

—特集 [生命の階層を可視化・操作する最先端技術：神経科学が切り拓くバイオイメージングと疾患研究の新展開 (4)]—



複雑な行動中にリアルタイムでシナプス動態の計測を行うための技術開発とその応用

長濱健一郎^{1,2}

¹ 蔚山科学技術院健康科学技術大学院大学・生体医工学部

² ジョーンズ・ホプキンス大学医学校神経科学部

1. はじめに

筆者は、日本医科大学に医学生として在籍していた2009年頃から、一貫してシナプス機能・神経細胞と行動の関係に興味を持ち、その生理学的なメカニズムを理解するべく研究を進めている。2年間の初期研修後に東京大学大学院で、統合失調症モデル動物で観察される行動学的異常とその根底にあるシナプス生理学をテーマにして学位を取得した¹。その後、前所属であるジョーンズ・ホプキンス大学でのポストドクトレーニング中に、神経科学における分子ツール開発とその応用に着手し、神経活動とシナプス機能に着目した分子ツールの開発に携わった^{2,3}。本稿では、特に後者の「シナプスの動的変化を可視化する」ツールにフォーカスし、行動中の動物脳内でのシナプス動態を観察する意義を示唆する最新の知見を含めて、筆者が行ってきた仕事の紹介をできればと思う。また、2026年から筆者が韓国の蔚山科学技術院 (Ulsan National Institute of Science and Technology : UNIST) で開く自身のラボの方向性についても触れたいと考えている。

2. シナプス可塑性—学習・行動の神経基盤

シナプスは、脳内の神経細胞間で構築される微細な構造物として知られている。構成要素としては、大きく分けて神経伝達物質を放出するシナプス前部 (プレシナプス) とその受け手である各種受容体が発現しているシナプス後部 (ポストシナプス) の2つに分けられる (図1)。古典的には、海馬のシナプスの電気生理学的解析および分子生物学的手法を通して、高次機能の神経基盤におけるシナプスの重要性が示されてきた^{4,5}。特に、シナプスがその伝達効率や構造学的な変化に対して「可塑性」を持ち、その「シナプス可塑性」が学習および記憶の神経基盤の一端を担っていることが明らかにされてきた。具体的には、実験的に、特定の刺激頻度でシナプスが刺激された場合に、シナプス

の伝達効率が亢進または低下し、その亢進・低下状態が一定時間 (数時間程度) 維持される (長期増強 : long-term potentiation (LTP) および長期抑制 : long-term depression (LTD)) ことが知られている (図1)⁵⁻⁸。シナプス機能と記憶・学習との関係性については、1990年代から2000年代に行われてきた様々な遺伝子改変動物の解析でも報告されている⁹⁻¹¹。これらの報告では、シナプス可塑性に関与する分子群の遺伝子欠損 (ノックアウト) 動物を対象に、シナプス機能から組織形態学的変化および行動学的異常までを網羅的に解析していく方針に則って行われている。その結果、複数の報告で、空間・恐怖記憶、運動学習機能などの様々な行動学的異常とともに、LTP減弱などのシナプス可塑性に関わる異常が示され、記憶・学習機能へのシナプス可塑性の寄与が示唆されている^{9,10,12,13}。

シナプス機能・可塑性の分子基盤としては、現在までに、ポストシナプスおよびプレシナプスに発現する様々な分子 (シナプスオーガナイザー) が⁸、シナプス伝達およびその可塑性に関与していることが解明されてきた。そして、伝達効率に基づき、プレシナプスとポストシナプスに局在する多種多様なシナプスオーガナイザー同士が相互に働くことで、シナプスの形成および消退が生じる。代表的なものとしては、2013年にノーベル賞を受賞した Thomas C. Südhof のグループが初めて同定した neuroligin1 やそのプレシナプス側の結合パートナーである neurexin が存在する¹⁴。それらの遺伝子欠損マウスの解析では、neuroligin1 ノックアウトマウスが空間記憶や恐怖記憶の障害とシナプスの長期増強減弱がみられる¹⁵。また、neurexin α ノックアウトマウスでは、海馬での興奮性シナプス伝達の減弱や統合失調症患者でもみられる症状と同じ行動学的表現型 (プレパルスインヒビションの減弱) を示す^{15,16}。さらに、これらのシナプスオーガナイザーをコードする遺伝子変異が統合失調症¹⁷ や自閉スペクト

