

[過程－2]

審査の結果の要旨

氏名 小橋一喜

本研究は、神経細胞シナプス機能調整の分子基盤を明らかにするため、2光子 raster image correlation spectroscopy (RICS) を用いて海馬神経細胞樹状突起内部で分子動態測定を行い、下記のような結果を得ている。

1. 蛍光相関分光法 (FCS) と今回構築した 2 光子顕微鏡システムによる RICS 測定を Dextran 70 Kda 溶液、神経細胞の細胞体内に発現させた EGFP、EGFP5 について行い、それぞれの方法で得られる拡散定数を比較した。2 つの方法で同程度の拡散定数が得られることを確かめ、まず 2 光子 RICS 法が比較的大きい細胞内領域で分子拡散計測に使用できることを示した。
2. 赤色蛍光タンパク質 (RFP) と緑色蛍光タンパク質 (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、EGFP5 の樹状突起内での局所的集積が観察された。樹状突起内部で fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) を行い、EGFP5 が EGFP と同程度まで蛍光回復することを観察した。この結果から、非特異的吸着が集積の原因ではないことが示された。
3. EGFP5 を発現させた海馬神経細胞の樹状突起において RICS 測定を行った。その結果、樹状突起領域の異なるサブコンパートメントにおいて異なる相関曲線が得られた。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。より微小なコンパートメントでは遅い拡散成分が主成分として測定された。
4. EGFP5 の速い分子拡散の拡散定数は、樹状突起の形態のスケールと相関せず、また、細胞体や樹状突起内での速い分子拡散の拡散定数と同程度だった。この結果から、RICS によって細胞内の微小領域においても分子動態計測が可能であることが示された。
5. アクチン重合阻害剤の処理によって、EGFP5 の遅い拡散成分の割合は減少した。また、プローブの大きさによる拡散抑制効果を調べるために、EGFP を発現させた海馬神経細胞の樹状突起内部で RICS 測定を行った。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、本論文は、RICS 測定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、樹状突起の異なるサブコンパートメント内で RICS 測定を行い、アクチン線維が拡散障壁となり 150kDa 程度の分子の拡散が抑制されることを明らかにした。本研究はこれまで測定が困難であった樹状突起内での分子動態の理解に重要な貢献をなすと期待され、学位の授与に値するものと考えられる。