

令和3（2021）年度 成果報告書

- 【1. 日本側拠点機関名】 同志社大学大学院脳科学研究科
- 【2. 日本側コーディネーター氏名】 坂場 武史
- 【3. 日本側協力機関名】 東京大学、国立研究開発法人理化学研究所
- 【4. 研究課題名】 光生物学を軸とした神経可塑性研究拠点の形成
- 【5. 研究分野】 神経科学（神経の動作原理を分子細胞レベルから明らかにする研究）
- 【6. 実施期間】
平成29（2017）年4月～令和4（2022）年3月（5年間）
- 【7. 全交流期間を通じた目標】

研究目標（学術的重要性、国際共同研究の必要性）： 脳は神経細胞という素子を組み合わせる複雑な情報処理を行っているが、1つ1つの細胞のレベルでも高度な計算が行われ（single-cell computation）、情報処理に寄与することが近年明らかになりつつある。これは神経細胞の中に多くの「シグナリング素子」が存在するためである。例えばシナプスには、神経伝達物質の放出を担う分子が集積し複合体を作っている active zone や、伝達物質受容体が集積する postsynaptic density などのシグナリング素子がある。このような素子が細胞内に整然と配置され、可塑的に機能を変化させることによって、適応的な single-cell computation が実現されている。しかし、素子の実態である分子複合体がどのように構成され変化するのかについては未解明のままである。一方、最近の超解像光学顕微鏡の登場によって、分子複合体の動態をつぶさに観察し、シグナリング素子の可塑性メカニズムに迫ることができる可能性が拓かれた。そこで本研究では、超解像光学顕微鏡を用いる日米欧の先端研究者が結集し、先端顕微鏡技術のノウハウを蓄積する国際拠点形成を提案した。電気生理学、生化学、遺伝学など相補的な技術を組み合わせながら、学習記憶などに関わる分子複合体レベルの可塑性、さらには病態時におこるであろう異常な可塑的变化を解析し、正常・病態における長期的・可塑的な機能変化の物質的基盤を明らかにすることを目標とする。

自立的で継続的な交流拠点の構築： 同志社大学大学院脳科学研究科は設立以来、細胞レベル、特にシナプス研究の神経科学に強みを持つ。これを発展させる一方で、超解像光学顕微鏡に強みを持つ国内外の研究室と協同する。拠点形成事業に加え、大学からの支援（特別研究員雇用）を合わせることで、研究上の必要性に基づいたボトムアップな交流を行う中で研究の国際的な優位性を持たせる。

若手研究者の育成： 同志社大学大学院脳科学研究科は神経科学に特化した博士一貫制大学院であり、基礎神経科学者と病態神経科学者の双方が集い、基礎病態融合研究を志向できる専門研究者養成を目的としている。同志社大学神経科学のリソースを基盤に、海外の研究者とのネットワークを十分に活用することで、国際的な視野を持った次世代研究者養成に繋げることを目標とする。

- 【8. 交流相手国との世界的水準の研究交流拠点の構築状況】

相手国拠点機関： ドイツ国 Neurocure（ベルリン自由大学、FMP、Volker Haucke）、フランス国パリ大学(Alain Marty) アメリカ国メリーランド大学(Thomas Blanpied)

研究成果： 本事業では、電気生理学、分子生物学に加え、最新の顕微鏡技術（超解像光学顕微鏡、全反射蛍光顕微鏡、二光子顕微鏡、電子顕微鏡など）を用いることで、神経シグナル素子の分子細胞メカニズムを解明することを目標とした。特にシナプス前終末内における直径 30-50

令和3 (2021) 年度 成果報告書

nm 程度のシナプス小胞のダイナミクス、伝達物質放出関連タンパク質の分布やそれらの秒単位から時間単位での可塑的变化を明らかにすることは、学習記憶の素過程であるシナプス可塑性メカニズム理解に必須であり、時空間分解能の高い最新イメージング技術の導入は今後に不可欠である。図1では5年間で構築された共同研究ネットワークを示している(計画当初のスキームをもとに作成)。以下、本事業の主要成果の概略を述べる。

