

細胞の動的・高次構造体
2021 年度採択研究者

2021 年度 年次報告書

坂本 寛和

東京大学大学院医学系研究科
助教

神経伝達物質の放出確率を制御する超分子集合体の再構成

§ 1. 研究成果の概要

本研究課題の目的は、神経伝達物質の放出確率を決定する動的な高次構造体であるアクティブゾーン超分子集合体の動作原理を解明することである。四つの構成因子 Munc13, RIM, RIM-BP, CAST からなるアクティブゾーン超分子集合体を *in vitro* で再構成する技術を構築し、ライブセル超解像イメージング技術および一分子動態計測技術と組み合わせることで、アクティブゾーン超分子集合体の空間分布パターン形成の動的なメカニズムを、自律的な組織化現象の観点から解明する。さらに、アクティブゾーン超分子集合体の再構成系に Ca^{2+} チャンネルを動員し、Munc13 ナノクラスター（シナプス小胞放出部位の分子実体）と Ca^{2+} チャンネルの分布様式および分子動態を定量することで神経伝達物質の放出確率を決定する分子メカニズムを明らかにする。今年度の研究では、四つの構成因子 Munc13, RIM, RIM-BP, CAST を非神経細胞（シナプス特有のタンパク質群が存在しない環境）に発現させ、細胞膜付近に局在化させることで自発的な超分子集合体形成を誘導する技術を構築した。構成因子にケミカルタグタンパク質を融合させ、超解像イメージングに最適化された低分子蛍光色素の標識を可能とすることで、二色ライブセル STED イメージングを実現した。また、再構成したアクティブゾーン超分子集合体中の分子動態を解析するために、同一励起・二色同時一分子動態計測を可能とする“蛍光サルベージ”方式の光学系を導入した一分子蛍光計測システムの設計を行った。具体的には、通常蛍光検出用とサルベージ蛍光検出用の二台の EM-CCD カメラを設置し、分岐光学系を導入した。顕微鏡システムの設計に並行して、同一励起・二色同時計測に適した近赤外蛍光波長領域のレポーター色素の選定を進め、これまでに二種の分子で一分子計測に成功している。

【代表的な原著論文情報】

- 1) “Synapse type-specific molecular nanoconfigurations of the presynaptic active zone in the hippocampus identified by systematic nanoscopy”, Hirokazu Sakamoto, Naoya Kimpara, Shigeyuki Namiki, Shun Hamada, Toshihisa Ohtsuka, and Kenzo Hirose, *bioRxiv*, doi.org/10.1101/2022.03.11.483942, 2022