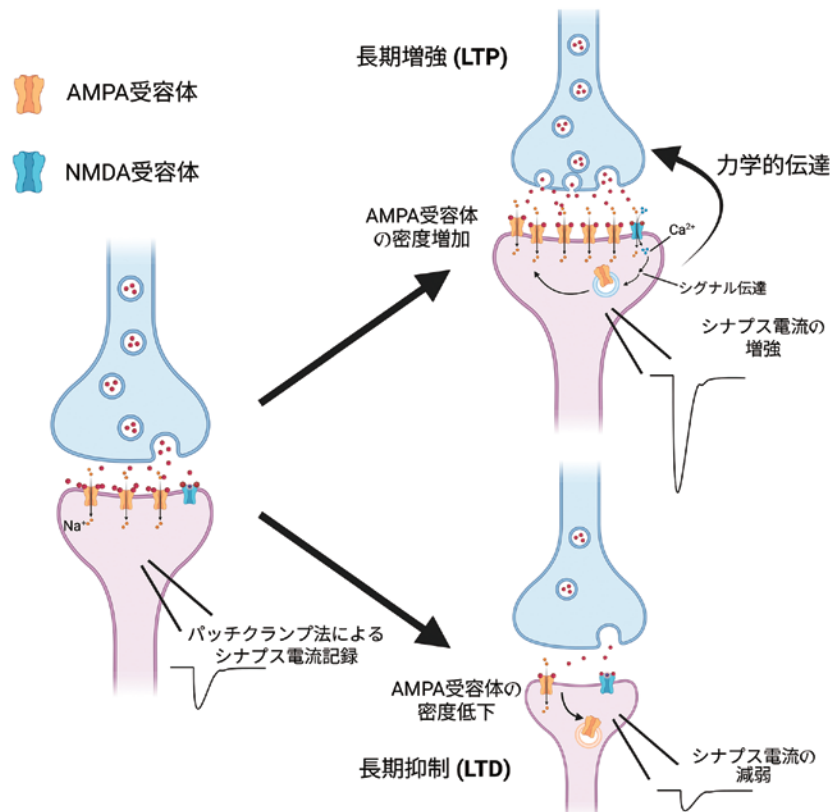


図1 シナプスの可塑的变化(長期増強(LTP)と長期抑制(LTD))。LTPの場合、100 Hzなどの高頻度刺激を人工的に与えることで、スパイン頭部の増大とともに、AMPA受容体の密度が増加し、一定時間シナプス電流の増強がみられる。一方、1 Hz程度の低頻度刺激を与えると、スパイン頭部が退縮し、AMPA受容体の密度低下によりシナプス電流の減弱が生じる。

ラム症¹⁸の患者から同定されている。

3. シナプス可塑性の解析技術

前述のように、シナプス機能は、学習・記憶を含めた様々な行動の駆動に關与する神経基盤の要素である。そのため、その機能や構造を觀察および解析するための様々な技術が開発されてきた。生理学的なシナプス機能の解析法として、パッチクランプ法を用いたやり方がある。これは、1976年にErwin NeherとBert Sakmannにより提唱された方法である。特に、ホールセル・パッチクランプ法を用いることで、AMPA受容体やN-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体を介したイオン流出入により発生する微弱な電流を記録できる(図1)。これにより、シナプスの伝達効率の変化による電流を機能的に解析することが可能である。さらに、1990年代に入ると二光子励起顕微鏡の登場から、1 μm^3 程度の限局した領域でのレーザー照射により、シナプスの構造学的な觀察やより微細な操作が可能になった。特にケージドグルタミン酸を用いたグルタミ

ン酸アンケーシング法により、単一シナプスレベルでの可塑的变化の解析が飛躍的に進んだ。

シナプス可塑性において、個々のシナプスでは何が起きているのか?過去の代表文献では、シナプスの長期増強時に、ポストシナプ側に存在する突起状の構造物であるスパイン(spine)の頭部の大きさが、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA)受容体の発現と正の相関を示す形で巨大化することが報告されている(構造学的可塑性)(図1)¹⁹⁻²²。また、最近では、ポストシナプス側のスパイン頭部増大に伴う機械的な圧刺激により、プレシナプス側の神経伝達物質の放出部位が刺激されることが報告されている(図1)²³。この通り、シナプス伝達調節を行うための様々な生理学的な機構が明らかになってきており、スパインが学習機能における素子であるとする説を支持する根拠でもある²⁰。