電気生理学と超解像光学顕微鏡を組み合わせた研究では、坂場と Sigrist (ドイツ) の共同研究で、学習・記憶に重要であると考えられるげっ歯類海馬苔状線維シナプス可塑性に焦点をおいた研究を行った。まず、短期・長期シナプス可塑性を誘導する cAMP のシナプス前終末内の濃度上昇によって、シナプス前終末 Ca チャンネルが伝達物質放出部位付近で集積することを示した。これは、シナプス前終末とシナプス後細胞の同時記録による電気生理学、全反射蛍光顕微鏡による形質膜直下 Ca イメージング、超解像光学顕微鏡 (STED) による Ca チャンネル分布解析の組み合わせにより

明らかにしたものである (Fukaya et al., 2021, *PNAS*)。これまでのようなシナプス小胞ダイナミクスの変化による可塑性メカニズムとは異なる新たなメカニズムを見出した。これをさらに発展させ、シナプス前性可塑性の分子細胞メカニズムを、伝達物質放出関連タンパク質複合体の分布変化に注目する形で坂場—廣瀬 (東京大学医学系・協力研究者)—Sigrist の間で研究を進めた (論文準備中)。坂場—廣瀬—Sigrist は、シナプス前終末において伝達物質放出部位を構成するタンパク質機能に関して、KO マウスを用い、さらには電気生理学による機能解析と超解像光学顕微鏡によるタンパク質複合体可視化技術を組み合わせた研究を進めた。これは、同志社大学の大学院生が中心となって研究を進めたものである (論文準備中)。STED 顕微鏡による研究と平行して、国内側の研究で、50-100 nm の z 軸解像度を持つ全反射蛍光顕微鏡を用い、シナプス小胞ダイナミクスをライブイメージングすること、cAMP による小胞ダイナミクスの修飾を可視化することが可能になった (Midorikawa and Sakaba, 2017, *Neuron*; Miki et al., 2020, *PNAS*)。これらによって、nm レベルの解像度で機能分子やシナプス小胞の可塑性時の変化を明らかにする研究の方向性が確立できた。2022 年度から始まる次期研究拠点形成事業で可塑性メカニズムに関する解析をさらに進める予定である。

神経シグナルの分子細胞メカニズムでは、特にシナプス前終末におけるシナプス小胞エンドサイトーシスの分子メカニズムについて電気生理学、イメージング、分子生物学を組み合わせた研究がドイツ側との間で進展した。坂場—Haucke (ドイツ) の間で行われた研究では、エンドサイトーシスタンパク質 Intersectin が開口放出後の伝達物質放出タンパク質 SNARE の回収を制御することを見出した (Jaepel et al., 2020, *Cell Reports*)。エンドサイトーシスタンパク質 AP2 のクラスリン非依存性のエンドサイトーシスにおける役割を明らかにした研究が高森—Haucke の間で行われた (Lopez-Hernández et al., 2022, *eLife*)。遺伝学と電気生理学を組み合わせ、シナプス小胞グルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み速度を計測し、小胞グルタミン酸トランスポーターの種類による速度の違いを明らかにした研究が、高森—堀 (OIST、協力研究者)—Brose (ドイツ) との間で行われた (Nakakubo et al., 2020, *Cell Reports*)。

三木—Marty (フランス) の間では、電気生理学的な方法と数理モデリング、電子顕微鏡を組み合わせた、伝達物質放出機構を解明する研究が進展した。シナプス応答の統計的な性質を新たなノイズ解析と数理モデルを組み合わせで解析し、シナプス小胞が形質膜上の伝達物質放出部位へ

