

CCD カメラのデッドタイムを利用した光刺激法が 可能にする蛍光・化学発光イメージングと オプトジェネティクスの高時間分解併用

新井 由之, 永井 健治

ライブセルイメージング技術の発展に伴い、遺伝子にコードされた指示薬によって細胞内の情報を読み取るだけでなく、光によって細胞にさまざまな入力や摂動を与えることができる光遺伝学技術が発達してきた。これら技術を用いることで、細胞の入出力応答を非侵襲的に計測することが可能となった。しかし、光刺激用の光が計測時に漏れ出るために、刺激中の細胞応答をみることができないのみならず、蛍光観察用の光が刺激光となる問題点が指摘されていた。我々は、CCD カメラの露光時間と露光時間の間の時間、いわばデッドタイム中に光刺激を行う顕微鏡システムを開発した。本システムを入力に、化学発光タンパク質を出力計測に用いることで、細胞における入出力応答を定量的に計測できるようになる。

1. 細胞内入出力応答を光でみる・操る

細胞は、細胞内において多くの化学物質やタンパク質が複雑に絡み合い情報処理を行うことで、例えば外部からの化学物質濃度勾配を感知して細胞運動をし、あるいは増殖・分化・細胞死（アポトーシス）といった応答を示すことができる。また、一見刺激がない場合においてさえ、細胞は自発的に細胞機能の制御を行っている。このような複雑な細胞のメカニズムについて理解するために、たとえば化学物質による刺激や阻害などを行ったり、ある遺伝子機能を破壊した結果、細胞や個体がどのような振る舞いをするか調べる方法が用いられる。つまり、細胞に対して何らかの入力を与え、その入力に対してどのような応答をするか、という出力を観察することで、ブラックボックスである細胞機能を理解しようと研究が行われてきている。

大阪大学産業科学研究所 (〒567-0047 大阪府茨木市美穂が丘 8-1 大阪大学産業科学研究所生体分子機能科学研究分野

Compatible use of fluorescence and chemiluminescence imaging with optogenetic stimulation during “dead-time” of CCD camera at real time

Yoshiyuki Arai and Takeharu Nagai (Department of Biomolecular Science and Engineering, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, Mihogaoka 8-1, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

1) 光遺伝学ツール

細胞に対する入力方法として、近年発達してきた手法に光遺伝学 (optogenetics) がある。これは、光に応答するタンパク質の遺伝子を細胞内に導入し光応答タンパク質を発現させ、その細胞に対し光照射による刺激を与えることで、細胞内にさまざまな入力をもたらす技術である。光を刺激として用いることで、空間的・時間的な制御を自由自在に行うことが可能であり、細胞レベルから、マウスなどの個体レベルへの入力が可能である。光遺伝学に用いられるタンパク質として、膜電位を変化させたり、Gタンパク質シグナル伝達経路を活性化したりするオプシン遺伝子グループ¹⁾や、光照射依存的にタンパク質構造がアンフォールディングする、植物の青色光受容タンパク質であるフォトトロピン分子由来の LOV (light-oxygen-voltage) ドメイン²⁾、さらに、光照射により活性酸素を排出することで標的タンパク質や細胞を破壊する SuperNova³⁾が知られている (図 1)。特に、オプシン遺伝子グループの一つであるチャンネルロドプシン 2 (Channelrhodopsin2 : ChR2) はクラミドモナスから発見されたタンパク質で、青色光に応答してチャンネルを開閉し、ナトリウムイオン (Na⁺) を流入させることができる。細胞内への Na⁺の流入により、膜電位は局所的に 0 の状態、いわゆる脱分極状態になる。局所的な脱分極は、ナトリウムイオンチャンネルによるさらなるイオン流入を促進し、細胞内外の電位差が 0 となる。このときの電位変化は活動電位と呼ばれ、神経活動においてきわ

