

2 光子顕微鏡による膜動態可視化解析技術の新展開

根本 知己

Recent Progress in Membrane Dynamics Research by Two-photon Microscopy

Tomomi NEMOTO

*National Institutes of Natural Sciences, National Institute for Physiological Sciences,
38 Nishigonaka, Myodaiji, Okazaki City 444-8585, Japan*

(Received November 15, 2007)

Two-photon microscopy is a less-invasive cross-sectional imaging technique for long-term visualization of living cells within deeper layers of organs. This microscopy is based on the multi-photon excitation process and has been used widely in medical and biological sciences. An attractive property of two-photon microscopy, multicolor excitation capability has enabled quantification of spatiotemporal patterns of $[Ca^{2+}]_i$, ion transport and single episodes of fusion pore openings during exocytosis. In pancreatic acinar cells, we have successfully demonstrated the existence of “sequential compound exocytosis” for the first time. Sequential compound exocytosis has subsequently been identified in a wide variety of secretory cells including exocrine, endocrine and blood cells. Further exploration has revealed dynamics and physiological roles of actin cytoskeleton, and soluble NSF attachment receptor (SNARE) proteins. In addition, our newly developed method (TEPIQ method) can be used to determine fusion pores and the diameters of vesicles smaller than the diffraction-limited resolution. Recently, we have successfully observed neurons deeper than 0.9 mm from the brain cortex surface in an anesthetized mouse. We have also improved the spatial resolution needed to visualize fine structures of basal dendrites in layer V *in vivo*. This microscopy also can be used to visualize dendritic spines, axon terminals and microglia cells, suggesting that we can follow long-term changes of neural or glial cells in a living mouse. Two-photon microscopy will thus be important in advancing the study of the molecular basis of physiological and pathological events in the human body.

Key words—two-photon microscopy; *in vivo* imaging; exocytosis; soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor (SNARE) protein; neuron; exocrine gland

1. はじめに

バイオイメージング、あるいは可視化解析の重要性を指摘する声は非常に多く広がってきている。その理由は、ゲノムプロジェクト終了以降、研究の流れはシステムとしての生命機能の理解、すなわち生体分子間の相互作用ネットワークがどのようにして細胞あるいは生体の機能を実現しているかへと移ってきているためであろう。薬理学研究においては、この相互作用ネットワークへ生理活性や薬理活性を持つ物質がどのような時間的空間的な影響を与えていくかを実証していくことが重要になってきている。このような文脈においては、生きた細胞の中の

様々なイベントを同時に時空間パターンとして捉える光学顕微鏡の重要性は益々増大しているといえよう。また、薬理効果の治験者個人の「個性」の問題や、全身的な副作用の抑制のための作用部位特異性もまた、薬剤開発上極めて重要な課題である。そのためには、ある薬剤がターゲットとする組織や器官へ意図した通りにデリバリーされるか、細胞内の特定の分子と結合するかを真に知ることが必要になる。そのためには生きた身体中で非侵襲的に検証していくことが必須である。すなわち、生きた個体中で長期間に渡って個々の分子の動態をモニターする方法論が必要になろう。このような要求に答えるイメージング手法として、多光子励起を用いた蛍光顕微鏡法(2光子顕微鏡)はその有力な候補の1つである。なぜならば、2光子顕微鏡は、インタクトに近い組織的標本の深部断層像を、高い空間分解能で長時間に渡って取得することができるためである。そのた

自然科学研究機構生理学研究所 (〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中 38)

e-mail: tn@nips.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムS30で発表したものを中心に記述したものである。

め、特に神経科学の領域で広く使われ始めてきた。¹⁻³⁾ 本稿では、前掲発表論文や最近得られたデータに基づき、2光子顕微鏡によるイメージングの特徴や将来について開口放出現象や大脳新皮質を例に解説したい。

2. 2光子顕微鏡の特徴

多光子励起過程は1931年という量子力学の黎明期に、のちにノーベル物理学賞を受賞する Maria Göppert-Mayer によって既に理論的に予言されていた。その生物学的応用は1990年の Webb のグループの報告以降全世界的に注目を浴びることとなった。¹⁾ 筆者らは膵臓外分泌腺から副腎髄質細胞のような内分泌腺、さらに神経細胞樹状突起スパインといった様々な標本において、開口放出、小胞動態、微小形態の変化や生理活性物質の可視解析に成功した。⁴⁻¹¹⁾

第一電子励起状態への励起が複数個の光子の同時吸収による多光子励起過程は量子力学的に極めて実現される確率の低い過程である (Fig. 1)。この確率が極めて低いことにより蛍光の発生がレンズの焦点に限局され、断層イメージングが可能となる。この過程の物理、化学的特徴から、2光子顕微鏡には、1) 深部到達性・低障害性、2) 自己遮蔽効果の回避・褪色の補償、3) 多彩かつ厳密な同時多重染色イメージング、4) 紫外励起共焦点顕微鏡、5) 局所的光化学反応の誘起というような性質がもたらされている (Fig. 2)。