共同研究・交流構築状況

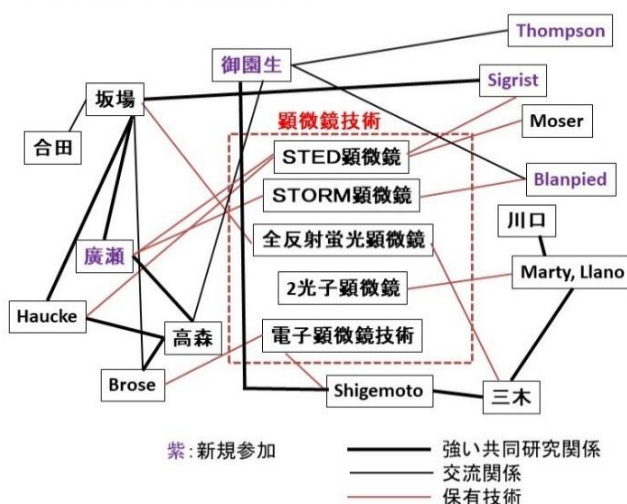


図1 5年間で構築された共同研究ネットワーク

令和3（2021）年度 成果報告書

10 ms 程度の時間経過で素早く動員されることを明らかにした（Miki et al., 2018, *Nat. Comm.*）。この研究は、後の Flash-and-Freeze 法を用いた電子顕微鏡解析による素早い小胞動員の発見に先駆けるものとして評価されている。また、三木—Marty は、シナプス前終末の小胞プールが複数あることを見出し、プール間的小胞遷移ダイナミクスを電気生理学的な方法から推定した（Tran et al., 2022, *PNAS*）。さらに、三木—Marty は、電子顕微鏡でシナプス前終末 Ca チャネルの分布を、オーストリア IST の重本（フランス側協力研究者）との間で解析した（Miki et al., 2017, *PNAS*）。

シナプスと同様に重要な神経シグナル素子である軸索機能に関しては、電気生理学、2光子イメージング、アンケーシング技術などを組み合わせて、IP3 受容体の軸索機能における役割を解析した研究、あるいは軸索上の GABA(A)受容体の存在を示すなど、軸索が単に活動電位を細胞体から軸索末端へと伝導するのではなく、情報修飾をおこす可能性を示唆した研究が、川口（協力研究者）—Marty（フランス）の間で公刊された（Gomez et al., 2020, *PNAS* ; Zorrilla de San Martin et al., 2017, *J. Physiol.*）。また、国内側の研究では、御園生が軸索の研究を発展させており、K チャネルの軸索への新たな輸送経路を明らかにするとともに（Jensen et al., 2017, *J. Neurosci.*）、病態との関連では、アルツハイマー病と関係あるタウタンパク質の軸索、樹状突起分布に関する知見を報告した（Kubo et al., 2019, *J. Neurosci.*）。

これ以外にも、国内側の研究では、直径 1 ミクロン程度の大きさのシナプス前終末からの直接パッチクランプ記録を行い、伝達物質放出ダイナミクスを膜容量測定法で直接計測する研究が行われた（Kawaguchi and Sakaba, 2017, *Cell Reports*）。また、合田らは、シナプス可塑性や強度調節機構に関する新たな知見を得た（Chipman et al., 2021, *eLife*; Tong et al., 2021, *Cell Reports*）。

交流状況（セミナー、シンポジウム）：毎年 1 回、事業参加研究者でシンポジウムを行っており（図 2）、2017 年（若手中心）、2018 年（主任研究者中心）は日本、2019 年はドイツで（主任研究者中心）と、3 年間連続して、50 人規模で開催した。一方で 2020 年度以降は、新型コロナウイルス感染症拡大によって対面での開催が困難になり、予定を変更してオンラインでシンポジウムを開催した。オンラインで実施すると参加人数は増えた一方（100 人程度）、突っ込んだ議論が若干難しいため、1 回非公式のセミナーを組み合わせることで、少人数（30 人）で議論する機会を作った。毎年開催しているシンポジウムは事業参加研究者以外の国内外の研究者にも公開した。



図 2 2018 年度国際シンポジウムの集合写真（同志社大学・今出川校地）

上記以外に、2017 年には日本神経科学会のシンポジウム（幕張）で成果を公表した。また、2020 年以降はオンラインによる非公式の会合をドイツ側、フランス側と年数回のペースで実施し、海外渡航制限による共同研究への障害を克服した。

成果の社会的還元：研究成果は論文として公表するだけでなく、以下の取り組みを実施した。
①高校生や大学生に研究成果をわかりやすく解説する「脳科学夏の学校」を同志社大学大学院脳科学研究科で始めた（本事業の枠組みだが経費外）。②学部生に研究室体験をさせるリサーチインターン制度を研究科で実施した（経費外）。

本事業により日本側研究機関が得た国際的強み：同志社大学大学院脳科学研究科は、研究科開設当初の 2012 年度から研究拠点形成事業を実施し、今後 2026 年度まで継続する予定である。ドイツ・ゲッチンゲン・マックスプランク研究所、ベルリン・Neurocure（ベルリン自由大学、ライプニッツ研究所）、フランス・パリ大学など国際的に知られている研究機関との共同研究が定着し、交流が活発になったことは、当研究科の研究が先端的であり、国際共同研究に十分な水