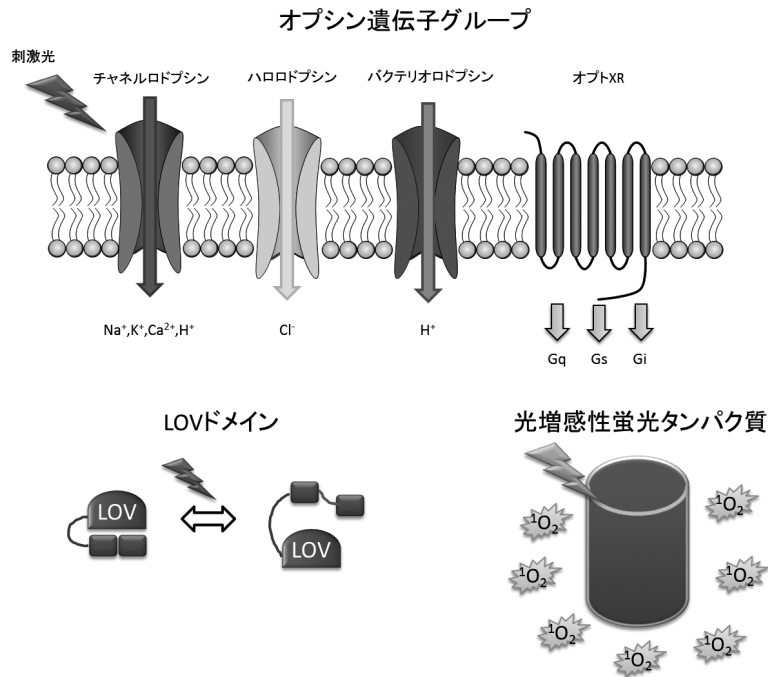


図1 光遺伝学ツールの一例

オプシン遺伝子グループでは、チャンネルロドプシン、ハロロドプシン、バクテリオロドプシンにそれぞれ照射することにより、イオン流入を制御することができる。また、オプトXRでは、光刺激依存的にGタンパク質シグナル伝達系を制御することができる。LOVドメインは光照射依存的に構造をアンフォールドすることから、タンパク質機能の活性制御に用いられる。また、光増感性蛍光タンパク質は、光依存的に活性酸素を放出することで、目的タンパク質や細胞を破壊することが可能である。

めて重要な役割を果たす。従って、ChR2を神経細胞に発現させて光刺激依存的な神経活動の制御を行うことで、マウスの行動を制御したり、記憶や感情の制御を行うといった操作が可能となった^{4,5)}。

2) 遺伝子にコードされた指示薬

このように入力技術として光遺伝学が発達してきた一方、出力としての細胞機能を観察する技術はすでに確立されている。特に、遺伝子にコードされたさまざまな指示薬によって、細胞内のセカンドメッセンジャーであるカルシウムイオン (Ca^{2+}) や環状AMP (cAMP)、ATPなどの可視化が可能となってきた。特に、 Ca^{2+} は細胞内のさまざまな局面で働く重要なセカンドメッセンジャーであることから、検出する指示薬は非常に多く開発されてきている(図2)⁶⁾。PericamやGCaMP、GECOのように一つの蛍光タンパク質内に Ca^{2+} 結合部位を導入したタイプや、CFP (cyan fluorescent protein) とYFP (yellow fluorescent protein) の間に Ca^{2+} 結合部位を導入し、 Ca^{2+} 結合時の構造変化をフェルスター共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer: FRET) により捉えるcameleonタイプ、さらには後述する化学発光タンパク質を用いたタイプがあげられる。これら指示薬を用いることで、細胞内の Ca^{2+} 応答を高感度・定量的に、リアルタイムに検出することができる。

