

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300121

研究課題名(和文) 超高速2光子励起顕微鏡による革新的神経細胞観察法の実践

研究課題名(英文) Establishment of evolutionary microscopy on neurons with ultra-fast two-photon microscope

研究代表者

井上 貴文 (Inoue, Takafumi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：10262081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：新規に開発した2光子励起顕微鏡システムを用い多点で同時に蛍光相関分光法(FCS)を適用することにより、1) 神経細胞樹状突起の細胞質中を高速に移動するタンパク質分子の動態を捉えること、および2) 神経細胞の膜電位計測を同時多点で行うことを目的とした。GFP発現プラスミドあるいはGFP融合CamKIIタンパク質発現プラスミドをマウス由来初代培養神経細胞に発現させ細胞質の複数点から蛍光強度変化の記録を10kHz以上の時間解像度で取得しFCS解析することに成功した。また、複数培養神経細胞から同時に活動電位記録を取ることに成功し、神経細胞のシナプス結合の有無および結合の方向性について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to measure dynamics of protein molecules rapidly moving in the cytosol of neuronal dendrites at multiple points simultaneously by means of a newly developed two-photon microscope. I succeeded in recording at multiple points at more than 10 kHz of time resolution from cytosol of primary cultured neurons derived from mouse, in which GFP or GFP-fused CamKII proteins were expressed, and in analyzing by FCS. I was also successful in recording action potentials from multiple cultured neurons, which enabled to analyze synaptic connections between neuron pairs and also direction of synaptic connections.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：分子動態 タンパク質 神経細胞 シナプス 活動電位 膜電位計測

### 1. 研究開始当初の背景

近年、機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) の進歩などにより、個体レベルでの脳神経系の機能解析が飛躍的に進んできたが、fMRI では細胞レベルの解析は困難である。脳神経系は、1000 億個にも及ぶ非常に多様な神経細胞が微細なシナプスを介してお互いに結合していることから、fMRI のような全体的な解析のみではなく、個々の神経細胞レベルでの機能解析がとりわけ必須となっている。例えば、記憶・学習過程の変化は個々の神経細胞の樹状突起上に存在する無数の数  $\mu\text{m}$  の構造物である棘突起上のシナプスにおける機能的・形態的变化の反映である。このような「まるごとの」個体における個々の細胞を可視化するための技術としての、2 光子励起共焦点顕微鏡の実用化は近年の画期的な技術革新であり、生きた脳の中の神経細胞内で起こっていることの理解は格段に進んだ。しかし従来の 2 光子励起顕微鏡は計測速度の限界のために、非常に興味ある領域が手つかずで残されている。

**細胞内分子動態：**神経細胞のシナプスにおける膜タンパク質の挙動はシナプス可塑性研究分野における大きな焦点のひとつであり、近年の蛍光標識・観察技術の進歩にともない多くの知見が集積しつつある。しかしながら膜に結合していない、遊離した機能タンパク質の細胞内での動態については解析が困難なためほとんどわかっていない。これは特に神経細胞樹状突起、更にスパイン内部の様な極小の空間の場合には特にあてはまる。生化学的アプローチ、すなわちタンパク質を細胞の外に取り出して試験管あるいはキュベットの中での挙動を測定して細胞内にある状態を外挿しモデル化せざるを得ない。しかしながら細胞内では個々の遊離タンパク質は満員電車に揺られている様な状態にあると考えられており、実際に細胞内にある状態でのキネティクスの測定が精密なモデルを構成するためには不可欠である。蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy; FCS) は溶液中での一分子の振る舞いを計測する手法で、これを細胞内に適用することにより細胞質内の遊離タンパク質の挙動を追跡できる。しかし従来の FCS 装置は細胞内の一点からしか記録できず、細胞内の様々な部位における機能タンパク質の動態解析を行うには制約があった。2 光子励起顕微鏡を用いて組織深部からの高解像度の蛍光画像を得られるようになって、スパインレベルでのイオンやタンパク質の動態についての知見は多く集まってきている。しかしながら従来型の 2 光子励起顕微鏡は、共焦点顕微鏡に使われるガルバノミラーによるスキャン機構をそのまま利用しており、面あるいは線に沿ったスキャンをせざるを得ず、FCS に必要な数 10 kHz 以上の速度が出ない。

**神経回路多点膜電位計測：**脳の局所神経回路は高密度に集積した神経細胞相互の複雑なシナプス結合により成り立っている。この局所回路の中で神経細胞がどのように協調し、全体として様々なパターンのリズムをつくりだしているのか。少数の指揮者ニューロンが制御する交響楽団形式か、神経細胞相互の連絡により全体のリズムを形成する室内楽形式か、神経回路理論からは様々な仮説が提案されている。これらを検証するために近年カルシウム感受性色素と高速 CCD カメラを用いた研究が行われている。円盤型共焦点装置と高速カメラを組み合わせることにより数 10 フレーム/秒の速度で神経細胞集団のシナプス結合が明らかにされつつあるが、活動電位をカルシウムイメージングで捉えることにより真の単シナプス結合を間接的シナプス結合から分離するに至っていない。