令和3（2021）年度 成果報告書

準であることを示唆している。また、国際交流が、シナプス研究における新たなコンセプトの開拓にプラスになっており、本拠点形成事業においても、Neuron 誌、Nature Communications 誌、PNAS 誌、Cell Reports 誌などに多くの優れた論文が公刊されたことで明らかである。また、同志社大学から、修了生、研究スタッフがパリ大学、ベルリン Neurocure、オーストリア IST に留学しており、内1名は同志社大学に戻って研究スタッフとして活躍している。このような海外との人的循環が円滑に進んでいることも本拠点の大きな強みとなった。

相手国拠点機関や国内外協力機関との協力・役割分担の体制：本事業では研究者同士のボトムアップかつ自由な共同研究を主軸としている。国内側は同志社大学大学院脳科学研究科（坂場、高森、御園生研究室など）が中心となり、同志社大学生命医科学部などの協力を得た。学外では、東京大学大学院医学系研究科・廣瀬研究室、理化学研究所脳神経科学研究センター・合田研究室などの協力を得た。ドイツ側はベルリンの神経科学研究機関である Neurocure（Haucke、Sigrist 研究室など）が中心となり、ゲッチンゲン大学 GGNB（Brose、Moser、Neher ほか）、ライプチヒ大学の研究者が協力した。フランス側はパリ大学（Marty 研究室）が中心となり、アメリカ側はメリーランド大学（Blanpied ほか）が中心となり、OHSU の研究者が協力研究者（von Gersdorff ほか）となった。

ドイツ側は遺伝子改変動物の供給（Haucke、Brose、Sigrist）、超解像光学顕微鏡技術（STED 顕微鏡、Sigrist）など同志社大学にないアプローチに強みがあり、坂場（電気生理学）—Haucke、Sigrist、高森（生化学）—Brose、Haucke 間で共同研究が進展した。フランス側（Marty）は電気生理学と数理モデリングに強みがある。同志社大学（坂場、三木）、ドイツ側の Neher、Hallermann はフランス側と異なる角度からシナプス伝達モデルを構築している。高橋（日本側協力研究者）と合わせると、国際レベルでシナプス前終末生理学の主要な研究者を網羅している。それぞれの考え方の違いを議論しつつ、シンポジウムなどを活用して、新たなコンセプトを作ることを目指した。アメリカ側とは、超解像光学顕微鏡（Blanpied）や電気生理学（von Gersdorff）での交流を実施した。国内でも共同研究・交流体制を5年間で構築している。東京大学・廣瀬研究室は国際的にも非常に優れた超解像顕微鏡技術を有しており、同志社大学研究室（坂場、高森）の若手研究者との間で活発な共同研究を行っており、今後も継続予定である。理化学研究所・合田研究室とは、シナプス可塑性に関してシンポジウムなどで議論している。人的交流としても、同志社大学・大学院修了生が2022年4月からポスドクとして合田研究室で研究に従事する。以上のように、5年間を通して国内外で多角的な共同研究の実施、交流ネットワーク形成を実現した。

【9. 次世代の中核を担う若手研究者の育成】

若手研究者に関する育成プログラム：若手研究者（大学院生・ポスドク）の国際共同研究を推進し、その結果、若手中心の論文が公刊されるとともに、海外側研究室に留学した。ポスドク1名と大学院生1名は Sigrist 研究室（ドイツ Neurocure、ベルリン自由大学）、Jonas 研究室（オーストリア IST）にそれぞれ留学した。大学院生1名が国内側協力研究室（合田研究室）にポスドクとして移籍した。前回拠点形成事業中に Marty 研究室（フランス側）にポスドク留学していた三木が同志社大学・坂場研究室に研究スタッフとして帰国した。ドイツ側からも大学院生1名が2017年に同志社大学・坂場研究室に長期滞在し、共同研究を追加で実施した。

毎年1回開かれるシンポジウムには大学院生、ポスドクが必ず参加するようにしている。対面の場合は若手中心のシンポジウムの開催、ポスター発表などを取り入れ、若手が発表の機会を得るようにした。残念ながら2020年以降は COVID-19 によって対面の交流は叶わなかったが、若手研究者が参加する非公式のドイツ、フランスとの会合を実施した。

また、同志社大学独自のプログラムとして、本事業に参加・支援する特別研究員を1名採用しており、2018年4月から2021年9月まで在籍した。PNAS 誌に論文を公刊するとともに、ドイツ側に2021年10月より留学した。

