

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750155

研究課題名(和文) 高次機能蛍光プローブの開発に基づく、メゾスコピック脳機能イメージング手法の確立

研究課題名(英文) Visualization of mesoscopic brain dynamics using novel fluorescence probes

研究代表者

浅沼 大祐 (Asanuma, Daisuke)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10611204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の神経ネットワーク内でどのように情報が処理されているのかを明らかにする上で、特定の細胞群における細胞活動を可視化する手法の開発は必須である。本研究では有機小分子蛍光プローブ技術と遺伝子工学技術を組み合わせた研究アプローチに基づいて2つの蛍光可視化手法を開発した。カルシウムダイナミクスの細胞選択的な可視化手法：レポーター酵素により機能化する蛍光プローブを開発し、細胞選択的にカルシウムダイナミクスを可視化することに成功した。シナプス小胞放出ダイナミクスに着目した神経活動の可視化手法：細胞選択的に標識可能な酸性pH蛍光プローブを開発し、神経活動を可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To reveal how neurons communicate with each other in neural networks of the brain, it is essential to develop imaging methods for selectively visualizing cellular activities in cell groups of interest. Here, I have constructed two such cell-type selective imaging methods by developing small-molecular fluorescence probes which are functionalized in target cells using genetic engineering techniques. (i) Method to visualize cell-selective calcium dynamics. I have developed calcium ion imaging probes which are functionalized by reporter enzyme and, using the optimal probe, have successfully visualized calcium dynamics in a cell-selective manner. (ii) Method to visualize synaptic transmission dynamics. I have developed acidic-pH-activatable probes which can monitor synaptic vesicle release by being conjugated to neural protein of interest using HaloTag labeling technology and, with the optimal probe, have successfully visualized neural activities.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：蛍光イメージング 蛍光プローブ 脳機能

### 1. 研究開始当初の背景

脳における働きを理解する上で、脳回路の機能単位となる神経ネットワーク内でどのように情報が処理されているのかを明らかにする必要がある。しかしながら、これまでに fMRI によりマクロな脳機能解析が、電気生理学的手法からミクロな神経細胞機能解析が行われているが、そのメゾ (中間的) スケールとなる神経ネットワークにおいては技術的な欠如により、それぞれの神経細胞間でどのように情報が伝達されるのか統合的に解析することができない。例えば、Fura-2 や Fluo-3 などのカルシウム蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法は神経活動に伴ってダイナミックに変化する細胞内カルシウムイオン濃度を可視化し、神経細胞で生じる速いカルシウムシグナルを追従可能であるが、多種多様な神経細胞・グリア細胞が存在する脳内では特定の細胞のみへの蛍光プローブの導入は難しく標的とする神経活動を捉えることはできない。そこで本課題では、遺伝子工学的に細胞選択的に機能化する有機小分子蛍光プローブの開発に基づき、特定の細胞群の活動を選択的に可視化する基盤技術の開発を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、有機小分子蛍光プローブ技術と遺伝子工学技術を組み合わせることにより、特定の細胞群における活動を可視化する基盤技術の開発を目的とする (図 1)。具体的には、標的細胞にレポーター酵素やタグタンパク質などを選択的に発現させ、それらの細胞においてのみ機能化する蛍光プローブを開発・応用する戦略である。

