

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名		革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
研究開発課題名		多重標識した記憶神経回路の固定透明化脳における高速2光子マッピング法の開発
機関名		国立大学法人東京大学
研究開発	所属 役職	大学院医学系研究科 教授
担当者	氏名	河西 春郎

2. 研究開発成果の内容

① 特異的記憶回路標識法の研究開発

平成 27 年度は、記憶プローブ (AS Probe) の改善のために、増大したスパインが選択的に染まるメカニズムを明らかにする実験を追加し、その機構を明らかにした。また、標識が学習特異的であることを示す追加実験を行い、論文を発表するに至った。

シナプス前部に関しても、また、FRET/FLIM法を用いて活動依存的にシナプス前終末を染色するプローブ (iSLIM) の開発を行い、マウス脳スライス標本において、活性領域を染め分けられることを確認し、こちらも論文発表に至った。

更に、マウス脳スライス標本を用いて、iSLIMを用いたFRET/FLIM法とPSD95の標識を併せたシナプス同定法の検討を行い、シナプスの同定はできるものの、学習が可能な生きてマウス個体への適用には、更なる改善が必要であることがわかってきた。

② 多重的記憶回路の標識法の研究開発

Cre-ER, Tet-OFF或はDD (destabilized domain) 法などを用いて、記憶プローブ (AS Probe) を適宜、短時間で誘導することを実現して、2つの記憶課題に関連したシナプス結合と軸索を別の色で染め分ける技術の開発を目指している。Cre-ER, Tet-off, DD法による目的タンパク質の誘導に要する時間を調べた仕事はこれまでに無いため、誘導時間を検証し、最も短時間で強い誘導のかかる方法を見出すことを目的として、タモキシフェンによるCre-ER法の発現時間の測定を行った。結果、Cre-ER法では、蛋白質発現に1日の遅延があること明らかになった。また、Tet-off系及びDD法については、その改良に取り組んでいるチームが革新脳内にいることがわかり、Tet-off系については2日の遅延があること、DD法については著しい改良が期待されるのでそれを待った方がいいことがわかった。

③ 高速2光子マッピングシステムの研究開発

中核拠点や個別課題における脳透明化法については脳透明化技術を開発している国立研究開発法人理化学研究所の宮脇 PL 及び国立大学法人東京大学の上田個別研究課題担当責任者と協議し、微細構造保存や抗体透過性などについて改良を進めており、当該課題で利用する段階に達した時に、当該研

究目的に則した最善の方法についてご教示頂き、かつ当グループ内で調査・検討することを計画していた。当グループ内での検討・調査は平成28年2月から開始可能となり、必要な機器や、試薬を揃えた。高速2光子顕微鏡を組み上げは予定通り終了していたが、項目①のプロープの作成が律速となり、神経回路が追跡できるような実験への着手はこれからである。従って、参画機関の国立大学法人京都大学の石井研究室にデータを送り、自動画像解析の試験実験を行うステップにも進めなかった。

④ プロジェクトの総合的推進

プロジェクト全体の連携を密としつつ円滑に運営していくため、運営会議や技術検討会の開催等、参画各機関の連携・調整するとともに、革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクトに参画する各機関と積極的に連携・情報共有にあたった。また、P S、P O、P Lとの連携を密にし、助言を仰ぎながらプロジェクト全体の進捗状況を確認しつつ計画の合理化を検討した。プロジェクトで得られた成果については、Nature誌に発表し、各新聞社によって報道された。

光遺伝学・細胞活動測定班の一員として、班長や班員と密に連携し、中核拠点国立研究開発法人理化学研究所の山森班とマーモセットでの共同研究を開始した。