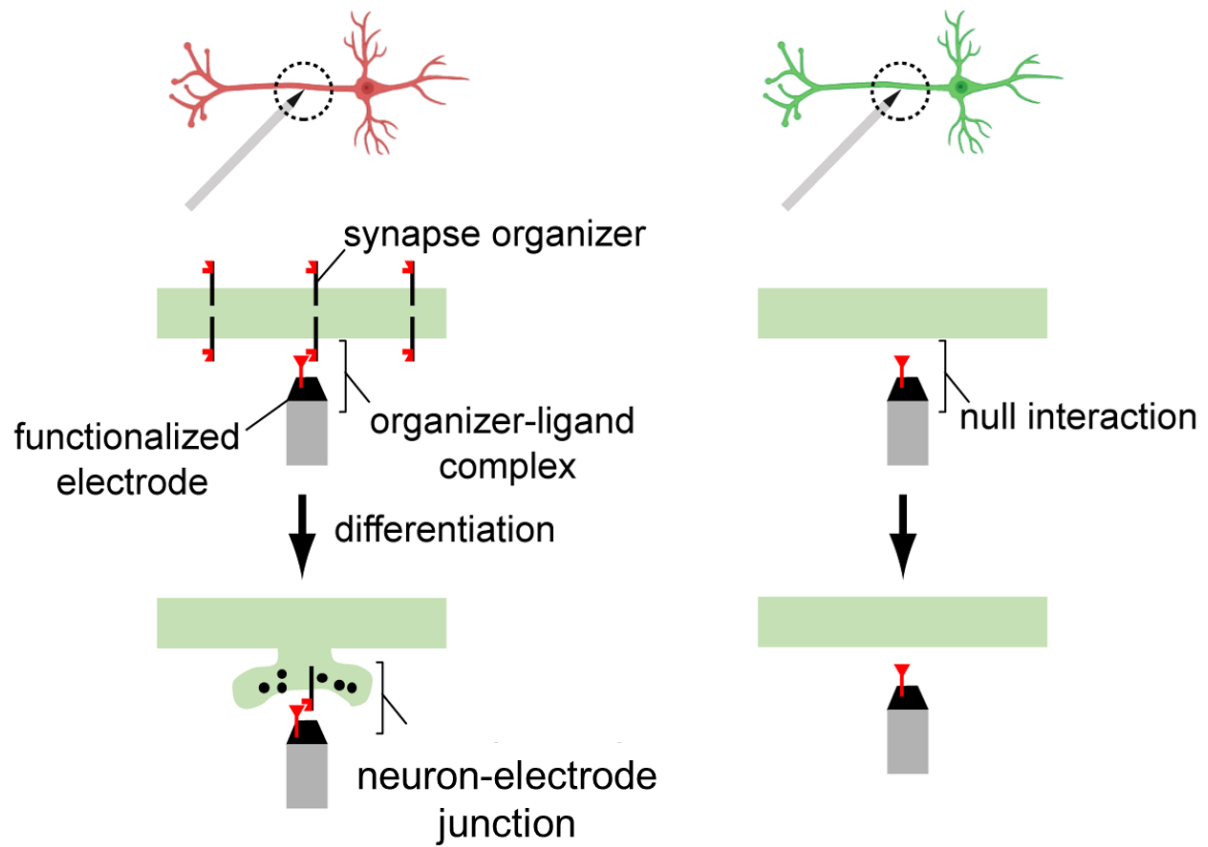
オーガナイザーは、神経細胞とシナプス間の結合の生成と維持に重要な役割を果たす一連のタンパク質である。軸索と樹状突起に存在するオーガナイザーの特定のセットは、接触時に複合体を形成し、細胞シグナルをトリガーしてシナプス前部とシナプス後部に分化する。シナプスオーガナイザーで機能化した微小電極は、対応するオーガナイザーを発現する標的ニューロンと接触すると分化シグナルを出し、シナプス様のニューロン-微小電極接合を形成するが、非標的ニューロンとは形成しない（図 2.1）。先行研究において、IL1RAPL1 で機能化した金微小電極が、接触した大脳皮質ニューロン（インターロイキン-1）にこのような分化シグナルを作用させることができることが見出されている。IL1RAPL1 はシナプス後膜に存在する天然のシナプスオーガナイザーであり、シナプス前膜には PTPδ [10]がある。これらの天然に存在するシナプスオーガナイザーは哺乳類の神経細胞に広く存在しているため、細胞種特異的な神経細胞と微小電極のインターフェースを実現するためには、既存の天然オーガナイザーと交差反応を起こさないような人工シナプスオーガナイザーを開発する必要がある。また、天然のシナプスオーガナイザーである neurexin の分子メカニズム[11-15]を利用することで、そのようなオーガナイザーが設計可能なことが示唆されている。しかしながら、そのために必要な neurexin-1βの最小な機能単位などに関しては不明であった。本章では、neurexin-1βに基づく人工シナプスオーガナイザーにおける最小かつ必須の機能単位を決定しようと試みた。細胞外あるいは細胞内領域を欠失させた4種類のテストコンストラクト、及び、非シナプスタンパク質である PDGFR（platelet-derived growth factor receptor; 血小板由来増殖因子受容体）の膜貫通セグメントを

利用したコントロールコンストラクトを作製し、それらをニューロンに導入して、マイクロビーズアッセイによりシナプス誘導能を評価した。

(a)

Target type of neuron

Non-target type of neuron



(b)

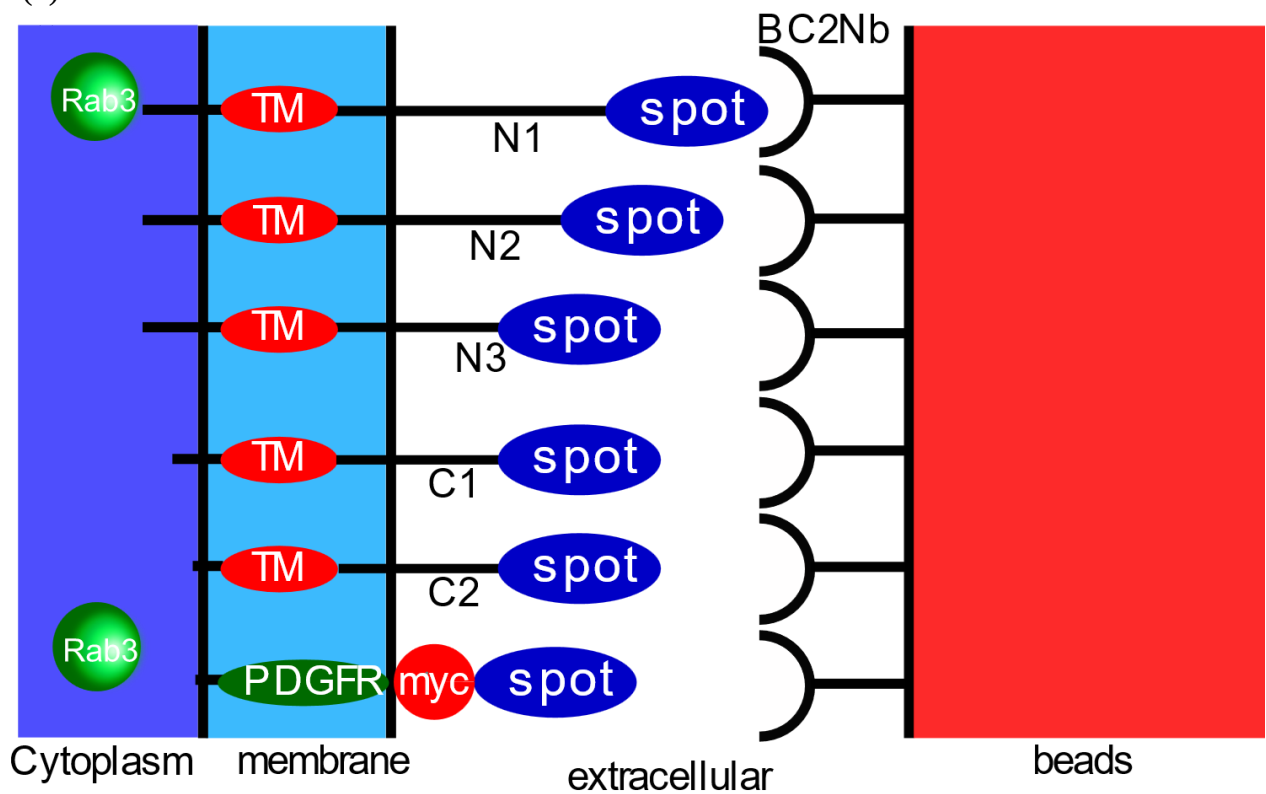


Fig.2.1

(a) 微小電極上に存在する人工ニューレキシンでニューロンを誘導する概念図である。

人工リガンドタンパク質をニューロンに導入し、微小電極上に存在するタンパク質と結合できるようにした。タンパク質の結合によってシナプス形成が起こるかどうかを確認する。

(b)この実験で最小機能単位を探索する試験のモデル図。antispotNb (BC2Nb) に特異的に結合できるように、Spot-tag に変更した。また、神経細胞の形態を確認するため、シナプス小胞を確認できる Rab3 を発現させることにした。N1-N3 は細胞外から、C1-C2 は細胞外から削り取る。そして、TM 部分を神経細胞とは関係のない膜貫通タンパク質である PDGFR に変更して実験することにした。

2.2 方法

分子生物学：

ベクター構築は標準的なクローニング技術で行った。通常、NucleoBond Xtra Midi kit、PrimeStar Max、DNA ligation kit ver. 1 (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて、それぞれプラスミド精製、PCR、ライゲーション反応を行った。Spot-tag(PDRVRAVSHWSS)は、BC2-tag(PDRKAAVSHWQQ)に対して発現させた nanobody の高親和性リガンドである[15,16]。混乱を避けるために、本論文では BC2-tag に対して発現させた nanobody を抗 SpotNb と呼ぶ。抗 SpotNb と Fc ドメインの融合タンパク質(抗 SpotNb-Fc)は、HEK293T 細胞を用いて既述のように調製した[13]。双方向性プロモーターベクターpBI-CMV1（タカラバイオ、滋賀県）を用いて、シナプスオーガナイザーとシナプス前マーカーとしての EGFP-Rab3 の二重発現を行った[17]。

細胞培養、およびマイクロビーズアッセイ：

HEK293T 細胞を、10%のウシ胎児血清（FBS）を添加したダルベッコ変法イーグル培地（高グルコース、043-30085、富士フイルム、東京、日本）で、標準的な CO₂ インキュベーターを用いて培養した。大脳皮質一次ニューロンは、胎生 18 日目の Wister ラットの胚から調製し、最小必須培地（MEM）（135-15175、富士フイルム、東京、日本）、2 % FBS、および 1 % B27 サプリメント（Thermo Fisher Scientific、マサチューセッツ州、米国）からなる培地で培養した。ニワトリ前脳ニューロンは、以前に記載されたように、培養 8-9 日目の受精卵から調製した[18,19,20]。ニワトリ前脳ニューロンの培地は、MEM、

2%ウマ血清、および 1%B27 サプリメントから成る。動物実験は ARRIVE ガイドラインに従った。本実験および関連するパイロット実験では、妊娠ラット 2 匹から得たラット胚 20 個とニワトリ胚 10 個を用い、胚の性別を区別しなかった。これらの実験は、北陸先端科学技術大学院大学の機関指針および米国国立衛生研究所の実験動物の飼育と使用に関する指針に従った。プラスミドのトランスフェクションは、Lipofectamine 3000 試薬 (Thermo Fisher Scientific 社、米国マサチューセッツ州) を用いて、ラット皮質ニューロンでは DIV (体外日数) 5 日目に、ニワトリ前脳ニューロンでは 4 日目に行った。シナプス形成活性は、マイクロビーズアッセイを用いて評価した[16](Fig2.2)。抗 Spot-Fc で修飾したプロテイン A 結合マイクロビーズ ($\phi 4.7 \mu\text{m}$ 、Spherotech 社、米国イリノイ州) と一晚共培養した。サンプルを固定し、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (FV1000D、オリンパス、東京、日本) を用いて解析した。EGFP-Rab3 蓄積を定量化するために、Rab3 指標を Ibead/Iaxon-1 と定義し、Ibead と Iaxon はそれぞれ、ビーズ周囲の $50\mu\text{m}^2$ の円形領域と、ビーズと接触していない代表的な軸索における EGFP シグナルの積分を表した。実験サンプルとコントロールサンプルの両方で、同一の取得条件を維持した。微小電極チャンバー内の神経細胞は、CMOS カメラ (C11440、浜松ホトニクス、浜松、日本) を備えた倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察した。

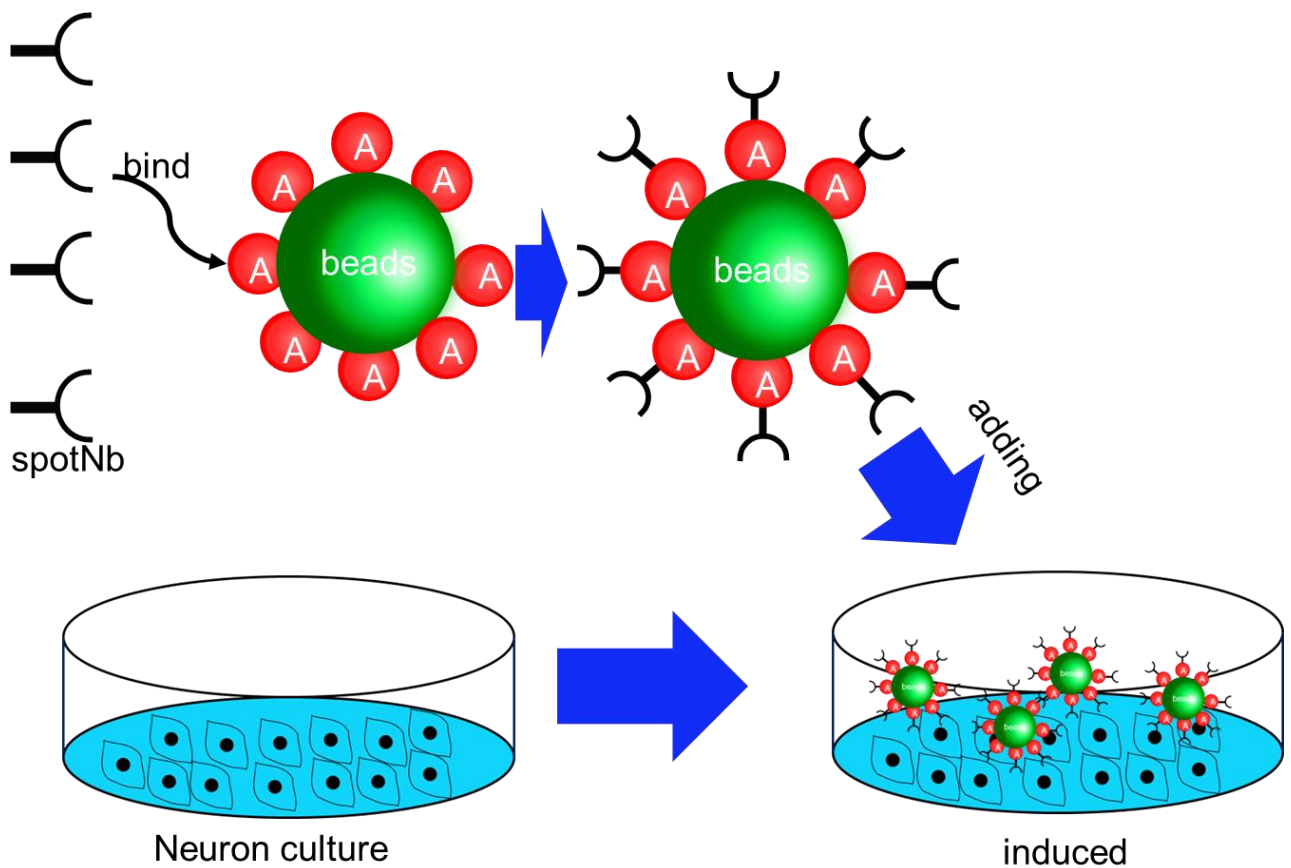


Fig2.2

人工ニューレキシンを発現させた神経細胞に beads 上に存在している antispotNb を特異的に結合させるための方法である。まず、proteinA が固定化されている beads 上に antispotNb-Fc を添加させ、抗体抗原反応で結合させた。培養した神経細胞のディッシュ上に antispotNb が結合した beads を添加させ、antispotNb と神経細胞の表面上に存在している spot-tag と特異的に結合させ、誘導の有無を観察した。

免疫染色：

細胞を 4%パラホルムアルデヒド／4%スクロースを室温で 20 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した後、PBS に 0.25%Tritonx-100 を含む PBS で透過処理した。59nm のレーザーラインを装備したレーザー走査型蛍光顕微鏡（FV1000；Olympus）を用いて免疫蛍光を画像化した。

2.3 結果

2.3.1 Neurexin-based engineered organizer 細胞外領域の削除の影響：

ニューレキシン 1 (Neurexin1)の一次構造は、N 末端のシグナルペプチドに続き、LNS (laminin, sex hormone-binding globulin) ドメイン、およびシンデカンファミリーに属する膜貫通ドメインから構成される。LNS ドメインはニューレキシンの天然リガンドの一つである neuroligin-1 との結合界面を形成し、2 つのニューレキシン 1 が、neuroligin1 二量体に結合することによりヘテロ四量体複合体を形成する[21]。本研究では、Spot-tag と anti-SpotNb を使用し、シナプス誘導に必須な構造単位の探索を行った。ここで、Spot-tag は 12 アミノ酸(PDRVRAVSHWSS)からなるペプチドタグであり、anti-SpotNb はそれに特異的に結合する Nanobody である[22,23]。