### 2. 研究の目的

我々が開発したランダムスキャン方式 2 光子励起顕微鏡を用い、その高時間分解能により従来の 2 光子励起顕微鏡の限界を打ち破ることを目的とした。細胞内多点 FCS により細胞内遊離タンパク質の動態解析を試みた。また、高速性を生かして電位感受性色素による多点膜電位記録を行い、単一神経細胞の多点の膜電位変化記録を記録することで神経細胞樹状突起における膜電位の空間・時間変化パターンを解析するとともに、更に同期して活動電位を発する複数ニューロンの組み合わせを正確に抽出し、局所神経回路の構造を明らかにすることを目指した。本研究で得られる細胞内局所でのタンパク質のキネティクスの定量的情報は、細胞内の分子情報を積み上げて細胞あるいは組織を計算機上に再現しようとする、システムズバイオロジーを構築してゆくための貴重な情報基盤となり得る。また多点膜電位計測の新しい手法は神経細胞・回路解析により精密な情報をもたらす。

### 3. 研究の方法

ランダムスキャン型 2 光子励起顕微鏡を用い初代培養神経細胞の樹状突起内を高速に移動する遊離型タンパク質の動態を計測する。2 光子励起顕微鏡に FCS を装備することによりタンパク分子の拡散係数を神経細胞内の局所ごとに定量的に測定する。本研究で開発したランダムスキャン型 2 光子励起顕微鏡システムは 100 kHz を超える時間分解能を持ち、細胞内を飛び交う遊離型タンパク質の動態を細胞内の多点から計測できる。更に二分子の会合状態を計測する FCCS 法や、分子状態を高精度に解析出来る蛍光寿命測定法 (FLIM) の実装も行う。これらの方法によりシナプス後部の遊離した機能分子やシナプスと核を結ぶシグナル伝達経路の分子実態を明らかにする。更にこの高速 2 光子励起顕微鏡と電位感受性色素を用い神経細胞内膜

電位分布の多点計測、あるいは神経回路内の多数の神経細胞の同期発火計測を試み、従来不可能だった精度での神経細胞・神経回路の情報処理様式を解明する。

#### 4. 研究成果

**細胞内分子動態:** 同時多点での FCS 計測を可能とするハードウェア及びソフトウェアを立ち上げた。対物レンズ直下に蛍光色素溶液を置き、FCS の同時多点計測が何点まで可能か試みた。その結果、少なくとも 10 点までは Rhodamine 6G あるいは EGFP 分子の拡散の計測を同時に測定できることを確認した。蛍光色素の濃度が高すぎると正確な FCS 計測が不可能になる。細胞内に蛍光タンパク質および蛍光タンパク質融合タンパク質を発現させてその拡散を計測する場合には発現量の制御が鍵となる。通常の発現ベクターを用いると FCS 計測に用いるには発現量が高すぎるので、発現ベクターのプロモータ領域の短縮変異を導入し、発現効率を落とした発現ベクターを何種類か作成した。その結果、FCS 計測が可能な発現量の範囲に収まるベクターを得ることができた。この改変ベクターを最適な発現時間で用いることにより細胞質での FCS 計測が可能となった。

初代培養神経細胞を用いて樹状突起およびスパイン内のタンパク質の FCS 計測を行った。GFP 発現プラスミドあるいは GFP 融合 CamKII タンパク質発現プラスミドをマウス由来初代培養神経細胞に発現させ細胞質の複数点から蛍光強度変化を 10kHz 以上の時分解像度で取得することに成功した。自己相関関数よりタンパク質の細胞局所での拡散係数が異なることを見いだした (投稿準備中)。

**神経回路多点膜電位計測:** 膜電位感受性色素を何種類か試し、DiO と dipicrylamine の組み合わせによる方法を採用した。初代培養神経細胞に導入し、パッチクランプ法と組み合わせ、電流注入により生じた活動電位を蛍光変化として捉えられることを確認した。次に顕微鏡視野中の複数の神経細胞から蛍光変化を 2 kHz 以上の速さで同時に計測し、自発的発火を複数の神経細胞から計測することに成功した (図)。神経細胞の活動

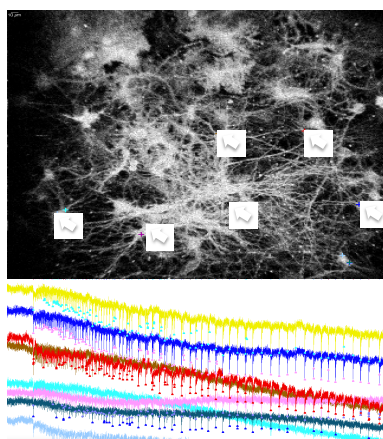


図: 培養神経細胞の同時多点膜電位計測  
上: 膜電位感受性色素の蛍光画像  
下: 各点からの蛍光強度変化 (活動電位は下向きに表示されている)