4. シナプス形成の可視化技術

スパインの構造学的可塑性からも、シナプス構造は

その機能的な変化を反映していることがわかる。そのため、シナプス構造の観察を行うことは、行動やその変化の根底にある神経細胞・回路メカニズムを理解する上で重要である。特に、興奮性シナプスの変化については、前項で述べたように、ポストシナプス側のスパインの形態を、行動中のげっ歯類モデル（主にマウス・ラット）の脳内で観察することにより解析を行ってきた。特に、運動学習中のマウスを用いた先行研究では、学習課題中にスパインが動的な形態変化を示すことが報告されている²⁴。しかし、従来のスパインの形態観察は、ポストシナプス側の変化のみに着目した解析である。一方、先行研究で示唆されているプレシナプス側の変化やプレ・ポストシナプス両者の協調によるシナプスの可塑的変化の全貌は、ポストシナプス側の観察のみでは不明瞭なままである。このことから、プレシナプスおよびポストシナプスを単一シナプスとしてとらえ、その動的変化を捉える技術が必要とされてきた。

これらの背景を踏まえて、今までに2つのグループがシナプス形成を可視化するための技術(mGRASPとSynView)を報告してきた^{25,26}。mGRASP (mammalian GFP reconstitution across synaptic partners) とSynViewは共に、neuroigin1とneurexin1 β の遺伝子シーケンスの一部を使用し、そこにSplit green fluorescent protein (GFP)²⁷の二つのフラグメントを結合させている。それにより、遺伝子コンストラクト発現下でシナプス形成が行われた際に、neuroigin1-neurexin1 β の結合依存的にsplit-GFPが再構成され、新たに形成されたシナプスの可視化を可能にした(図2)。特に、neuroigin1とneurexin1 β の結合ドメインの変更とGFPのポイント変異の導入を行い、mGRASPを改良したenhanced GRASP (eGRASP)は、記憶および学習に関与するシナプス形成の解析に用いられている(図2)²⁸。これらのツールは、シナプス形成の可視化を、遺伝子コンストラクト発現とともに、バラホルムアルデヒドを用いた還流固定と必要に応じて免疫組織染色のみで行うことができる比較的簡便な方法である。

しかし、split-GFPに基づいたこれらのツールにはいくつかの限界点がある。まず、split-GFPが、結合強度($K_d \approx 1$ nM)の点で構造的に比較的安定であり、一度結合してしまえば蛍光発現が残り続けることがある(蛍光発色の不可逆性)。これにより、様々な行動下で刻一刻と変化するシナプス動態を、個々のシナプスで即時観察および解析していくことは難しい。また、生きた動物の脳での蛍光の観察は、顕微鏡のレーザーに

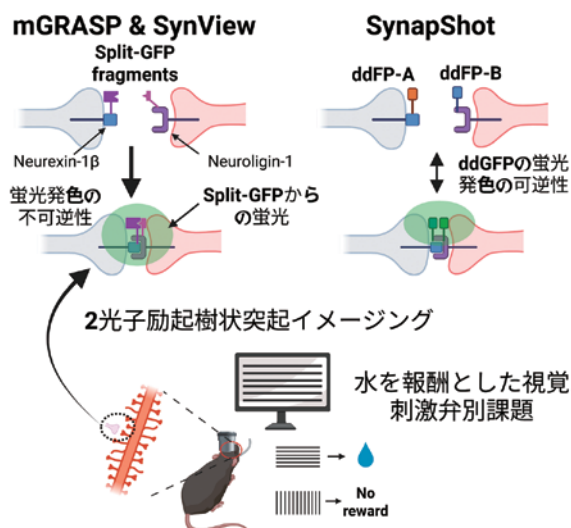


図2 SynapShotとSplit-GFPに基づく可視化ツールの比較。

Split-GFPの蛍光発色の不可逆性により、mGRASPおよびSynViewではシナプス動態の観察は困難である。一方、SynapShotはddGFPの蛍光発色の可逆性を利用している。これにより、学習課題実行中の動物の生きた脳内で、シナプス動態を可視化することができる。

