

## 二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法によるシグナル分子活性計測 Quantitative Measurements of the Activity of Signaling Molecules by Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

村 越 秀 治

Hideji Murakoshi

自然科学研究機構 生理学研究所, 脳機能計測・支援センター

**要 旨** 近年, 2光子励起蛍光顕微鏡が普及したことにより, 脳組織深部においてもシナプス等の微小構造を高解像度で観察することが可能になった. しかしながら, スパイン内部で起こるシグナル伝達については, タンパク質活性やタンパク質間相互作用を直接観察する方法がなかったため, 殆ど明らかにされてこなかった. しかし最近, 2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法 (2pFLIM) を用いた蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の計測の技術進歩により, スパインや樹状突起内部で起こる様々な生化学反応を画像化し観察することが可能になりつつある. 我々はこの方法を用いて, 海馬組織中のスパイン内で低分子量 G タンパク質 Rho GTPase の活性化を可視化することに成功した. 本稿では2光子蛍光寿命イメージングの原理とシグナル分子活性定量の方法, 及び, この方法を用いた海馬スライス神経細胞シナプス内での Cdc42 と RhoA の活性化イメージングについて紹介したい.

**キーワード**: 2光子顕微鏡, 蛍光寿命イメージング, 低分子量 G タンパク質

### 1. はじめに

二光子励起蛍光顕微鏡は, 近年各顕微鏡メーカーが販売を開始したことにより広く使われるようになった. この顕微鏡の特徴は長波長の近赤外パルスレーザー (Ti:sapphire や Yb:YAG 結晶を用いたものがよく使われる) を励起に使用することによって, 組織深部の細胞構造等を高解像度で取得できることである (図 1)<sup>1,2)</sup>. この方法では, 組織浸透性の高い長波長 (700~1100 nm) レーザーで目的の蛍光分子 (例えば細胞に導入した蛍光分子) を励起する. レーザーを集光させて2つの光子をほぼ同時に蛍光分子に吸収させることにより, 焦点からの距離の4乗に反比例して減衰する励起スポット (1~2 μm 程度) を得ることができるため, 焦点以外からの背景光をなくすることができる. 4乗に反比例する理由は, レーザーの集光効果と非線形効果 (2光子励起確率が励起光子密度の2乗に比例する) の2要因によるものである. この顕微鏡法によって, 例えば生きた個体マウスにおいて, 緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein : GFP) を発現した神経細胞やグリア細胞の構造を詳細に観察することができるようになり, 様々な知見が得られてきている. また, 2光子蛍光顕微鏡に蛍光寿命を測定するための機能を付加することにより, 組織深部で細胞に発現させた GFP から, 温度や分子間相互作用といった情報を画像化することもできる<sup>3)</sup>. この方法を2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法 (2-photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy : 2pFLIM) と呼ぶ

(図 1). この方法を用いることにより, 形態観察だけでなく細胞内部で起こるシグナル伝達などの生化学反応を観察することが, 組織深部においてもできるようになった.

### 2. 時間相関単一光子計数法による2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法

蛍光寿命とは, 励起光により蛍光分子が高いエネルギー状態に遷移してから蛍光光子を放出するまでの時間である. よく勘違いされるが, 蛍光寿命は蛍光退色 (蛍光発色団が不可逆的に壊れる) とは全く異なる現象である<sup>3)</sup>. 蛍光寿命は2光子蛍光顕微鏡に光子到着時間を測定するための FLIM ボードを付加することにより, 比較的簡単に計測できる (図 1). すなわち, 2光子励起単一パルスによる励起と細胞からの蛍光光子の放出の時間差 (蛍光寿命) を何度も繰り返し計測する (時間相関単一光子計数法). この測定をサンプル面でレーザーを走査しながら繰り返すことにより, 各ピクセルで得られた蛍光寿命をヒストグラムにする. 蛍光光子の放出は確率的に起こるので, 指数関数的に減衰するヒストグラムを各ピクセルがもつことになる. ここで, ヒストグラムの時定数が蛍光寿命である. 蛍光分子は固有の蛍光寿命を持っており, 別の蛍光分子が 10 nm 以下程度の近傍に存在し蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer : FRET ; 用語解説参照) を起こしている場合や, 温度, pH, イオン濃度といった外部環境によって変化する. つまり, 蛍光寿命を各ピクセルで測定することにより, 蛍光分子の外部環境変化の情報を画像化することができる<sup>4)</sup>. 具体的には, 各ピクセルが指数関数のヒストグラムを持つので, 式 (1)