することに成功した (図)。神経細胞の活動

電位の発火タイミングを相互相関をとることにより、シナプス結合の有無および方向性の同定することに成功した (投稿準備中)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

Haruki Odaka, Satoshi Arai, Takafumi Inoue, Tetsuya Kitaguchi

Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with expanded dynamic range for dual-color imaging  
PLOS ONE, 査読有, in press

Yoshiaki Takei, Atsushi Murata, Kento Yamagishi, Satoshi Arai, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue, Shinji Takeoka

Intracellular click reaction with a fluorescent chemical  $Ca^{2+}$  indicator to prolong the cytosolic retention

Chemical Communications, 査読有,

49:7313-7315 (2013),

doi:10.1039/C3CC42489H

Yu-Chun Lin, Benjamin Lin, Pawel

Niewiadomski, Hideki Nakamura, Siew

Cheng Phua, John Jiao, Takafumi Inoue,

Andre Levchenko, Rajat Rohatgi, Takanari

Inoue

Chemically-inducible diffusion trap at cilia

(C-IDTc) reveals molecular sieve-like barrier

Nature Chemical Biology, 査読有,

49:7313-7315 (2013),

doi:10.1038/nchembio.1252

Satya Ranjan Sarker, Yumiko Aoshima,

Ryosuke Hokama, Takafumi Inoue, Keitaro

Sou, Shinji Takeoka,

Arginine-based cationic liposomes for

efficient in vitro plasmid DNA delivery with

low cytotoxicity

International Journal of Nanomedicine, 査読

有 2013:8:1361-1375 (2013),

doi:10.2147/IJN.S38903

Sayako Tamamushi, Takeshi Nakamura,

Takafumi Inoue, Etsuko Ebisui, Kotomi

Sugiura, Hiroko Bannai, Katsuhiko

Mikoshihira

Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is

predominantly involved in agonist-induced

$Ca^{2+}$  signaling in Bergmann glia

Neuroscience Research, 査読有, 74:32-41

(2012), doi:10.1016/j.neures.2012.06.005

Hikdeki Nakamura, Hiroko Bannai, Takafumi

Inoue, Takayuki Michikawa, Masaki Sano,

Katsuhiko Mikoshihira

Cooperative and stochastic calcium releases

from multiple calcium puff sites generate

calcium microdomains in intact HeLa cells

The Journal of Biological Chemistry, 査読有,

287:24563-24572 (2012),

doi:10.1074/jbc.M111.311399

( )

〔学会発表〕(計 21 件)

武井 義明, 村田 篤, 山岸 健人, 新井 敏,  
中村 秀樹, 井上 貴文, 武岡 真司  
生細胞内クリック反応を利用した Ca<sup>2+</sup>イ  
ンジケーターの開発

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

Intracellular click reaction with a fluorescent  
chemical Ca<sup>2+</sup> indicator to prolong its  
cytosolic retention

日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 3 月  
27-30 日(2014)

Hideki Nakamura, Takafumi Inoue

FRAP analysis with boundary value updating  
is a robust method of diffusion kinetics  
quantification

58th Annual Meeting of Biophysical Society,  
San Francisco, February 15-19 (2014)

Takanari Inoue, Yu-Chun Lin, Benjamin Lin,  
Siew Cheng Phua, John Jiao, Andre

Levchenko, Pawel Niewiadomski, Rajat

Rohatgi, Hideki Nakamura, Takafumi Inoue

Illuminating passive permeability barrier of  
primary cilia using novel diffusion trap  
technique

57th Annual Meeting of Biophysical Society,  
Philadelphia, February 2-6 (2013)

長谷川 里奈, 田村 泰嗣, 阿部 洋, 常田  
聡, 井上 貴文

神経細胞樹状突起における内在性 mRNA  
の検出および動態解析

第 3 5 回日本神経科学大会, 名古屋, 9 月  
18-21 日(2012)

青島 由美子, Satya Ranjan Sarker, 井上 貴  
文, 武岡 真司

カチオン性アミノ酸型脂質リポソームに  
よる神経細胞への遺伝子導入の評価

第 33 回日本バイオマテリアル学会大会,  
京都, 11 月 21-22 日 (2011)

S.Morteza Heidarinejad, 井上 貴文

ランダムスキャン 2 光子励起顕微鏡によ  
る多点同時 FCS の試み

第 8 回バイオオプティクス研究会、理研シ  
ンポジウム「蛍光相関分光と情報伝達

8」合同シンポジウム, 北里大学相模原校  
舎, 相模原市, 12 月 16-17 日 (2011)

〔その他〕

ホームページ等

<http://inouelab.biomed.sci.waseda.ac.jp>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

井上 貴文 (INOUE TAKAFUMI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号 : 10262081

研究者番号 :

(2) 研究分担者