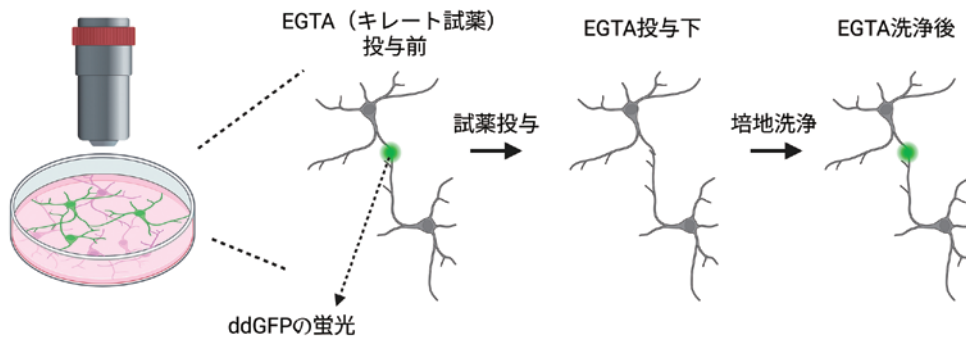
よる蛍光退色を起こしてしまい、安定した観察は不向きである。以上から生きた動物の脳内で、リアルタイムにシナプス動態の観察を行うことは、技術的な点で困難だった。

5. SynapShot—リアルタイムにシナプス動態を観察するための分子ツールの開発

以上の現状を踏まえて、筆者たち研究グループは、シナプス動態を即時的に観察するための分子ツールの開発に取り組んだ。まず、split-GFPに代わる蛍光タンパク質として、二量体依存性蛍光タンパク質(dimerization-dependent fluorescent protein: ddFP)に着目した^{29,30}。これは、二つの一量体(copy Aとcopy B)が二量体を形成することで、蛍光発色を示すタンパク質であり、Robert Campbell研究室で最初に作製された²⁹。この蛍光タンパク質は、二量体が二つの一量体に戻ることで、その蛍光が消退する蛍光発色の「可逆性」を特徴として持つ($K_d \approx 1 \sim 20$ μ M)。筆者たちは、この可逆性を利用して、シナプス可塑性に伴う構造的変化を可視化できないかと考えた。

そこで、二量体形成性緑色蛍光タンパク質(ddGFP)のcopy Aとcopy Bを、プレシナプスのneurexin1 β とポストシナプスのneuroigin1にそれぞれ結合した。これにより、シナプスの可塑的変化(形成および消退)

A. 培養細胞系を用いたSynapShotの蛍光発色の可逆性の確認



B. タイムラプスイメージング下でのシナプス構造学的動態の観察

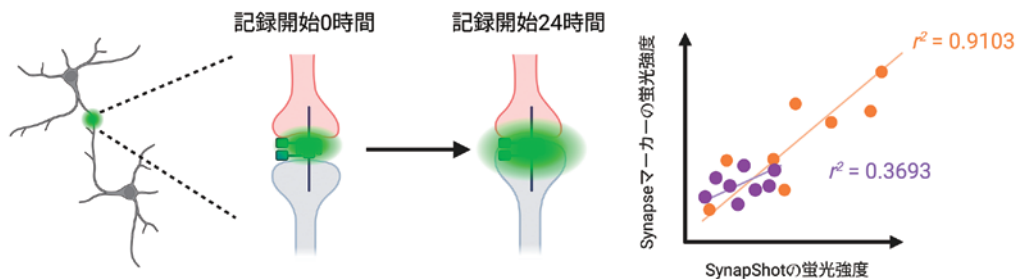


図3 シナプス動態を観察するための分子ツール SynapShot の開発.

- (A) 培養細胞系を用いた SynapShot の蛍光変化の評価. Neurexin1 β -Neurologin1 の結合がカルシウム依存であるため, キレート試薬の EGTA を培養細胞に投与すると, ddGFP の蛍光が消退する. さらに, EGTA を培地から洗い流すと, ddGFP の発色を再度確認できる.
- (B) タイムラプスイメージングを用いた個々のシナプスにおける SynapShot の蛍光評価. 一部のシナプスにおいて, シナプスマーカーの蛍光発色と比較すると, ddGFP の蛍光強度は, 時間経過とともに正の相関を持って増強していく.

に伴う両者の結合に依存して, 蛍光を発色させることを狙った. そして, シナプス動態をリアルタイムで可視化するツールとして“SynapShot”と命名した³.