若手研究者による交流相手国との研究ネットワーク構築：若手研究者は独自に交流相手国とのネットワークを構築した。前回拠点形成事業に引き続き、川口（協力研究者）は同志社大学から京都大学に異動後も、フランス側との共同研究を継続し、Trigo と日本学術振興会・二国間交流事

令和3（2021）年度 成果報告書

業を実施するとともに、Frontiers in Cellular Neuroscience 誌に軸索機能に関する総説の特集を企画した（2019年）。三木は帰国後もフランス側との共同研究を継続し、Marty、Tran と複数の論文を公刊した。また、坂場と Sigrist（ドイツ側）の間では科学研究費補助事業・国際共同研究強化Bに採択されており、若手研究者の三木、坂本が共同研究に従事している。Sigrist 研究室には同志社大学特別研究員が共同研究の結果、2021年9月から留学するに至っている。当該分野（シナプスなどの細胞神経科学）の発展のためには、次期の研究拠点形成事業では、若手研究者が研究主体となるだけでなく、事業運営の主体になっていく必要があると考える。

【10. 中間評価指摘事項への対応】

中間評価では、既にシナプス前末端研究の国際拠点のひとつになりつつあり、現行の努力を継続することで想定以上の成果が期待できると評価された。一方で、①超解像光学顕微鏡の利用、②大学院生の研究発表の促進、③独自の研究による対等な国際共同研究の構築の必要性を指摘された。また、④参加研究者の中で、今回日本側で新規に参加したものの具体的な役割が示されていない研究者の積極的参画が望まれた。

①に関しては、超解像光学顕微鏡を用いたシナプス可塑性の研究成果が論文公刊されており（Fukaya et al., 2021, *PNAS*）、続いて複数の論文を投稿するところである。シナプス可塑性に伴う形態的変化、分子分布の変化を捉えるのに強力な手法であることが再確認されたところで、今後も効果的な活用を進める。また、電子顕微鏡や二光子顕微鏡など、狭義の超解像光学顕微鏡以外での顕微鏡利用も進んでいる。②に関しては、eLife 誌や Cell Reports 誌などに学生主体の共同研究論文が公刊されており（Lopez-Hernández et al., 2022, *eLife*; Nakakubo et al., 2020, *Cell Reports*）、日本側の研究でも PNAS 誌などに論文が公刊されるなど（Tabuchi et al., 2022, *PNAS*; Miyano et al., 2019, *J. Physiol.*）、大学院生が主著者になって水準の高い論文が公刊された。③に関しては、苔状線維のシナプス可塑性研究（Fukaya et al., 2021, *PNAS*）や小胞グルタミン酸トランスポーターの役割（Nakakubo et al., 2020, *Cell Reports*）など、日本側が主導した国際共同研究の成果が事業後半で公刊された。また、④参加研究者の中で、日本側で新規に参加したものの具体的な役割が示されていない研究者の積極的参画が望まれる点については、御園生が Shigemoto との国際共同研究を推進するとともに、国内で宮坂らとの共同研究を推進し、疾患にかかる基礎研究に関して成果を上げ、基礎研究と応用を架橋する役割を担った（Kubo et al., 2019, *J. Neurosci.*）。また、超解像顕微鏡技術を持つ廣瀬研と坂場研、高森研との共同研究を推進した。さらに、前述②のように新規に参加した大学院生が研究成果を上げた。なお、海外側でも、Sigrist 研究室のような新規参加研究グループと日本側での超解像顕微鏡を用いた共同研究が進展した（Fukaya et al., 2021, *PNAS*；図1参照）。次期の研究拠点形成事業（2022年度～）では、Sigrist がドイツ側のコーディネーターであり、さらなる共同研究の進展が期待できる。

【11. その他の成果・今後の課題・展望等】

2022年度から日本学術振興会・研究拠点形成事業 A. 先端拠点型として、“階層融合型の神経シグナル研究拠点の形成”が採択された（2012年度から通算3期目）。次期の事業では、今回の事業を総括したうえで、成果が上がっていたシナプス可塑性のメカニズムの研究を中心課題に絞り込むこと、また、生体における可塑性の役割の解明を目指すことにしている。また、国内側、海外側参加研究者も絞り込んだ形で、全体として研究の焦点を絞る形とした。日本学術振興会をはじめ、研究への持続的なサポートに深く感謝する。