

岡部繁男

東京大学大学院医学系研究科
教授

ナノ形態解析によるシナプス動態制御システムの解明

§ 1. 研究実施体制

(1)「岡部」グループ

- ① 研究代表者: 岡部 繁男 (東京大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目 ナノ形態イメージングによるシナプス動態解析
 - ・In vivo 二光子イメージングによる脳内シナプスの寿命測定と電子顕微鏡観察
 - ・培養神経細胞でのナノスケール分子動態イメージングと形態測定

(2)「楠見」グループ

- ① 主たる共同研究者: 楠見 明弘 (京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS)、教授)
- ② 研究項目 一分子追跡法によるシナプス分子動態解析
 - ・一分子追跡法によるスパイン内での膜分子の動態
 - ・膜分子の PSD 領域への出入りと領域内での挙動の解析

(3)「井上」グループ

- ① 主たる共同研究者: 井上 康博 (京都大学再生医科学研究所、准教授)
- ② 研究項目 数理モデリングによるシナプス動態解析
 - ・ブラウン動力学法に基づくシナプスでの分子拡散シミュレーション
 - ・シナプスに特徴的な幾何学的変数の抽出のためのクラスター分析

§ 2. 研究実施の概要

平成 26 年度は今後の研究の推進に必要となる技術の開発や効率化の期間と捉え、*in vivo* 二光子イメージングと電子顕微鏡観察の相関顕微鏡法の技術開発、培養神経細胞におけるシナプス分子の超解像顕微鏡観察と1分子追跡技術の開発と効率化を主体として研究を行った。分子動態のモデル化に関しても、シナプス・スパイン部位での分子動態を表現する数理モデルを作製するため、実験データとモデル解析の間のパイプラインとなるアルゴリズム、手法の開発を重点的に行った。

岡部グループ

(1) *In vivo* 二光子イメージングによる脳内シナプスの寿命測定と電子顕微鏡観察

*In vivo*二光子イメージングの観察方法の最適化を行い、3週令マウスの大脳新皮質体性感覚野を対象として2日から1か月程度の観察期間でのシナプス動態の記録を行う事とした。相関顕微鏡法で最も重要な技術である、同一観察視野を確実に確保するための方法論として、電子顕微鏡切片上で識別可能なマーカーをレーザー等により作成する方法を確立した。シナプスを効率良く3次元再構築するためには画像再構築を効率化する必要があるため、代表的な画像再構築ソフトの比較を行い、**Reconstruct**を利用した画像の再構築を行う事とした。**Reconstruct**を利用して作成されるメッシュについて最適化するための後処理を井上グループの協力により検討し、開発を進めている。

(2) 培養神経細胞でのナノスケール分子動態イメージングと形態測定（シナプス足場蛋白質・細胞骨格分子の分子動態解析）

シナプス足場蛋白質に光活性化蛍光蛋白質である **Eos** を付加した分子を海馬神経細胞に発現させ、超解像顕微鏡法である **PALM** 法により足場蛋白質の分布を計測し、直径 **500 nm** 以下のシナプス後肥厚部内での足場蛋白質の分子分布を高い空間解像度で検出した。またこの手法を別の超解像顕微鏡法である **SIM** 法と組み合わせる事により、スパイン形態とシナプス後肥厚部の分子分布の関係を明かにした。

楠見グループ

培養海馬神経細胞を用い、スパインヘッド、ネック、および、樹状突起のシャフトの3つの部位で、細胞膜蛋白質の分子動態を1分子追跡・解析する技術開発をおこなった。神経細胞に特に発現が多いグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質の **Thy1** の1分子追跡、AMPA受容体の1分子追跡、**Homer1b-GFP** の形成するスパインのクラスターの解析、等に成功しており、これらの要素技術を組み合わせる事により、スパインおよびPSD領域への出入りと領域内での分子の挙動を定量的に解析する事が可能となった。

井上グループ

ブラウン動力学法に基づき、スパイン膜上およびスパイン内部の分子拡散を表す数理モデルの構築に着手した。岡部グループと密に議論を行い、初年度は実験計測で用いられる蛍光分子相関 (FCS) 法を模擬したアルゴリズムの導入に力点をおき、ブラウン動力学法に

基づく分子拡散シミュレーションの結果を、FCS法の計測データとして *in silico* に再構成する事が可能となった。また分子拡散の境界条件として与えるスパイン形状を模したコンピュータモデルを構築するために、スパインのヘッド直径とネック長さを与えることで、バーチャルなスパイン形状を三角形メッシュモデルとして構築するソフトウェアの開発に着手し、比較的簡素な形状は自動で構築できるようになった。