まず, SynapShot の遺伝子コンストラクトの作製を行った. Neurologin1 と neurexin1 β の結合ドメイン, PDZ ドメイン, copy A と copy B の挿入部位を検討し, 最終的に, mGRASP および SynView 両者それぞれの遺伝子配列に基づく SynapShot の遺伝子コンストラクトを作製した³. そして機能評価のために用いた海馬神経細胞の分散培養系では, カルシウム依存的に, SynapShot が蛍光発色の可逆性を示すことが確認できた (図3)³.

次に, SynapShot の蛍光が生理学的にどのような意味を持つかを調べた. そのために, SynapShot の遺伝子コンストラクトを発現した海馬分散培養系で, タイムラプスイメージングを行った. 個々のシナプスの構造をポストシナプスとプレシナプスの分子マーカーを染色することで確認し, その蛍光強度の変化と SynapShot の ddGFP の蛍光強度の相関を解析した.

その結果, 両者が正の相関を示す (=シナプスの蛍光強度が強くなればなるほど, SynapShot のシグナルは強くなる) ことが分かった (図3)³. 一方で, シナプスの蛍光強度が低下した場合には, 逆に相関関係が減弱していくことが明らかになった³. 以上のことから, SynapShot の蛍光強度変化は, 即時的なシナプス動態の変化を反映していると考えられる. また, シナプスの蛍光強度の増強は, 先に紹介したシナプス可塑性におけるスパイン動態とも関連している可能性があり, SynapShot が生理学的なシナプスの機能解析に適したツールであることを示唆している.

6. 生きた脳内でのシナプス動態の観察

次に, 行動中の動物を用いて, シナプス動態の観察に取り組んだ. シナプス可塑性が学習の神経基盤と考えられているが故に, げっ歯類モデル (マウス) の脳内に SynapShot を発現させ, 二光子励起顕微鏡下で, 学習課題試行中の脳内で蛍光変化の観察および解析を行った (図4). 学習機能を評価するための課題として

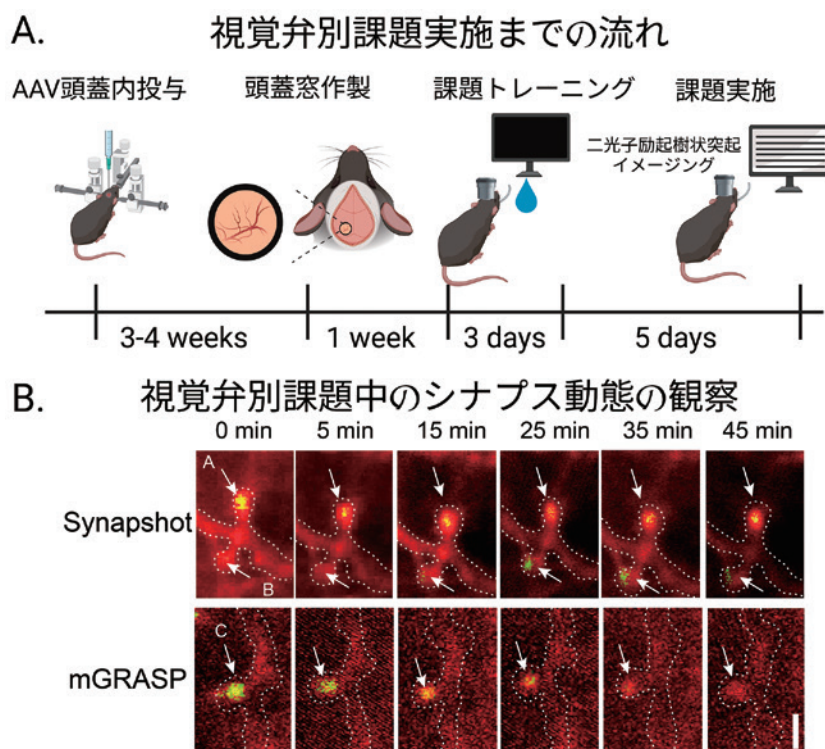


図4 生きた脳内で学習機能に関わるシナプス動態の観察。

- (A) 視覚弁別学習における生きた脳内でのシナプス動態の観察。アデノ関連ウイルスベクター (AAV) を用いて SynapShot の遺伝子コンストラクトを発現後に、頭蓋窓を作製した。その後、1週間経過後から、舌を出して水を取得するための課題トレーニングを3日程度行った後に、水報酬と視覚刺激の提示を始めた。
- (B) SynapShot と mGRASP の蛍光発色の軌跡。課題実行中に、SynapShot は異なるシナプスで多様な蛍光強度の変化を示す。一方、mGRASP の split-GFP の蛍光は時間経過とともに低下を示す。以上から、SynapShot の蛍光は、シナプス動態を反映して変化していると考えられる。