2. 光遺伝学ツールと指示薬の組み合わせにより細胞の入出力応答を観測する

以上のように、細胞への入力を光遺伝学で行い、出力は蛍光タンパク質をベースとした指示薬によりモニタリングすることで、細胞の入出力応答を計測できるようになった。しかしながら、ここで一つ問題点が生じる。光遺伝学を用いるツール、特にChR2やLOVドメインでは、青色の光を刺激光として用いる必要がある。従って、これらツールを、同じく青色～シアン色の励起光が必要なcameleonタイプの蛍光指示薬と同時に利用することはできない。なぜなら、蛍光指示薬を観察するための励起光が、そのまま光遺伝学ツールを刺激する光になってしまうため、常に刺激された状態のみの観察となってしまいうからである。では、より長波長の励起光を用いることができる蛍光指示薬、たとえばR-GECO (吸収極大波長561 nm) を用いればよいかというとそうはいかない。光遺伝学の励起光強度が強いため、高性能な蛍光フィルターやダイクロイックミラーを用いても必ず検出器に励起光が漏れ出てしまい、背景光の上昇を引き起こしてしまう。従って、これまでは光遺伝学ツール刺激時には蛍光指示薬を観察することはできず、刺激中の動態をうかがい知ることはできなかった。

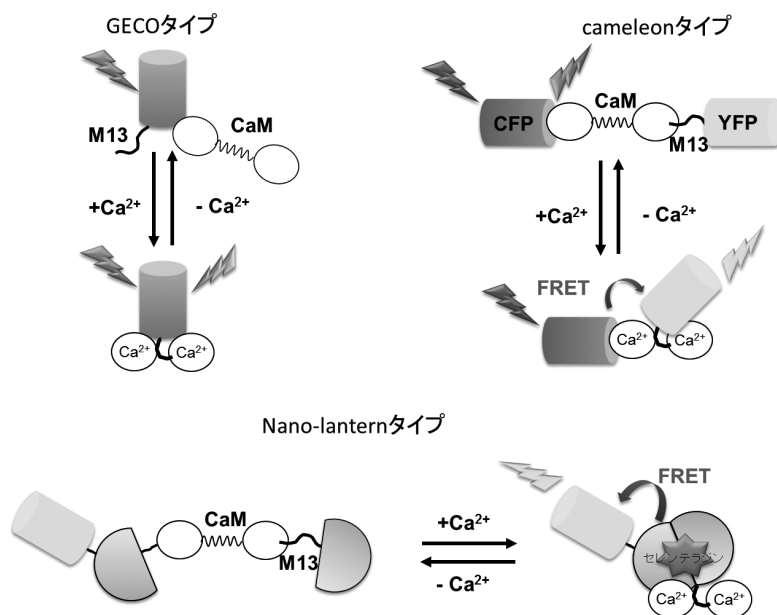


図2 遺伝子にコードされた Ca^{2+} 指示薬の例

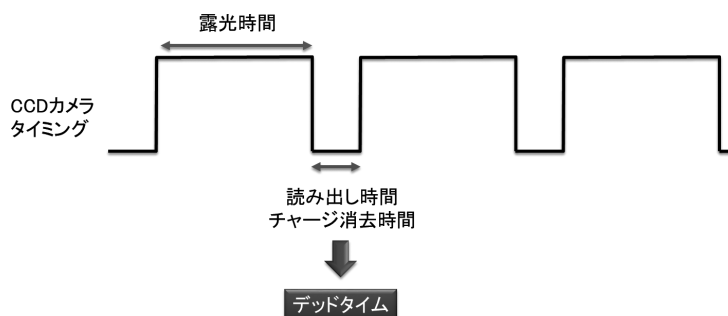


図3 CCDカメラの露光時間のタイミングチャート

そこで、我々は時間のロスなく光遺伝学と蛍光指示薬観察を行うために、CCDカメラの読み出し時間を利用した新しい計測方法を開発した⁷⁾。CCDカメラで計測されたリアルタイム像（たとえば30フレーム/秒でのリアルタイム計測）は、一見完全に連続なシーケンス画像を取得できているように見えるが、実際には露光時間と読み出し時間を繰り返している。CCDカメラでは、露光時間中にCCDチップ上に到達した光子が光電効果により電荷に変換され、CCDチップ上に蓄積される。その後、蓄積された電荷はバケツリレーのように読み出され、アンプにより信号を増幅し、アナログ信号として計測される。最後に電荷がクリアされ、再び露光できるようになる。この露光時間と露光時間との時間はいわばCCDカメラの「デッドタイム」である（図3）。この時間中に光遺伝学用の光刺激を行えば、露光時間をすべて蛍光指示薬観察の時間に利用することができる。図4は本システムを実現する構成例である。最近のCCDカメラは、露光時間のタイミングや読み出し時間のタイミングを、5VのTTL信号や3.3VのCMOS信号として取り出すことができる端子が備わっていることが多い。これら矩形波の信号はトリガーとして、ファンクションジェネレータへ入力される。ファンクシ

