

Title	神経回路と微小電極間の細胞種特異的な多重化インターフェイスのための分子ツールの開発
Author(s)	李, 佳林
Citation	
Issue Date	2025-12
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	https://hdl.handle.net/10119/20321
Rights	
Description	Supervisor: 筒井 秀和, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	LI, Jialin		
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 627 号		
学位授与年月日	令和 7 年 12 月 24 日		
論文題目	Engineering of orthogonal synapse organizers for multiplexed cell-specific interface between neurons and microelectrodes		
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
	沼野利佳	豊橋技術科学大学	教授

論文の内容の要旨

Neuronal circuits are complex networks composed of diverse types of neurons that provide the functional flexibility of living organisms. It is generally thought that each type of neuron plays a distinct role, and together they enable the integrated operation of the entire circuit. Therefore, techniques that selectively record the activity of specific neuronal types are indispensable for studies of neural circuits. Microelectrode technique has long been one of the major methods for recording neural activity with millisecond precision. However, because it lacks cell-type specificity, identifying neuronal types requires the use of cumbersome and indirect auxiliary methods. This limitation becomes even more critical in recently developed multi-electrode array technologies, where distinguishing neuronal types has become increasingly difficult.

To confer cellular selectivity on electrodes, this study set out to engineer an orthogonal library of synapse organizers functioning as molecular “lock-and-key” switches. These tools were designed so that a receptor-functionalized microelectrode could induce the formation of presynapse-like structures on axons expressing the corresponding ligand-tagged organizer, in a cell-type-specific manner. The study also sought to determine the ligand–receptor affinities required for such tools.

Three polycistronic constructs—Spot-, V5-, and Alfa-cNrxn1 β Δ ECD—were generated, each fused via a P2A peptide to EGFP-Rab3 as a fluorescent presynaptic marker. Truncation of the LNS domain eliminated binding to endogenous neuroligins, ensuring that synapse induction was strictly dependent on ligand–nanobody interactions. Reported affinities of the peptide–nanobody pairs span from 26 pM (Alfa) to 29 nM (V5). HEK293T surface-display assays confirmed strict one-to-one recognition: only the cognate nanobody produced robust membrane fluorescence, even under saturating ligand concentrations (up to 8 μ M). Primary chick forebrain neurons were transfected with the constructs and cultured overnight with nanobody-decorated microbeads. Synapse formation was quantified by EGFP-Rab3 accumulation at axon–bead contacts, and statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis followed by Dunn’s post-hoc tests. Targeted contacts (e.g., Spot construct + anti-SpotNb beads) showed significantly higher Rab3 indices than any off-target combination. No significant differences were detected among the three on-target pairs, indicating comparable synaptogenic potency despite an \sim 1000-fold range in dissociation constant (Kd). These results establish Spot, V5, and Alfa tags as a bona fide orthogonal trio well suited for multiplexed interfacing. The molecular tools described here are expected to provide a platform for precise, genetically targeted, and multiplexed electrophysiological recording in future. This

dissertation is organized into five main chapters. Chapter 1 serves as a general introduction, outlining the basic concepts of key components discussed in this work, including neurons, synapses, and microelectrode technology. Chapter 2 provides a detailed discussion of the background of synapse organizers and their applications in experiments, representing the central focus of this study. Chapter 3 describes the experimental principles and procedures employed in this research, as well as the methods for data acquisition and analysis. Chapter 4 presents and analyzes the experimental results in detail, drawing the corresponding conclusions. Finally, Chapter 5 summarizes the results and conclusions as a whole and offers perspectives for future studies.

Keywords

Neurons, Neuronal Circuits, Synapses, Synapse Organizers, Microelectrode Technique, Dissociation constant, Orthogonality, Engineered synapse organizers

論文審査の結果の要旨

神経回路における情報の符号化や保持の基本原理は明らかではない。生体の神経回路は一般的に多種類（近年の空間トランスクリプトーム解析によると、齧歯類で5千種以上）のニューロンが構成する複雑なネットワークであり、各タイプが異なる役割を担うことにより、堅牢かつ柔軟な回路機能を統合的に実現しているとされている。このため、神経回路研究におけるニューロン活動計測には細胞種特異性が必須である。既存の微小電極法はミリ秒分解能でニューロン電気活動の記録が可能一方で、細胞型特異性を直接的には備えておらず、形態観察や遺伝子マーカー確認といった間接的な手法を用いて測定対象の特定を行うことが必要である。こうした間接的な細胞の同定は、膨大な労力を要するうえに、近年発展が著しい高密度多点電極法に应用することは困難である。この課題解決を目指す立場から、人工改変したシナプスオーガナイザーを発現する軸索が、その活性化因子で修飾され微小電極と特異的に結合し、シナプス様接合を形成するという既存研究が報告されている。本博士論文は、これを発展させ、神経軸索と微小電極を接続する分子ツールの多重化の可能性を検討するものであり、具体的には二つの課題を設定している。第一は、ペプチドタグと対応するナノボディのペアを用いて、交差反応を示さず各ナノボディにより特異的にシナプス誘導活性を発揮する直交的分子ツールの開発を試みること。第二は、こうした分子ツールに要求されるタグとナノボディの結合強度に関する知見を得ることである。そこで平衡解離定数 (Kd) が数十 nM から数十 pM と桁異なる V5、Spot、Alfa タグおよび対応ナノボディに着目し、Neurexin-1 β 由来配列とシナプスマーカー EGFP-Rab3 をポリシストロニックに発現する人工シナプスオーガナイザーを設計した。HEK 細胞での表面発現アッセイでは良好な直交性が確認され、対応ナノボディのみが強い膜蛍光を示した。さらに初代培養ニューロンに導入し、ナノボディ修飾マイクロビーズと共培養した結果、正しい組み合わせでのみ有意に高い Rab3 指数を示した。一方、3 種類の正しい組み合わせ間では有意差はなく、Kd 値に約 1000 倍の差があっても同等のシナプス誘導能を示した。これらの結果は、互いに交差反応のない直交シナプスオーガナイザーを実際に設計可能なこと、そして重要なことは、そのような分子ツールが人工リガンドと受容体の結合強度に関する要求が過度に高いわけではないことを示しており、今後、より多様な人工エピトープタグと対応するナノボディを用いてさらなる多重化が可能であることを示唆する。このように、本研究が明らかにした知見は、今後、遺伝学的に標的化された精密かつ多重化可能な電気生理学的記録の新たな計測原理が実現される可能性を広げるものであり、その学術的貢献は極めて大きい。よって、本論文は博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。