は視覚刺激弁別課題を用いて、先行研究で視覚刺激の弁別学習に関与することが知られている前部帯状回 (anterior cingulate cortex : ACC) から一次視覚野 (primary visual cortex : V1) の神経投射に着目した。まず、アデノ関連ウイルス (adeno-associated virus : AVV) ベクターを用いて、ACC-V1 の神経回路に SynapShot またはコントロール群として mGRASP の遺伝子コンストラクトを、それぞれ別個体に発現させた。続いて、各々の遺伝子コンストラクトを発現したマウスに対して、視覚刺激の弁別を行うためのトレーニングを行った。その結果、水の報酬が貰える成功率が、トレーニングを重ねることで線形に上がっていくことを確認した。学習の完成に寄与し、課題学習に直接的に関与するシナプス動態を観察するために、5日間の視覚刺激の弁別トレーニング期間の3日目に、SynapShot の ddGFP および mGRASP の split-GFP の蛍光を、それぞれの個体において二光子励起顕微鏡下

で観察した (図4)。一般的に、二光子励起顕微鏡を使った蛍光観察では、励起レーザーによる蛍光退色が起こる前提の元、対象を観察する必要がある。その前提の元、ddGFP の蛍光発色は、観察対象としている動物が視覚弁別課題を遂行中に、個々のシナプスにおいて多彩な変動を示すことが明らかとなった (図4)。一方で、split-GFP の蛍光発色は、励起レーザーによる蛍光退色により、課題実行中に、時間経過とともに、徐々に低下していった (図4)。以上から、同じ二光子励起レーザーの照射下で、ddGFP に基づく SynapShot は、学習中のシナプス動態をリアルタイムで捉えることを実現する可能性があることを示すことができた。これは、前述の過去の分子ツールでは実現困難だった観察手法であり、記憶および学習を含めた高次機能を反映する様々な行動の根底にあるシナプス機構の解明に寄与する技術であると考えている。

7. これからの展望

以上、筆者はシナプス動態の観察に関わる分子ツールの開発およびその応用をポストドクトレーニングのテーマの一つとして行ってきた。しかし、SynapShotについても改善できる点が残っている。まず、元々のddGFPの蛍光発色が通常のGFPと比較すると蛍光発色の程度は弱い。そのため、対象とする脳領域は頭蓋窓（cranial window）を介した観察が可能な脳表層の皮質領域に限られ、二光子励起顕微鏡が必要となる。これらの限界点については、ddFP自体の改変とともに、他のシナプスオーガナイザーと組み合わせることで、より蛍光発色が強く可逆性を持つ可視化ツールを開発できる可能性はある。さらに、我々も培養細胞系で示した通り、複数色のddFPを組み合わせることで、マルチカラーでのシナプス動態のイメージングも可能となる³。

筆者は、前述の通り、2026年3月から韓国にある蔚山科学技術院（UNIST）で研究室を主催している。自身の研究室では、行動駆動の細胞・シナプス基盤の解明とそのための技術・方法論開発を念頭に、各種遺伝子改変マウスやウイルスと既存の電気生理学的手法やイメージング手法と組み合わせ、研究を展開していく。また、精神疾患の神経基盤を解明するために、開発した技術をげっ歯類モデルに応用していく予定である。筆者は、SynapShot開発の他に、ジョンズ・ホプキンス大学において、行動の駆動に関与する細胞および細胞集団を同定するための分子ツール（soma-targeted Cal-Light : ST-Cal-Light）の開発にも取り組んできた²。SynapShotやST-Cal-Lightなどの分子ツールの開発とその応用、そして既存の方法論との組み合わせを通して、行動の神経メカニズムを今までアプローチが難しかった解像度で解明し、脳の高次機能の神経基盤およびその破城による精神神経疾患の生物学的病態の解明に貢献していきたいと考えている。