〒 444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中 38  
2015年3月25日受付

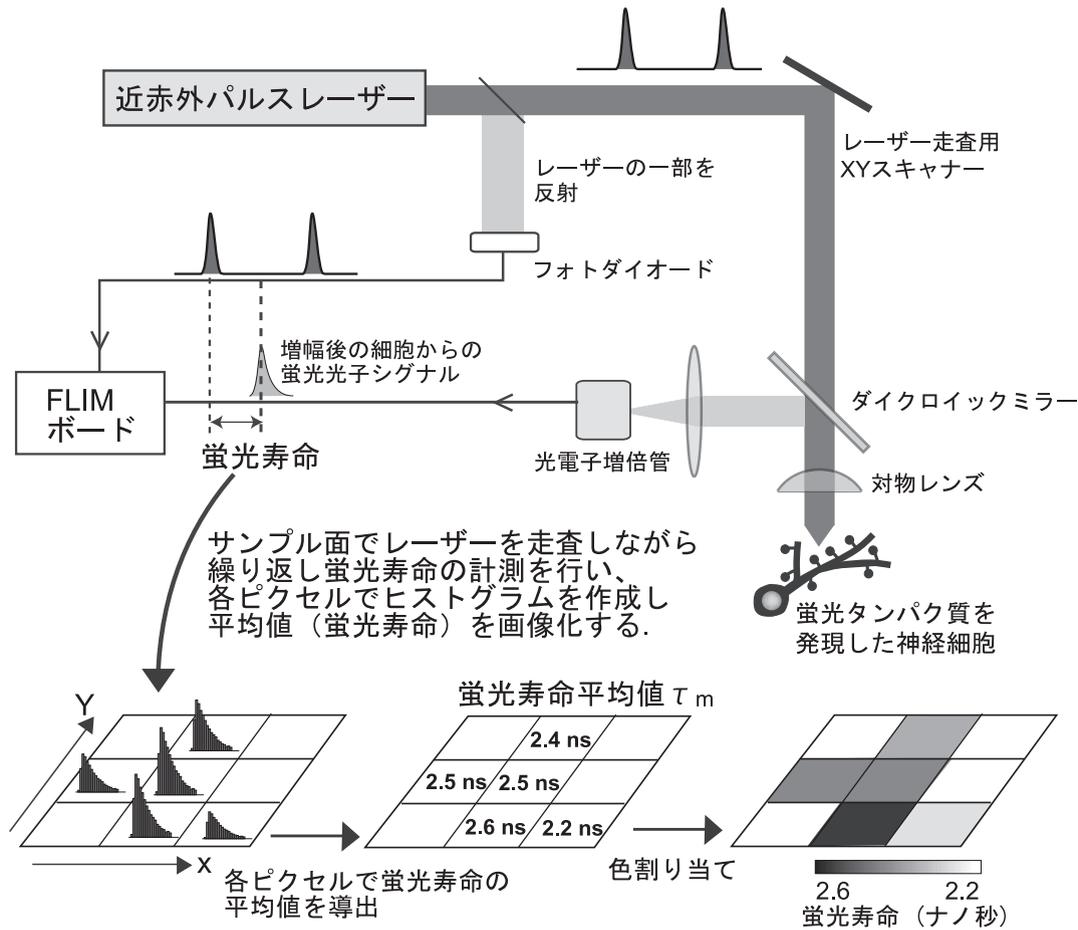


図1 2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡の装置構成と蛍光寿命イメージの構築。

により、各ピクセルでの蛍光寿命の平均値 ( $\tau_m$ ) を求めて画像化する。ここで、 $t$  は励起と細胞からの蛍光光子の放出の時間差、 $t_0$  はオフセット時間、 $F$  は蛍光寿命ヒストグラムの関数である。

$$\tau_m = \frac{\int dt \cdot tF(t)}{\int dt \cdot F(t)} - t_0 \quad (1)$$

### 3. カーブフィッティングによる結合成分の定量

蛍光寿命カーブをフィッティングすることにより、分子間相互作用 (FRET を起こしている成分) を定量化することができる。例えば、細胞内に発現している GFP のある成分が赤色蛍光タンパク質 (RFP) の近傍に存在しており、FRET を起こしているとする。この場合、GFP の蛍光寿命は短くなるので<sup>3)</sup>、蛍光寿命カーブは FRET を起こしていないドナーと起こしているドナーの2成分の蛍光寿命の混合になる (図2)。すなわち、2成分の指数減少関数でフィットできる。しかしながら、励起に用いているレーザーパルスは完全なデルタ関数ではなくガウス関数なので、2成分の“Exponentially modified Gaussian function”<sup>5)</sup> でよくフィットできる (式2)。ここで、 $\text{erfc}$  は相補誤差関数、 $\tau_g$  はガウス形の装置応答関数

(IRF : Instrument Response Function) の標準偏差、 $t_0$  はオフセット時間、 $\tau_D$  と  $\tau_{AD}$  はそれぞれドナーと FRET を起こしているドナーの蛍光寿命の時定数である。 $P_D$  と  $P_{AD}$  はそれぞれの係数であるので、 $P_{AD}/(P_D + P_{AD})$  がアクセプターに結合

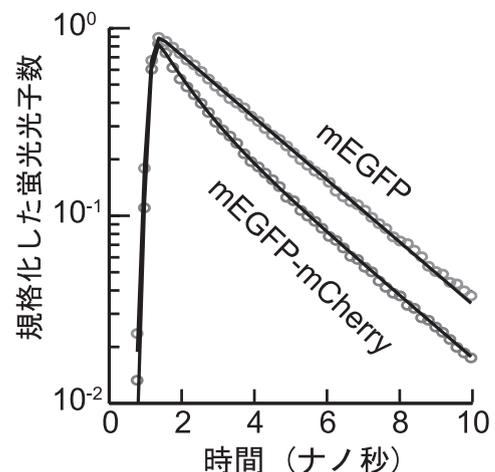


図2 蛍光寿命カーブ。HeLa細胞にmEGFPまたはmEGFPとmCherryをタンデムに繋いだmEGFP-mCherryを発現させ、蛍光寿命を測定した。黒線はフィッティングカーブ。

しているドナー成分となる。  $\tau_G$ ,  $\tau_D$ ,  $t_0$ ,  $t$  はあらかじめ決めておくことができるので、フィッティングのパラメーターは  $P_D$  と  $P_{AD}$  のみになる。

$$F(t) = P_D \exp\left(\frac{\tau_G^2}{2\tau_D^2} - \frac{t-t_0}{\tau_D}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{\tau_G^2 - \tau_D(t-t_0)}{\sqrt{2}\tau_D\tau_G}\right) + P_{AD} \exp\left(\frac{\tau_G^2}{2\tau_{AD}^2} - \frac{t-t_0}{\tau_{AD}}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{\tau_G^2 - \tau_{AD}(t-t_0)}{\sqrt{2}\tau_{AD}\tau_G}\right) \quad (2)$$

一方で、シナプス（用語解説参照）のような微小な領域からのシグナルは非常に小さい（数百光子程度）ので、式2ではカーブフィッティングがうまくできないことも多い。そこで、以下のように式3を用いて、フィッティングを使わずに FRET を起こしている GFP 成分を導出する方法もよく使われる<sup>6)</sup>。

$$P_{AD} = \frac{\tau_D(\tau_D - \tau_m)}{(\tau_D - \tau_{AD})(\tau_D + \tau_{AD} - \tau_m)} \quad (3)$$

式3は次のように導出できる。蛍光寿命カーブが二成分（非結合 GFP と FRET を起こしている GFP が共存）からなる場合、蛍光寿命の平均値は式4のように書くことができる。

$$\tau_m \sim \frac{\int t(P_D e^{-t/\tau_D} + P_{AD} e^{-t/\tau_{AD}}) dt}{\int (P_D e^{-t/\tau_D} + P_{AD} e^{-t/\tau_{AD}}) dt} = \frac{P_D \tau_D^2 + P_{AD} \tau_{AD}^2}{P_D \tau_D + P_{AD} \tau_{AD}} \quad (4)$$

また、

$$P_D + P_{AD} = 1 \quad (5)$$

であるので、式4、5より式3が得られる。

式4の変形は2つの積分公式（式6、7）より簡単に導出できる。

$$\int_0^\infty x e^{-ax} dx = \frac{1}{a^2} \quad (a > 0) \quad (6)$$

$$\int_0^\infty e^{-ax} dx = \frac{1}{a} \quad (a > 0) \quad (7)$$

式3で  $\tau_D$  と  $\tau_{AD}$  は定数（あらかじめ実験により決定しておくことができる）なので、 $\tau_m$  を決めてしまえば、 $P_{AD}$  をフィッティングせず求めることができる。スパイン（用語解説参照）のような小さな領域ではシグナルが小さい（蛍光寿命のヒストグラムが荒い場合）ため、式2によるカーブフィッティングがうまく行かないことが多い。このような場合でも式3を用いればシグナルが弱くても  $P_{AD}$  を比較的高い精度で求めることができる。

#### 4. FRET センサー

上述した方法を用いてタンパク質活性やタンパク質間相互作用を生細胞内で観察するには FRET プローブを細胞に導入する必要がある。方法は2つあり、1つは蛍光標識したタンパク質をマイクロインジェクション等の方法により細胞へ導入する方法。もう1つは遺伝子導入により、蛍光タンパクを融合したものを発現させる方法である。前者は手間のかかるタンパク質精製と蛍光標識を行う必要があることから、現在

は殆ど行われない。後者は遺伝子導入がリン脂質を用いたリポフェクションや遺伝子銃（用語解説参照）、AAV ウイルスベクターを用いることで簡単に行える。また、遺伝子改変によりプローブの蛍光タンパク質やリンカー配列等を簡単に変更することも容易であることから、現在の主流となっている。

DNA でコードされた FRET センサーには、大別すると1分子タイプ（intra-molecular sensor, 図3a）のものと2分子タイプ（inter-molecular sensor, 図3b）のもの2つがある<sup>7)</sup>。前者は観察対象のタンパク質にドナーとアクセプター蛍光タンパク質を結合させたもので、分子構造変化が起こった際に末端に結合させた蛍光分子間の距離が変化（FRET が変化）するのを捉えるためのものである。上述したように、FRET は10 nm 以下のときに生じ、距離が短いほど効率よく起こる。すなわち、2つの蛍光分子間の距離の変化をナノメートルレベルで知ることができる。例えばプロテインキナーゼである CaMKII は、図3aのように閉じた構造がカルモジュリンとの結合により開いた構造をとるようになるため、マスクされていたキナーゼドメインが解放（キナーゼ活性を上昇）される。つまり、構造変化によって蛍光分子間（図3aでは GFP と RFP）の距離が大きくなることによる FRET 解消を観察することにより活性化を可視化できる（図3a）。一方で、後者は分子間の結合を観察するタイプのものである（図3b）。タンパク質 X にドナーとして GFP を融合させておき、相互作用を調べたい相手方（タンパク質 Y）の分子にアクセプターとして RFP を融合させ、両者を細胞に発現させる。例えば、タンパク質 X と Y に相互作用がない場合には FRET は起こらないが、外部からの刺激等により X と Y が結合すると、GFP と RFP 間の距離が縮まるため FRET が起こる。このようにして、それぞれのタンパク質の特徴や観察したい現象に

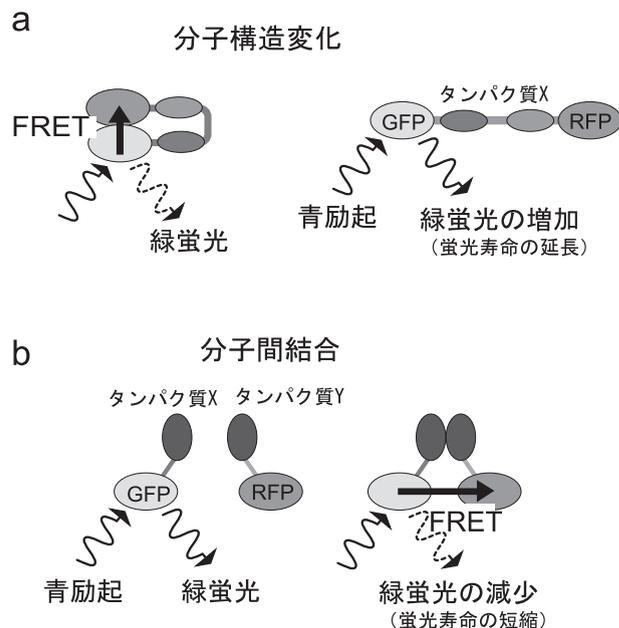


図3 (a) Intra-molecular タイプの FRET センサー。 (b) Inter-molecular タイプの FRET センサー。

合わせて工夫した FRET センサーを用いることによって細胞内での活性化や結合などの分子動態が観察できるようになる。現在のところ FRET センサーの作製には一般的な方法はなく、個々の分子について蛍光タンパク質の挿入位置やリンカーの位置などをトライ&エラーで試していくことにより、分子活性や構造変化に対して FRET の変化量を出来る限り大きくすることが重要である。

## 5. Rho GTPase 活性化の可視化

2pFLIM を用いた例として、低分子量 G タンパク質である Cdc42 と RhoA 活性化のシナプスレベルでの観察について紹介する。海馬の興奮性シナプスでは、前シナプスから放出されたグルタミン酸が後シナプスに存在する NMDA 受容体に結合する。これにより、NMDA 受容体を通してスパイン内への  $Ca^{2+}$  流入が起こることで様々なシグナル分子を活性化し、最終的にシナプス長期増強 (Long-term potentiation: LTP) を惹起する。この過程では、スパイン内部でのアクチン重合が LTP にとって重要であることが知られている。そこで我々はアクチン重合と脱重合を制御する分子である Cdc42 と RhoA に着目し、これらの分子の時空間活性パターンを調べることにした<sup>8)</sup>。まず、Cdc42 と RhoA の活性を観察するための FRET センサーについて説明する (図 4a)。我々の方法では、単量体 GFP (monomeric enhanced GFP:mEGFP) を融合させた Cdc42 を FRET のドナーとし、下流のシグナル分子である Pak3 の活性化 Cdc42 結合ドメインに赤色蛍光タンパク質変異体である mCherry を 2 つ融合させたものをアクセプターとしている。Cdc42 が活性化すると Pak3 結合ドメインと結合するため、mEGFP と mCherry の距離が近くなり、FRET が起こる (mEGFP の蛍光寿命が短くなる)。RhoA の FRET センサーも同様に、mEGFP を融合させた RhoA を FRET のドナーとし、アクセプターとして Rhotekin の活性化 RhoA 結合ドメインを用いることで作製した<sup>8)</sup>。試料としては、神経細胞がネットワークを保った状態で観察を行うためにラット海馬の

スライス (用語解説参照) を用いた。生後 6 日のラットの海馬切片 (厚み 350  $\mu\text{m}$  程度) を培養し、約 10 日後に CA1 領域の神経細胞に Cdc42 あるいは RhoA の FRET センサーを遺伝子銃<sup>9)</sup> を用いて導入し、その 2 日後に 2pFLIM で観察を行った。また、ケイジドグルタミン酸を用いて LTP を引き起こす条件で単一スパイン刺激を行い、その際の Cdc42 と RhoA の活性化パターンを調べることにした (図 4b)<sup>8)</sup>。ケイジドグルタミン酸をスパイン先端付近の直径 1  $\mu\text{m}$  程度の領域のみで 720 nm の 2 光子励起でアンケイジ (0.5 Hz, 30 パルス) することでスパイン体積の増大が引き起こされ長期増強を誘起することが既に示されていたため<sup>10)</sup>、我々はこれとほぼ同じ条件を用いて実験を行った。より生理的な条件で LTP を誘起する方法として神経線維の電気刺激が挙げられる。しかしながら、この方法ではどのシナプスで LTP が起こるのかを予め知る事ができないため、観察領域 (単一シナプス観察条件では 15  $\mu\text{m}$   $\times$  15  $\mu\text{m}$  程度) を予め決めておくことが困難なので今回は用いなかった。