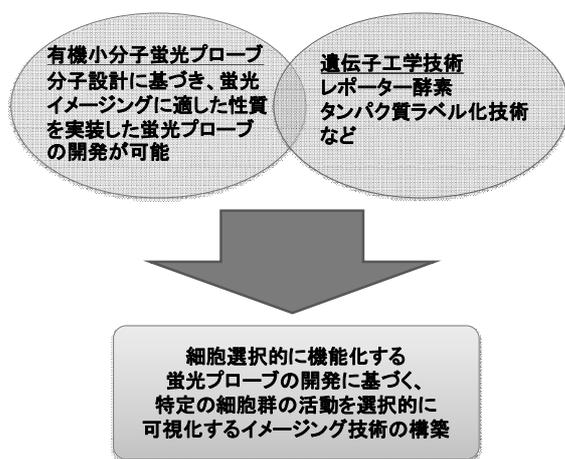


図 1. 本研究の目的の概略

### 3. 研究の方法

本課題では申請者が着想した以下 2 つの手法を実現する有機小分子蛍光プローブの開発について実証的に進める：(1) カルシ

ウムダイナミクス of レポーター酵素発現細胞に選択的な可視化手法、(2) HaloTag タンパク質を利用したシナプス小胞放出ダイナミクスに着目した神経活動の可視化手法。本課題で考案する基盤技術を確立する上で、開発した蛍光プローブについて *in vitro* 実験により基礎特性の評価および問題点の洗い出しを行い、さらに細胞実験で蛍光プローブの機能化の細胞選択性などの評価を行い、提案コンセプトを実証するものであるかどうか精査する。また、蛍光プローブの機能性が十分でない場合は、各項目の結果を順次蛍光プローブの分子設計へとフィードバックする計画である。

### 4. 研究成果

(1) カルシウムダイナミクス of レポーター酵素発現細胞に選択的な可視化手法：神経活動に付随する細胞内カルシウムイオン濃度変化を可視化することで神経活動を観察することが可能である。本研究では、レポーター酵素による酵素反応を受けて機能化するカルシウム蛍光プローブの開発を目指した。本課題で提案する蛍光プローブは、レポーター酵素との反応前ではカルシウムイオンの有無に関わらず無蛍光性であるが、レポーター酵素との反応後はカルシウムイオンと反応することにより強蛍光性となり、カルシウムイオンを可視化するものである。

研究提案時に分子設計を行っていた蛍光プローブ RhoCa1 を全 17 ステップで合成し、*in vitro* における蛍光特性を評価した。しかしながら、本蛍光プローブはカルシウムイオンに対する蛍光応答特性が望ましくなかった。本実験結果を分子設計にフィードバックし、蛍光団とカルシウムイオン反応部位を結びリンカーの長さを変えた 2 種類の蛍光プローブ (RhoCa 2 および 3) を開発した。その結果、開発した蛍光プローブ RhoCa2 および 3 について、レポーター酵素との反応生成物がカルシウムイオンに反応して蛍光強度が顕著に増大することを *in vitro* において確認した。

さらに、カルシウムイオン応答時により明るい蛍光特性を示した RhoCa3 を基に、蛍光プローブの細胞応用のためアセトキシメチル (AM) 化を施した RhoCa3, AM を開発した。本蛍光プローブをレポーター酵素発現/非発現 HEK293 細胞に応用したところ、レポーター酵素を発現する HEK293 細胞において選択的に ATP で誘導したオシレーションするカルシウムシグナルの可視化に成功した (図 2)。この結果は、本研究の提案するコンセプトである細胞選択的にカルシウムダイナミクスを可視化できることを実証するものである。

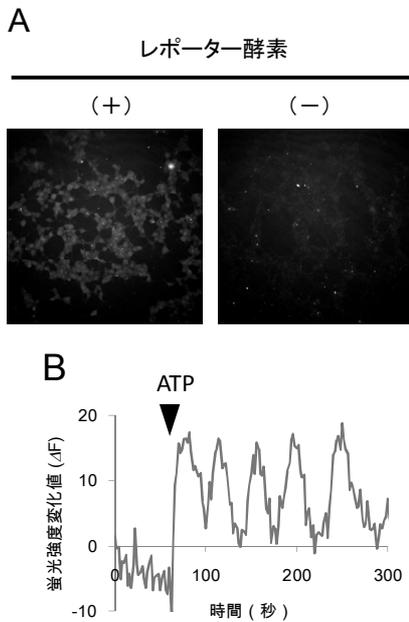


図 2. 細胞選択的カルシウムイメージング.  
 (A) RhoCa3, AM を負荷したレポーター酵素発現/非発現 HEK293 細胞の蛍光イメージング画像. レポーター酵素発現 HEK293 細胞において顕著な蛍光が観察された. (B) RhoCa3 によるレポーター酵素発現 HEK293 細胞におけるカルシウムシグナルの可視化. ATP を加えることにより、細胞におけるカルシウムオシレーションを惹起した.