Conflict of Interest : 開示すべき利益相反はなし。

図表は bioRender を用いて作製した。

文 献

1. Nagahama K, Sakoori K, Watanabe T, et al.: Setd1a Insufficiency in Mice Attenuates Excitatory Synaptic Function and Recapitulates Schizophrenia-Related Behavioral Abnormalities. *Cell Rep* 2020; 32: 108126.
2. Hyun JH, Nagahama K, Namkung H, et al.: Tagging active neurons by soma-targeted Cal-Light. *Nat Commun* 2022; 13: 7692.
3. Son S, Nagahama K, Lee J, et al.: Real-time visualization of structural dynamics of synapses in live cells in vivo. *Nat Methods* 2024; 21: 353-360.
4. Malenka RC, Nicoll RA: NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 1993; 16: 521-527.
5. Nicoll RA, Malenka RC: Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1995; 377: 115-118.
6. Harris KM, Teyler TJ: Developmental onset of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampus. *J Physiol* 1984; 346: 27-48.
7. Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T: Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Science* 1996; 273: 648-650.
8. Malenka RC, Bear MF: LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004; 44: 5-21.
9. Silva AJ, Stevens, CF, Tonegawa S, et al.: Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 1992; 257: 201-206.
10. Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, et al.: Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 2004; 116: 467-479.
11. Aiba A, Kano M, Chen C, et al.: Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 1994; 79: 377-388.
12. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S: The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996; 87: 1327-1338.
13. Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, et al.: Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 2002; 297: 211-218.
14. Südhof TC: Synaptic neurexin complexes: A molecular code for the logic of neural circuits. *Cell* 2017; 171: 745-769.
15. Südhof TC: Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 2008; 455: 903-911.
16. Achterberg EJM, Biemans B, Vanderschuren LJM: Neurexin1 α knockout in rats causes aberrant social behaviour: relevance for autism and schizophrenia. *Psychopharmacology* 2024 doi: 10.1007/s00213-024-06559-z
17. Marshall CR, Howrigan DP, Merico D, et al.: Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. *Nat Genet* 2017; 49: 27-35.
18. Matsunami N, Hadley D, Hensel CH, et al.: Identification of rare recurrent copy number variants in high-risk autism families and their prevalence in a large ASD population. *PLoS One* 2013; 8: e52239.
19. Kasai H, Ucar H, Morimoto Y, et al.: Mechanical transmission at spine synapses: Short-term potentiation and working memory. *Curr. Opin. Neurobiol* 2023; 80: 102706.
20. Kasai H, Ziv NE, Okazaki H, et al.: Spine dynamics in the brain, mental disorders and artificial neural networks. *Nat Rev Neurosci* 2021; 22: 407-422.
21. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, et al.: Structural basis of long-term potentiation in single

- dendritic spines. *Nature* 2004; 429: 761-766.
22. Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, et al.: Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1086-1092.
 23. Ucar H, Watanabe S, Noguchi J, et al.: Mechanical actions of dendritic-spine enlargement on presynaptic exocytosis. *Nature* 2021: 686-689.
 24. Fu M, Yu X, Lu J, et al.: Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature* 2012; 483: 92-95.
 25. Kim J, Zhao T, Petralia RS, et al.: mGRASP enables mapping mammalian synaptic connectivity with light microscopy. *Nat Methods* 2011; 9: 96-102.
 26. Tsetsenis T, Boucard AA, Araç D, et al.: Direct visualization of trans-synaptic neuroligin-neurexin interactions during synapse formation. *J Neurosci* 2014; 34: 15083-15096.
 27. Romei MG, Boxer SG: Split green fluorescent proteins: Scope, limitations, and outlook. *Annu Rev Biophys* 2019; 48: 19-44.
 28. Choi JH, Sim SE, Kim JI, et al.: Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. *Science* 2018; 360: 430-435.
 29. Alford SC, Ding Y, Simmen T, et al.: Dimerization-dependent green and yellow fluorescent proteins. *ACS Synth Biol* 2012; 1: 569-575.
 30. Ding Y, Li J, Enterina JR, et al.: Ratiometric biosensors based on dimerization-dependent fluorescent protein exchange. *Nat Methods* 2015; 12: 195-198.

(受付：2026年2月13日)

(受理：2026年2月16日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的の場合、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。