

## 論文の内容の要旨

論文題目           Molecular mobility inside dendritic spines of cultured hippocampal neurons  
                          investigated by two photon raster image correlation spectroscopy  
                          (2光子 RICS 法による海馬神経細胞スパイン内分子動態解析)

氏名                小橋一喜

脳が複雑な情報処理を行うためには、個々の神経細胞がシナプスを介して適切に接続され、そしてそのシナプスの機能が必要に応じて調整される必要がある。すなわち、シナプス機能調整の基本原理を理解することは脳機能を理解する上で重要であると考えられる。大脳皮質や海馬において、興奮性シナプスの後部は、錐体細胞樹状突起からつきだした微小構造である樹状突起スパイン内に形成される。スパインは、直径 0.5 - 1.5  $\mu\text{m}$  のおよそ球状のスパインヘッドと太さ 0.5 $\mu\text{m}$  以下のスパインネックで構成される。スパインネックは分子拡散障壁として作用することが知られており、スパインは独立した生化学反応ユニットとして機能すると考えられている。スパイン内には、シナプス後肥厚部、アクチン線維、細胞内小器官が存在している。また、100 種類を超えるシナプス分子がスパイン内で同定されている。これらのシナプス分子のスパイン内での分子動態はスパイン内部でのシグナル伝達の基盤となる。したがって、スパイン内でのシナプス分子の量、局在、運動性を定量的に測定することはシナプス機能調整を理解する上で非常に重要である。スパインの大きさは一般的な光学顕微鏡の空間分解能と同程度であるため、使用可能な測定方法に制限がある。そのため、スパイン内におけるシナプス分子動態の定量的な理解に関しては未だに不明な点が多い。

光学顕微鏡による細胞内分子動態測定は、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)や fluorescence correlation spectroscopy (FCS)、そしてそれらに関連した方法によ

って行われることが多い。FRAP は、数十秒から数時間の時間幅でおこる分子交換を測定するのに適している。そのため、スパインにおけるシナプス分子のターンオーバー速度の測定によく用いられてきた。蛍光タンパク質のような小分子についてもスパインで FRAP 測定を行った研究が報告されている。これらの実験では、退色領域がスパイン体積と同程度であり、スパインネックを介した分子拡散が蛍光回復の主要因になる。したがって、スパイン内部の分子拡散を測定するには他の測定法を用いる必要がある。Raster image correlation spectroscopy (RICS)は FCS を拡張した image correlation spectroscopy の一種であり、細胞内領域において、およそ  $0.1 - 100 \mu\text{m}^2/\text{sec}$  の幅広い拡散定数をもつ分子運動を定量的に測定できる方法である。RICS 測定では、ラスタースキャンにより取得した画像の空間相関 (RICS 相関関数) を計算する。ラスタースキャンした画像には距離と時間の情報が含まれるため、その RICS 相関関数を適切な物理モデルでフィッティングすることで拡散速度を推定できる。

細胞内は多くのタンパク質や細胞内小器官が存在する分子密度の高い環境であるため、細胞内と溶液中では、分子の拡散速度は大きく異なる。どのような細胞内構造が分子動態を制御しているかを調べる目的で、異なる分子量をもつ分子の細胞内動態を比較するという方法が用いられてきた。例えば、測定対象の分子の大きさを大きくしていった時に、分子の大きさに従って分子動態が抑制されて行く場合には、その分子の大きさに相当した大きさをもつ網目構造が細胞内に存在することを推定できる。

そこで、本研究ではスパインなどの樹状突起コンパートメント内での分子動態を測定できる新規の光学測定法として RICS に着目し、2 光子 RICS を用いることで分子動態が計測可能であるかを調べた。そして、異なる分子量のプローブを RICS 測定することで分子動態を制限する細胞内構造が存在するかについて調べた。

まず、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と EGFP をタンデムに結合したタンデム 5 量体 (EGFP5) をプローブとして海馬分散培養神経細胞に発現させたところ、両者の局在に違いが観察された。FRAP を行い、EGFP5 の集積部位での蛍光回復を測定したところ、EGFP5 は EGFP と同程度の蛍光回

復を示したので、非特異的吸着が集積の原因ではないことが示された。アクチン重合阻害剤で処理すると EGFP5 の集積は消失した。この結果はアクチン線維が EGFP5 の拡散を抑制している可能性を示唆した。より詳細に EGFP5 の分子動態を調べるために、EGFP5 の 2 光子 RICS 測定を行うことにした。はじめに、本研究で用いた RICS 測定方法が細胞内の EGFP5 の分子動態を FCS と同等に測定できることを細胞体で確認した。次に、EGFP5 を発現した神経細胞の樹状突起内部で RICS 測定を行った。RICS 相関関数を 2 成分拡散モデルでフィッティングすることで、速い拡散成分と遅い拡散成分の拡散定数と、それらの成分比を求めた。EGFP5 の速い分子拡散の拡散定数は、細胞体や樹状突起コンパートメント間で一様であった。この結果から、RICS によって樹状突起内の微小領域においても分子動態計測が可能であると考えた。もし、樹状突起において EGFP5 の拡散を抑制するような細胞内構造があるならば、RICS 測定によって遅い拡散成分の割合が増加すると予想され、そのような不均一性が測定された。また分子拡散抑制は、樹状突起の構造のスケールとは関連性を示さなかった。アクチン重合阻害剤処理によって、遅い拡散成分の割合は減少した。このことはアクチン線維が分子動態制御に関係していることを示唆する。もし、微小空間内での物理的衝突が拡散定数低下の要因であるならば、より大きさの小さい分子ではその効果は小さくなると考えられる。そこで、EGFP を発現させた神経細胞の樹状突起内部で RICS 測定を行った。予想したとおり、EGFP では遅い拡散成分の割合は EGFP5 と比較して小さく、またアクチン重合阻害剤の効果も弱かった。以上の結果は、アクチン線維が分子動態を制御する一要素であることを支持する。

本研究では、RICS が細胞内微小領域での分子動態計測に有用な方法であることを示した。また、神経細胞樹状突起内で RICS 測定を行い、アクチン線維との立体障害により 150kDa 程度の分子の拡散が抑制されることを明らかにした。この結果は、アクチン線維が拡散性分子の分子動態を制御する機能を持ち、機能分子の拡散を制御することで神経細胞の機能を調整している可能性を示唆する。