(2) HaloTag タンパク質を利用したシナプス小胞放出ダイナミクスに着目した神経活動の可視化手法: 神経活動の際に神経伝達物質の放出を担うシナプス小胞放出現象は神経情報伝達の基本機能単位である。本研究ではシナプス小胞放出現象に着目し、そのダイナミクスを可視化する蛍光プローブの開発を行った。シナプス小胞放出ダイナミクスの可視化の原理として、神経伝達時にシナプス小胞内で生じる pH 変化の検出を目指した(図 3)。

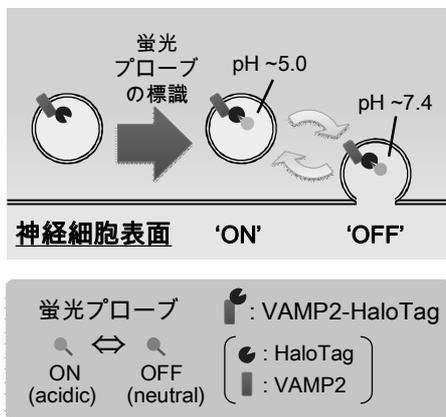


図 3. 酸性 pH 検出蛍光プローブを利用した

シナプス小胞放出ダイナミクスの可視化戦略. VAMP2-HaloTag 融合タンパク質を発現した神経細胞に蛍光プローブを負荷して、HaloTag タンパク質を介して VAMP2 に蛍光プローブを標識する. 標識された蛍光プローブはシナプス小胞内の pH 環境変化にตอบสนองして蛍光特性を変化する.

通常シナプス小胞内は酸性 (pH 5.0 程度) であるが、シナプス小胞放出時には中性 (pH 7.4 程度) となる。さらに、シナプス小胞はその後再生成され、その内部はプロトンポンプにより再酸性化されると考えられている。本課題において蛍光プローブによりこれらの pH 変化を蛍光変化として捉えることでシナプス小胞の放出ダイナミクスを可視化できると考えた。また、その際に蛍光プローブをシナプス小胞にターゲティングするため、蛍光プローブをタグ化するタンパク質としてシナプス小胞に局在する VAMP2 分子を選択した。

神経活動時におけるシナプス小胞内の pH 変化を大きなダイナミックレンジで捉えるため、pH 感受性を種々に変化させた 5 種類の酸性 pH 検出蛍光プローブを開発した。この際、蛍光プローブの分子設計としてその分子構造に含まれるピペラジンの N-置換基の電子吸引性・供与性を変化させることで、蛍光プローブの pH 感受性を種々に変化させることに成功した。これらの蛍光プローブの蛍光特性を精査した結果、RhP-EF (図 4) は pH 7.4 から pH 5.0 への環境変化で最大の蛍光強度増大率 (50 倍以上) を示すことを明らかにした (図 5)。また、RhP-EF の外界 pH 変化に対する蛍光変化の可逆性について調べたところ、その蛍光変化は非常に良い可逆性を示した (図 6)。この結果は、シナプス小胞内におけるサイクリックな pH 変化を信頼性高く測定できることを示唆するものである。

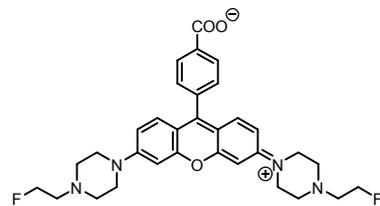


図 4. RhP-EF の化学構造式

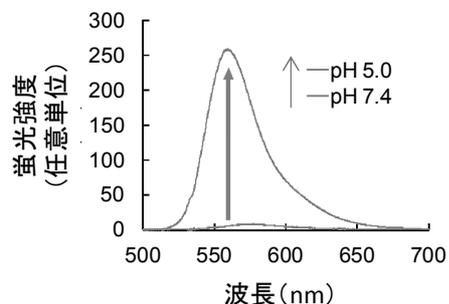


図 5. RhP-EF の蛍光スペクトル. リン酸ナト

リウムバッファー (200 mM) を用いて測定を行った。

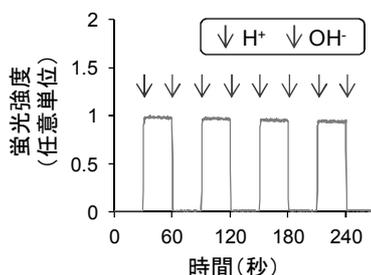


図6. RhP-EF の外界 pH 変化に対する蛍光変化の可逆性. ここでは、測定系に酸と塩基を30秒毎に交互に加えて、外界 pH を7.2 と3.1をサイクリックに変化するようにした。