ョンジェネレータは、トリガー信号を受けた後に矩形波パルスを出すことができるように設定されている。この信号を、光刺激用の光源へのトリガー信号として用いることで、デッドタイム中の光刺激を実現することができる。実際には、電荷の読み出し最中に光が当たると漏れ光となる。従って、ファンクションジェネレータからの矩形波パルスの位相をずらすことで光照射のタイミングを調整し、光が漏れずにかつデッドタイム中に光照射が終わるように、ファンクションジェネレータでパラメータの調整を行う必要がある。CCDカメラの計測タイムシーケンスにおいて、デッドタイムが来るたびにこのようなパルス状の光照射が引き起こされることで、デッドタイム中の光刺激を行うことが可能となる。

蛍光観察では、一般に水銀ランプと機械式シャッターを組み合わせることでタイムラプス観察を行う。機械式のシャッターは、速くてもミリ秒オーダーの開閉速度しかない。一方で、レーザーと音響光学素子や電気光学素子などを組み合わせることで、高速に光をオン・オフすることが可能だが、高価な上に使用できる励起光も限られてしまう。最近、高輝度LED (light emitting diode) が顕微鏡用の光源として用いられるようになってきた。レーザーに比

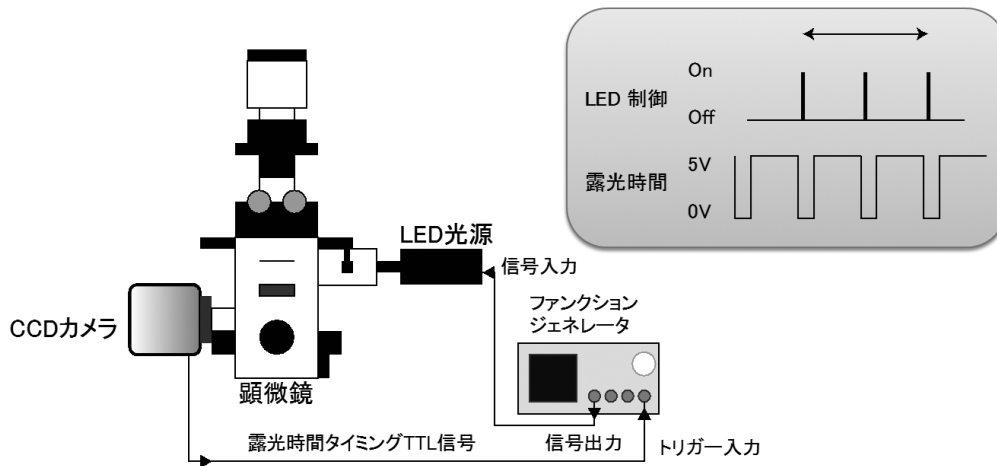


図4 デッドタイム中の光刺激を可能とする装置構成例

CCDカメラからの露光時間タイミング信号をトリガーとしてファンクションジェネレータに入力する。ファンクションジェネレータでは出力する信号のパルス幅、位相等を調整した信号を出力し、LED輝度のオン・オフ制御を行う。

べて安価であり、紫外から赤色の多色LED光源を利用することができる。出力も数百mW程度あるため励起光光源として十分利用可能である。さらに、LEDに供給する電流値を変えることで容易に出力の変調ができ、光強度をマイクロ秒オーダーで高速変調することが可能である。本システムでは、ファンクションジェネレータからの出力信号をLED光源のオン・オフ制御に用いることで、デッドタイム中の高速光刺激を実現している。図4右上は、CCDカメラの露光時間のタイミングとLEDの光をオン・オフ制御する時系列を示す。

「多色タイムラプスシステムでも実現できるのでは」と思われるかもしれない。確かに、数百ミリ秒～数秒といった遅い時間分解能であれば、蛍光指示薬観察用・光刺激用に1チャンネルずつ割り当てて多色タイムラプス計測とすることが可能である。しかし、ビデオレート程度で動作させる場合、チャンネルごとにカメラ設定を切り替えるためのソフトウェア上の時間的ロスが生じる。デッドタイムの時間は、読み出し時間速度やビニング、撮像サイズ、電荷の読み出しモードなどの設定によって調整可能であり、サブミリ秒から数十ミリ秒といったオーダーの時間をデッドタイム時間として用いることができる。

3. 光遺伝学ツールと指示薬による細胞への入出力応答リアルタイム計測

1) 蛍光型指示薬との組み合わせ

例として、PC12細胞にCa²⁺指示薬R-GECOとChR2を発現させ、神経成長因子(NGF)刺激によって神経様細胞に分化させた細胞でのデッドタイムを利用した光刺激実験を示す。図5左下は、デッドタイム中に光刺激を行った実験例である。PC12細胞に青色光を照射すると、ChR2が活性化されて膜電位変化を引き起こし、細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起きる。一方、図5右下は、露光時間中(ライブ

タイム)にも刺激光が照射されるように設定した場合の測定例である。R-GECOのシグナルの上昇とともに、背景光の上昇が起きている様子が観察されてしまい、刺激光が漏れている様子が観察された。今回の測定では、R-GECOの光を観察するために蛍光フィルターを導入し、フィルター特性では励起光をカットできている。しかし、刺激光はR-GECOのシグナルに漏れてしまった。これは、刺激光がmW/mm²オーダーの強い光であることから、蛍光フィルターで刺激光を完全にカットすることができなかったためである。一方、デッドタイム中の照射では、刺激光のR-GECO観察シグナルへの漏れはまったくみられない。このことは、デッドタイム中の光刺激が観察を阻害しないことを示している。さらに、本質的に刺激光の波長に影響されないことから、どのような波長の刺激光も用いることができることを示唆している。

次に、構築したシステムを用いて、刺激光の強度および時間を変えた計測を行った。図6はR-GECOの相対的な蛍光強度シグナル変化を示している。光刺激を行うトータルの時間を2～5秒と徐々に増やしていくと、時間依存的にR-GECOシグナルの上昇が観察された。このとき、光刺激はCCDカメラのデッドタイム毎にパルス的に行われているので、2～5秒間に複数の光刺激パルスが照射されている。図7は刺激光強度とR-GECOシグナル上昇の関係を示したグラフである。刺激光そのものの強さや照射パルス時間を変えることで、ChR2活性を制御し、自由にCa²⁺応答を観察することが可能である。従来の計測法では刺激前・刺激後の2点間のシグナル変化量しか捉えることができなかったが、デッドタイム中の光刺激法を用いることで、光刺激中のCa²⁺濃度上昇を高時間分解能で捉えることが可能となった。

2) 化学発光タンパク質を利用した細胞内Ca²⁺応答観察

CCDカメラのデッドタイム中に光刺激を行うことで、

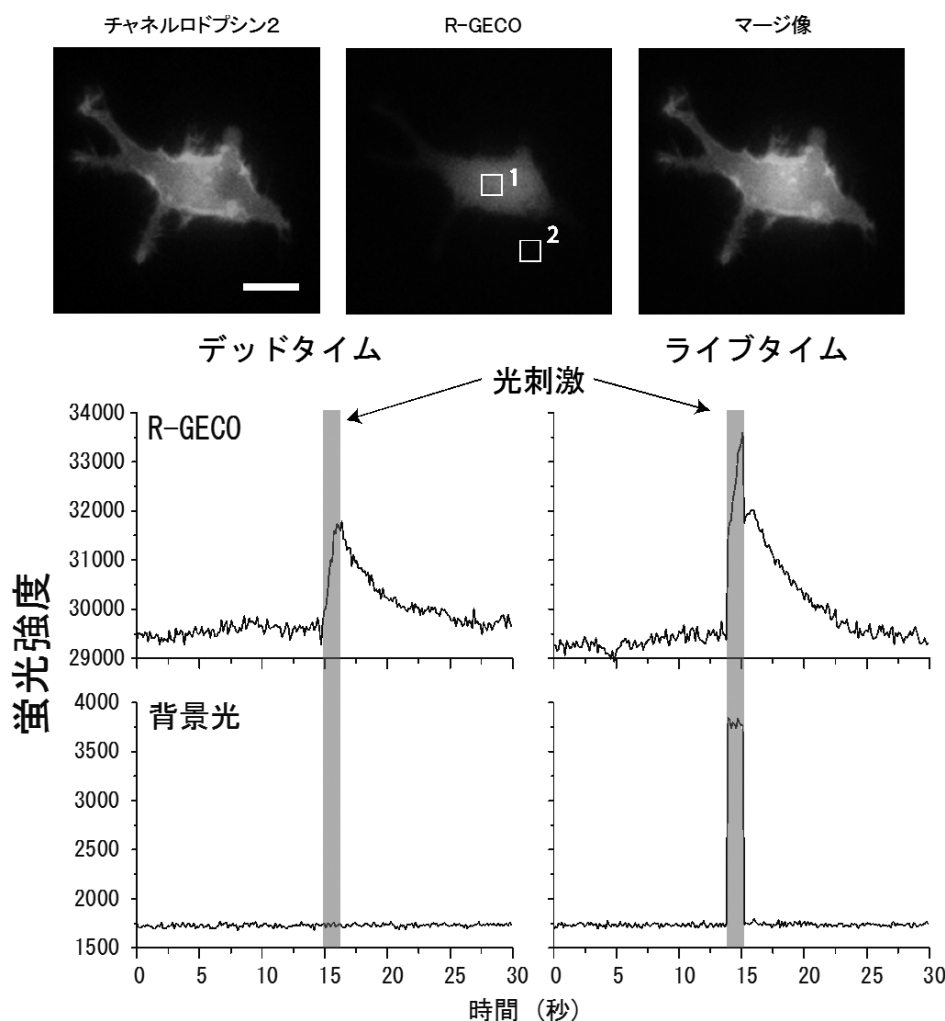


図5 デッドタイムを利用した光刺激と Ca^{2+} 濃度の同時計測
 上：PC12細胞に発現したChR2およびR-GECOの蛍光像。左下：デッドタイム中での光刺激。右下：ライブタイム中での光刺激。明らかに刺激光が漏れている。

刺激光の露光時間への漏れを防ぎ、かつ光刺激中の細胞応答を捉えることができたようになった。しかし、指示薬として蛍光タンパク質を使うため、蛍光タンパク質を励起する光を照射する必要があり、その光が刺激光となり光遺伝学ツールを刺激してしまう。励起光を使う限り、この問題から逃れることはできない。従って、励起光を用いずに細胞内 Ca^{2+} を観察する必要がある。ホタルやウミシイタケなどの生物は、生体内でルシフェリンやセレンテラジンを作り、それらを化学発光タンパク質が代謝することにより発光することができる。さらに、化学発光タンパク質は励起光を用いないため、蛍光観察における光毒性は無視でき、励起光が届かない個体深部からの発光検出にも利用することができる。しかしながら、従来の化学発光タンパク質の強度は非常に低く、シグナル検出には秒や分オーダーでの長時間露光が必要であった。最近、ウミシイタケ由来の化学発光タンパク質 RLuc よりも 10 倍以上明るい化学発光タンパク質 Nano-lantern が開発された (図 2 参照)。Nano-lantern は改良型 RLuc と蛍光タンパク質 Venus を融合させたタンパク質である。RLuc は基質としてセレンテ