このうち、1) 深部到達性・低障害性は最も重要な特徴であるが、励起光が近赤外の領域にあり、生体組織に対して低吸収、低散乱であるためである。さらに、このことは標本に対する侵襲性が低いことをも意味し、長時間に渡って安定的な蛍光観察を可能としている。この特徴は、後述の *in vivo* イメージングにおいて特に重要になってくる。

また、3) 多彩かつ厳密な同時多重染色イメージングは、吸収スペクトルの重なりが少なく同時に1光子励起が困難な複数の色素も、2光子励起では同時に励起可能になることによる。これは2光子励起スペクトルが理論的に予想されるよりも広がっているためである (Fig. 3)。¹²⁾ したがって、2光子顕微鏡は断層化のために共焦点ピンホールを用いていないため、原理的にほとんど色収差、視差のない同時多重断層イメージングが可能になる。¹³⁾

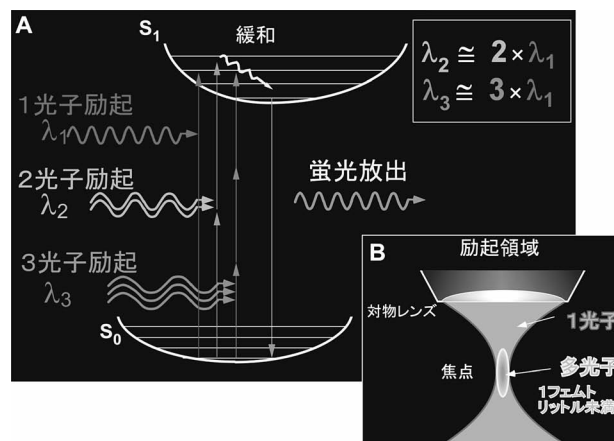


Fig. 1. Multi-photon Excitation Process
A) Energy diagram, B) Excitation areas.

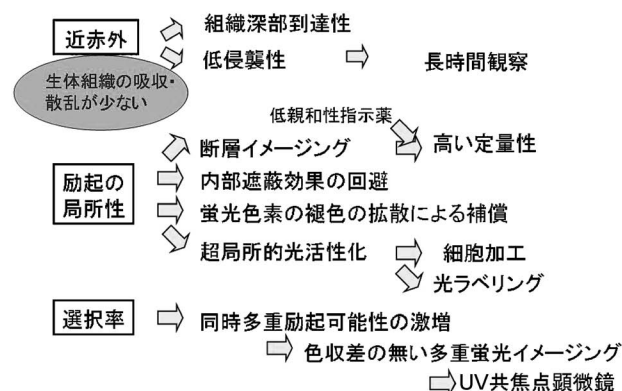


Fig. 2. Advantages of Two-photon Microscopy

この特徴は、*in vitro* 的な薄い標本、培養細胞でも有効であり、2光子顕微鏡の最も重要な特徴の1つである。さらに4) 紫外励起共焦点顕微鏡という特徴を加味すれば、例えば、最もスタンダードな Ca^{2+} 指示薬である UV 励起の fura-2 と他の蛍光色素の同時観察が可能であるので、 Ca^{2+} 依存性細胞機能の解析に強力なツールになる。例えば、われわれは NADH の青色自家蛍光像を同時にイメージングし、培養中枢神経細胞における Ca^{2+} 動態とミトコンドリアの活性状態の関係を検討した。⁴⁾ また、



根本知己

生理学研究所脳機能計測センター准教授。1967年千葉県生まれ。都立日比谷高校、東大理・物理、東工大院・応物、博士(理学)。理研フロンティア研究員、同基礎科学特別研究員、東大・医・生理・学振研究員、生理所・助手、JST・さきがけ研究員を経て、2006年昇任、現在に至る。

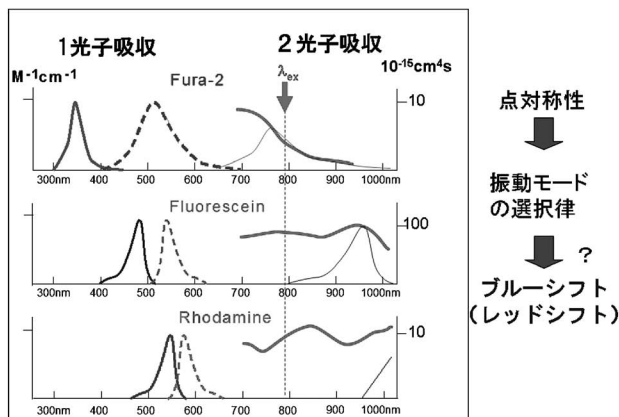


Fig. 3. Increase in Simultaneously Excitable Dyes

多光子励起による UV 自家蛍光を利用して、生体組織を無染色のままモノアミンニューロンや分泌顆粒を可視化することにも成功している。⁵⁾

またわれわれは⁵⁾ ケージド試薬の局所的な光活性により、細胞膜上のチャネル・受容体の機能マッピングにも成功し、グルタミン酸受容体の分布とスパイン形態の関係を明らかにすることに成功した。⁶⁾ カルシウム依存性水・電解質輸送の可視化に成功している。⁷⁾ その他の応用例としては、多光子励起用レーザーがパルスレーザーであることを利用して、蛍光寿命を可視化することができた。¹⁴⁾ この手法は細胞内小器官内部の局所的分子環境の評価、蛍光エネルギー共鳴移動法 (FRET) などへの応用が可能である。

3. 逐次開口放出のイメージング

われわれが第一に Ca^{2+} イメージングの対象とし、多くの基礎的データを得ることができた標本は膵臓外分泌腺腺房である。膵臓外分泌腺腺房を構成する細胞は極性の明確な上皮細胞であり、その細胞極性や $1\ \mu\text{m}$ もの大きな分泌顆粒のため、生合成、 Ca^{2+} シグナリング、開口放出、小胞輸送などのモデルとして広く用いられてきた。¹⁵⁾ 膵臓外分泌腺腺房細胞は、腺房内に終端する膵管末部である腺腔に向かって生成した酵素を分泌する。真の生理的な開口放出を捉えるためには、組織的な構造を保ったまま深部断層を得る必要があった。しかし旧来の共焦点顕微鏡では高屈折率の分泌顆粒に散乱され蛍光シグナルを得られなかったが 2 光子顕微鏡の 1) 深部到達性・低障害性により、腺腔の真の構造を高い分解能で可視化できた。さらに、2) 自己遮蔽効果の回

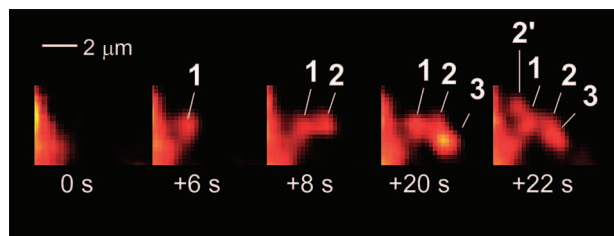
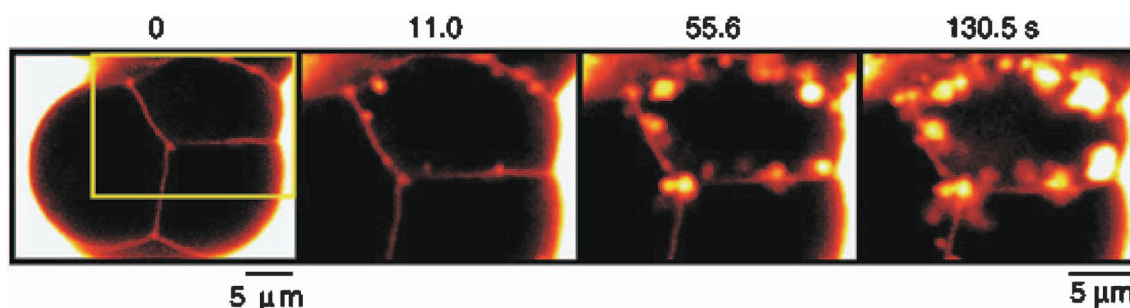
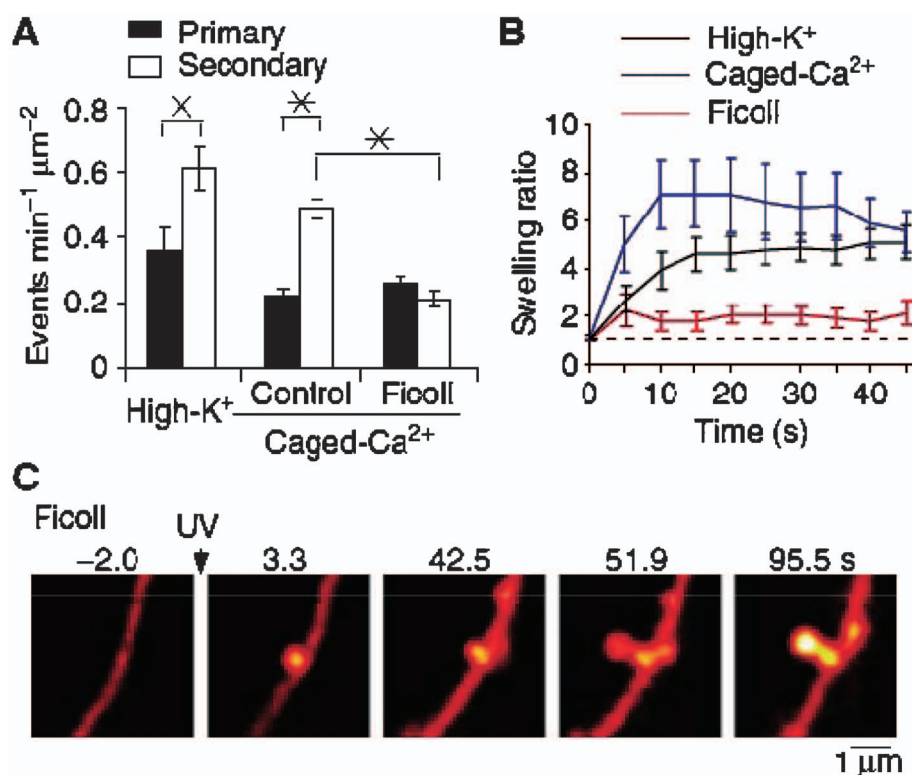


Fig. 4. Sequential Compound Exocytosis
Modified from Reference.⁵⁾

避・褪色の補償の性質が、水溶性蛍光色素による Ω 構造の発生の検出を可能とし、われわれは開口放出現象の素過程の可視化に成功した。その結果、世界に先駆けて、われわれは膵臓外分泌腺細胞では「逐次開口放出」という新しい分泌様式を用いていることを実証した (Fig. 4).⁵⁾ すなわち、細胞膜と小胞の膜融合が生じると、その一体化した小胞膜を新たに、細胞の内側にある小胞と膜融合することが可能になる。したがって、数珠のように次々と連なって小胞が開口放出していくという形式である。

このような細胞膜から連なって連続化している小胞群は、1960 年代に既に電子顕微鏡によって撮影されていたが、¹⁶⁾ これが真に逐次開口放出かどうか、証明は困難であった。すなわち、あらかじめ、細胞内で膜融合を起こした小胞群が、最後に細胞膜と融合している可能性を固定した細胞では否定できないためである。このような古典的な命題を新たな観察法が解決していくことはしばしば生じる。¹⁷⁾ またわれわれを含め内外の研究者により逐次開口放出は PC12 細胞、膵 β 細胞、好酸球等でも追認されており、一般的な様式である可能性が高い。^{8,9,14-16,18-20)}

さらに最近、われわれは副腎髄質クロマフィン細胞において、「ヴァキュオール型」逐次開口放出という様式が存在することを世界に先駆けて実証し報告した (Fig. 5).⁹⁾ 分泌小胞内容物ゲルが融合細孔形成後に膨潤するにより Ω 構造がヴァキュオール様に激しく拡張していく (Fig. 6). この膨潤が細胞深部の分泌小胞の分泌への動員を加速しており、細胞を破壊することなく、短時間で大量の生理的な分泌を可能とする機構であると推定された。このような劇的ともいえる細胞内微細構造変化がわれわれの体内で生理的に生じている可能性があるということは、極めて驚異的であり、2 光子顕微鏡法をもって初めて明らかになった事実である。

Fig. 5. Vacuolar Sequential Compound Exocytosis⁹⁾Fig. 6. Inhibition of Vacuolar Structure Formation under Hypertonic Condition⁹⁾

ではこれら逐次開口放出はどのような分子機構によって実現されているのであろうか？われわれはSNARE仮説に基づきこのメカニズムを推定した。シナプス前終末における神経分泌は元より、大型有芯小胞の開口放出や細胞分画間の小胞輸送における生体膜融合過程は、酵母から哺乳動物まで広く進化上保存されている可溶性*N*-エチルマレミド感受性因子 (*N*-ethylmaleimide sensitive actor; NSF) 結合タンパク質受容体 (soluble NSF attachment receptor; SNARE) 関連タンパク質の一群によって引き起こされると考えられている。特に、開口放出の初期に小胞膜と細胞膜を結ぶ融合細孔が形成される

が、この融合細孔形成には、対面する2膜に存在するSNAREタンパク質分子、すなわち、小胞膜におけるv-SNARE分子 [vesicle-associated membrane protein (VAMP2 (synaptobrevin))], 細胞膜における2種のt-SNARE分子 [synaptosome-associated protein of 25,000 daltons (SNAP25) と syntaxin] が熱力学的に安定な4重 α ヘリックス構造を形成しSNAREコア複合体となる必要があると提唱されてきている(SNARE仮説) (Fig. 7).^{13,21,22)}