また、光退色耐性に優れるローダミン色素を母核とした RhP-EF は長時間の励起光照射下においても非常に安定であり、安定的な神経活動計測を実現する上で必須な性質を実装していることも明らかにした。

さらに、HaloTag ラベル化技術を利用して RhP-EF をシナプスタンパク質 VAMP2 に標識することにより、蛍光プローブのシナプス小胞へのターゲティングに成功した。その際、RhP-EF に HaloTag リガンドを共有結合させた蛍光プローブを合わせて開発した。蛍光プローブを標識した海馬培養神経細胞において電気刺激により神経活動を惹起させたところ、神経活動に付随するシナプス小胞内の pH 変化を蛍光変化として捉えることで神経活動を可視化することに成功した (図7) (本成果は雑誌論文1にて発表)。

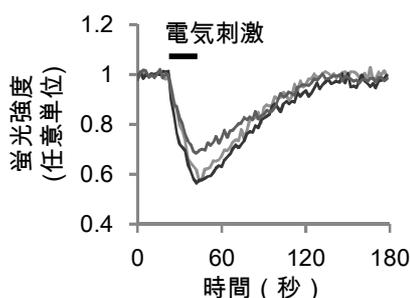


図7. シナプス小胞放出ダイナミクスの可視化. 20-40秒の間に神経活動を惹起するよう電気刺激を加えた。ここでは、観察視野内に含まれた代表的な3つのシナプスにおける蛍光強度変化を記載した。

#### 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 1 件)

1. Asanuma D, Takaoka Y, Namiki S,

Takikawa K, Kamiya K, Nagano T, Urano Y & Hirose K. Acidic-pH-activatable fluorescence probes for visualizing exocytosis dynamics. *Angew. Chem. Int. Ed.* accepted (2014) **53**, 6085-6089. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

1. 浅沼大祐, 高岡洋輔、並木繁行、長野哲雄、浦野泰照、廣瀬謙造. 酸性環境検出蛍光プローブによるエキソサイトーシスダイナミクスの可視化. 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 2013年9月29日, 名古屋大学 (愛知県) .
2. 浅沼大祐, 高岡洋輔、並木繁行、長野哲雄、浦野泰照、廣瀬謙造. エキソサイトーシスダイナミクスを可視化する酸性環境検出蛍光プローブ. 2013年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ, 2013年8月31日, 名古屋国際会議場 (愛知県) .
3. 浅沼大祐, 高岡洋輔、並木繁行、長野哲雄、浦野泰照、廣瀬謙造. エキソサイトーシスダイナミクスを可視化する酸性環境検出蛍光プローブ. 第8回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 2013年5月31日, 赤レンガ倉庫 (神奈川県) .
4. Asanuma D, Takaoka Y, Namiki S, Takikawa K, Kamiya K, Nagano T, Urano Y & Hirose K. Acidic-pH activatable fluorescence probes for monitoring exocytosis dynamics. 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月21日, 福岡国際会議場 (福岡県) .
5. 浅沼大祐, 高岡洋輔、並木繁行、長野哲雄、浦野泰照、廣瀬謙造. 生体内酸性 pH を検出する新規蛍光プローブの開発と応用. 筋生理の集い, 2012年12月22日, 東京慈恵会医科大学 (東京都) .
6. 浅沼大祐, 高岡洋輔、並木繁行、長野哲雄、浦野泰照、廣瀬謙造. エキソサイトーシスのダイナミクスを可視化する酸性環境検出蛍光プローブ. 生理学研究所研究会「超階層シグナル伝達研究の新展開」, 2012年10月2日, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県) .

[その他]

ホームページ

<http://www.neurobiol.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅沼 大祐 (ASANUMA DAISUKE)  
東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10611204

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし