

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 24日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650066

研究課題名（和文） 多点同時蛍光相関分析法による神経細胞樹状突起内の分子動態の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular dynamics in neuronal dendrites by simultaneous multi-point fluorescence correlation spectroscopy

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。

研究成果の概要（英文）：This research project aimed to measure dynamics of protein molecules rapidly moving in cytosole 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 time of resolution from cytosol of primary cultured neurons derived from mouse, in which GFP or GFP-fused CamKII protein was expressed, and in analyzing by FCS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	600,000	3,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学

キーワード：分子・細胞神経科学

1. 研究開始当初の背景

シナプス機能を主役のひとつである伝達物質受容体のシナプス局在のメカニズムは、膜タンパク質としての膜中での拡散速度という切り口から大きく理解が進んだ。受容体タンパク質を蛍光標識して一分子レベルの動態解析によりシナプス内・外での拡散速度の計測という定量的検討によりシナプス可

塑性を支える分子基盤の一端が明らかになってきている。膜タンパク質の動態解析には 0.1-1 Hz 程度の時間解像度があればよく、CCD カメラによる画像解析によりこの分野の研究は進んだ。これに対し細胞質内の浮遊タンパク質は拡散速度の桁違いの大きさのため直接的な動態の計測は困難だった。シナプス機能を司る浮遊タンパク質としては

CamKII や小分子 G タンパク質系が注目されている。近年これらの活性を捉える FRET プローブが開発され、これらタンパク質の拡散とともに活性の空間動態が報告されたが、多くの機能タンパク質の動態が未知のままである。細胞内シグナル伝達経路は主にタンパク質同士の結合強度という生化学的指標で議論されてきたが、細胞内局所での動的に変動するタンパク質の濃度、拡散速度や重合状態を理解できなければ正しく細胞内で起こっている現象を捉えたことにならない。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。特に神経細胞は細胞内の機能局在性が高く、同時多点からの FCS 解析は非常に多くの情報をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

本研究では新規に開発した二光子励起顕微鏡システムを用いカルモジュリン、CamKII、カルシウム結合タンパク質 (calbindin 等) などシナプス機能に重要な機能分子のスパイン内外での動態を検出する。また、シナプス膜タンパク質の細胞内ドメインを切断することにより核まで到達するシグナル伝達系が提唱されているが、これら分子の動態を実際に検出することは困難であった。これら ErbB4 や amyloid precursor protein (APP) に代表される、シナプスから核へ情報伝達するシグナル分子の実態を FCS により捉えることを目的とした。私の開発したランダムアクセス型 2 光子励起顕微鏡システムは 10kHz 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することが可能となる。

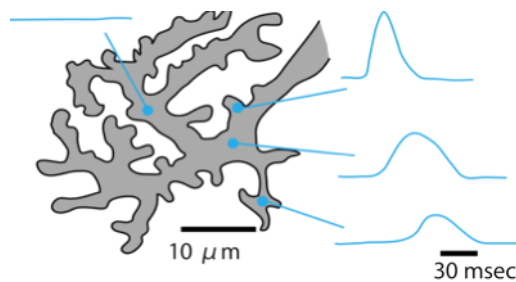
3. 研究の方法

マウスより初代培養海馬神経細胞を調製し蛍光タンパク質融合タンパク質発現プラスミドをリポフェクション法により発現させた。

ランダムスキャン方式の 2 光子励起顕微鏡システムを整備した。本方式は通常の 2 光子励起顕微鏡で使われるガルバノミラーによる XY 両軸のスキャンではなく、直交する 2 つの AOD デバイスによる XY スキャンを採用することによって、従来型では不可能であったランダムスキャンが可能で、これにより非常に高速な (数 10 kHz 以上) 観測が可能となる。従来型で高速にスキャンするために

はラインスキャンモードを用いる必要があり、これにより数 k Hz の時間分解能が出せるが、2 次元的な広がり犠牲になる。AOD によるスキャン方式では 2 次元空間上の複数の点から測定できるので、多数のスパインおよび樹状突起中の情報を収集できる。またランダムスキャン方式により、必要最小限のスポットにのみ励起光を照射するので、従来型の XY スキャンあるいはラインスキャンの場合に大きな問題であった細胞のダメージが大きく軽減される。また、記録部は光電子増倍管を光子計数モードで動作させるので熱ノイズをキャンセルすることができ、低ノイズで記録を可能とした。ランダムスキャン型二光子励起顕微鏡の特性を生かして蛍光相関分光法 (FCS) を装備することにより樹状突起内を高速に移動する遊離型タンパク質の動態の計測を可能とした。

AOD デバイスの制御や光子計数器からの読み取りなどハードウェアの制御、計測のためにソフトウェアを構築した。



スパイン内外でのランダムスキャン

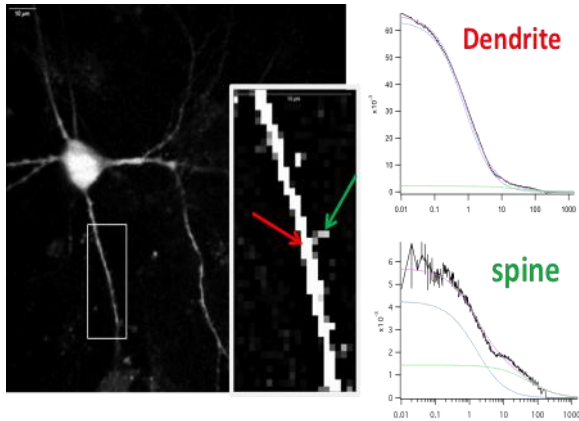
4. 研究成果

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 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。通常が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



培養神経細胞樹状突起とスパイン内の FCS 記録 (GFP)

質の複数点から蛍光強度変化を 10kHz 以上の時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。

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 7 件)

- ① 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, in press
- ② 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, in press, doi:10.1038/nchembio.1252
- ③ Kristina Leuner, Wei Li, Michelle D. Amaral, Stephanie Rudolph, Gaston Calfa, Anita M. Schuwald, Christian Harteneck, Takafumi Inoue, Lucas Pozzo-Miller
Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca^{2+} -permeable TRPC6 channels
Hippocampus, 査読有, 23:40-52 (2013), doi:10.1002/hipo.22052
- ④ 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

- ⑤ Sayako Tamamushi, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, Etsuko Ebisui, Kotomi Sugiura, Hiroko Bannai, Katsuhiko Mikoshiba
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
- ⑥ Hikideki Nakamura, Hiroko Bannai, Takafumi Inoue, Takayuki Michikawa, Masaki Sano, Katsuhiko Mikoshiba
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
- ⑦ Kazumi Fukatsu, Hiroko Bannai, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba
Lateral diffusion of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in Purkinje cells is regulated by calcium and actin filaments
Journal of Neurochemistry, 査読有, 114:1720-1733 (2010), doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06885.x

[学会発表] (計 3 件)

- ① 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)
- ② 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 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 9 月 18-21 日(2012)
- ③ S.Morteza Heidarnejad, 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
/inouelab-web/](http://inouelab.biomed.sci.waseda.ac.jp/inouelab-web/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 貴文 (INOUE TAKAFUMI)

早稲田大学・先進理工学研究科・教授

研究者番号：10262081

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：