したがって、われわれは腺腔膜に局在するt-SNARE分子が、連続化した小胞膜を側方拡散し、隣接した小胞の近くにくることで、その小胞膜の

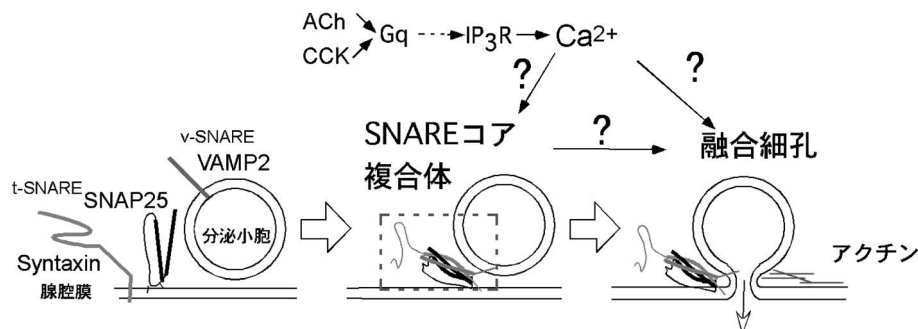


Fig. 7. “SNARE” Hypothesis

VAMP2 と SNARE 複合体を形成し、最終的に 2 次的な開口放出を起こすと考えた。この場合、1 次的開口放出においても、SNARE 複合体の形成は、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇後生じると推定される。^{5,17,23)} われわれは副腎髄質クロマフィン細胞、PC12 細胞、膵 β 細胞の逐次開口放出融合した小胞膜への *t*-SNARE SNAP25 の側方拡散が先行することがあることを示した。^{9,23)} 膵外分泌腺においても、この *t*-SNARE の側方拡散モデルを支持する組織化学的結果を、ケンブリッジ大のグループは *t*-SNARE タンパク質 syntaxin-2 の抗体を用いて報告した。²⁴⁾ 筆者らは SNAP23-EGFP を用いて、SNAP23 は腺腔膜に局在することや融合した分泌小胞膜上へ拡散することを示した (未発表)。また、膵臓外分泌腺初代培養標本に安定な SNARE コア複合体の 4 重 α ヘリックス構造の形成に必須な syntaxin2 の 226 番目のグルタミンをアラニンに置換した変異体を強制発現させたところ、 Ω 構造発生が完全に阻害された。この結果は野生型を過剰発現した細胞では盛んに逐次開口放出が観察されたことから、SNARE コア複合体形成が融合細孔形成に必須であることを意味している (未発表)。

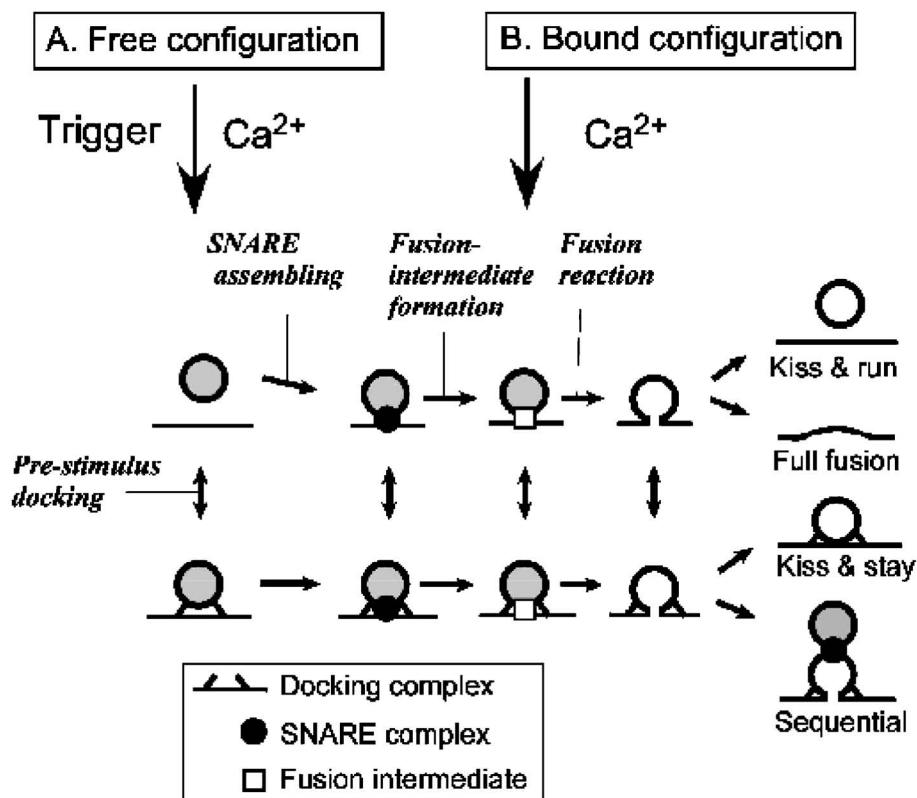
このように新規的な様式である逐次開口放出は、様々な分泌機能を持つ細胞において一般的な小胞膜輸送の一様式であり、その機能は重要な研究対象となりつつある。また Ca^{2+} 依存性開口放出の様式の多様性とその生理的な意義の解明には、融合細孔自身の安定性と SNARE コア複合体の関係性をその分子機構のレベルで理解することが重要である (Fig. 8)。今後、神経分泌への適用可能性が重要な局面になるであろう。