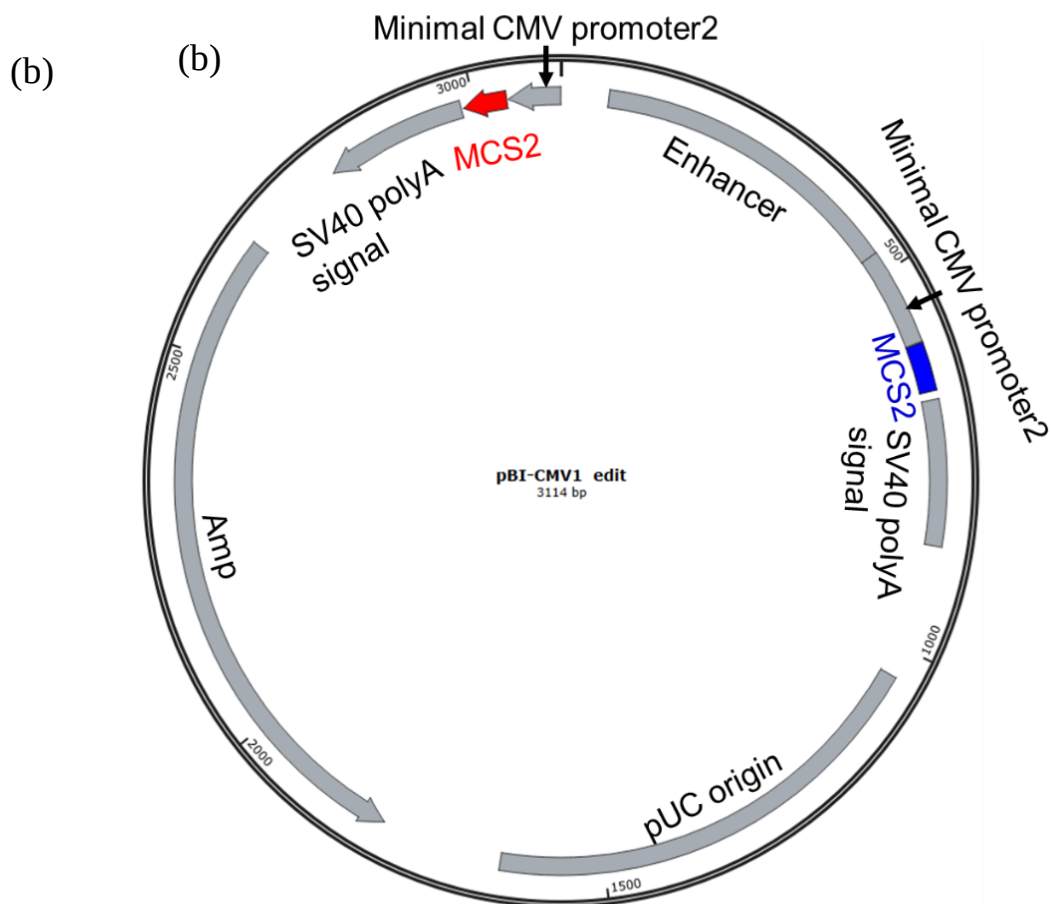
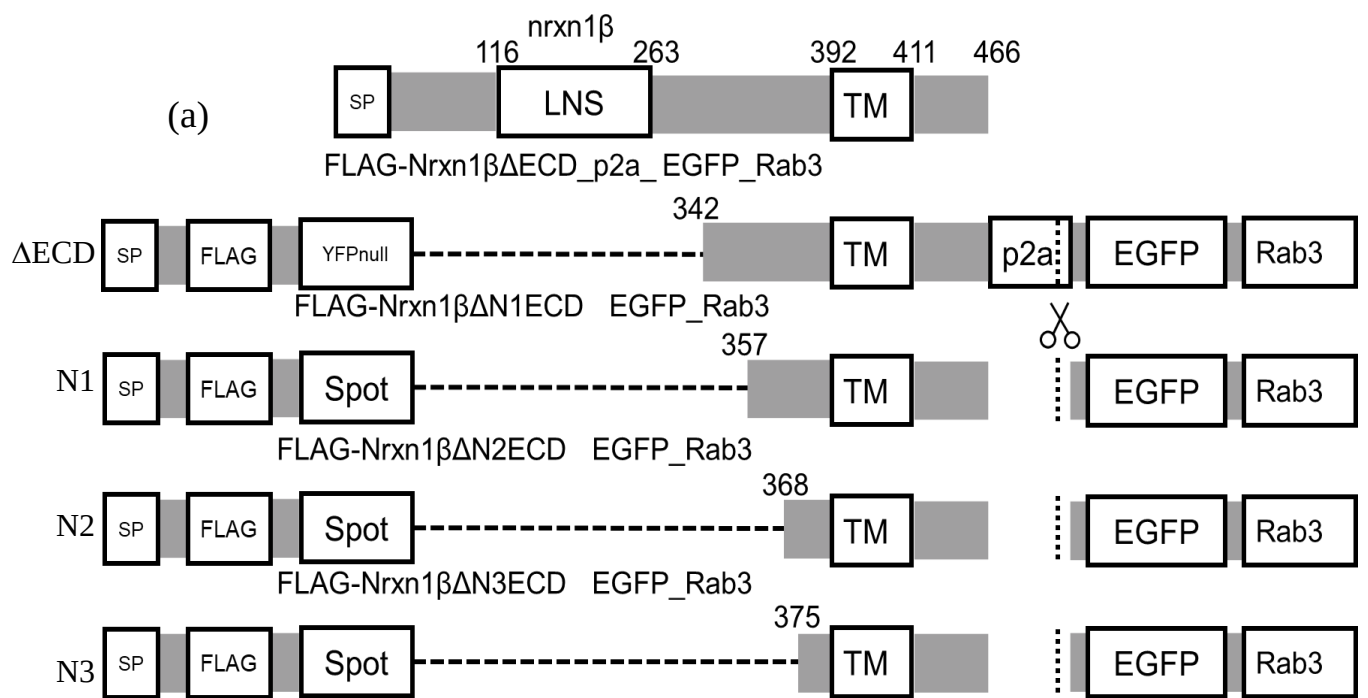
ニューレキシン 1 β の細胞外側の異なる領域を削除した 3 種類のコンストラクトを作製し、初代培養した chick forebrain neuron に遺伝子導入した(Fig2.3(a))。このとき、bidirectional promoter を持つ発現ベクターである pBI-CMV-1 を用いて、EGFP-Rab3 をシナプス前部マーカーとして共発現させた(Fig2.3(b))。Rab3 はシナプス小胞に局在することが知られているタンパク質で、シナプスマーカーとして一般的に用いられる。EGFP-Rab3 の蛍光により、テストコンストラクトを発現するニューロンを識別することができる。antiSpotNb は Fc ドメインとの融合タンパク質として精製し、Protein A をコンジュゲートしてあるマイクロビーズに結合させる。このマイクロビーズとテストコンストラクトを発現

するニューロンとの接触により、シナプス前部が分化すると、そこに EGFP-Rab3 が集積するので、この集積を指標に、シナプス誘導能の活性を共焦点レーザー顕微鏡画像のもとに評価した。結果図を Fig2.3(c) に示す。対照実験 (control) は、人工ニューレキシン N3 を発現させた神経細胞と、antiSpotNb を付加させていない protein A beads を共培養した場合を意味する。1 種類の人工ニューレキシンに対して、代表的な結果を 3 例ずつ示している。人工ニューレキシン N1, N2, N3 を発現させた神経細胞は antiSpotNb を付加した beads 上に軸索の表面上で局部的に EGFP-Rab3 の集積が認められ、シナプス誘導活性があると判断された。

集積を定量的に解析するために、Rab3-index :

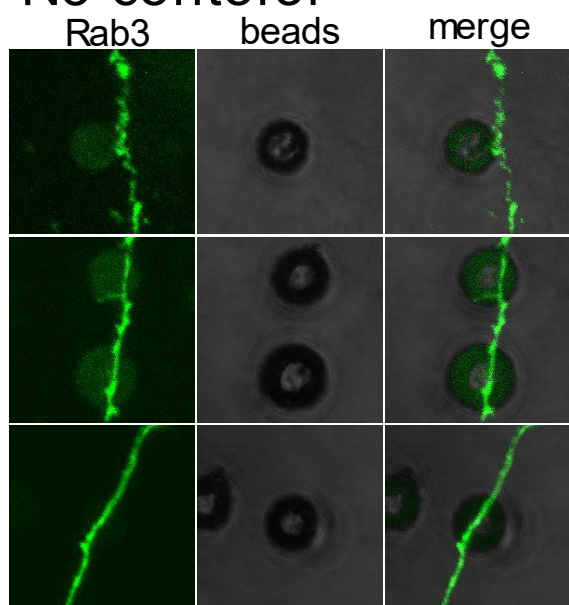
$$Rab3\ index = \frac{I_{bead}}{I_{axon}} - 1$$

を定義した。ここで、 I_{bead} と I_{axon} は、それぞれ、ビーズ周辺の $50\mu m^2$ の円形領域における EGFP シグナルと、ビーズと接触していない代表的な軸索周辺のシグナルの積分値である。同一の撮影条件で撮影されたレーザー走査顕微鏡画像について解析した。N1-N3 の Rab3-index (約 1.0-2.0) は、control (約 0.1) と比較して有意に高く、シナプス誘導活性の優位性が示された (t-test, Fig2.3(d))

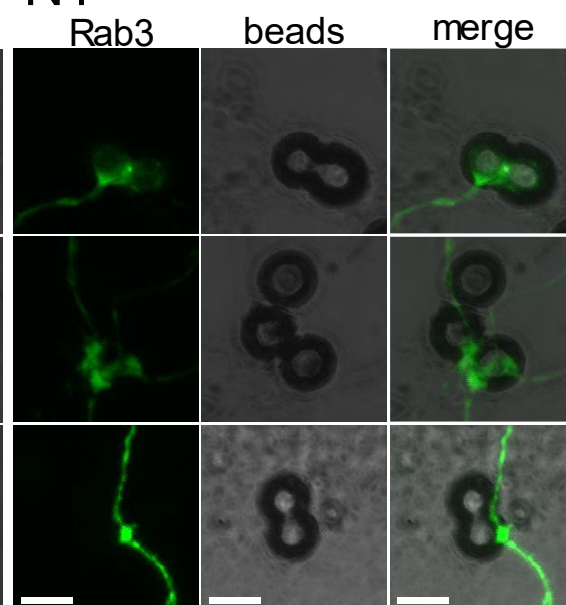


(c)

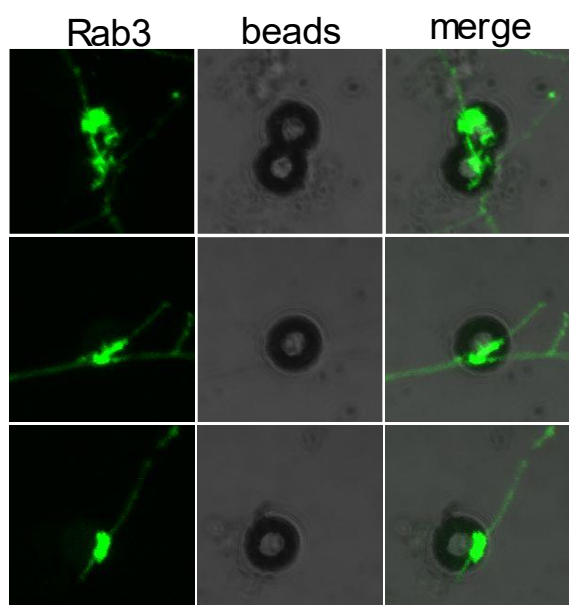
N3 control



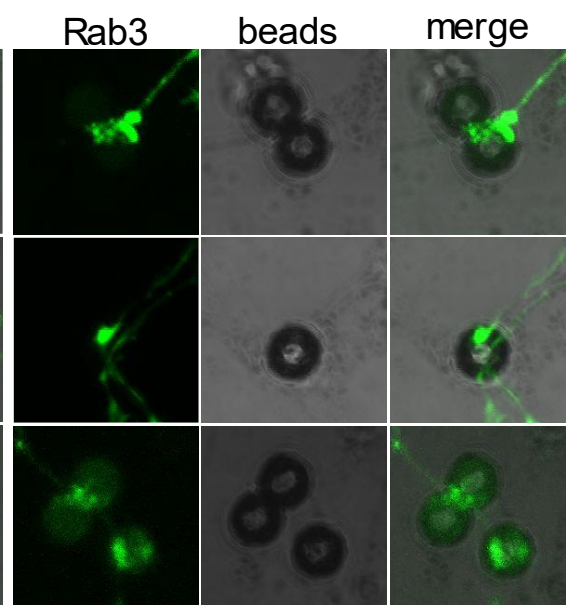
N1



N2



N3



(d)

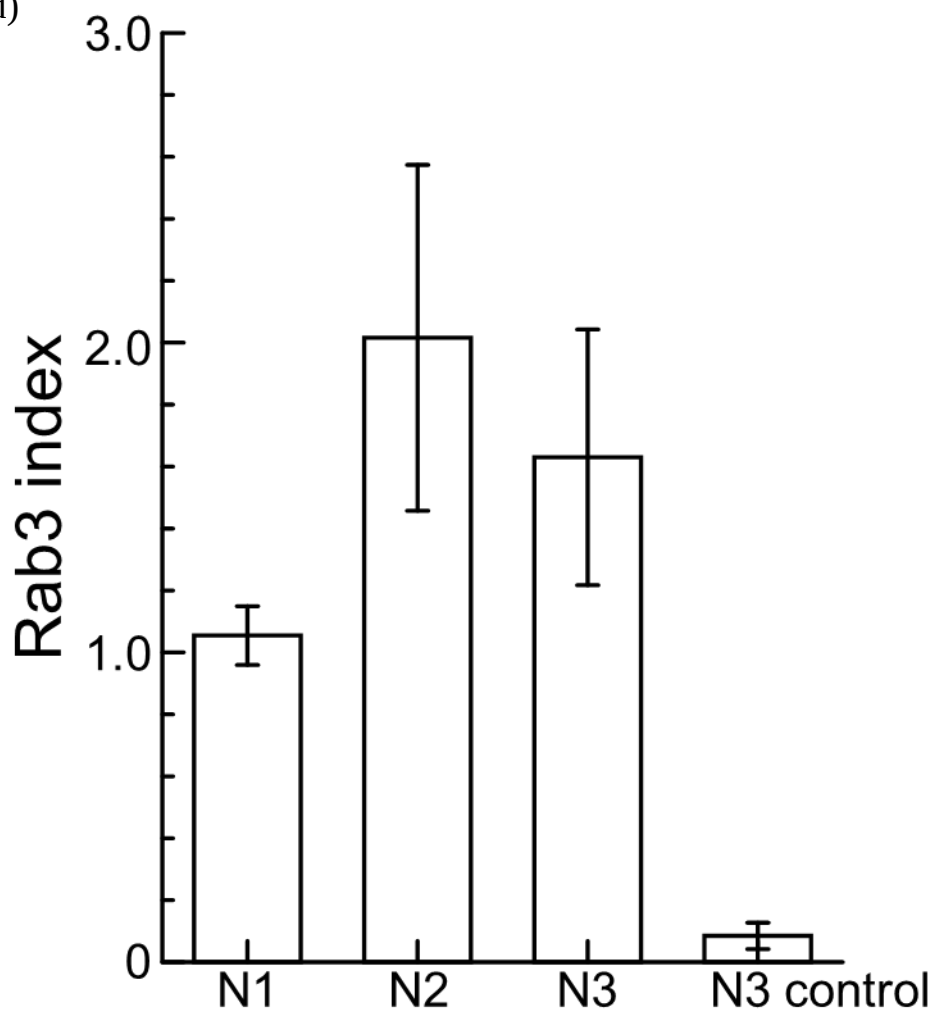


Fig2.3

(a) 先行研究のニューレキシン 1b と FLAG-YFPnull-ChickNrnx1 β DeltaECD-p2a-EGFP-

Rab3、および本研究で作製した N1,N2,N3 のコンストラクトを示す。アミノ酸配列は TM の細胞外部分を削ることで縮小した。

(b) この実験で用いた pBI-CMV1 のベクター図である。このベクターは 1 つの細胞内で 2 つのタンパク質を同時に発現させることができる。特に、2 つのプロモーターが存在することで、2 つのタンパク質それぞれを発現させることができ、MCS1 領域と MCS2 領域にインサートを導入することができる。

(c) ビーズ上に誘導されたニューレキシン N1、N2、N3 で形質転換されたニューロンを用いて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Rab3 を緑色蛍光と赤色蛍光で撮像した画像。

bar=5 μ m。BC2Nb のみがビーズ上に固定化され、スポットタグに結合することができた。

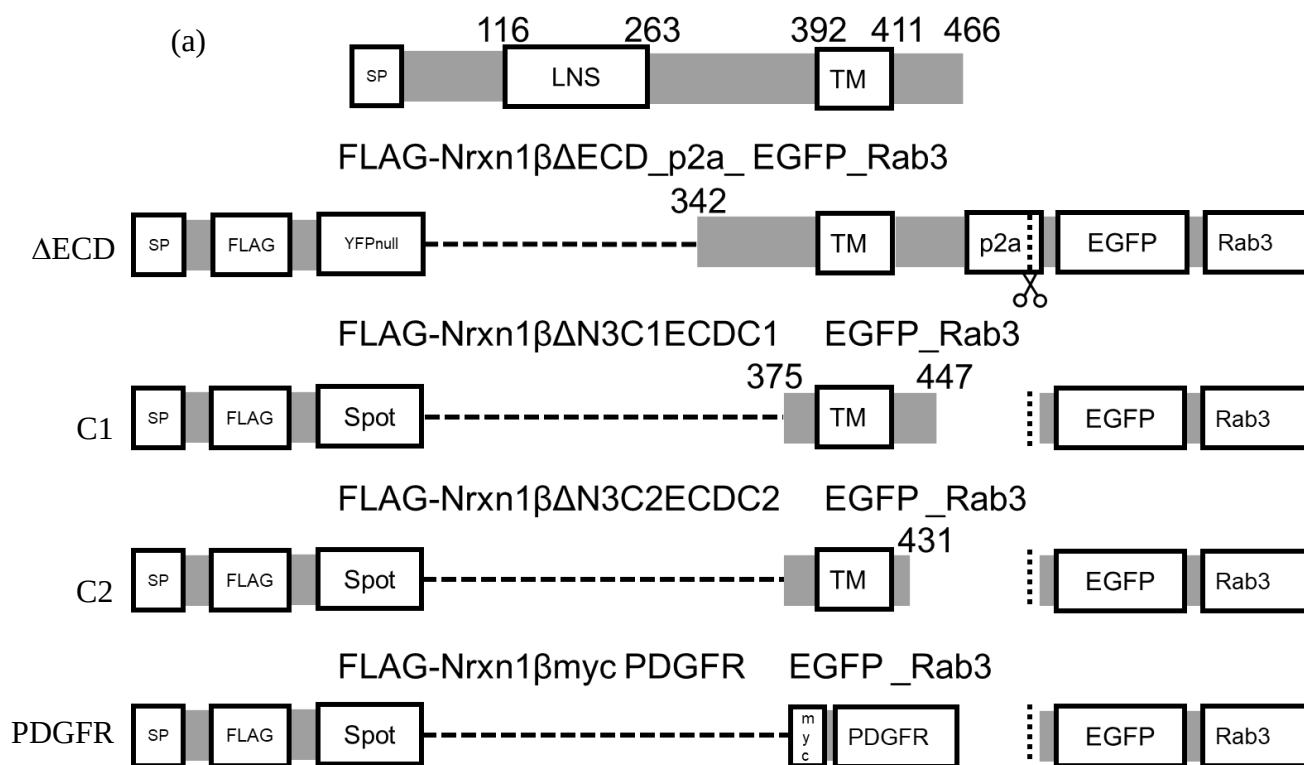
すべての画像はビーズサイズに合わせて一様に拡大した。矢印はビーズ上に集積したシナプスを示す。これは神経細胞の形態を確認するため、同時に Rab3 の有無を確認するために行った。

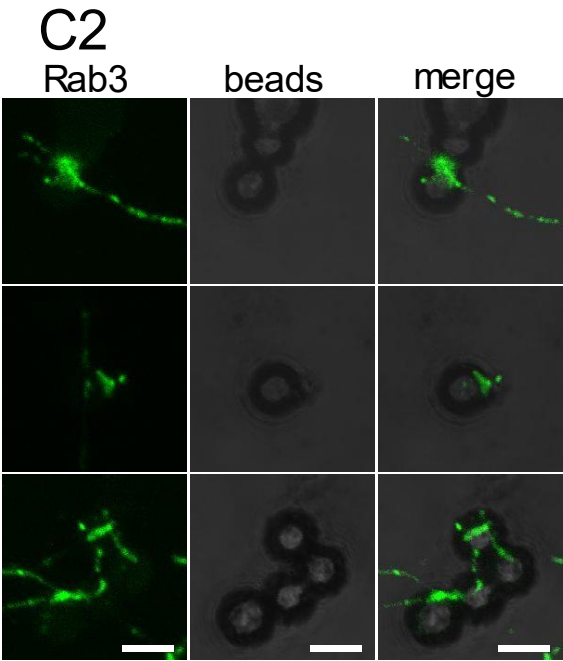
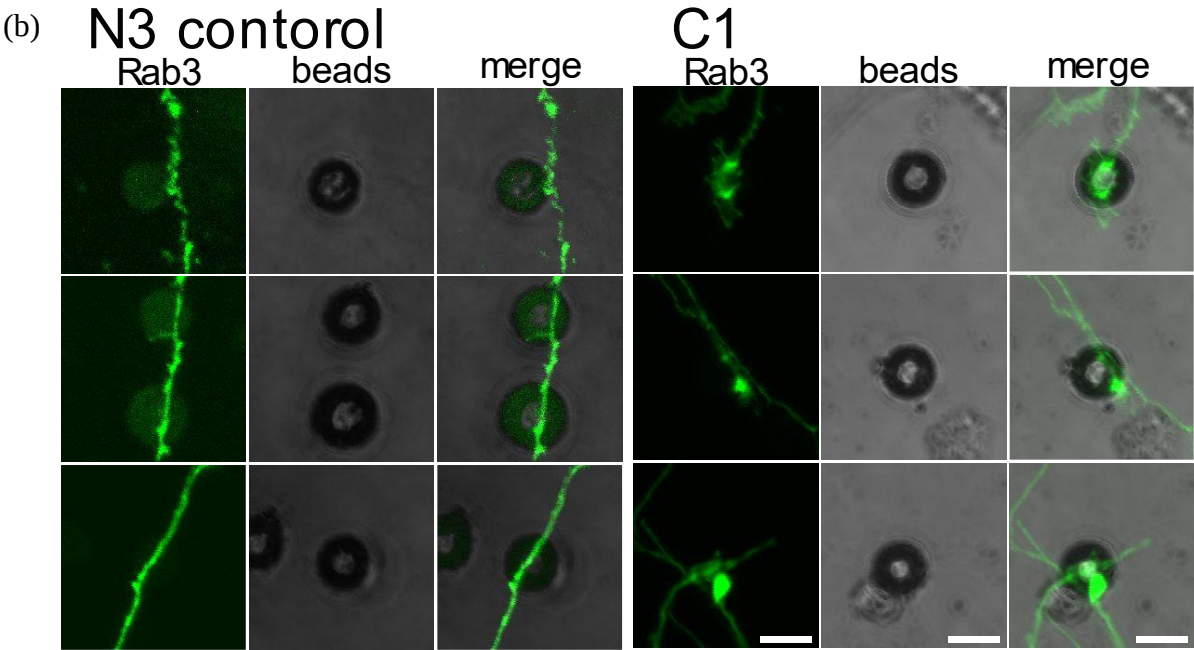
(d) 人工ニューレキシン N1-N3 および N3 コントロールの定量値を棒グラフに示す。N1-N3 の Rab3-index (約 1.0-2.0) は、control (約 0.1) と比較して有意に高く、本手法の優位性が示された (t-test, Fig2.3(d))

2.3.2 Neurexin-based engineered organizer 細胞外領域の削除の影響：

人工ニューレキシン 1 β は細胞外側を削った場合も誘導能を有しているが、人工ニューレキシンのたんぱく質がシナプス形成に深く関係している部分が不明瞭である。そのため、TM よりも内側に存在している細胞内領域を削り、シナプス形成されない箇所を探索する (Fig2.4(a))。細胞膜側には PDZ binding domain と呼ばれる PDZ domain と結合する箇所があり、PDZ domain が結合することで、シナプス形成され则认为られている。そのため、私はこの PDZ binding domain を除去することで、シナプス形成しないと期待し、TM から PDZ binding domain までの 1/2 サイズの C1 と 1/4 サイズの C2 を作成して、人工ニューレキシンを発現した神経細胞の誘導の有無を確認した。この人工ニューレキシン C1 と C2 を導入したベクターは2つのたんぱく質を1つの細胞内に同時に発現させ、遺伝子導入の確認と蛍光で神経細胞の形態を確認できるようにした。実験方法は、beads 上に anti-spotNb を付着させ、人工ニューレキシンから突出している spot-tag と特異的に結合させた (Fig.2.2)。人工ニューレキシンを発現させた神経細胞を培養したディッシュに anti-spotNb を付着させた beads を添加し、24 時間以上培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。control として人工ニューレキシンである N3 を発現させた神経細胞を培養したディッシュに anti-spotNb が付着していない beads を添加して 24 時間以上培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。こうすることで、特異的に結合していない人工ニューレキシンを発現した神経細胞の様子を観察できる。観察した結果を Fig2.4(b)に示す。C1 と C2 において beads 上に沿って蛍光強度が上昇していることを確認でき、2 つの箇所で蛍光強度が上昇していることを確認で

きたため、誘導した結果になった。また、C1 と C2 それぞれを N3 control に対して t 検定を行ったところ、p 値はそれぞれ $1.27\text{E}-08$, 0.000472 であった(Fig2.4(c))。これは、C1,C2 において N3 control の優位性があることを示しており、シナプス様形成していることが示唆された。





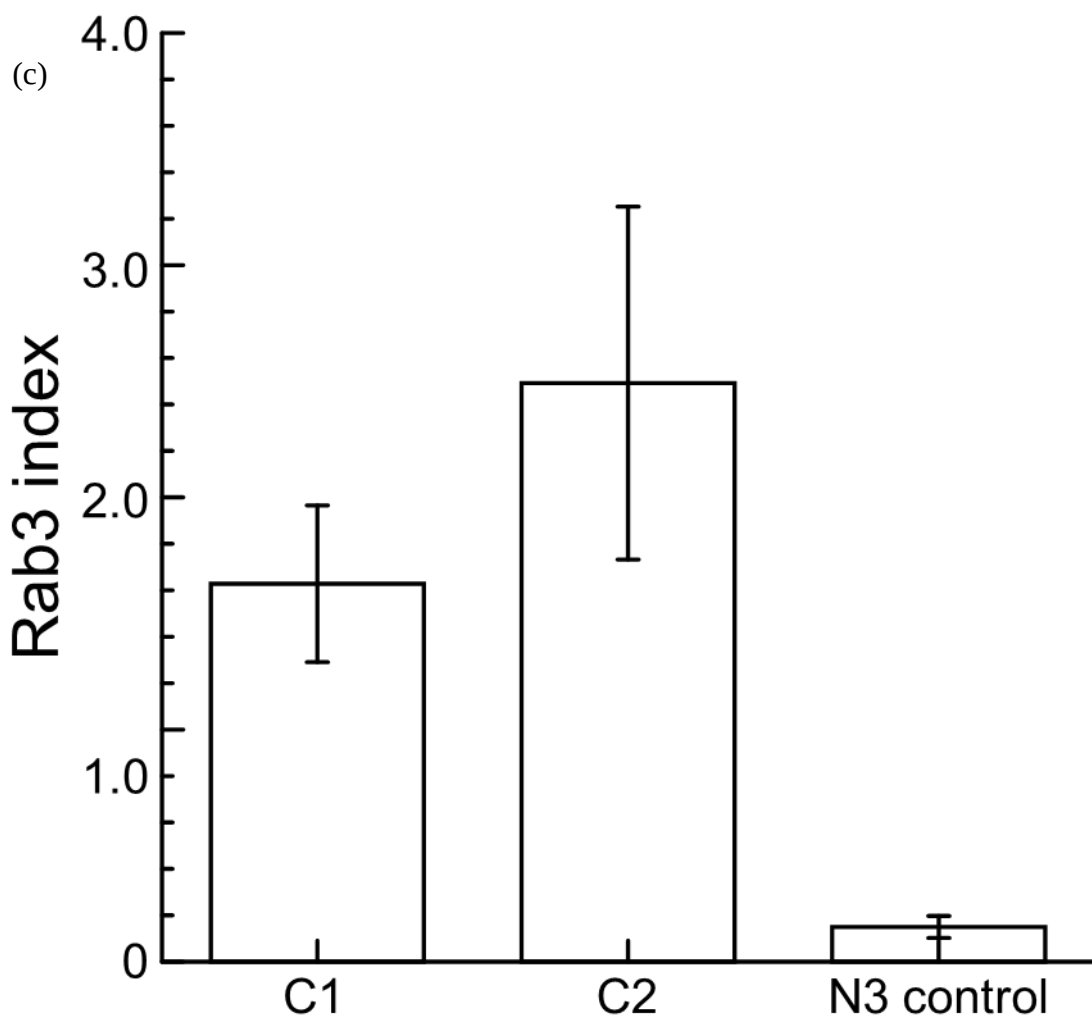


Fig2.4

(a) 先行研究のニューレキシン 1 β と FLAG-YFPnull-ChickNrxn1 β DeltaECD-p2a-EGFP-Rab3、および本研究で作製した C1,C2 のコンストラクトを示す。アミノ酸配列は TM の細胞外部分を削ることでコンパクトにした。

(b) ビーズ上に誘導したニューレキシン C1、C2 を形質導入したニューロンを用いて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて緑色および赤色蛍光で撮像した Rab3 の画像。ビーズは白色光下で観察した。bar=5 μ m。BC2Nb のみがビーズ上に固定化され、スポットタグに結合できるようにした。すべての画像はビーズサイズに合わせて一様に拡大した。矢印はビーズ上に集積したシナプスを示す。これは、Rab3 を同時に確認することで神経細胞の形態を確認するために行った。

(c) 人工ニューレキシン C1-C2 と N3 コントロールの定量値を棒グラフに示す。C1-C2 の Rab3 index は N3 コントロールに対して優位に高く ($p=1.27\text{E-}08$, $p=0.000472$, t-test)、C1-C2 の優位性が示された。

2.3.3 Neurexin-based engineered organizer 細胞膜貫通たんぱく質の除去の影響：

神経細胞内に存在しているニューレキシンを支える役割のある TM を除去し、新たに神経細胞とは関係ないたんぱく質に変更して誘導の有無を確認した。人工ニューレキシン内に存在している PDZ domain binding や CHO, Cys loop を除去しても誘導能を有している。そのため、私はオリジナルのニューレキシンに存在していた膜貫通ドメインである TM を除去し、新たに、神経細胞とは関係ない膜貫通ドメインに変更しても誘導するかを調べることにした(Fig2.4(a))。ニューレキシンの TM を除去すると細胞外と細胞膜が貫通できず、人工ニューレキシンが神経細胞の表面上に発現しないと考えた。そこで、私は TM の代替として、神経細胞と関与しないとされる膜貫通ドメインである赤血球由来増殖因子(PDGFR)を導入して、誘導の有無を調べた。PDGFR は赤血球由来増殖因子で膜貫通ドメインとして知られている[26]。今回のベクターも 2 つの蛋白質を同時に 1 つの細胞に発現させることができるベクターである pBI-CMV1 を使用した。実験方法は、beads 上に antispotNb を付着させ、人工ニューレキシン内に存在している spot-tag と特異的に結合させることにした。人工ニューレキシンを発現させた神経細胞を培養したディッシュに antispotNb を付着させた beads を添加し、24h 以上培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Control として PDGFR を導入した人工ニューレキシンを発現させた神経細胞を培養した dish に antispotNb が付着していない beads を添加して 24h 以上培養した。こうすることにより、人工ニューレキシンに存在している spot-tag と結合しないようにすることで、beads 上に人工ニューレキシンを発現した神経細胞が誘導しないことを示した。

結果は Fig2.5(a)に示す。結果は 2 つ以上の箇所で蛍光強度が上昇している部分や beads 上に沿って蛍光強度が上昇している部分を確認することができた。また、PDGFR は PDGFR control に対して、優位性を示していた(t-test, Fig.2.5(b))。これらの実験から、人工シナプスオーガナイザーにおいて、神経細胞とは関係ない PDGFR に変更した場合にもシナプス様構造を形成し、誘導能を有していることが示された。

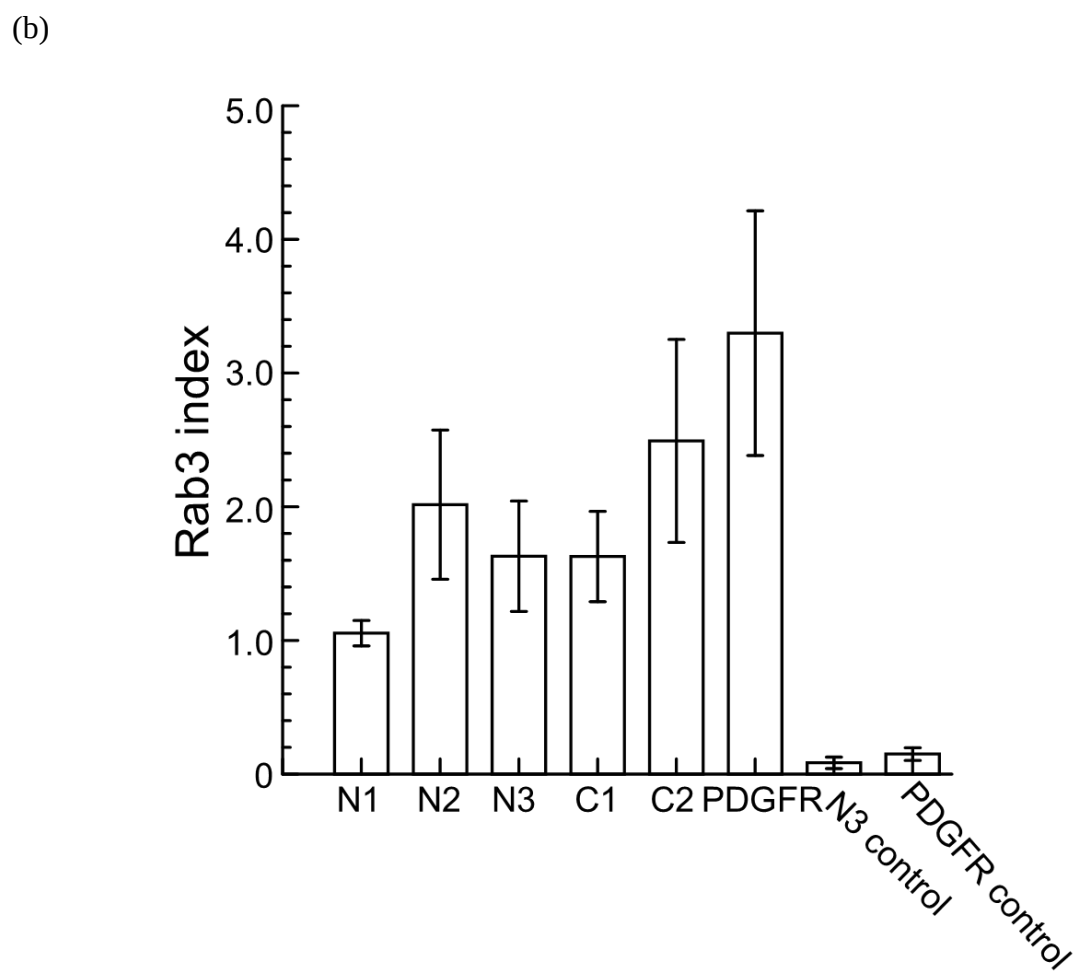
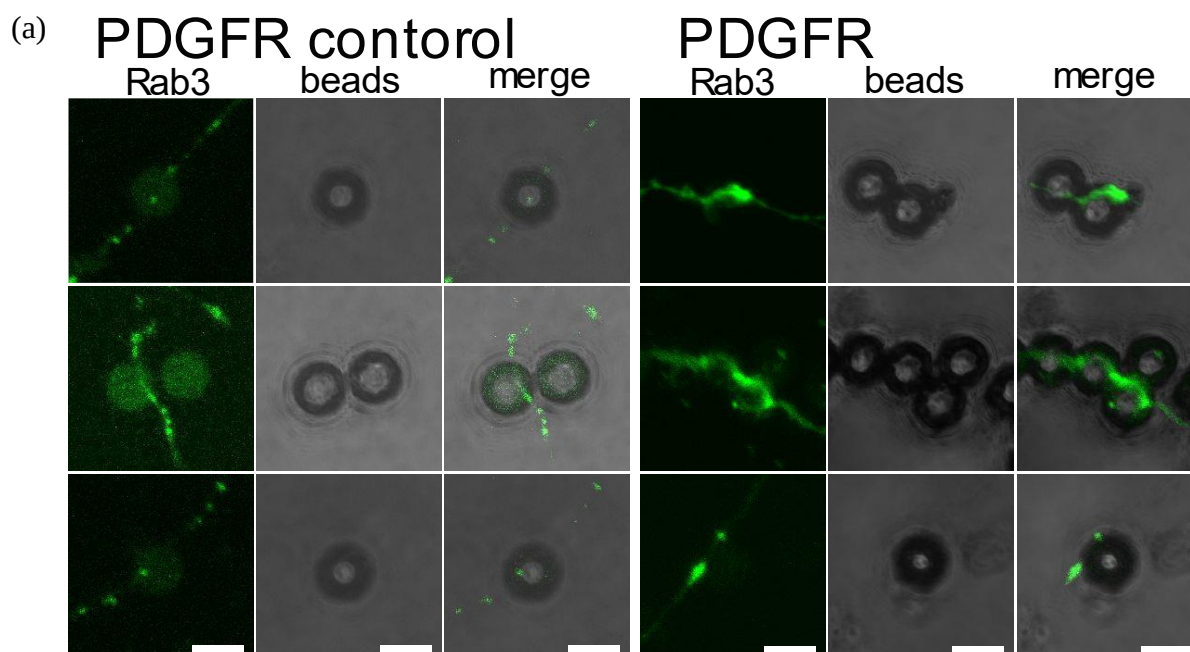


Fig2.5

(a)神経細胞の細胞膜に内在している膜貫通ドメインである TM を、赤血球成長因子 (PDGFR)に変更させることでビーズ上に誘導の有無を調べた。PDGFR を導入したニューレキシンを発現させるために神経細胞にトランスフェクションした。antispotNb を固定化していない beads をコントロールとして用意した。その後、共焦点レーザー顕微鏡を使ってニューロンを観察し、Rab3 を 559nm の波長の光で観察した。beads は白色光で観察し、3つの画像を合成した。その結果、antispotNb のみが beads に固定化され、スポットタグに結合できることがわかった。ビーズのサイズに調節し画像を一様に拡大し、同時に Rab3 を同定することで神経細胞の形態を確認した。

b) 人工ニューレキシシン N1-N3、C1-C2、PDGFR の Rab3 index の定量値をまとめた（詳細は Fig. 2.3, 2.4）。PDGFR を導入した人工ニューレキシシンを発現した神経細胞は control に対して誘導能の優位性があった ($p=0.00103$, t-test)。

2.4 考察

人工シナプスオーガナイザーの原理を用いて、筒井研究室の hamid で使用した人工ニューレキシンの YFPnull を spot-tag に変更し、さらに細胞外側を削った人工ニューレキシンを作成した。この人工ニューレキシン N1-N3 を発現させた神経細胞がシナプス様構造を形成することを確認できた。これにより、CHO と Cys loop はシナプス形成には必要なく、細胞外側では誘導能に関係しているドメインが存在していないことが示された (Fig.2.6)。また、細胞膜側に存在する PDZ binding domain も必要ないことを示している。この PDZ はニューレキシンが細胞質内で結合できる CASK の一部であり、PDZ binding domain が PDZ への結合部位である。そのため、人工ニューレキシンでは PDZ がニューレキシンの結合する必要があることを示している。これは、Südhof 氏が行ったオリジナルのニューレキシンの細胞外と細胞膜側を削った研究と一致している。細胞外側と細胞膜側を削ったニューレキシンもシナプス様構造を誘導し、最小機能単位を探索できなかった。そこで、人工ニューレキシン内にある膜貫通ドメインである TM を神経細胞とは関係ない赤血球成長因子膜貫通ドメイン (PDGFR) に変更してシナプス形成するかを確かめた (Fig.2.6)。その結果、PDGFR を含んだ人工ニューレキシンを発現させた神経細胞はシナプス様構造を形成することが分かった。この結果は、シナプス様構造の形成には TM も必要ないことを示しており、人工ニューレキシンの表面上に存在している何らかの分子が結合することで同構造を形成すると考えられる。人工ニューレキシン内のすべてのタンパク質を変更しても誘導能を有していることから、最小機能単位が存在せず、人工シナプスオー

ガナイザーにおいて、神経細胞の表面上の分子と特異的に結合することでシナプス様構造を形成していることを示唆する結果が得られた。細胞膜の表面上に形成するたんぱく質に変更した際の誘導能の有無やシナプス様形成した神経細胞の機能を調べる必要がある。そのため、第4章では、誘導した神経細胞の機能性の有無を検出できる微小電極を開発する。

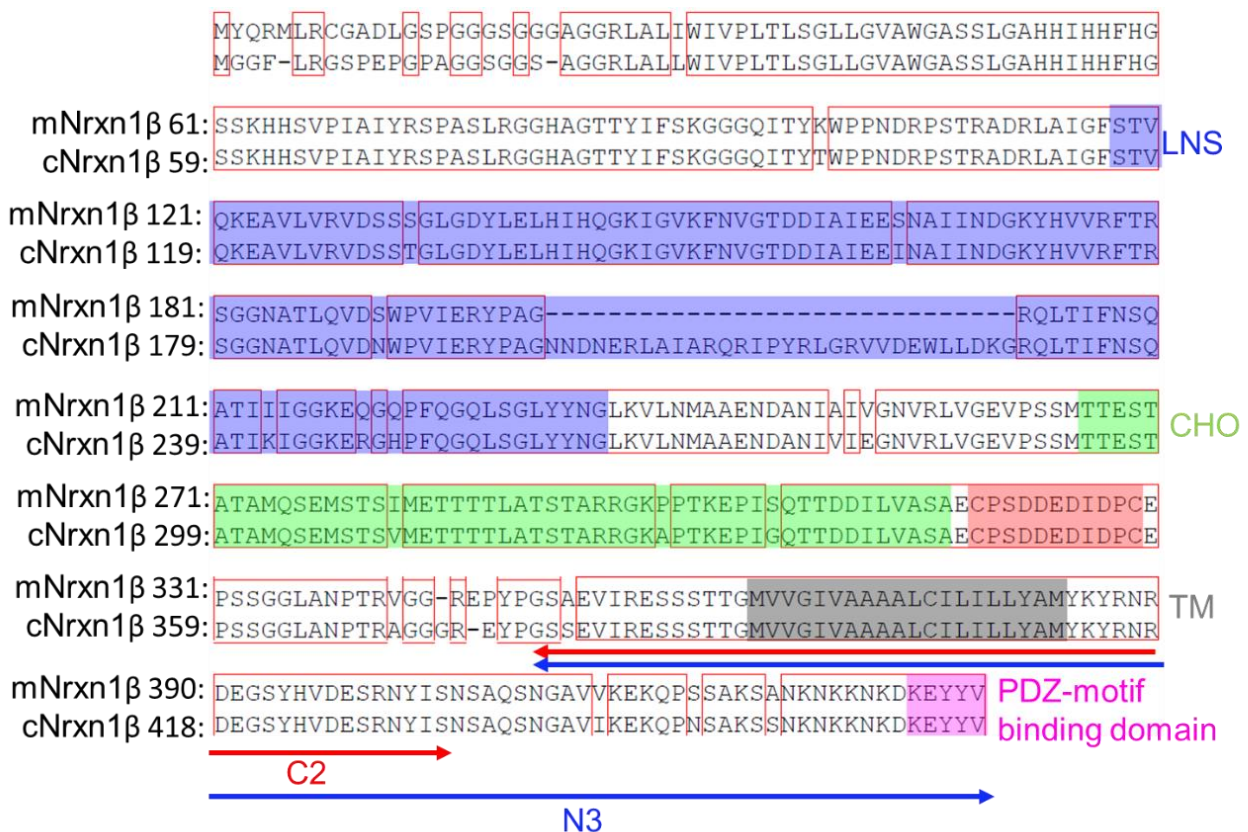


Fig 2.6

この図はニワトリのニューレキシシン 1b とマウスのニューレキシシン 1b のアミノ酸配列を比較したものである。この図では、Cho、Cys ループ、TM、PDZ biding ドメインを示した。N3 細胞外側を削った最も縮小させたサイズであり、C2 は細胞膜側を最も縮小させたサイズである。N3,C2 を神経細胞に形質導入しても誘導能を有していること示した結果を得られた。そのため、Cho、Cys ループ、PDZ biding ドメインが必要ないことを示している。また、TM を非シナプスたんぱく質である PDGFR に変更しても誘導することを確認した。そのため、TM も必要がないことを示している。

2.5 まとめ

本章では神経細胞に発現させる人工ニューレキシンの最小機能単位を探索することを目的に実験をおこなっていた。人工ニューレキシンはニューレキシン 1 β の LNS を spot-tag に変更したニューレキシンを示している。人工ニューレキシンを細胞外側に削ったものを神経細胞に発現させ、antispotNb を集積した beads 上にシナプス様形成を示した。そのため、CHO や Cys loop は必要なく、細胞膜側を削って神経細胞に発現させ、antispotNb が集積した beads 上にシナプス様形成が起きた。そのため、誘導することを確認でき、細胞膜側にある PDZ binding domain も必要ないことを示している。最後に、ニューレキシン 1 β で最も必要と考えられていた TM を新たに神経細胞とは関係ないたんぱく質である PDGFR に変更して同様の実験を行った。結果はシナプス様形成されているような様子を観察でき、神経細胞が誘導できたことを示している。そのため、人工ニューレキシンにおいてオリジナルのニューレキシン 1 β のドメインが必要ないことを示している。よって、人工ニューレキシンの一部を新たなドメインに変更しても誘導することができるため、センサードメインを導入することで電気信号を測定できるようになるとも考えられる。そして、人工ニューレキシンを発現した神経細胞は機能を有しているかが定かでないため、生存している神経細胞であるかが明らかにされていない。後述のように、神経細胞の機能性の有無を検出するための微小電極を第 4 章で開発している。

2.6 参考文献

- ¹ H. Tsutsui, S. Karasawa, Y. Okamura, and A. Miyawaki, “Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins,” *Nat Methods* 5(8), 683–685 (2008).
- ² H. Tsutsui, Y. Jinno, A. Tomita, Y. Niino, Y. Yamada, K. Mikoshiba, A. Miyawaki, and Y. Okamura, “Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase,” *Journal of Physiology* 591(18), 4427–4437 (2013).
- ³ A.S. Abdelfattah, R. Valenti, J. Zheng, A. Wong, A.S. Chuong, J.P. Hasseman, V. Jayaraman, I. Kolb, W. Korff, L.D. Lavis, Y. Liang, L.L. Looger, D. Merryweather, D. Reep, N. Spruston, K. Svoboda, A. Tsang, G. Tsegaye, G. Turner, K. Podgorski, M. Koyama, D.S. Kim, and E.R. Schreiter, “A general approach to engineer positive-going eFRET voltage indicators,” *Nat Commun* 11(1), (2020).
- ⁴ L.M. Leong, B.E. Kang, and B.J. Baker, “Improving the flexibility of genetically encoded voltage indicators via intermolecular FRET,” *Biophys J* 120(10), 1927–1941 (2021).
- ⁵ V. Villette, M. Chavarha, I.K. Dimov, J. Bradley, L. Pradhan, B. Mathieu, S.W. Evans, S. Chamberland, D. Shi, R. Yang, B.B. Kim, A. Ayon, A. Jalil, F. St-Pierre, M.J. Schnitzer, G. Bi, K. Toth, J. Ding, S. Dieudonné, and M.Z. Lin, “Ultrafast Two-Photon Imaging of a High-Gain Voltage Indicator in Awake Behaving Mice,” *Cell* 179(7), 1590-1608.e23 (2019).
- ⁶ C. Beck, and Y. Gong, “A high-speed, bright, red fluorescent voltage sensor to detect neural activity,” *Sci Rep* 9(1), (2019).

- ⁷ G. Buzsáki, “Large-scale recording of neuronal ensembles,” *Nat Neurosci* 7(5), 446–451 (2004).
- ⁸ S. Kim, M. Imayasu, T. Yoshida, and H. Tsutsui, “Formation of neuron-microelectrode junction mediated by a synapse organizer,” *Applied Physics Express* 16(5), (2023).
- ⁹ D.A. Henze, Z. Borhegyi, J. Csicsvari, A. Mamiya, K.D. Harris, O. Buzs, and G. Buzsáki, *Intracellular Features Predicted by Extracellular Recordings in the Hippocampus In Vivo* (2000).
- ¹⁰ T. Yoshida, T. Shiroshima, S.-J. Lee, M. Yasumura, T. Uemura, X. Chen, Y. Iwakura, and M. Mishina, “Interleukin-1 Receptor Accessory Protein Organizes Neuronal Synaptogenesis as a Cell Adhesion Molecule,” (2012).
- ¹¹ Y.E. Pan, D. Tibbe, F.L. Harms, C. Reißner, K. Becker, B. Dingmann, G. Mirzaa, A.A. Kattentidt-Mouravieva, M. Shoukier, S. Aggarwal, M. Missler, K. Kutsche, and H.J. Kreienkamp, “Missense mutations in CASK, coding for the calcium-/calmodulin-dependent serine protein kinase, interfere with neurexin binding and neurexin-induced oligomerization,” *J Neurochem* 157(4), 1331–1350 (2021).
- ¹² D.P. Quinn, A. Kolar, M. Wigerius, R.N. Gomm-Kolisko, H. Atwi, J.P. Fawcett, and S.R. Krueger, “Pan-neurexin perturbation results in compromised synapse stability and a reduction in readily releasable synaptic vesicle pool size,” *Sci Rep* 7(February), 1–13 (2017).
- ¹³ T.C. Südhof, “Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits,” *Cell* 171(4), 745–769 (2017).
- ¹⁴ O. Gokce, and T.C. Südhof, “Membrane-tethered monomeric neurexin LNS-domain triggers

synapse formation,” *Journal of Neuroscience* 33(36), 14617–14628 (2013).

¹⁵ T.C. Südhof, “Towards an Understanding of Synapse Formation,” *Neuron* 100(2), 276–293 (2018).

¹⁶ M. Sm. Ahasanul Hamid a, Imayasu, T. Yoshida, and H. Tsutsui, “Epitope-tag-mediated synaptogenic activity in an engineered neurexin-1 β lacking the binding interface with neuroligin-1,” *658* (2023) 141–147.

¹⁷ B.A. Akhoun, P.S. Slathia, P. Sharma, S.K. Gupta, and V. Verma, “In silico identification of novel protective VSG antigens expressed by *Trypanosoma brucei* and an effort for designing a highly immunogenic DNA vaccine using IL-12 as adjuvant,” *Microb Pathog* 51(1–2), 77–87 (2011).

¹⁸ A.H. Kossel, C. V Williams, M. Schweizer, and S.B. Kater, *Afferent Innervation Influences the Development of Dendritic Branches and Spines via Both Activity-Dependent and Non-Activity-Dependent Mechanisms* (1997).

¹⁹ Y. Kakinuma, H. Hama, F. Sugiyama, K. Goto, K. Murakami, and A. Fukamizu, *Anti-Apoptotic Action of Angiotensin Fragments to Neuronal Cells from Angiotensinogen Knock-out Mice* (1997).

²⁰ S.R. Heidemann, M. Reynolds, K. Ngo, and P. Lamoureux, “The culture of chick forebrain neurons,” *Methods Cell Biol* 2003(71), 51–65 (2003).

²¹ D. Araç, A.A. Boucard, E. Özkan, P. Strop, E. Newell, T.C. Südhof, and A.T. Brunger, “Structures of Neuroligin-1 and the Neuroligin-1/Neurexin-1 β Complex Reveal Specific Protein-Protein and Protein-Ca²⁺ Interactions,” *Neuron* 56(6), 992–1003 (2007).

- ²² D. Virant, B. Traenkle, J. Maier, P.D. Kaiser, M. Bodenhöfer, C. Schmees, I. Vojnovic, B. Pisak-Lukáts, U. Endesfelder, and U. Rothbauer, “A peptide tag-specific nanobody enables high-quality labeling for dSTORM imaging,” *Nat Commun* 9(1), 1–14 (2018).
- ²³ J. Ren, H. Xiong, C. Huang, F. Ji, and L. Jia, “An engineered peptide tag-specific nanobody for immunoaffinity chromatography application enabling efficient product recovery at mild conditions,” *J Chromatogr A* 1676, 463274 (2022).
- ²⁴ A. Sakane, S. Manabe, H. Ishizaki, M. Tanaka-Okamoto, E. Kiyokage, K. Toida, T. Yoshida, J. Miyoshi, H. Kamiya, Y. Takai, and T. Sasaki, “Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3,” *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26), 10029–10034 (2006).
- ²⁵ M. Montero, N. Gulzar, K.-A. Klaric, J.E. Donald, C. Lepik, S. Wu, S. Tsai, J.-P. Julien, A.J. Hessel, S. Wang, S. Lu, D.R. Burton, E.F. Pai, W.F. DeGrado, and J.K. Scott, “Neutralizing Epitopes in the Membrane-Proximal External Region of HIV-1 gp41 Are Influenced by the Transmembrane Domain and the Plasma Membrane,” *J Virol* 86(6), 2930–2941 (2012).
- ²⁶ C. Muhle-Goll, S. Hoffmann, S. Afonin, S.L. Grage, A.A. Polyansky, D. Windisch, M. Zeitler, J. Bürck, and A.S. Ulrich, “Hydrophobic matching controls the tilt and stability of the dimeric platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α transmembrane segment,” *Journal of Biological Chemistry* 287(31), 26178–26186 (2012).

Chapter3

人工シナプスオーガナイザーによる
シナプス様ニューロン-微小電極接合の誘導

Key points

- ・ 神経細胞を微小電極上に選択的に誘導することを目的に、シナプスオーガナイザーの仕組みを用いて特異的に神経細胞を微小電極上に誘導させることに成功した。

3.1 研究背景

神経回路における情報の符号化、処理、保存の原理は、今日の科学における未解決の難問のひとつであるが、その基本的なプロセスは、回路内のニューロンの膜電位の動態にあると考えられている。したがって、神経細胞の電気活動をより詳細に検出するための技術開発が不可欠である[1-7]。現在、光電圧インジケータと微小電極という 2 つの主要なアプローチが用いられている。前者は、膜電位依存的に蛍光を発するように設計されたタンパク質である。このようなインジケータは、シグナルの起源を確実にするために、特定の遺伝子プロモーターを用いて目的の細胞タイプに導入することができる[3,6]。最新のインジケータは、プロトタイプと比較して、レスポンスとスピードで大きく進歩し、さらに開発が進んでいるが、光イメージングの原理から生じる限界もある[8]。後者は、パッチクランプや細胞内・細胞外記録などの技術を指す[7,9]。微小電極技術は、もともと単一部位あるいは複数部位での記録に適していたが、最近のフレキシブル・アレイ電極は、大規模な並列記録を可能にし始めている。しかし、これらの技術には、この原理から生じる限界がある。ひとつは、細胞タイプの特異性の欠如である。神経回路は異なるタイプの細胞で構成され、それぞれが回路機能において特定の役割を果たすため、これは極めて重要である。したがって、記録中の細胞は他の間接的な手段、例えばマーカー遺伝子の発現の視覚的なコンフォメーションによって同定されなければならない。しかし、このような同定は手間がかかり、大規模な並列記録には非現実的である。私は、シナプスオーガナイザーを利用することで、細胞タイプに特化した微小電極技術を開発しようと試みた。シナプ

スオーガナイザーは、神経細胞とシナプス間の結合の生成と維持に重要な役割を果たす一連のタンパク質である。軸索と樹状突起に存在するオーガナイザーの特定のセットは、接触時に複合体を形成し、細胞シグナルをトリガーとしてシナプス前部とシナプス後部に分化させる。シナプスオーガナイザーを機能化した微小電極は、対応するオーガナイザーを発現する標的ニューロンと接触すると分化シグナルを発揮し、シナプス様のニューロン-微小電極接合を形成するが、非標的ニューロンとは形成しない（図 2.1(a)）。私が所属している研究室では、IL1RAPL1 で機能化した金微小電極が、接触した大脳皮質ニューロン（インターロイキン-1）にこのような分化シグナルを作用させることを見いだした。

IL1RAPL1 はシナプス後膜に存在する天然のシナプスオーガナイザーであり、シナプス前膜には PTP δ [10]がある。これらの天然に存在するシナプスオーガナイザーは哺乳類の神経細胞に偏在しているため、細胞種特異的な神経細胞と微小電極のインターフェースを実現するためには、既存の天然オーガナイザーと交差反応を起こさないような人工シナプスオーガナイザーを開発する必要があった。また、よく研究されている天然のシナプスオーガナイザーである neurexin-1 β [11-15]の分子メカニズムを利用することで、そのようなオーガナイザーを設計することが可能であることも見出した。しかし、この論文では、神経細胞と非生物学的物体との間の接合形成について、これまで過小評価されてきた性質について報告する。天然に存在するシナプスオーガナイザーから設計されたタンパク質は必ずしも必要ではなく、細胞外エピトープを持つ単純な非シナプス膜タンパク質も、このような接合の形成を仲介することができる。この発見は、後述するように重要な科学的意味合い

と技術的利点を持つ。私はこのことを、以前行った neurexin-1 β based engineered synapse organizer [16]の研究のフォローアップ作業中に発見した。以前の章では、PDGFR(赤血球成長因子)に変更しても誘導することを確認めたため、神経細胞の表面上に存在しているタンパク質が結合するだけで、シナプスが形成されていると考えられるような結果を得ることができた。人工シナプスオーガナイザーを用いて細胞識別性を内在させるために、人工ニューレキシン N3 を発現した神経細胞を微小電極上に誘導するかを確認する。人工的なシナプスオーガナイザーの仕組みを駆使することで、神経細胞を選択的に微小電極上に誘導することになる。本研究では、人工シナプスオーガナイザーを用いることで、金属微小電極とニューロンとの間に特異的な接合構造が実際に形成できることを確認することを目的とする。

3.2 方法

分子生物学、細胞の調製、たんぱく質精製等に関しては、第二章と同様の方法を用いた。

微小電極付き細胞培養チャンバーの作製

イオンビームスパッタリング装置(EIS-220, Elionix, Tokyo)を用いて、ホウケイ酸カバースリップ(22×32 mm, Matsunami, Osaka, Japan)上にクロムおよび金をそれぞれ 30 nm および 200 nm の厚さでスパッタリングした。電極ラインと接続パッドは、通常のリソグラフィを用いてパターンニングした。その上に SU-8 3005 (MicroChem 社、米国マサチューセッツ州)を約 5 μ m の厚さでパターンニングし、微小電極チップと絶縁体を形成した。この研究における典型的なチップサイズは幅 5 μ m、長さ 10 μ m であった。ハードベーク (200°C、

10分) 後、ポリジメチルシロキサンエラストマーを用いてホウケイ酸ガラスリング (直径 20mm、高さ 5mm) を取り付け、細胞培養チャンバーを構成した[8]。

3.3 結果

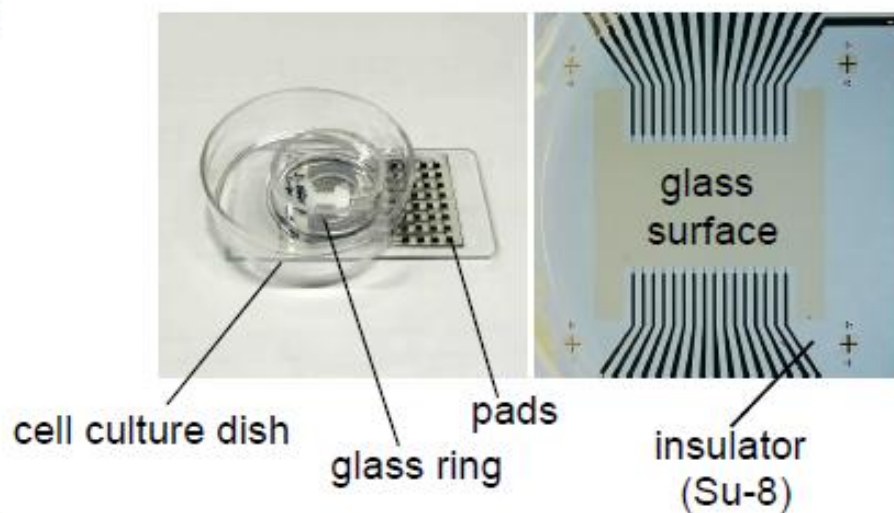
3.3.1 微小電極上に固定化した antispotNb の機能性の確認

筒井研究室の Kim 氏の実験において微小電極上に単一の一般的な神経細胞がシナプス様構造を形成するような結果を得られており、微小電極上に単一の神経細胞を誘導することに成功している[8]。一方で、一般的な神経細胞に存在している PTP δ と結合し、シナプス形成するたんぱく質 IL1RAPL1 を使用していたため、神経細胞の選択性がないことが欠点となっている。そこで本研究では、選択的に単一の神経細胞を微小電極上に誘導することを目的としている。

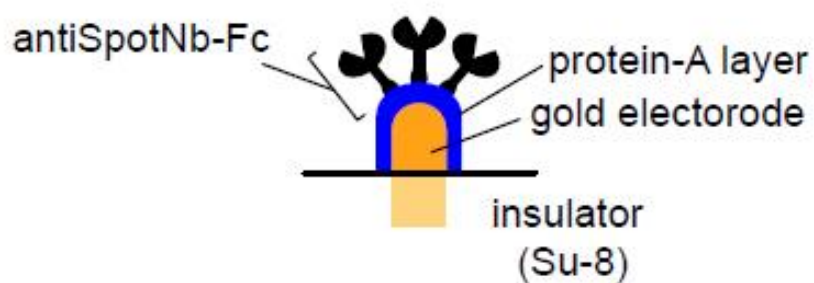
第二章において人工ニューレキシン 1 β の細胞外側を削ったところ、シナプス様形成の活性を得られた。この特異的結合で、神経細胞を選択的に微小電極上に誘導できると期待し、人工ニューレキシン N 3 を発現させた神経細胞を微小電極上に培養することで、微小電極上に固定化された antispotNb の誘導能の有無を明らかにしようと試みた。Fig.3-2(a)は本実験で使用した微小電極であり、左が全体図、右が拡大図になっている。微小電極はカバーガラス状に Cr/Au で薄膜生成し、CAD でデザインした微小電極をフォトリソグラフィで作製した。微小電極上以外の部分にはレジストを塗布し、100 μ m ほどの大きさを持つ微小電極にはレジストを塗布しないような設計にした。この微小電極上に、神経細胞を誘導するように、antispotNb を固定化した。微小電極上に固定化した antispotNb は spot-tag と結合能を有しているかが明らかにされていない。そこで、antispotNb の結合能を明らかにする実験として、mCherry-spot-tag と微小電極上に固定化した antispotNb が結合するか

を確かめた。微小電極上に固定化できるように緩衝材として Fc domain と結合できる proteinA を使用することにした。この proteinA の結合手は 3 本あることが、私の研究室に所属していた Trisha 氏によって明らかにされている。パルス波の信号波を与えることによって proteinA を微小電極上に固定化することができる。この後に、antispotNb-Fc をガラス電極上に添加することで、Fc と proteinA が結合できる。しかしながら、Fc と proteinA の結合は強固なものでないため、クロスリンクで固定化させた。微小電極→proteinA→Fc-antispotNb の順番で固定化させている(Fig3.1)。ここで、クロスリンクを行うとたんぱく質の機能性を失うことがあるため、クロスリンクした後の antispotNb の結合能を調べる必要がある。このクロスリンク後の微小電極上に antispotNb と結合できる mCherry-spottag を添加し、mCherry の赤色の蛍光を放出するかを確かめた。結果を Fig3.2(c)に示す。Fig3.2(c) 左が mCherry-spottag を添加した結果であり、右が裸電極で control 実験を行った結果である。proteinA が固定化した微小電極上に、赤色の蛍光を確認することができた。微小電極上には antispotNb が固定化されているため、spot-tag と結合できるようになっている。そのため、微小電極上に固定化された antispotNb は spot-tag との結合能を有していることが明らかになった。

(a)



(b)



(c)

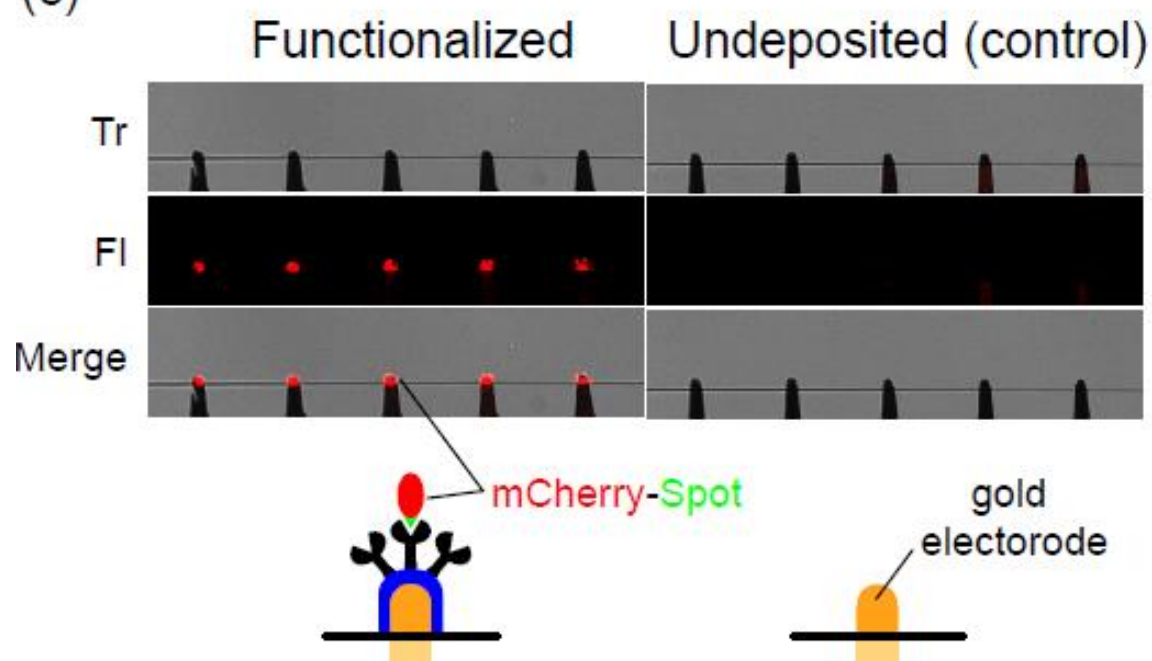


Fig3.1

(a)人工ニューレキシンを微小電極上に存在させたニューロンの誘導実験に用いた培養ニューロンのディッシュ。微小電極はカバーガラス上に金属でコーティングされ、フォトリソグラフィによって微細加工された。右が微細加工像。左側の細胞培養ディッシュには、微小電極と接触するように穴が開けられた。その後、神経細胞の拡散を防ぐためにガラスリングを取り付けた。

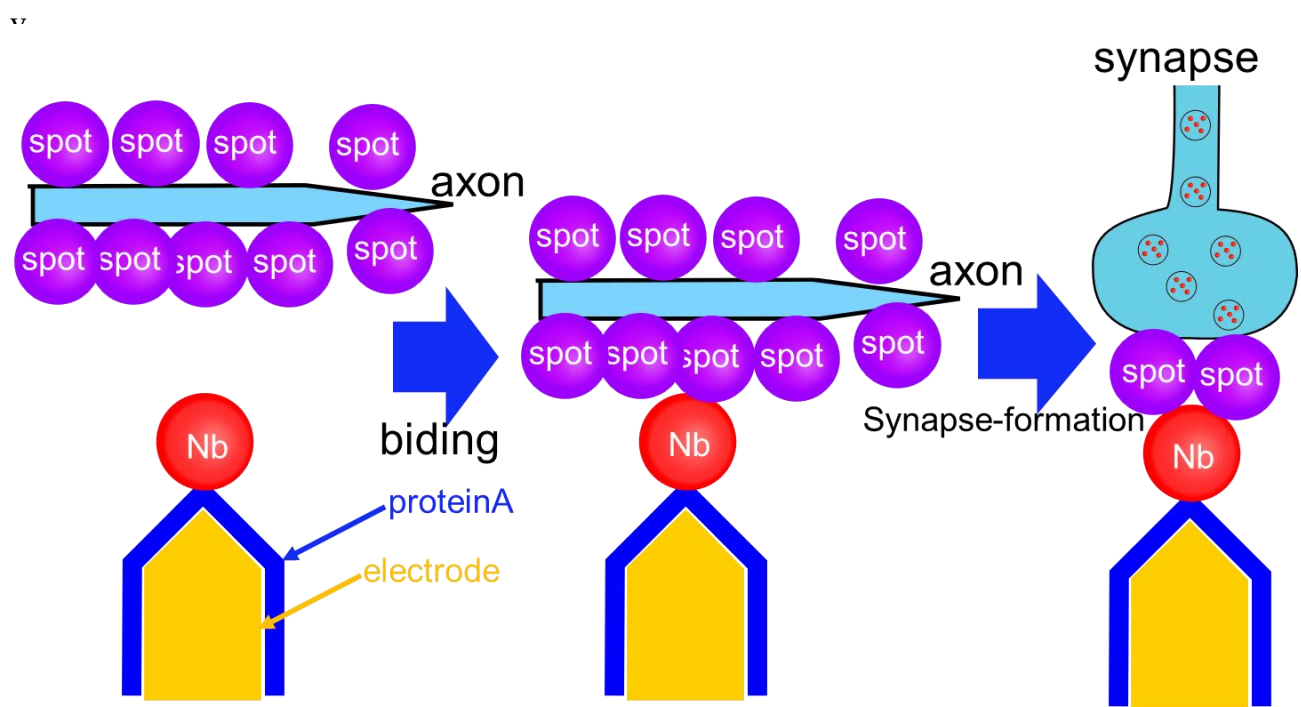
(b)パッドに電流を流して proteinA を微小電極上に誘導し、proteinA に結合できる Fc ドメインを持つ spot-Nb-Fc を固定した。固定化された AntispotNb は spot-tag に結合できる。

(c) この実験は、spot-tag が微小電極に固定した Antispot-Nb に結合できるかどうかを確認するために行った。 左の画像は白色光のみでの AntispotNb の画像であり、右の蛍光画像は特定の波長での AntispotNb の画像である。左の画像は AntispotNb を含む微小電極、右の画像はタンパク質を含まない微小電極。

3.3.2 微小電極上に神経細胞が誘導したことの確認

微小電極上に固定化した antispotNb は機能を有しているため、神経細胞の表面上に存在している spot-tag と結合できることを示している。そこで、私は神経細胞の表面上に存在している一部の spot-tag が微小電極上の antispotNb が結合することでシナプス様形成の有無を確認した。まず、antispotNb を固定化した微小電極上に人工ニューレキシン N3 を発現させた神経細胞を 4 日間培養し、波長 559nm の光を照射し、蛍光顕微鏡で観察した (Fig.3.3(a))。Control 実験として微小電極上に antispotNb がない状態にして人工ニューレキシンを発現した神経細胞を培養し、蛍光顕微鏡で観察した。観察した画像を Fig.3.3(b) に示す。右の図が control の結果であり、微小電極上で蛍光強度が上昇している箇所を見つけることができなかったため、誘導していないことを示す結果である。そして、左の 2 つの画像はそれぞれ、微小電極上で神経細胞の軸索の蛍光強度が有意に上昇している箇所を確認できたため、神経細胞が微小電極上に誘導した結果を得ることができた。そのため、微小電極上に固定化した antispotNb と神経細胞の表面上に存在する spot-tag は結合することで、シナプス様構造が形成されていることを示している。この結果から、選択的に神経細胞を微小電極上に誘導できることを示す結果になっている。

(a)



(b)

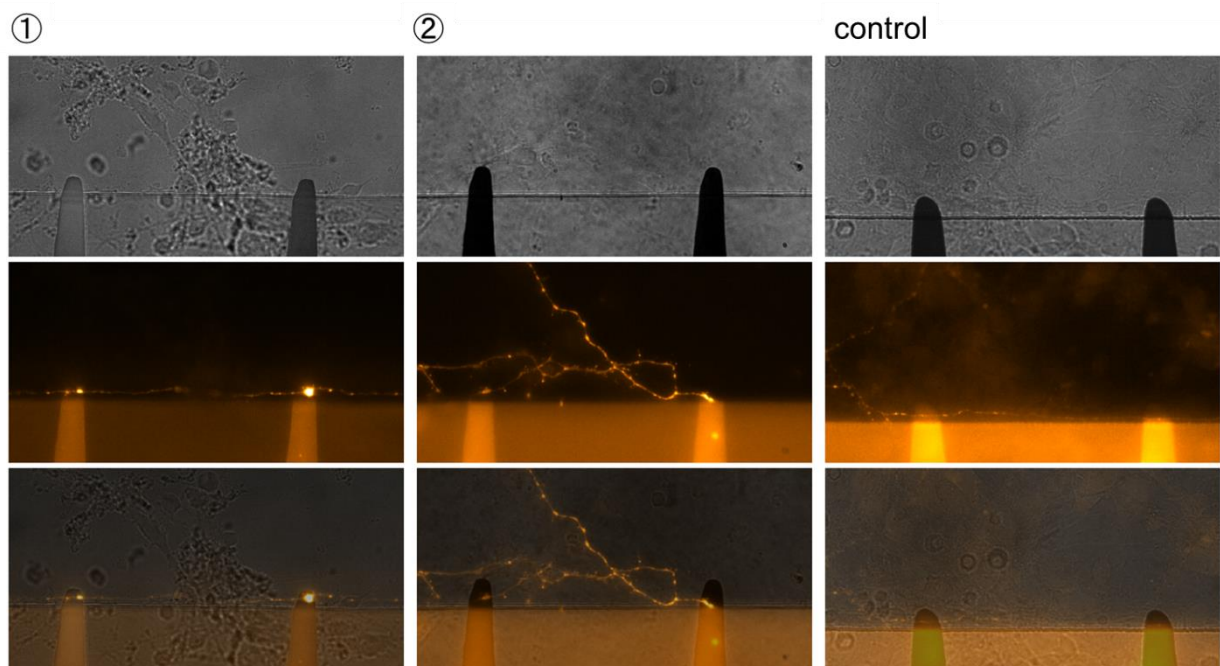


Fig3.3

(1) 人工ニューレキシン N3 を発現するニューロンの spottag が、微小電極上に固定化した antispotNb と結合し、シナプスが形成されるかどうかを確認する実験の模式図である。微小電極上の antispotNb は、ニューロンの軸索表面の人工ニューレキシンの spottag に結合する。これは結合によってシナプス形成が起こることを確認する実験である。

(2)(a) (b) 作製した人工ニューレキシンである spotcNrxnN3 をトランスフェクトしたニューロンが、antispotNb を固定化した微小電極上に誘導されるかどうかを確認する実験を行った。(c)spotcNrxnN3 をトランスフェクトした神経細胞において、微小電極上に antispotNb がない状態で実験を行った。この実験は、コントロールである。

3.4 考察

人工ニューレキシン N3 を発現させた神経細胞が微小電極上にシナプス様構造を誘導することを目的として実験を行った。これが成功すると選択的に神経細胞を微小電極上に誘導できることを示すような結果となる。下準備として微小電極上に proteinA を固定化させ、mCherry-Fc を集積させても機能性を有していることを確認した。また、人工ニューレキシン N3 を発現させた神経細胞を微小電極上に誘導できることを調べた。その結果、微小電極上に人工ニューレキシンを発現した神経細胞が誘導され、選択的に神経細胞の電気信号を測定できるような結果を得られた。この微小電極に神経細胞を誘導させ、脱分極させた神経細胞の電気信号を測定する方法を 2 つ考えている。1 つは神経細胞が放出するグルタミン酸濃度を測定する方法である。この方法では対物レンズにグルタミン酸濃度を測定する測定器を装着する必要があるため、大掛かりな作業となる[8]。そして、2 つ目は直接的に電気信号を測定する方法となる。パッチクランプ法を使用して選択的に単一の神経細胞を脱分極させるつもりである。神経細胞の情報伝達の謎の解明について一歩近づくことができる[8.17]。

3.5 まとめ

本研究では人工ニューレキシンを発現した神経細胞を微小電極上に誘導することを目的に行った。人工ニューレキシンは N3 を使用しており、spot-tag と antispotNb の抗体抗原反応によって結合させている。そのため、微小電極上においても antispotNb が機能を有するかを確かめる必要があった。そこで、微小電極上に、antispotNb を集積させ、mCherry-spot-tag を添加したところ微小電極上が蛍光することを確認した。そのため、微小電極上に antispotNb を集積させても機能性を有していた。そして、この antispotNb を集積させた微小電極上で人工ニューレキシンを発現させた神経細胞を培養した。神経細胞は微小電極上に誘導することができ、シナプス様構造を観察することができた。そのため、選択的に神経細胞を誘導でき、この原理を用いることにより、単一の神経細胞の電気信号を測定することができ、神経細胞の情報伝達の謎を解明する手掛かりになると考えている。しかしながら、誘導した神経細胞の機能性を有しているかが明らかにされていないため、第 4 章では誘導した神経細胞の機能性の有無を検出できる微小電極を開発する。

3.6 参考文献

- ¹ H. Tsutsui, S. Karasawa, Y. Okamura, and A. Miyawaki, “Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins,” *Nat Methods* 5(8), 683–685 (2008).
- ² H. Tsutsui, Y. Jinno, A. Tomita, Y. Niino, Y. Yamada, K. Mikoshiba, A. Miyawaki, and Y. Okamura, “Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase,” *Journal of Physiology* 591(18), 4427–4437 (2013).
- ³ A.S. Abdelfattah, R. Valenti, J. Zheng, A. Wong, A.S. Chuong, J.P. Hasseman, V. Jayaraman, I. Kolb, W. Korff, L.D. Lavis, Y. Liang, L.L. Looger, D. Merryweather, D. Reep, N. Spruston, K. Svoboda, A. Tsang, G. Tsegaye, G. Turner, K. Podgorski, M. Koyama, D.S. Kim, and E.R. Schreier, “A general approach to engineer positive-going eFRET voltage indicators,” *Nat Commun* 11(1), (2020).
- ⁴ L.M. Leong, B.E. Kang, and B.J. Baker, “Improving the flexibility of genetically encoded voltage indicators via intermolecular FRET,” *Biophys J* 120(10), 1927–1941 (2021).
- ⁵ V. Villette, M. Chavarha, I.K. Dimov, J. Bradley, L. Pradhan, B. Mathieu, S.W. Evans, S. Chamberland, D. Shi, R. Yang, B.B. Kim, A. Ayon, A. Jalil, F. St-Pierre, M.J. Schnitzer, G. Bi, K. Toth, J. Ding, S. Dieudonné, and M.Z. Lin, “Ultrafast Two-Photon Imaging of a High-Gain Voltage Indicator in Awake Behaving Mice,” *Cell* 179(7), 1590-1608.e23 (2019).
- ⁶ C. Beck, and Y. Gong, “A high-speed, bright, red fluorescent voltage sensor to detect neural activity,” *Sci Rep* 9(1), (2019).

- ⁷ G. Buzsáki, “Large-scale recording of neuronal ensembles,” *Nat Neurosci* 7(5), 446–451 (2004).
- ⁸ S. Kim, M. Imayasu, T. Yoshida, and H. Tsutsui, “Formation of neuron-microelectrode junction mediated by a synapse organizer,” *Applied Physics Express* 16(5), (2023).
- ⁹ D.A. Henze, Z. Borhegyi, J. Csicsvari, A. Mamiya, K.D. Harris, O. Buzs, and G. Buzsáki, *Intracellular Features Predicted by Extracellular Recordings in the Hippocampus In Vivo* (2000).
- ¹⁰ T. Yoshida, T. Shiroshima, S.-J. Lee, M. Yasumura, T. Uemura, X. Chen, Y. Iwakura, and M. Mishina, “Interleukin-1 Receptor Accessory Protein Organizes Neuronal Synaptogenesis as a Cell Adhesion Molecule,” (2012).
- ¹¹ Y.E. Pan, D. Tibbe, F.L. Harms, C. Reißner, K. Becker, B. Dingmann, G. Mirzaa, A.A. Kattentidt-Mouravieva, M. Shoukier, S. Aggarwal, M. Missler, K. Kutsche, and H.J. Kreienkamp, “Missense mutations in CASK, coding for the calcium-/calmodulin-dependent serine protein kinase, interfere with neurexin binding and neurexin-induced oligomerization,” *J Neurochem* 157(4), 1331–1350 (2021).
- ¹² D.P. Quinn, A. Kolar, M. Wigerius, R.N. Gomm-Kolisko, H. Atwi, J.P. Fawcett, and S.R. Krueger, “Pan-neurexin perturbation results in compromised synapse stability and a reduction in readily releasable synaptic vesicle pool size,” *Sci Rep* 7(February), 1–13 (2017).
- ¹³ T.C. Südhof, “Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits,” *Cell* 171(4), 745–769 (2017).
- ¹⁴ O. Gokce, and T.C. Südhof, “Membrane-tethered monomeric neurexin LNS-domain triggers

synapse formation,” *Journal of Neuroscience* 33(36), 14617–14628 (2013).

¹⁵ T.C. Südhof, “Towards an Understanding of Synapse Formation,” *Neuron* 100(2), 276–293 (2018).

¹⁶ M. Sm. Ahasanul Hamid a, Imayasu, T. Yoshida, and H. Tsutsui, “Epitope-tag-mediated synaptogenic activity in an engineered neurexin-1 β lacking the binding interface with neuroligin-1,” *658* (2023) 141–147.

¹⁷ K. Tsuchida, H. Hirose, S. Ozawa, H. Ishida, T. Iwatani, and U. Matsumoto, “Monensin-Induced Increase in Intracellular Na⁺ Induces Changes in Na⁺ and Ca²⁺ Currents and Regulates Na⁺-K⁺ and Na⁺-Ca²⁺ Transport in Cardiomyocytes,” *Pharmacology* 106(1–2), 91–105 (2021).

第 4 章

シナプス誘導因子とグルタミン酸光学センサーを同時に固定化した微小電極の作成

Key points

- ・ 前章では、人工シナプスオーガナイザーの活性を利用して、プレシナプス様の構造を微小電極上に誘導することに成功した。しかし、この構造が生理学的にシナプス前駆体として機能するかどうかは不明である。
- ・ 本章では、グルタミン酸蛍光センサーと人工シナプスオーガナイザーを固定化した金微小電極を開発し、このシナプス前様構造の機能解析を目指した。

研究背景

4.1.1 微小電極上に誘導した神経細胞の機能性を検出するための光学センサーである

iGluSnFR

興奮性シナプスにおける代表的な神経伝達物質はグルタミン酸である。シナプス終末からのグルタミン酸放出を光学的に検出できるタンパク質が開発されている[5]。その一つが、iGluSnFR であり、センサードメインがグルタミン酸と結合することで、GFP の蛍光強度が上昇するといった変化するタンパク質である。この iGluSnFR は Marvin らが開発し、Fig4.2 のような結果を示した。左図は iGluSnFR の存在している環境下でグルタミン酸濃度によって蛍光強度が上昇している図である(Fig4.1)。右の図はグルタミン酸濃度の変化を横軸と蛍光強度の変化率を縦軸にした相関関係を示す図である。iGluSnFR は存在している環境下によって蛍光強度の変化率を示している。この iGluSnFR の実用例としては、長期増強(LTP)という海馬の記憶に深く関与しているといわれる現象を調べるために、使用されている[6]。さらには、アルツハイマー病のメカニズムの解明のために、アミロイドβタンパク質が蓄積された脳の機能性の有無を調べることに使用されている[7]。そのため、神経細胞の機能性の有無を調べるために、多用されているのが iGluSnFR である。近年では iGluSnFR を改良してよりグルタミン酸濃度の応答性を向上させた A184V iGluSnFR が開発されている[8]。私の研究では、この iGluSnFR を用いて微小電極上に誘導した神経細胞の機能性の有無を調べることにした。

