

## 研究題目 シナプスプロテオミクスの多様性の解明

### 研究組織

研究代表者：平野恭敬（香港科学技術大学、 Division of Life Science）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1] 本研究の目的・概要

脳神経回路では、一つの神経が多様な神経とシナプスを形成し、複雑な情報処理を行っている。本研究では、ショウジョウバエの記憶中枢回路をモデルとして、神経細胞内のシナプスを分離精製する方法論を構築し、プロテオミクス解析を用いてそれらの生化学特性を解明する。シナプスごとの局所的なプロテオームを捉えることで、シナプスの多様性の原理に迫ることを目的とする。

#### [1-2] 研究の方法・経過

ショウジョウバエにおいて情報の統合領域であるキノコ体と呼ばれる神経集団は、ドーパミン神経とそのシナプス後神経との接続において顕著なシナプス層構造を作っていることが知られており、遺伝学的ツール（Gal4/UAS システム）を用いることで、このような細胞種特異的シナプスを別々に標識することが可能である。それら遺伝学的ツールを活用し、これまでの研究では学習記憶、および行動出力において各シナプスが異なる役割を担うことが示されており、キノコ体のシナプス層構造はシナプス多様性研究のよいモデルとなる。本研究では、キノコ体の各層のシナプスを遺伝学的に標識し、単離し、プロテオーム解析を行うことで、シナプスごとの生化学的違いを明らかにすることを目標とした。

特定の神経間のシナプスのみを可視化する技術である GRASP 法（GFP Reconstitution Across Synaptic Partners）を応用した。GRASP 法では、GFP の N 末と C 末をそれぞれシナプス前細胞とシナプス後細胞で提示させることで、2つの神経が会合するシナプスでのみ GFP が再構成され、蛍光標識される。しかし、GFP の N

末と C 末の結合は効率的に起きるわけではなく、また免疫沈降中に失われる。そこで、GFP の N 末を認識する抗 GFP nanobody を GFP の C 末側に導入した。N 末 GFP および C 末 GFP の膜からの距離、またスパーサー配列の検討と nanobody の位置などの組み合わせを検討し、効率的な GRASP シグナルを得られる組み合わせを同定した。これにより、従来の GRASP 法では得られなかった効率で GFP の再構成が可能になり、かつ免疫沈降中にもシナプス間結合を保つことに成功した。GripGRASP により異なるシナプスで GFP を再構成させたハエからシナプス分画を遠心法により回収し、免疫沈降法をもちいて再構成 GFP を有するシナプスのみを回収する。そのため、N 末 GFP には FLAG タグ、さらに C 末 GFP には HA タグを挿入し、二段階の免疫沈降を行った。ウェスタンブロットの結果、GripGRASP させたものだけで免疫沈降がみられること、さらに免疫沈降物からシナプトソームと考えられる小胞が検出されることを確認している。このようにして得られた免疫沈降物を LC-MS/MS 解析した。

本年度には、キノコ体とキノコ体シナプス後神経の各シナプスを単離し、プロテオーム解析を行った。さらに光遺伝学を用いて、学習に伴う神経活動を模倣することによって、学習に必要なシナプス可塑性メカニズムをプロテオームから解明することを試みた。

### 【2】研究成果

#### [2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

キノコ体神経とその出力神経のシナプスを単離し、LC-MS/MS 解析を行った。各シナプスでそれぞれ 250 から 400 のタンパクが同定され、その中で 50%以上のタンパクがシナプスごとに局在が異なることを見出した。特に学習記憶

に特に重要であるキノコ体神経  $\gamma$  1 シナプスでのプロテオームの違いは顕著で、シナプスタンパク、細胞接着因子、G タンパク等の局在が見られ、神経可塑性の分子メカニズムを示唆していると考えられる。さらに光遺伝学を用いた学習模倣刺激を行うことで、キノコ体神経  $\gamma$  1 および  $\gamma$  2 シナプスにおける可塑的变化を示すタンパク群を同定した

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

様々な神経標識法を用いた過去の研究から神経回路図（コネクトーム）が明らかにされ、1 細胞 RNA-seq 解析から神経細胞の多様性が網羅的に捉えられてきた。一方で、シナプスレベルでの生化学的多様性の理解については、方法論の欠如から十分ではない。精神疾患および加齢性の病理脳では、特定のシナプスの機能不全が関与することが示唆され、そのようなシナプスを標的とした治療戦略を提案するうえでも、本研究のシナプス特異的な生化学的解析法の確立は重要なステップになる。ショウジョウバエでの検証が終われば、哺乳類脳でも展開していく。

### 【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表  
なし

[3-2] 学会発表

2024 年 日本神経科学大会 Neuro2024 シンポジウム

[3-3] 成果資料等  
なし

### 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

標的にするシナプスを広げ、包括的にシナプス多様性を調べる必要がある。

今回の得られた成果に関して、候補として挙げられたタンパクに関して、可視化およびノックダウン実験による機能解析を進める。