4. *In vivo* イメージング

筆者は、2006 年 1 月に着任以降、機能協関研究

部門・岡田泰伸教授や生体恒常機能発達機構研究部門・鍋倉淳一教授、バイオ分子センサープロジェクトの協力を得、超短光パルスレーザー 3 台と、*in vivo* イメージング用正立型 1 台、イメージング用倒立型 1 台、光機能性分子活性化用倒立型 1 台の、計 3 台の顕微鏡からなる 2 光子顕微鏡システムを構成している (Fig. 9)。特に、鍋倉淳一教授との共同研究により、1) 深部到達性・低障害性を最大限に利用した個体用 “*in vivo*” 2 光子顕微鏡を構築した。この顕微鏡を用いることで、麻酔下のマウス個体の大脳皮質深部の神経細胞のイメージングに成功した (Fig. 10)。現在、皮質表面から 0.9 mm 以上の深部で神経細胞を観察することが可能である。これは大脳皮質に立体的に広く枝を張る神経細胞の全体像を生きた動物中で捕らえることができたということの意味するのみならず、樹状突起スパインや軸索終末の構造を高い空間分解能で観察できているので、長期間に渡り 1 個体中で生じる神経細胞ネットワークの変化を追跡することを可能とする方法論を手にしたことをも意味する。実際、われわれのシステムは他研究グループの 1/10 程度のレーザー量で十分に観察できており、極めて侵襲性が低い。ある光学顕微鏡メーカーからは、このような高い深部到達性と分解能を両立できたのは、世界で唯一であるとの評価を受けた。

さらに励起の局所性を用いて、生きたマウス大脳皮質中での神経軸索 1 本のみ切断にも成功した。筆者らは現在、このイメージングと細胞手術法を駆使し、神経細胞やグリア細胞の動態を調べている。まだ準備的な段階ではあるが、生きた個体中の神経細胞やグリア細胞の動態は、今までのスライス標本の報告とは非常に異なっていることが次第に明らかになってきた。また分解能に関しても、新たなレー

Fig. 8. Modes of Exocytosis²³⁾

ザー光学系を設計，導入し，いままで不可能であった第 V 層の somatic dendrite の *in vivo* イメージングに世界にさきがけて成功した(特許出願準備中). この分野の研究は，今，大きなターニングポイントを迎えているのではないかと，われわれはひしひしと感じている.

5. バイオイメージングの今後の課題

以上のように医学・薬学の分野でのバイオイメージングの重要性の増大に伴って，2光子顕微鏡は多くの研究所，大学等に導入されてくことが予想される. 既に米国 NIH では数年前に2光子顕微鏡導入についての重点的な予算配分があったと聞いている. 2光子顕微鏡の一般化の最大の問題点はその価格にあり，その半分以上は近赤外フェムト秒パルスレーザー(チタンサファイアレーザー)の価格である. この点は，波長は固定であるが廉価な固体レーザーが市場に出始めており，解決される可能性も出てきている. 今後の技術的な展開については，例えばスーパーコンティニューム光のように，新たに数100 nm の超広帯域フェムト秒パルスレーザー光の発生の成功とその2光子顕微鏡への応用が報告され

ており，2光子顕微鏡の利用可能な観察対象は著しく広がる可能性がある.²⁵⁾ また，microelectromechanical systems (MEMS) 加工技術によるレーザーキャニシングミラーのマイクロ化²⁶⁾により，覚醒した小動物の *in vivo* イメージングに成功したという報告もなされた. マイクロ固体レーザーやファイバーレーザーの技術により超小型軽量のレーザー開発例も数多く報告されるようになってきており，「ベツトサイド」2光子顕微鏡の実現も夢ではなであろう. これらの技術を用いた2光子内視野顕微鏡の報告も海外ではなされており，たとえば腫瘍の光力学治療といったような臨床応用の期待は極めて大きい. さらに最近では，多光子励起過程のほかにも，第2高調波発生 (SHG), Stimulated Emission Depletion (STED) などの非線形光学過程を用いた新たな顕微鏡法が，医学生物学研究の場合にも登場している.^{27,28)} 超短光パルスレーザーの衝撃波の利用により，顕微鏡下で任意の細胞に遺伝子導入を行うような細胞操作技術も生まれている.

しかし，2光子顕微鏡を普通に使えるようになるには予算の問題以外にもまだ問題は残っている. 特

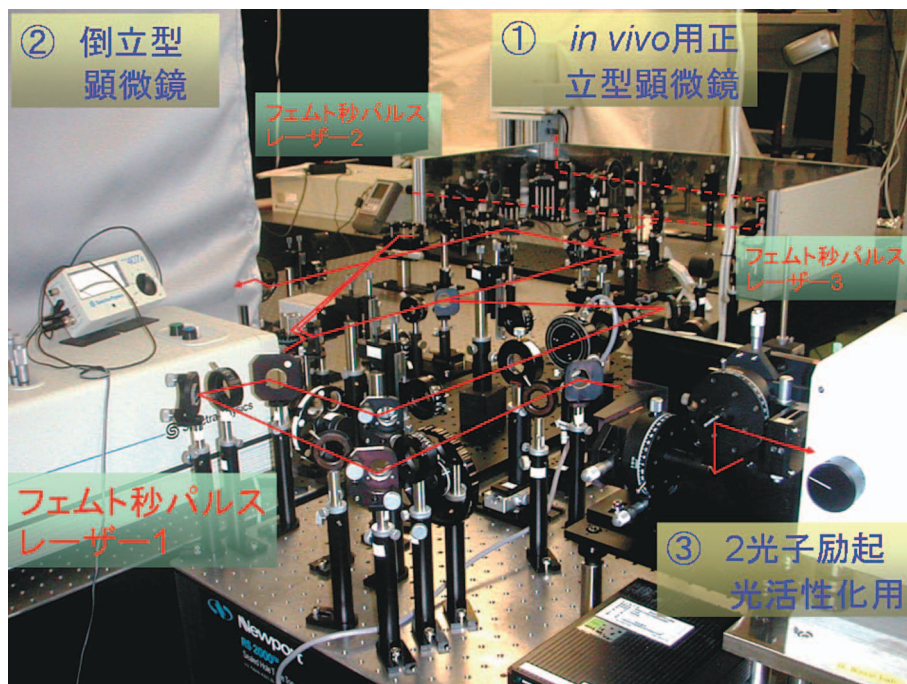


Fig. 9. Two-photon Microscopy System

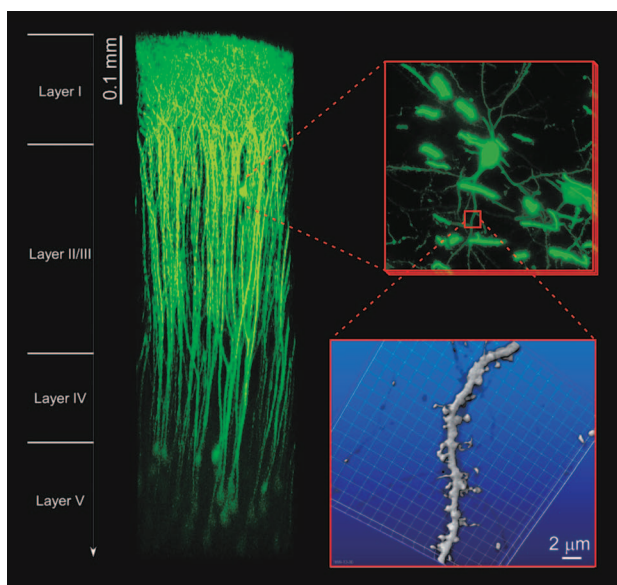


Fig. 10. 3D Reconstruction of Neocortex in an Anesthetized Mouse

に、ルーチンに使用する機械になるには技術的に改良の余地がある。例えば、メンテナンスフリーをうたっているチタンサファイアレーザーを使用する場合でも、最大の空間分解能を実現するためには立ち上げ時の微調整は日々欠かせない。このような不便さが解決されるためには、レーザーメーカーと顕

微鏡メーカーが本腰を入れ協力を進めていく必要がある。しかし、それを待っている間に日本の研究は遅れてしまっているかもしれない。また、光学顕微鏡は生命科学の研究においてはなくてはならないものである。しかし、その基本的な技術の伝承は果たして十分に行われているであろうか？ともすればピペット操作と遺伝子工学のキットさえ使えばよいという極端な言動を年配の分子生物学者から聞いた時に、筆者は暗澹たる思いに囚われる。培養細胞の蛍光標識固定標本やゲルのパターンを観察するだけの技量で、前線にたつ若手研究者は今後一層激しくなる国際的な開発・研究競争に打ち勝つことができるだろうか？生理学研究所は大学共同利用機関法人として、大学や企業に広く門戸を開け、共同研究を推進している。また本所のスマートレーングコースでは、光学顕微鏡の基礎や2光子顕微鏡システムを使ったイメージングをレクチャーしている。もしこの拙文をお読みになった方でご関心を抱いた方がおられれば、ご連絡頂ければ幸いです。

謝辞 逐次開口放出に関する研究は現、東大・疾患生命工学センターの河西春郎教授のご指導を賜りました。また、岡田泰伸教授、鍋倉淳一教授をはじめとする生理研の諸先生方のサポートがなけれ

ば、独立後わずか4ヵ月で2光子顕微鏡室が立ち上がり、世界トップクラスのスペックを達成することは不可能であったと考えます。この場をかりて心より感謝の意を表したく存じます。

REFERENCES

- 1) Denk W., Strickler J. H., Webb W. W., *Science*, **248**, 73–76 (1990).
- 2) Denk W., Svoboda K., *Neuron*, **18**, 351–357 (1997).
- 3) Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G. C. R., Kasai H., *Nature*, **429**, 761 (2004).
- 4) Hayakawa Y., Nemoto T., Iino M., Kasai H., *Cell Calcium*, **37**, 359–370 (2005).
- 5) Nemoto T., Kimura R., Ito K., Tachikawa A., Miyashita Y., Iino M., Kasai H., *Nat. Cell Biol.*, **3**, 253–258 (2001).
- 6) Matsuzaki M., Ellis-Davies G. C., Nemoto T., Miyashita Y., Iino M., Kasai H., *Nat. Neurosci.*, **4**, 1086–1092 (2001).
- 7) Oshima A., Kojima T., Dejima K., Hisa Y., Kasai H., Nemoto T., *Cell Calcium*, **37**, 349–357 (2005).
- 8) Kishimoto T., Liu T. T., Hatakeyama H., Nemoto T., Takahashi N., Kasai H., *J. Physiol.*, **568**, 905–915 (2005).
- 9) Kishimoto T., Kimura R., Liu T. T., Nemoto T., Takahashi N., Kasai H., *EMBO J.*, **25**, 673–682 (2006).
- 10) Takahashi N., Kishimoto T., Nemoto T., Kadowaki T., Kasai H., *Science*, **297**, 1349–1352 (2002).
- 11) Liu T. T., Kishimoto T., Hatakeyama H., Nemoto T., Takahashi N., Kasai H., *J. Physiol.*, **568**, 917–929 (2005).
- 12) Hafez I., Stolpe A., Lindau M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 44921–44928 (2003).
- 13) Jahn R., Lang T., Sudhof T. C., *Cell*, **112**, 519–533 (2003).
- 14) Nemoto T., Kasai H., Japan unexamined patent 2002–039943.
- 15) Johnson L. R., Barrett K. E., Ghishan F. K., “Physiology of the Gastrointestinal Tract.” 4th ed., Academic Pr., 2006.
- 16) Ichikawa A., *J. Cell Biol.*, **24**, 369–385 (1965).
- 17) Pickett J. A., Edwardson J. M., *Traffic*, **7**, 109–116 (2006).
- 18) Xu C., Zipfel W., Shear J. B., Williams R. M., Webb W. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 10763–10768 (1996).
- 19) Nemoto T., Kojima T., Oshima A., Bito H., Kasai H., *J. Biol. Chem.*, **279**, 37544–37550 (2004).
- 20) Leung Y. M., Sheu L., Kwan E., Wang G., Tsushima R., Gaisano H., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **292**, 980–986 (2002).
- 21) Sutton R. B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A. T., *Nature*, **395**, 347–353 (1998).
- 22) Rothman J. E., *Nature*, **372**, 55–63 (1994).
- 23) Kasai H., Kishimoto T., Nemoto T., Hatakeyama H., Liu T. T., Takahashi N., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 850–877 (2006).
- 24) Pickett J. A., Thorn P., Edwardson J. M., *J. Biol. Chem.*, **280**, 1506–1511 (2005).
- 25) Kano H., Hamaguchi H., *Seibutsu Butsuri*, **46**, 349–352 (2006).
- 26) Piyawattanametha W., Barretto R. P., Ko T. H., Flusberg B. A., Cocker E. D., Ra H., Lee D., Solgaard O., Schnitzer M. J., *Opt. Lett.*, **31**, 2018–2020 (2006).
- 27) Campagnola P. J., Loew L. M., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1356–1360 (2003).
- 28) Willig K. I., Kellner R. R., Medda R., Hein B., Jakobs S., Hell S. W., *Nat. Methods*, **3**, 721–723 (2006).