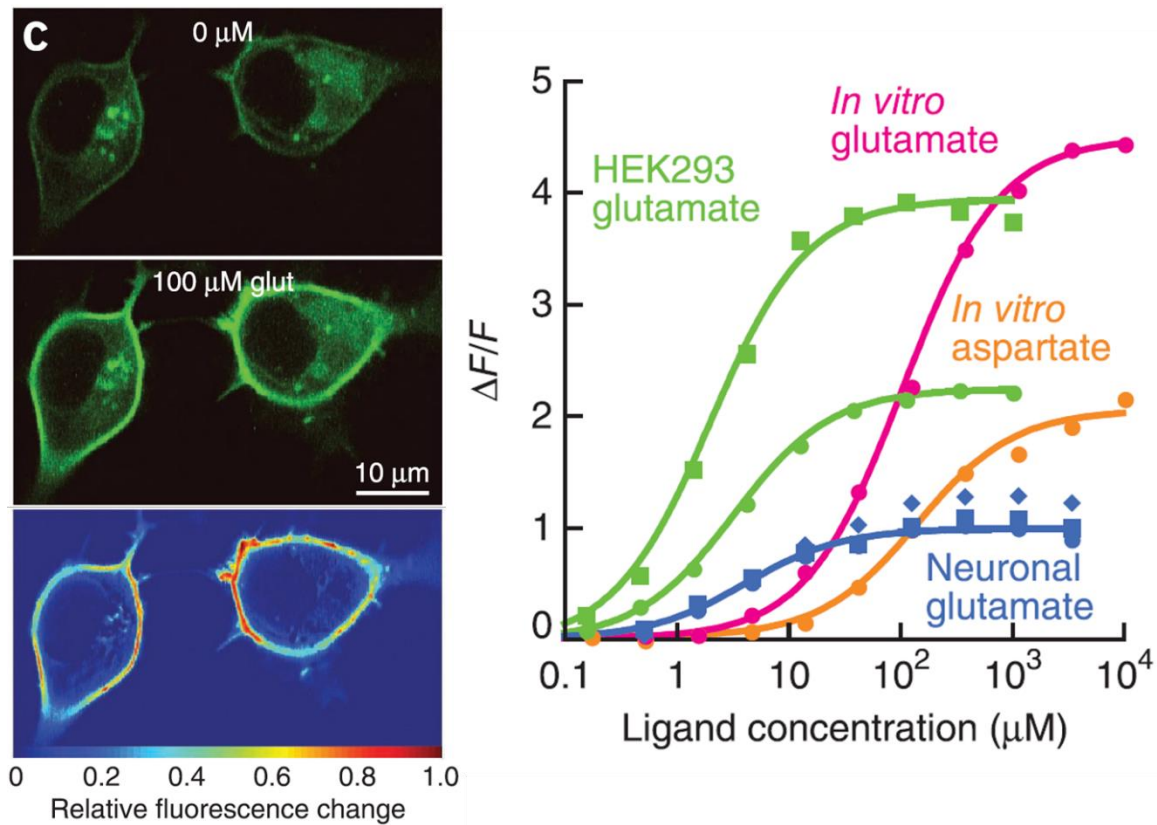


Fig4.1 iGluSnFR のグルタミン酸濃度の変化による蛍光強度の変化

左図 iGluSnFR を HEK 細胞に発現させ、グルタミン酸濃度を変化させたときの蛍光画像である。上が 0mM の時の蛍光画像、真ん中が 100mM の蛍光画像、下が上との蛍光画像が上昇したことを示す疑似的な蛍光画像である。右図 iGluSnFR の蛍光強度の変化とグルタミン酸濃度の関係性についてのグラフである。

参考文献 Jonathan S Marvin (2013) "An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission" nature methods pp1-9

4.1.2 特定の神経細胞を誘導させつつ誘導した神経細胞の機能性の有無を検出する微小電極の構築のモデル

誘導した神経細胞の機能性の有無を検出するために、神経細胞が放出したグルタミン酸を光学的に検出できる iGluSnFR と人工ニューレキシン内に存在している spot-tag と特異的に結合できる antispotNb の 2 つのたんぱく質を微小電極上に集積させることを目的としている。このモデル図を Fig4.2 に示す。本研究の構想は iGluSnFR と antispotNb を微小電極上に集積させるために、proteinA や、streptavidin を仲介させることで、微小電極上に集積するようにした。この微小電極を開発するにあたって必要な条件は 2 つある。

1. インキュベータ内の環境下でも 2 つのたんぱく質が微小電極上に集積した状態で、機能性を有していること
2. インキュベータ内の環境下で 2 つのたんぱく質が数日間、剥離しないこと

1 の条件はインキュベータの環境下では温度 37°C、湿度 100%、5%CO₂ で神経細胞を培養するため、インキュベータの環境下で 2 つのたんぱく質が剥離したり、失活したりすると、微小電極上に誘導した神経細胞の機能性を検出できないためである。そのため、インキュベータの環境下でも集積し続けられるような耐性が必要である。条件 2 は神経細胞を数日の間培養しなければならないため、2 つのタンパク質が微小電極上に集積している状態を数日間、たもたなければならない。そのため、これらの 2 つの条件を達成することができれば、神経細胞の機能性の有無を検出できるような微小電極が開発でき、微小電極上

に誘導した神経細胞の機能性の有無を調べることができる。本研究の目標として、トランスミッター放出という観点でこの接合の機能解析を行うためのグルタミン酸蛍光プローブを同時に固定化した微小電極の開発に関する3つの実験を行った。

1.微小電極上に iGluSnFR を付加させた際に神経細胞の機能性の有無を検出するのに十分であることの確認

2.proteinA を介した際の2つのたんぱく質を同時に集積したときに神経細胞の機能性を光学的に検出するたんぱく質と人工ニューレキシンと結合する抗体の機能の確認

3. streptavidin を介した際の2つのたんぱく質を同時に固定化したときに神経細胞の機能性を光学的に検出するたんぱく質と人工ニューレキシンと結合する抗体の機能の確認

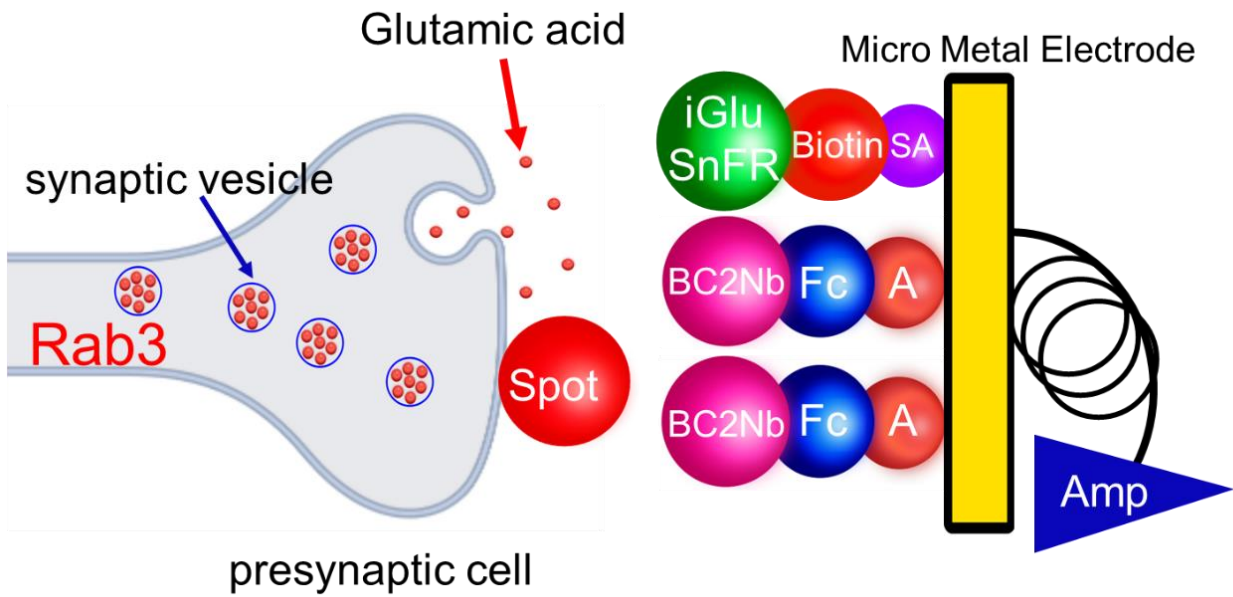


Fig4.2

構築する微小電極のモデル図。シナプス前部にはスポットタグを持つ人工ニューレキシンを発現させ、シナプス後部には微小電極を取り付けた。スポットタグに結合できる Nb と、ニューロンから放出されるグルタミン酸を検出できる iGluSnFR を微小電極に固定化した。微小電極上に誘導された神経細胞における iGluSnFR の反応性を検出することにより、神経細胞機能の有無を検出するシステムである。

4.2 方法

4.2.1 微小電極上に機能性を検出するたんぱく質の実用性の確認

本実験は、微小電極上の環境下において iGluSnFR の機能性が神経細胞の機能性の有無を検出するうえで十分な反応性を示す有無を確かめる目的で行う。微小電極上に集積している iGluSnFR の応答性を調べるために、iGluSnFR の周りのグルタミン酸濃度を変化させる。変化させた微小電極を波長 415nm の放射光で照射し、445nm の蛍光で観察する (Fig4.3)。本実験で使用した微小電極を SEM で観察した画像である。この微小電極上に iGluSnFR を集積させる。この項以降の実験でもこの微小電極と同様の大きさである微小電極を用いた。まず、iGluSnFR を微小電極上に集積させるには、proteinA を仲介する必要がある。proteinA は Fc-domain と特異的に結合するため、Fc-domain を内在させた iGluSnFR-Fc を作製した。iGluSnFR-Fc は HEK 細胞を培養し、ダルベッコ変法イーグル培地（高グルコース、043-30085、富士フイルム、東京、日本）に回収した。微小電極上に、パルス波の電圧をかけ、proteinA を固定化する。固定化後、iGluSnFR-Fc を含むダルベッコ変法イーグル培地(DEME)を添加し、proteinA と Fc-domain の抗体抗原反応によって結合させる。その後、グルタミン酸濃度を調節するために、PBS で充満させ、グルタミン酸を含む PBS を添加してグルタミン酸濃度を変化させ、蛍光強度とグルタミン酸濃度の関係性を調べる。

Experimental system for measuring the functionality of iGluSnFR immobilized on microelectrodes

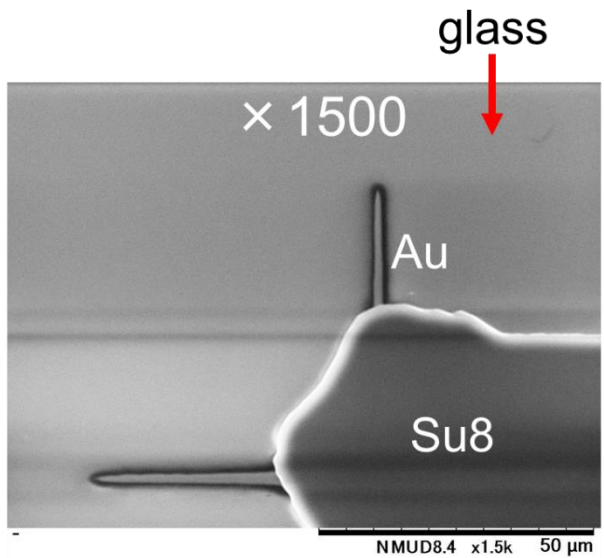
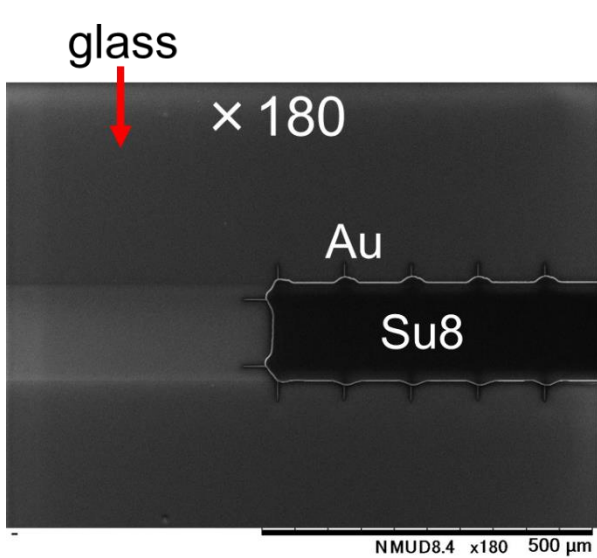
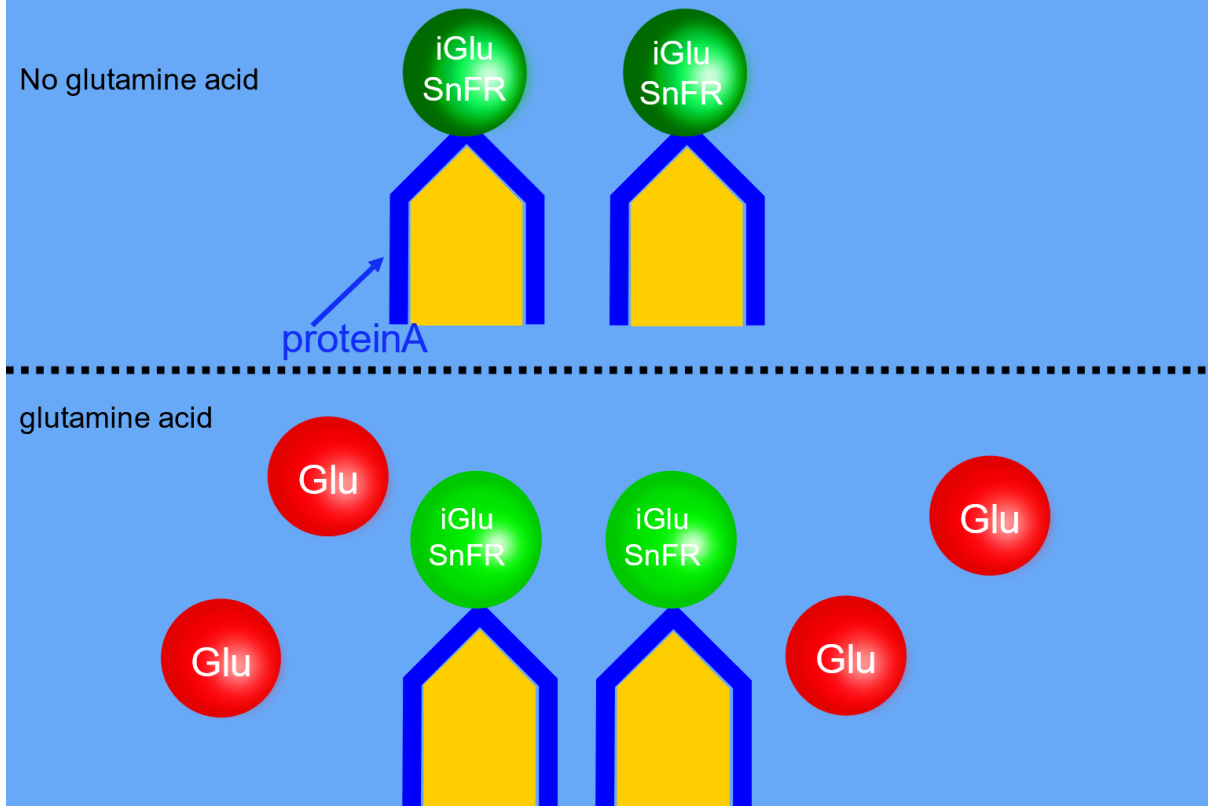


Fig4.3

(a) iGluSnFR の機能を確認するために微小電極上に集積させた実験図。上は iGluSnFR の周囲にグルタミン酸がないときの状態、下は iGluSnFR にグルタミン酸を加えたときの状態のモデル図。グルタミン酸がないときは iGluSnFR が反応を示さず、グルタミン酸があると iGluSnFR は反応する。

(b) この実験で使用した微小電極の電子顕微鏡（SEM）像。左は倍率 180 倍、右は倍率 1500 倍。

4.2.2 微小電極上に集積した proteinA を介した 2 種類のたんぱく質の機能性を確認

この実験では proteinA を仲介した場合の 2 つのたんぱく質を集積させることができるかの実験である。本実験では 2 つのたんぱく質が微小電極上に集積しても機能を有するかを確認するために、mCherry と iGluSnFR を集積させた。微小電極上に 2 つのたんぱく質を集積させるために、Fc-domain が導入している iGluSnFR と mCherry を作製した。この作製方法は、HEK 細胞を発現させ、発現したタンパク質を回収するためにダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)に放出させるようにした。まず、proteinA を微小電極上にパルス波の電圧を与え、固定化する。固定化後に、mCherry-Fc を含有している DMEM に添加して、proteinA と Fc-domain の抗体抗原反応によって結合させた(Fig4.4)。mCherry-Fc を低濃度の disuccinimidyl sube (DSS)を用いて部分的にクロスリンクをかけたのちに、iGluSnFR-Fc を含有したダルベッコ変法イーグル培地を添加して抗体抗原反応で結合させた。その後、蛍光をそれぞれで観察し、グルタミン酸濃度を 1mM に調整した状態で観察した。

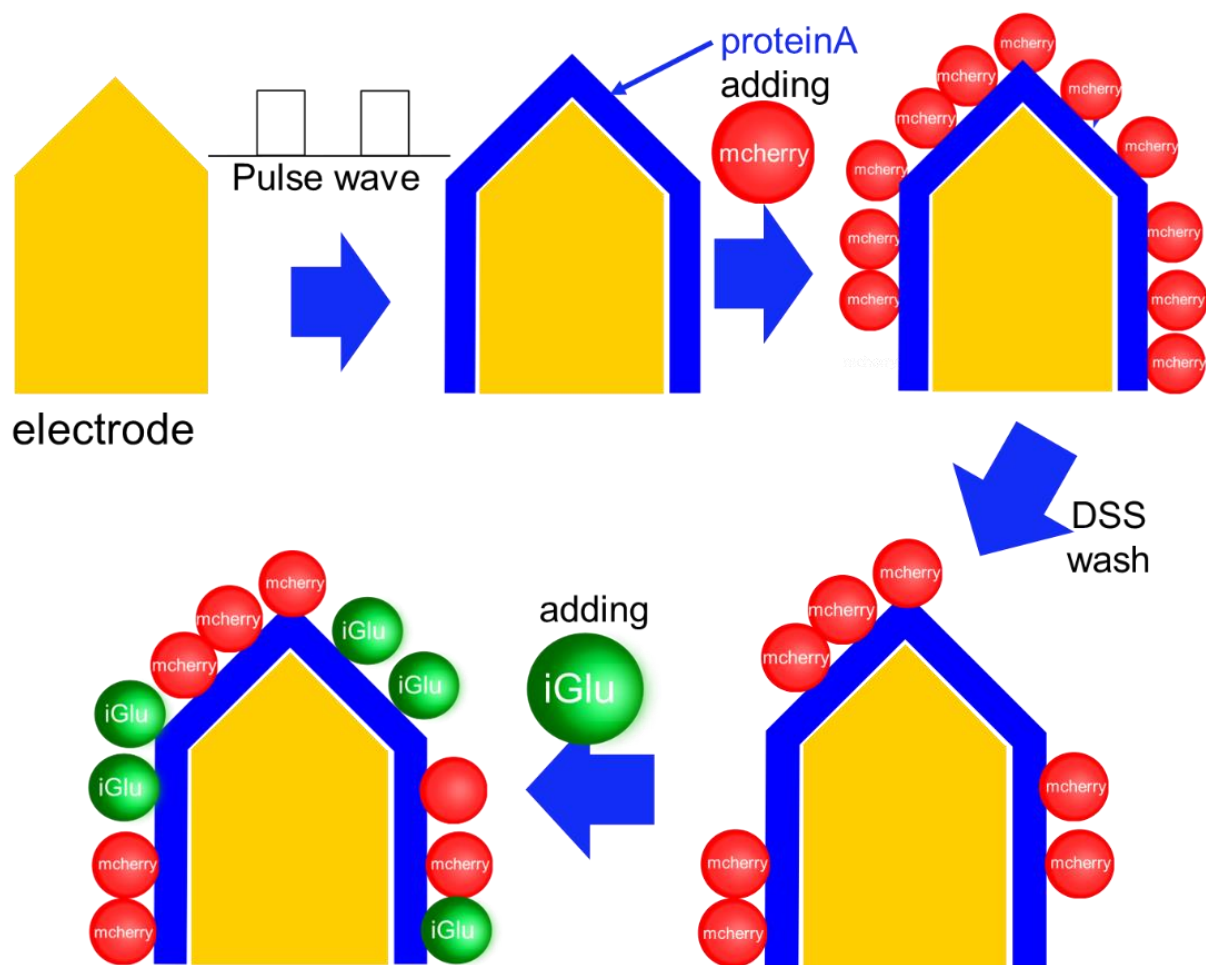


Fig4.4

パルス波の電気信号を用いてプロテイン A を固定化し、mcherry-Fc を蓄積させた。

mcherry-Fc を低濃度の disuccinimidyl sube (DSS)を用いて部分的にクリスリンクをかけ、その後、iGluSnFR を結合させた。次に、iGluSnFR と mCherry の両方の反応性の有無を確認した。

4.2.3 微小電極上に集積した streptavidin を介した 2 種類のたんぱく質の機能性を確認

本実験では proteinA よりも簡単にできる streptavidin(SA)を仲介させ、2つのタンパク質を集積させることを目的としている。特に、SA が proteinA よりも簡単にできるのは DSS()を用いて剥離させる作業が必要ないからである。まず SA も proteinA を微小電極上に固定化する方法と同様に、パルス波を与えて、微小電極上に固定化させる(Fig4.5)。SA はビオチンと特異的に結合できるため、iGluSnFR と mCherry を大腸菌に発現させ、菌を溶解して回収した。この iGluSnFR と mCherry を 1:1 の状態で添加し、SA とビオチンの抗体抗原反応によって結合させた。その後、蛍光顕微鏡で 2つの波長で観察し、グルタミン酸を 1mM に調整後にもう一度観察した。

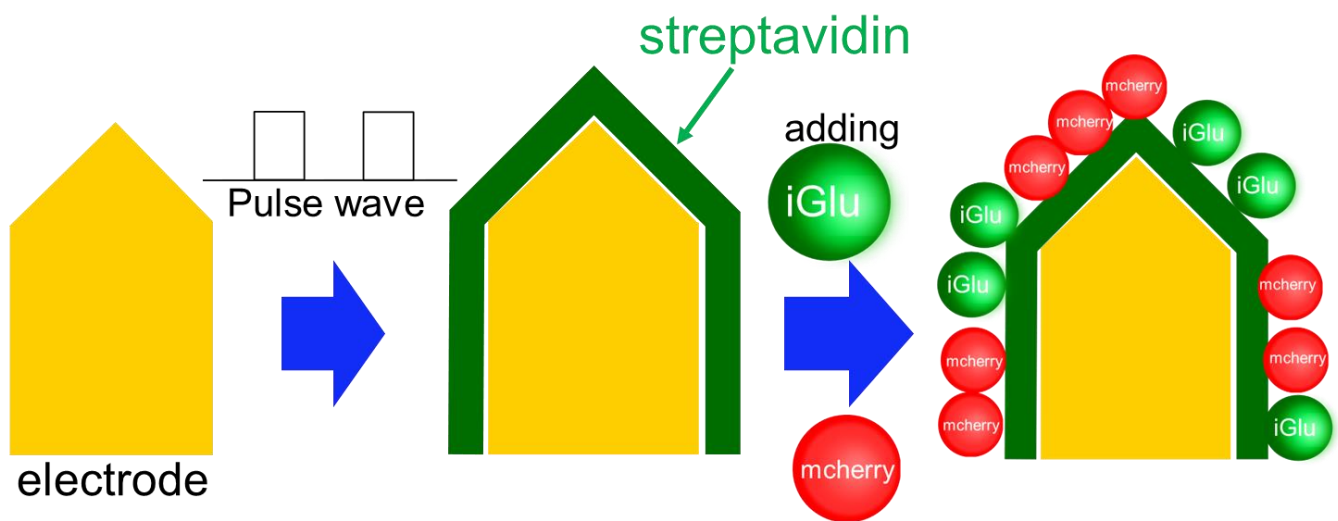


Fig4.5

パルス波の電気信号を微小電極に印加し、SA を固定化した。その後、この実験で

mCherry と iGluSnFR を同時に蓄積させ、mCherry と iGluSnFR の両方が微小電極上で機能

性の有無を調べた。

4.3 結果

4.3.1 微小電極上に集積した iGluSnFR が神経細胞の機能性の有無を検出するのに十分であることを確認する

iGluSnFR は神経細胞が放出したグルタミン酸を検出することができるため、神経細胞の機能性の有無を確認するのに適している。しかしながら、iGluSnFR が存在している環境によって反応性が異なることが知られているため、微小電極上に誘導した神経細胞の機能性を十分に検出できる反応性を示すことを明らかにする必要がある。本実験では微小電極上に誘導した iGluSnFR の反応性を調べることを目的としている。私は微小電極上にパルス波を与え固定化した proteinA と iGluSnFR-Fc を含有した DMEM を添加した。ここで、proteinA と iGluSnFR-Fc が結合することによって、微小電極上に誘導できる。そのため、微小電極上の周辺のグルタミン酸濃度を調整することで、iGluSnFR の反応性を調べられる。グルタミン酸濃度を変化させるために、グルタミン酸濃度を 1mM に調節した PBS をガラスリング状に添加して、グルタミン酸濃度を変化させた。本実験では、iGluSnFR A184V は通常の iGluSnFR よりも反応性が向上させた iGluSnFR であり、iGluSnFR GGSG, A184V iGluSnFR GGSG に通常の iGluSnFR, A184V iGluSnFR にグリシン、グリシン、セリン、グリシン (GGSG) リンカーを付与させ、柔軟性を増加させることで、iGluSnFR の反応性が向上することを期待した。グルタミン酸濃度を変化させ、1 μ M-10mM の 30 点において蛍光顕微鏡で emission415nm の光を射出し、iGluSnFR の蛍光を観察した。結果図を Fig.4.6 に示した。今回は蛍光強度が変化した点 3 例を示している。蛍

光強度の変化とグルタミン酸濃度の関係性を Fig.4.8 に示す。蛍光強度の変化で用いた計算式を以下に示す。

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{F_o - F_i}{F_i}$$

ΔF はグルタミン酸濃度を変化したときの蛍光強度の変化、 F グルタミン酸濃度 0mM の蛍光強度、 F_o はグルタミン酸濃度を変化させたときの蛍光強度、 F_i はグルタミン酸濃度 0mM の蛍光強度である。Fig.4.8 から 4 種類の iGluSnFR グルタミン酸濃度を変化させると S 字カーブのように上昇していき、約 100mM に到達すると蛍光強度の変化が上昇していないことが分かる。最も変化したのは iGluSnFRGGSG であることが分かり、GGSG のリンカーを付与することで、柔軟性が向上し iGluSnFR の反応性が上昇したと考えられる。しかしながら、0mM では蛍光強度が低いため、誘導している微小電極を探すことが困難である。今後の実験では、iGluSnFR と antispotNb の 2 つのたんぱく質を微小電極上に誘導するため、2 つのたんぱく質を誘導したことを確かめるのが困難になる可能性がある。本実験では 0mM で探しやすく、かつ蛍光強度の変化が最もある A184V iGluSnFR が最も適しているため、今後の実験ではすべて A184V を使用している。グルタミン酸濃度が約 10mM 付近になると蛍光強度が低下している。iGluSnFR は pH の変化で反応性が変化することも実験的に解明されている[5]。そのため、グルタミン酸を上昇させると pH が低下するため、pH が変化し iGluSnFR の反応性が低下したからだと考えられる。

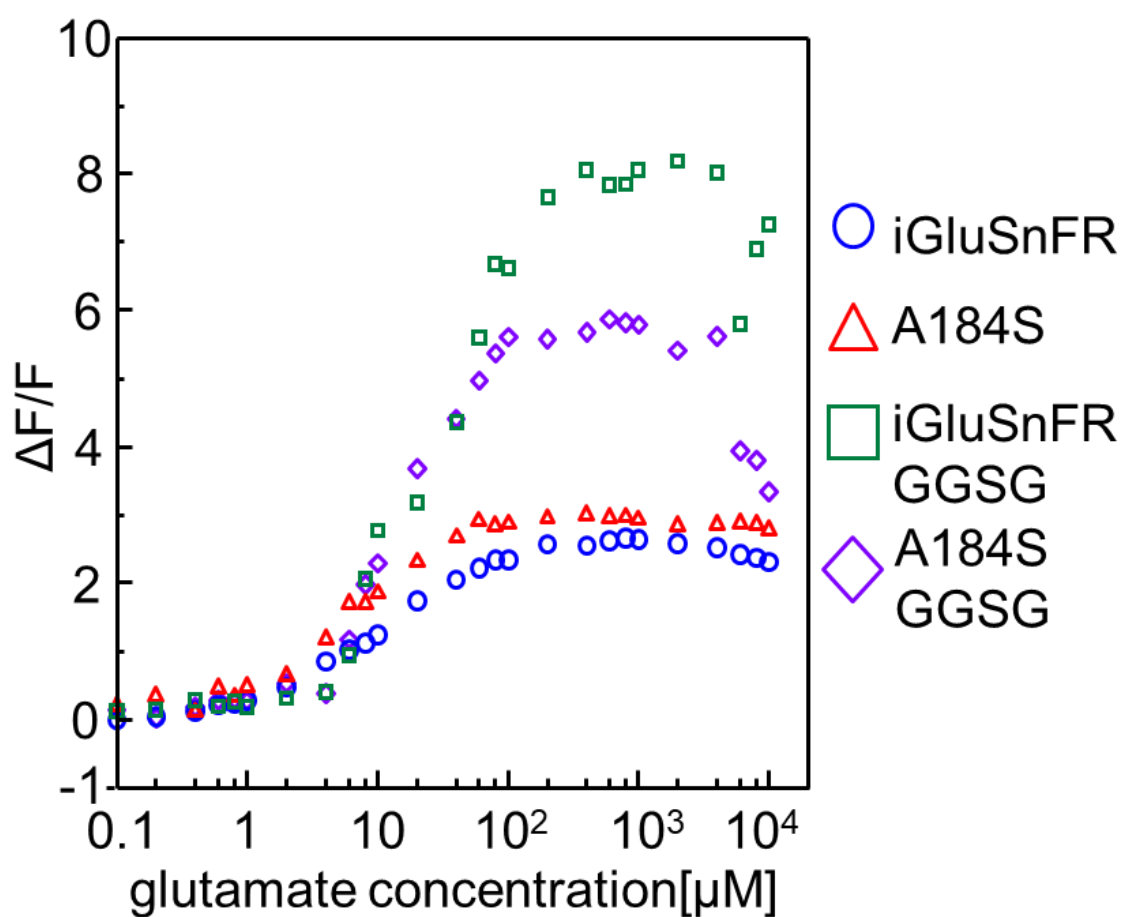
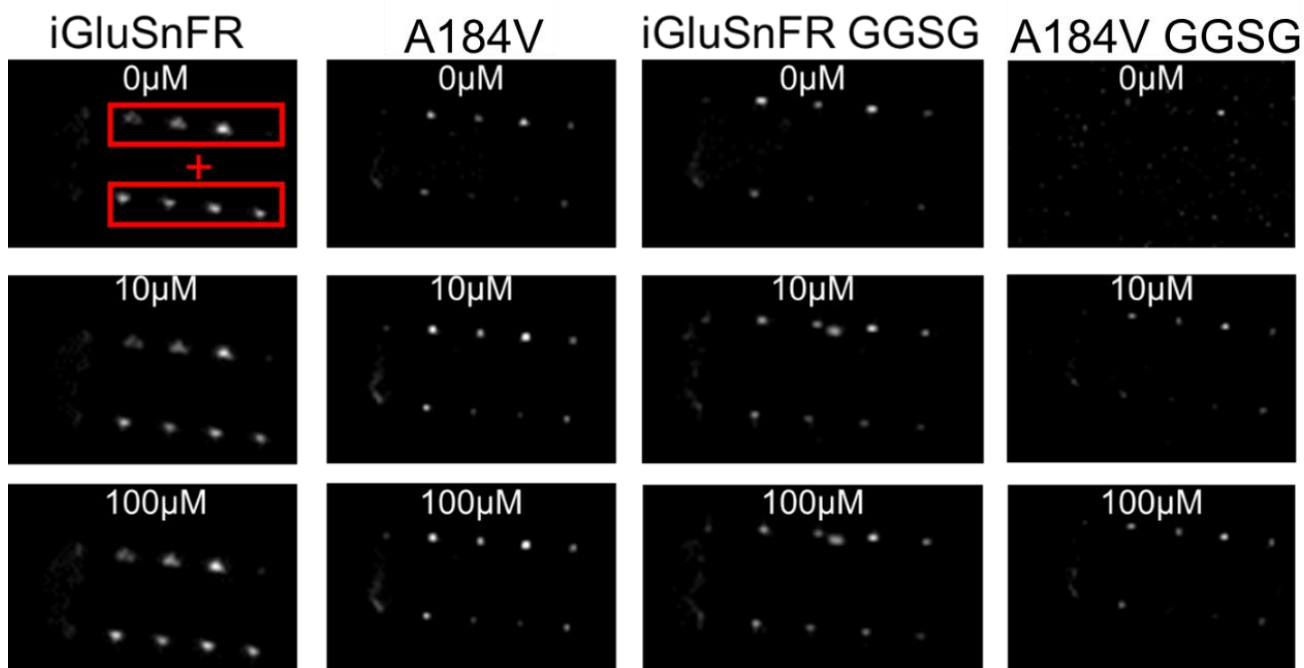


Fig4.6

(a)微小電極上に蓄積した iGluSnFR が、神経細胞から放出されるグルタミン酸濃度を検出する機能性を有していることを確認するために観察した。濃度を 0 μ M-100mM の範囲で調整したところ、濃度の変化に伴って蛍光強度が変化することを確認した。imageJ を用いて赤枠を解析した結果を(b)に示す。

(b) 赤枠の解析結果をグラフに示す。x 軸はグルタミン酸濃度、y 軸は蛍光強度である。グルタミン酸濃度が増加するにつれて蛍光強度も増加し、100 μ M で最大値に達することがわかった。

4.3.2 微小電極上に集積した proteinA を介した 2 種類のたんぱく質の機能性を確認

本実験では 2 種類のたんぱく質を同時に集積し、機能性の有無を確認することを目的としている。本実験においての 2 種類のたんぱく質は、神経細胞の機能性を光学的に検出できる iGluSnFR と人工ニューレキシンを発現した神経細胞の表面上に存在している spottag と結合できる antispotNb であり、これらを微小電極上に集積させる。この 2 つのたんぱく質は直に微小電極上に結合できないため、仲介するたんぱく質が必要である。また、antispotNb は蛍光しないため、微小電極上に集積していることを確認できない。そこで、私は antispotNb の代替品として mcherry を使用して微小電極上に集積したことを光学的に確認できるようにした。proteinA と結合できる Fc-domain を iGluSnFR と mcherry のそれぞれに付加させ、微小電極上にある proteinA と結合できるようにし、微小電極上に集積したたんぱく質を固定化する作業であるクロスリンクを行う。しかし、iGluSnFR を固定化すると機能性を失うことが私たちの実験からわかっている。そのため、iGluSnFR と mcherry を別々に微小電極上に集積させる必要がある。私は mcherry を先に固定化したのちに、iGluSnFR を集積させることにした。今回の実験ではパルス波 50ms duty ratio50%を与えて、微小電極上に proteinA を固定化したのちに、mCherry-Fc を含む DMEM を添加して proteinA と Fc-domain の抗体抗原反応によって結合した。微小電極上に mCherry の蛍光を確かめた結果を Fig.5.5(a)に示す。結果はすべての微小電極上で集積させることができた。微小電極上には mCherry のみがある状態であるため、iGluSnFR を結合できる proteinA の結合手がない。そのため、微小電極から mCherry を脱着させるために DSS を添加し

た。その結果を Fig.4.8 に示し、蛍光をかすかに確認することができるため、微小電極上に mCherry が集積していることを確認できた。その後、クロスリンクを行い mCherry と微小電極上に固定化を行った後に、A184V iGluSnFR-Fc を含む DMEM を添加した。抗体抗原反応で結合させるために、24h ほど放置した。その後、グルタミン酸を添加する前ではかすかに蛍光していることを確認することができた。そして、グルタミン酸を 1mM に調節したところ iGluSnFR の蛍光強度が上昇していることを確認した。そのため、proteinA を仲介することで、iGluSnFR と mCherry の 2 つのたんぱく質の機能性を有した状態で微小電極上に集積でき、proteinA を介した際の 2 つのたんぱく質を同時に集積したときに神経細胞の機能性を光学的に検出するたんぱく質と人工ニューレキシンと結合する抗体が機能性を有している。しかしながら、この系では、iGluSnFR が固定化されていないことと iGluSnFR と神経細胞のニューレキシンの結合能を有したたんぱく質の比率を変更することが困難である。特に、DSS の時間によって決まった量を調節することが困難であり、操作者の技術力が必要である。そこで、proteinA の代替となる streptavidin を用いて実験することにした。

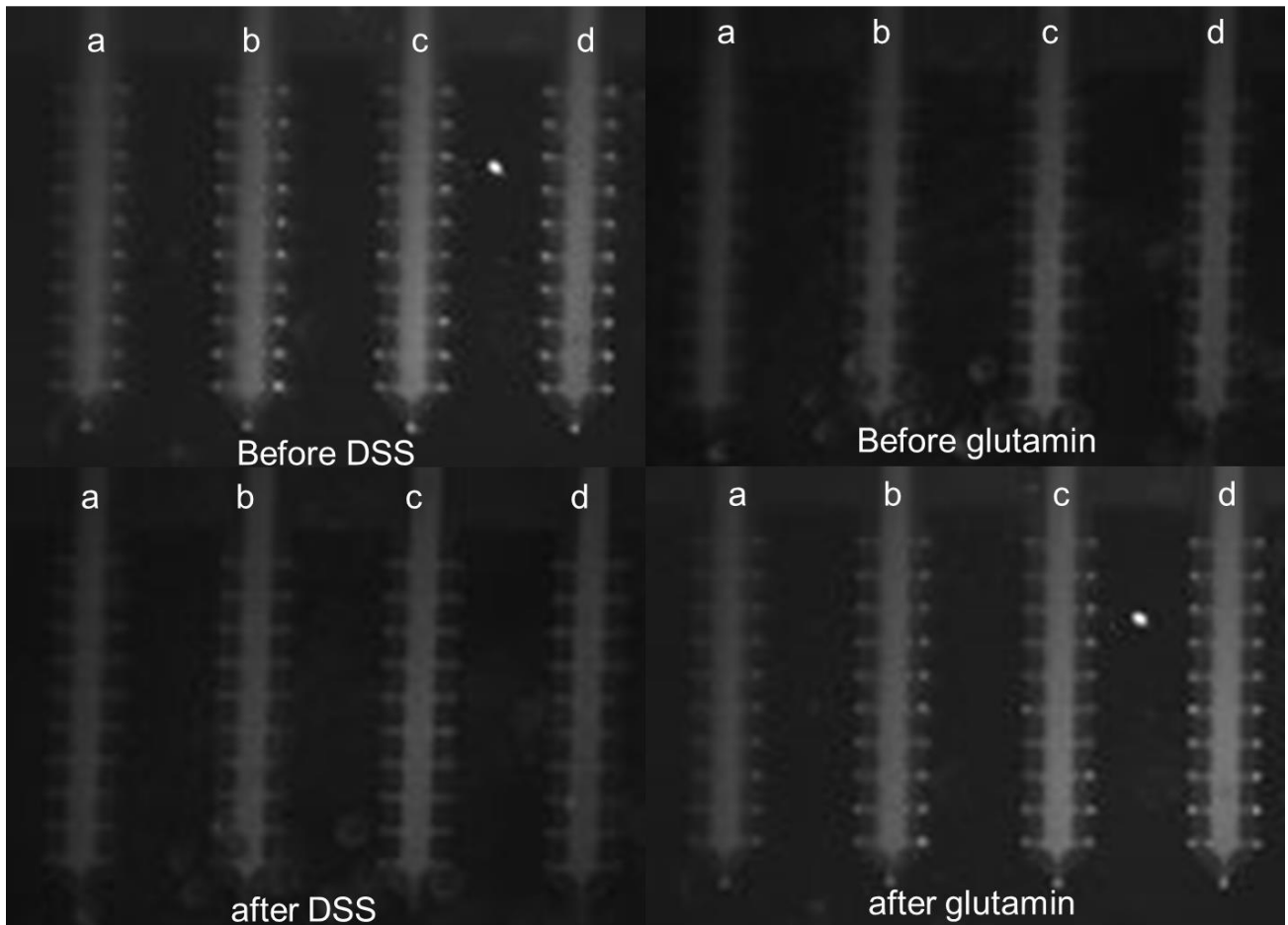


Fig4.7

左上の画像は、プロテイン A を固定化した微小電極上に mCherry-Fc を 50ms のパルス長、50% の duty ratio で結合させた結果である。左下の画像は iGluSnFR が微小電極上に集積した結果であり、disuccinimidyl sube (DSS) により少量の mCherry が除去されている。

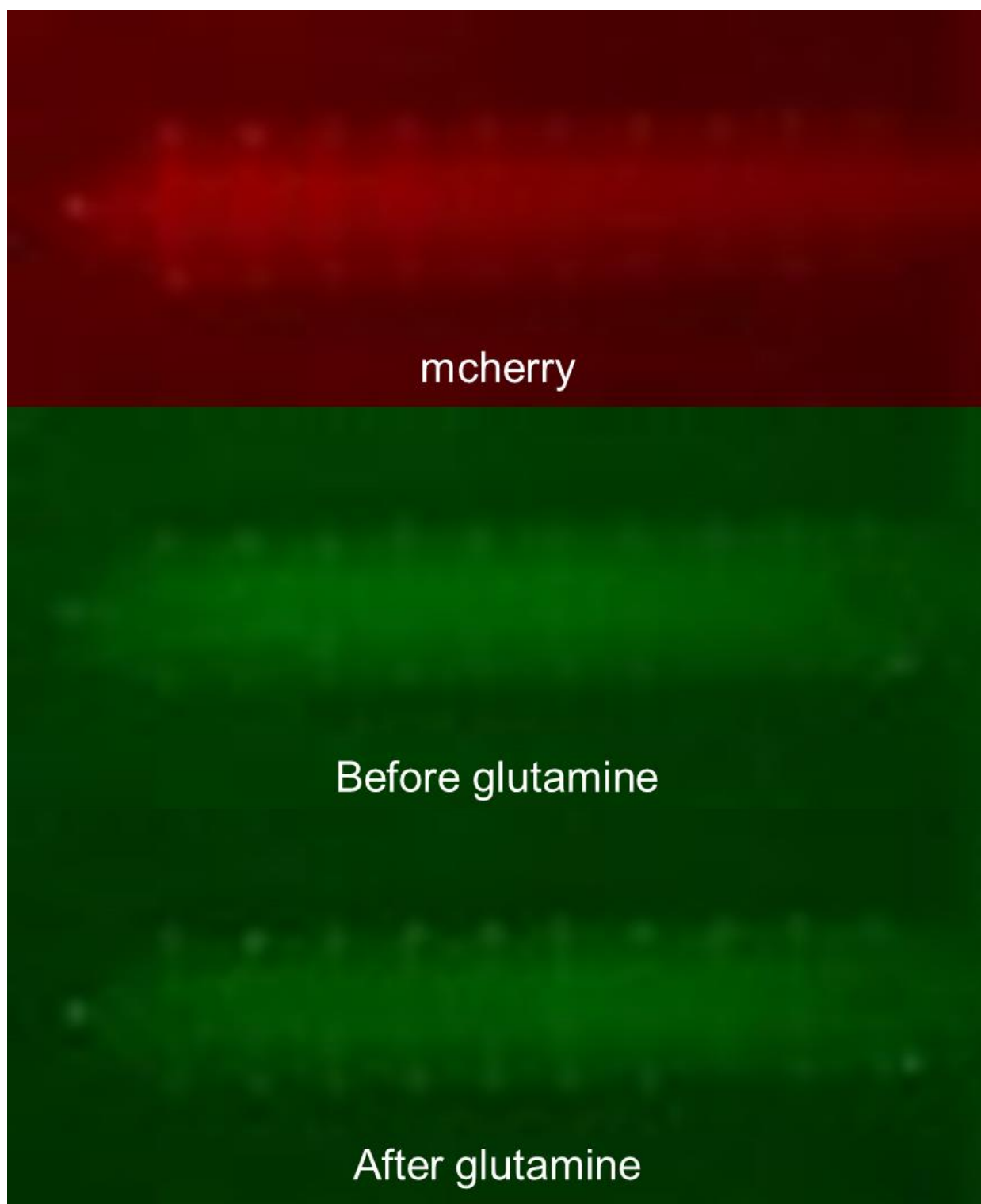
iGluSnFR は微小電極上に集積した状態で 2 つのタンパク質が iGluSnFR と反応できるようにグルタミン酸濃度を 1mM に調整した。グルタミン酸濃度調整後の画像。

3. 微小電極上に集積した streptavidin を介した 2 種類のたんぱく質の機能性を確認

proteinA を介して微小電極上に機能性を有した 2 つのたんぱく質を集積させることに成功した。しかしながら、proteinA を仲介したクロスリンクが必要であるため、機能性を有した iGluSnFR の固定化や iGluSnFR と antisportNb の比率の調整が困難である。そこで、私はクロスリンクで iGluSnFR を固定化する必要がない streptavidin(SA)を使用して微小電極上に機能性を有した 2 つのたんぱく質を集積させることにした。特に、2 つのたんぱく質を微小電極上に集積させる比率を変更することは簡易的にできる。SA はビタミンHであるビオチンと結合することができるが、ビオチンはビタミンであるため非常に小さい物質であることから、ビオチンと結合できるたんぱく質であるビオチンアクセプターペプチド (BAP)を付与させる必要がある。本実験では iGluSnFR と mCherry に BAP をそれぞれ付与して SA と結合を可能にした。この 2 つのたんぱく質の比率は、たんぱく質の比率を 1:1 で混合させることで調整できる。ここで、微小電極上に 2 つのたんぱく質を同時に集積させる方法について説明する。まず、微小電極上に SA を固定化するために、SA が混在している PBS を微小電極上で 50ms 50%のパルス波を与える。最後に、1:1 に調整した iGluSnFR と mCherry の混在液を添加して SA と iGluSNFR と mCherry を同時に結合させた。蛍光顕微鏡で観察した結果を Fig4.9 に示す。Fig4.9(a)は iGluSnFR と mCherry の混合液を添加してから 24h 後の結果である。Fig.4.9 上が mCherry の蛍光の結果であり、中央がグルタミン酸を添加前の iGluSnFR の蛍光であり、下段がグルタミン酸を添加後の iGluSNFR の結果である mCherry と iGluSnFR とともに蛍光を確認できたため、集積したことを示しており、機能

性も有していることを確認できた。本実験の目的は、誘導した神経細胞の機能性の有無を検出できる微小電極の開発であるため、神経細胞は4日間培養する必要がある。そのため、微小電極に2つのたんぱく質が固定化された後にも、数日間集積している状態が好ましい。そこで、インキュベータ内で3日間培養した結果を Fig 4.9(b)に示す。上が mCherry の蛍光の結果、中央がグルタミン酸を添加前の iGluSnFR の蛍光、下がグルタミン酸を添加後の iGluSnFR の結果である。mCherry や iGluSnFR の蛍光を確認できたため、機能性を有したたんぱく質を3日間微小電極上で集積できた。そのため、神経細胞を培養したとしても微小電極上から剥離することなく、2つのたんぱく質が微小電極上に集積している状態を示す結果になっている。

(a)



(b)

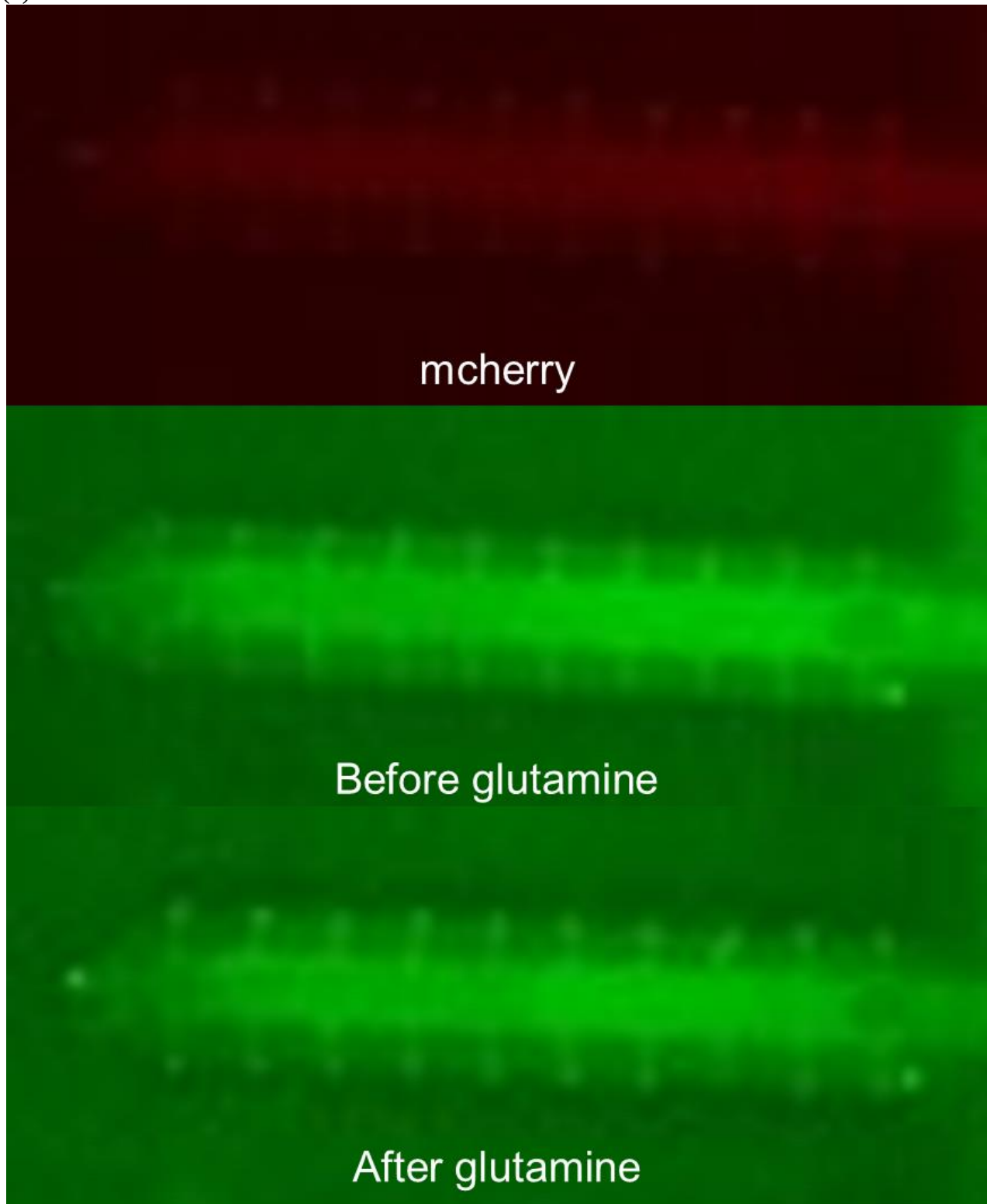


Fig4.8

- (a) ストレプトアビジン (SA) を、パルス幅 50ms、duty ratio50%のパルス波を供給することにより、微小電極上に固定化した。2つのタンパク質、mCherry と iGluSnFR が同時に固定化 SA 上に蓄積した。上は mCherry の赤色蛍光像。中央は iGluSnFR の蛍光像。下はグルタミン酸濃度を 1 mM に調整したときの iGluSnFR の蛍光像である。これらの画像は蓄積後 1 日目に撮影された。
- (b) 集積後 3 日目の蛍光画像。上段は mCherry の赤色蛍光像、中段は iGluSnFR の蛍光像である。下はグルタミン酸濃度 1mM に調整した蛍光像。

4.4 考察

微小電極上に誘導した神経細胞の機能性の有無を光学的に検出できる微小電極の開発を目的に実験を行った。まず、神経細胞の機能性の有無を検出するために、神経細胞が放出するグルタミン酸を検出する iGluSnFR を微小電極上においても機能性の有無を調べた。その結果は微小電極上に集積した iGluSnFR は 100 μ M 以上のグルタミン酸濃度でも機能を有している。そして、この iGluSnFR を用いて微小電極上に人工ニューレキシン内に存在している spot-tag と結合できる antispotNb と、誘導した神経細胞の機能性の有無を検出できる iGluSnFR を同時に集積させることにした。仲介させるたんぱく質を proteinA と streptavidin で 2 つのたんぱく質を集積させたところ 2 つのたんぱく質を誘導させることに成功した。さらには、streptavidin では、3 日間インキュベータ内に放置したとしても 2 つのたんぱく質が機能性を有したまま集積していた。そのため、誘導した神経細胞の機能性を光学的に検出することが可能であることを示している。誘導した神経細胞を脱分極させ、グルタミン酸を放出することができるかを調べた。そのため、グルタミン酸が放出されていれば、iGluSnFR の蛍光強度が上昇し、グルタミン酸が放出されていなければ、iGluSnFR の蛍光強度が変化しないことを示すと考えられる (Fig4.9)。

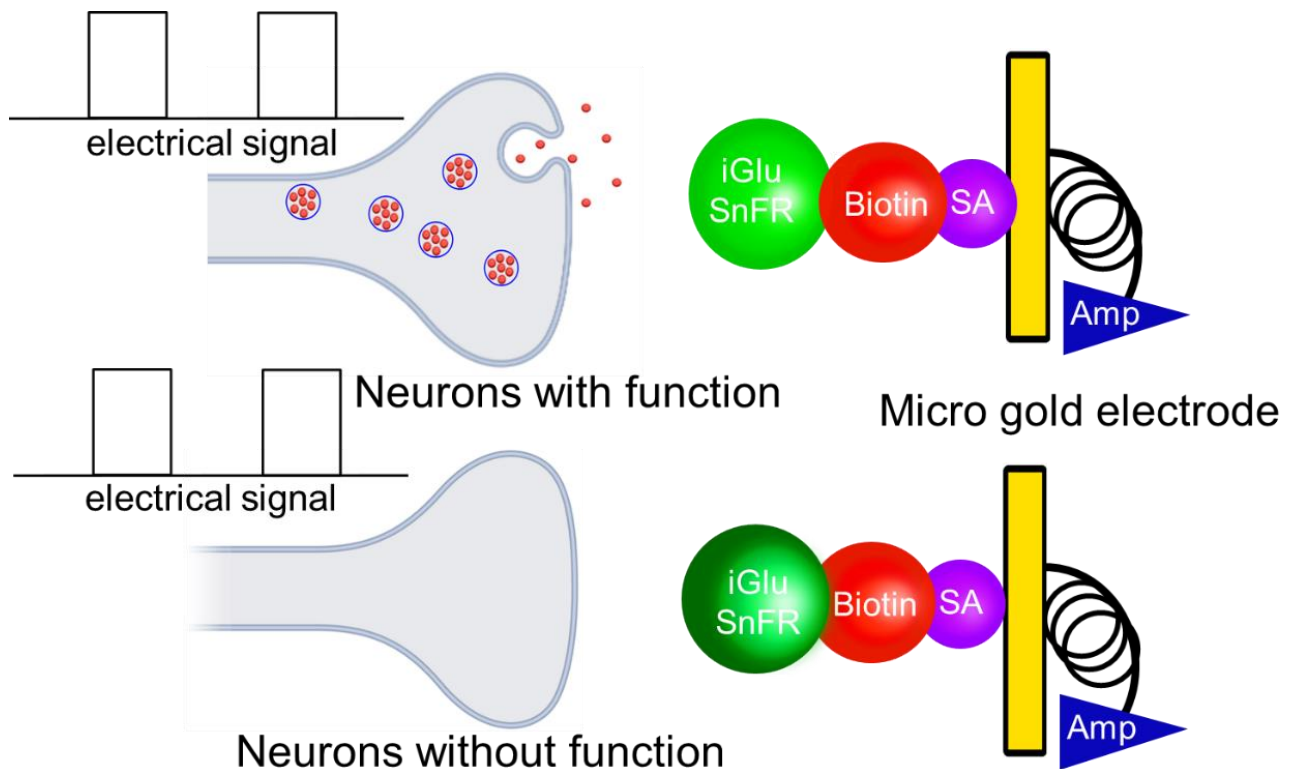


Fig4.9

誘導した神経細胞の機能性の有無を調べるための実験のモデル図。微小電極上に誘導している神経細胞の機能性を調べるために、脱分極させる必要がある。そこで、パッチクランプ法で脱分極した神経細胞の機能性の有無を検出する。機能性を有している神経細胞では iGluSnFR が反応し、蛍光強度が上昇すると期待される。機能性がない神経細胞では iGluSnFR の蛍光強度は変化しないことが考えられる。

4.5 まとめ

人工ニューレキシンを発現した神経細胞は微小電極上に誘導することに成功している。しかしながら、誘導した神経細胞の機能性の有無が明らかにされていない。人工ニューレキシンを発現した神経細胞の機能性の有無を調べるために、微小電極上に2つのタンパク質を集積させるため、本研究では微小電極上に誘導した神経細胞の機能性の有無を光学的に検出する微小電極の開発を目的に行ってきた。2つのたんぱく質を微小電極上に集積させ、機能性を有している状態で数日間、剥離しないことを確かめた。この条件を達成するために、私は3つの実験をおこなった。

1.微小電極上に iGluSnFR を付加させた際に神経細胞の機能性の有無を検出するのに十分であることを確認

2.proteinA を介した際の2つのたんぱく質を同時に集積したときに神経細胞の機能性を光学的に検出するたんぱく質と人工ニューレキシンの結合する抗体が機能性を持つことの確認

3. streptavidin を介した際の2つのたんぱく質を同時に固定化したときに神経細胞の機能性を光学的に検出するたんぱく質と人工ニューレキシンの結合する抗体が機能性を持つことの確認

1.の実験では iGluSnFR が微小電極上の環境下においても神経細胞の機能を検出するうえで十分な機能性を持っているかを確かめた。ここでは、グルタミン酸濃度が変化すると蛍

光強度が上昇しているといった相関関係が現れ、100mM で蛍光強度が十分に上昇していた。そのため、iGluSnFR は微小電極上においても神経細胞の機能の有無を検出するには十分な値であった。2 と 3 では微小電極上に 2 つのたんぱく質を集積させることを行った。2 と 3 の違いは仲介したたんぱく質を変更して、最も効率よく微小電極上を集積するかを調べた。結果は 2 と 3 で両方とも 2 つのたんぱく質を集積させ、インキュベータ上に放置しても 2 つのたんぱく質が機能性を有していることから目的の 1 つを達成することができた。そして、3 の streptavidin では 2 つのたんぱく質を微小電極上を集積させただけでなく、3 日間放置したとしても集積している状態を保つことができた。そのため、1, 2 の条件を達成することができたため、誘導した神経細胞の機能性の有無を光学的に検出する微小電極ができたことを示している。

4.6 参考資料

- ¹ Yasuo Mori, Haruhiko Odo (2018) "Neuroscience: How Much Can the Brain Now Say in the Language of Chemistry", Kyoto: Sinano Publishing Press
- ² G. Buzsáki, "Large-scale recording of neuronal ensembles," *Nat Neurosci* 7(5), 446–451 (2004).
- ³ S. Kim, M. Imayasu, T. Yoshida, and H. Tsutsui, "Formation of neuron-microelectrode junction mediated by a synapse organizer," *Applied Physics Express* 16(5), (2023).
- ⁴ M. Sm. Ahasanul Hamid a, Imayasu, T. Yoshida, and H. Tsutsui, "Epitope-tag-mediated synaptogenic activity in an engineered neurexin-1 β lacking the binding interface with neuroligin-1," (xxxx), 1–6 (2023).
- ⁵ J.S. Marvin, B.G. Borghuis, L. Tian, J. Cichon, M.T. Harnett, J. Akerboom, A. Gordus, S.L. Renninger, T.W. Chen, C.I. Bargmann, M.B. Orger, E.R. Schreiter, J.B. Demb, W.B. Gan, S.A. Hires, and L.L. Looger, "An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission," *Nat Methods* 10(2), 162–170 (2013).
- ⁶ Y. Xie, A.W. Chan, A. McGirr, S. Xue, D. Xiao, H. Zeng, and T.H. Murphy, "Resolution of high-frequency mesoscale intracortical maps using the genetically encoded glutamate sensor iGluSnFR," *Journal of Neuroscience* 36(4), 1261–1272 (2016).
- ⁷ Brymer, K. J., Hurley, E. P., Barron, J. C., Mukherjee, B., Barnes, J. R., Nafar, F., & Parsons, M. P. (2023). Asymmetric dysregulation of glutamate dynamics across the synaptic cleft in a mouse

model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 11(1), 1–20.

<https://doi.org/10.1186/s40478-023-01524-x>

⁸ J.S. Marvin, B. Scholl, D.E. Wilson, K. Podgorski, A. Kazemipour, J.A. Müller, S. Schoch, F.J.U. Quiroz, N. Rebola, H. Bao, J.P. Little, A.N. Tkachuk, E. Cai, A.W. Hantman, S.S.H. Wang, V.J. DePiero, B.G. Borghuis, E.R. Chapman, D. Dietrich, D.A. 'DiGregorio, D. Fitzpatrick, and L.L. Looger, "Stability, affinity, and chromatic variants of the glutamate sensor iGluSnFR," *Nat Methods* 15(11), 936–939 (2018).

第 5 章

まとめ

既存の電気生理学的計測法は、細胞種に対する選択性を持たないという原理的制約を持つ。本研究では、シナプスオーガナイザーと呼ばれる、近年明らかにされてきたシナプス形成や維持に関与する分子群に着目し、神経細胞と微小電極との間に特異的な接合構造を形成させ、細胞特異性を備えた電氣的計測法の基本原理に発展させることを目標とした。

まず、分子生物学的なアプローチによりシナプスオーガナイザーの分子設計に関する検討を行った（第2章）。Neurexin1 β を基に、コンパクトな人工シナプスオーガナイザーを設計し、それらがシナプス誘導活性を持つことをマイクロビーズアッセイにて示した。さらに、非シナプス蛋白質である PDGFR（赤血球成長因子受容体）の膜貫通ドメインを用いたコンストラクトもシナプス誘導活性を示すことを見出し、シナプス蛋白質非依存的なシナプス誘導の機序が存在する可能性を見出した。第3章では、第2章で設計した人工シナプスオーガナイザーを用いることで、金属微小電極と神経細胞との間に特異的な接合構造を実際に形成できることを実証した。このような原理で誘導された、シナプス様の神経細胞－微小電極接合の機能の詳細はまだ明らかではない。第4章では、トランスミッター放出という観点でこの接合の機能解析を行うためのグルタミン酸蛍光プローブを同時に固定化した微小電極の開発を行った。以上のように、本研究を通じて、人工シナプスオーガナイザーを介した神経細胞－微小電極接合の特異的形成の原理実証と、その特性の生理学的解析を行う基礎を構築した。

謝辞

今回の研究にあたり主指導教官の筒井秀和先生に感謝申し上げます。また、微細加工に必要な機器を貸して下さった平塚祐一先生、ナノマテリアルセンターの使い方や微細加工技術を教えて下さった筒井研究室の KIM SAMYOUNG、実験のご指導をして頂いた筒井研究室の今康様、その他の研究室メンバーに感謝します。また、本研究は JST SPRING（助成番号 JPMJSP2102）の助成を受けました。