FRET センサーを導入した神経細胞上の単一スパインを刺激し 2pFLIM で観察したところ、興味深いことに刺激スパイン内で Cdc42 と RhoA の活性化 (FRET の増加) が観察され (図 4b)、そのタイムコースはスパイン体積変化と高い相関を示していた (図 5)。次に、Cdc42 と RhoA の機能を調べるため shRNA を用いて各分子の発現量を減少させ、局所グルタミン酸刺激によるスパイン体積変化を調べたところ、RhoA の活性化はスパイン体積増大のトリガーとして、また、Cdc42 は体積増大を維持するためのメモリー分子として機能していることが分かった<sup>8)</sup>。一方、興味深いことに刺激後の Cdc42 と RhoA の空間的活性化パターンを比較したところ、Cdc42 の活性はスパインに局限しており (図 4b)、RhoA の活性は樹状突起へと広がっていた (図 4c)。このように、Cdc42 と RhoA がほぼ同じ分子サイズであるにも関わらず異なる活性分布を示すには 2 つの理由が考えられる。一つは、Cdc42 と RhoA の拡散速度が異なる場合、もう一つは個々の

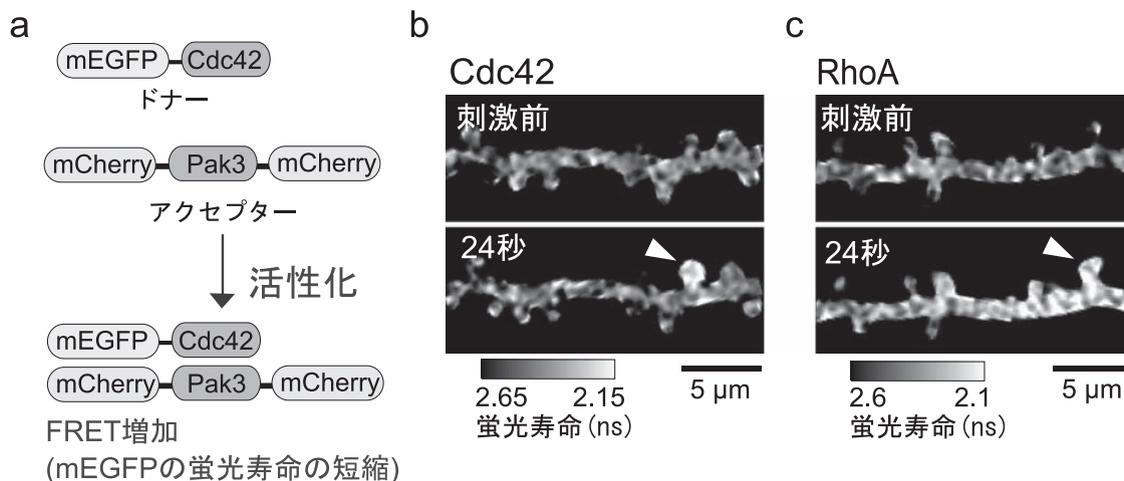


図 4 (a) FRET センサーの概略図。 (b, c) ケイジドグルタミン酸による単一スパイン刺激 (矢尻) による Cdc42 の活性化 (b) と RhoA の活性化 (c)。 (文献 8 より改変転載)。

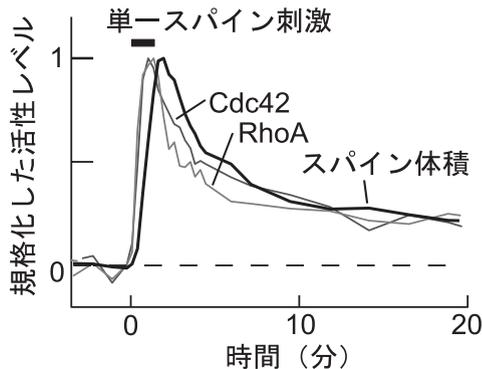


図5 刺激スパイン内でのCdc42, RhoAの活性化とスパイン体積変化のタイムコース。(文献8より改変転載)。

分子の不活化速度が異なる場合である。そこで我々は、スパイン内での活性型Cdc42とRhoAの滞在時間を調べるために光活性型GFPを融合させたCdc42とRhoAを作製し、2光子励起によるGFP活性化法<sup>10)</sup>を用いてスパイン内での滞在時間を調べた。その結果、両分子共にスパイン内での滞在時間は5秒程度と非常に短時間であった<sup>8)</sup>。すなわち、Cdc42の局在化した活性は拡散が遅くなることによってではなく、個々の分子の早い不活化によるものであると考えられた<sup>8)</sup>。

## 6. おわりに

2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法により、シナプスのような組織深部に位置する微小コンパートメント内で細胞内のシグナルタンパク質分子の活性化を観察することができるようになり、タンパク質活性化の時空間的パターンを詳細に調べることができるようになった。すなわち、組織深部の細胞内のいつ、どこで、どの分子がどのように活性化しているのかといった情報を脳組織内の神経細胞がネットワークを保った状態で得ることができるのである。このような情報は、これまでの生化学的手法や電気生理学的手法では決して得られなかったことである。このことは、2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡による研究が非常に有用であることを示しており、今後、様々な新規分子プローブが開発され、生化学反応によって惹起されるシナプス可塑性の仕組みが本手法により詳細に明らかになると考えられる。

## 7. 用語解説

### シナプス, スパイン

脳神経細胞は細胞体から、樹状突起（電気情報や化学物質を受け取る入力側）と軸索（出力側）が伸びた非対称な構造になっている。樹状突起は枝分かかれして、他のニューロンの軸索とシナプスを介して結合している。樹状突起と軸索の結合している部分がシナプスであり、シナプスの軸索側を前シナプス、樹状突起側を後シナプスと呼ぶ。中枢神経系の興奮性シナプスにおいて、後シナプスはマッシュルームのような形をした直径0.5マイクロメートル程度の突起になっており、この構造をスパインと呼ぶ。

## 組織脳スライス

神経細胞はシナプスを介して互いに結合しており、電気信号のやり取りをしているため、神経細胞の観察にはネットワークやシナプスを保ったままで観察する必要がある。例えばシナプスの可塑性を調べるための試料として、ラットやマウスの海馬スライスは培養方法が確立されており、神経回路構造も比較的よく分っているためよく使われる。通常、数百マイクロメートル程度の海馬スライスがよく用いられる。

## FRET

FRETは、光励起されたドナー蛍光分子（エネルギー供与体）から近く（通常2から10ナノメートル程度）にあるアクセプター蛍光分子（エネルギー受容体）へと励起エネルギーが電気双極子相互作用によって発光を伴わずに移動する現象である。ドナー蛍光分子の発光スペクトルとアクセプター蛍光分子の励起スペクトルに重なりがある場合、励起状態にあるドナーの近くにある相対的向きを保ってアクセプターが存在すると、ドナーからの発光が起こらないうちに励起エネルギーがアクセプターに移動しアクセプターから発光する。

## 遺伝子銃

負電荷をもつDNAを正電荷を持つスペルミジンで凝集させ、さらにこれを1.5マイクロメートル程度の微小金粒子に結合させる。このDNA-金粒子複合体をヘリウムの圧力で加速することで、神経細胞を含む様々な細胞の核に遺伝子を導入することができる。

## 謝辞

本稿で紹介した研究は、筆者が安田涼平研究室（Duke University, 現 Max Planck Florida Institute）で博士研究員として行った成果であり、ここに深謝致します。

## 文献

- 1) Helmchen, F. and Denk, W.: *Nature Methods*, 2, 932–940 (2005)
- 2) Svoboda, K. and Yasuda, R.: *Neuron*, 50, 823–839 (2006)
- 3) Lakowicz, J.R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer (2006)
- 4) Yasuda, R.: *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 4, 1121–1128 (2012)
- 5) Kalambet, Y., Kozmin, Y., Mikhailova, K., Nagaev, I. and Tikhonov, P.: *J. Chemometr.*, 25, 352–356 (2011)
- 6) Yasuda, R. et al.: *Nature Neuroscience*, 9, 283–291 (2006)
- 7) Kiyokawa, E., Aoki, K., Nakamura, T. and Matsuda, M.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 51, 337–358 (2011)
- 8) Murakoshi, H., Wang, H. and Yasuda, R.: *Nature*, 472, 100–104 (2011)
- 9) O'Brien, J.A. and Lummis, S.C.: *Nat. Protoc.*, 1, 977–981 (2006)
- 10) Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C. and Kasai, H.: *Nature*, 429, 761–766 (2004)
- 11) Patterson, G.H. and Lippincott-Schwartz, J.: *Science*, 297, 1873–1877 (2002)