

「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」
平成26年度採択研究代表者

H27 年度 実績報告書

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 27 年度は前年度に実施した技術開発・効率化を具体的にシナプス・スパインの動態に適用し、高精度のデータを取得するための条件検討を主に実施した。分子動態のモデル化に関しては、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実験的に取得したデータと比較し、更に数理モデルを最適化・高度化するための方法論の確立に注力した。

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条件検討を進め、3-8週令マウスの大脳新皮質体性感覚野を対象として行う方針を決定した。ガラス窓を作成して長期間の観察期間中に多くの時系列データを取得する方法と、頭蓋骨を薄く削って1か月程度の間隔で二回同じ皮質領域からデータを取得する方法の比較を行った。前者の方法を用いた場合にはガラス窓が作成後に曇り、観察が不可能となる確率が高いこと、観察中に消失するスパイン・シナプスの数が多いことから、採用するメリットが少ないと結論し、頭蓋骨を薄く削る方法を採用することとした。電子顕微鏡の観察については、in vivo 二光子イメージングを行った領域を再度同定する事に成功し、その後の電子顕微鏡データの取得に関しては切片をテープ上に回収する方法とイオンビームを用いて標本の表面を削除しつつ画像を取得するFIB-SEM法の二つについてその効率と画像の質について検証を行った。

(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

前年度に導入した構造化照明顕微鏡(SIM)を利用して、スパインの微細形態を観察するための手法を開発した。SIM法により取得したスパイン形態の特徴を解析するためのアルゴリズムおよびそれを実装したプログラムを開発し、形態に関連するパラメーターを効率良く取得する事が可能となった。更にSIM法によって取得されたスパイン形状のデータを電子顕微鏡により取得したスパインのデータと比較し、形態に関するパラメーターの信頼性を検証した。

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

岡部グループ、楠見グループが取得するスパインシナプス内の分子動態測定の結果を in silico に再現する分子動態モデリングを行い、シミュレーションによる作業仮説の検証や予測を

行うことを目標としている。本年度は、スパイン内部構造を考慮した分子拡散動態を捉える数理モデルを構築した。また、分子拡散シミュレーションに用いるスパイン形状として、実測に基づく計算モデルの構築が可能となった。具体的には、スパインの形や拡散係数の違いが、蛍光分子相関法(FCS)による測定結果にどのように反映されるかをシミュレーションによって検討できるようにするため、空間の各所に拡散係数値を設定できる分子拡散シミュレーションと、これを基に分子拡散の軌跡データから、蛍光分子相関法による測定をシミュレーションするソフトウェアの開発を行った。この方法を利用して実形状を境界条件とした分子拡散シミュレーション、FCS 測定シミュレーションを実際の分子サイズと内部構造の特徴サイズに合わせて行うための方法論も開発した。

発表論文

1. Matlashov M. V., Bogdanova Y. A., Mishina N. M., Ermakova Y. G., Nikitin E. S., Balaban P. M., Okabe S., Lukyanov S., Enikolopov G., Zaisky A. G., and Belousov VV.

Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: applications in neuroscience and regenerative biology.

BBA-General Subjects 1850, 2318-2328, 2015

2. Hayashi, A., Asanuma, D., Kamiya, M., Urano, U. and S. Okabe.

High affinity receptor labeling based on basic leucine zipper domain peptides conjugated with pH-sensitive fluorescent dye: visualization of AMPA type glutamate receptor endocytosis in living neurons.

Neuropharmacology 100, 66-75, 2016.