ラジンを代謝することで発光するが、その発光量子収率は 0.05 程度と非常に低い値である。さらに、RLuc の代謝速度 (k_{cat}) は 1 秒間に 5 回程度なので、1 秒あたりわずか 0.25 個しか光子を放出しない。実際の顕微鏡による光子の検出効率はこの半分程度と考えられるので、光子 1 個を検出するためには 10 秒以上の露光が必要となる。そこで、FRET により RLuc の励起エネルギーを蛍光量子収率が 0.7 である Venus に移動させることで、RLuc に比べ 10 倍以上明るく発光する Nano-lantern が作られた⁸⁾。また、Nano-lantern の RLuc ドメイン中に Ca^{2+} や ATP、cAMP を結合するドメインを挿入することで、セカンドメッセンジャーを高感度に検出できる化学発光タイプの各種指示薬も開発された。十分な発光強度を持つ Nano-lantern によりセカンドメッセンジャーの濃度をリアルタイムでの検出が可能となったことから、光遺伝学ツールとの併用が実用レベルになった。

そこで、化学発光指示薬である Nano-lantern (Ca^{2+}) と ChR2 を発現させたラット海馬細胞を用いて、デッドタイム中の刺激光照射を行った (図 8)。その結果、R-GECO を用いた計測と同じように、光刺激照射中の Ca^{2+} 濃度上

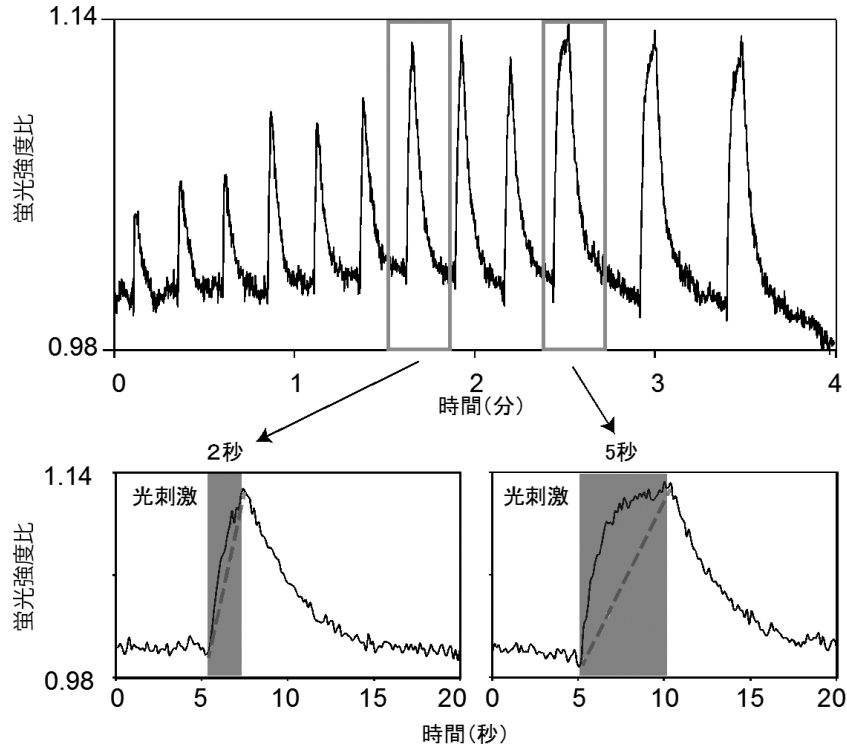


図6 光刺激中のCa²⁺濃度上昇のダイナミクス
 上：光刺激の時間依存的なR-GECOシグナル強度の増加. 下：2秒および5秒間刺激時のCa²⁺濃度上昇のようすの拡大図. 光刺激中（薄青色）において濃度上昇が観察される. 点線は刺激前と刺激後をつないだ、従来法により得られるグラフを示す.

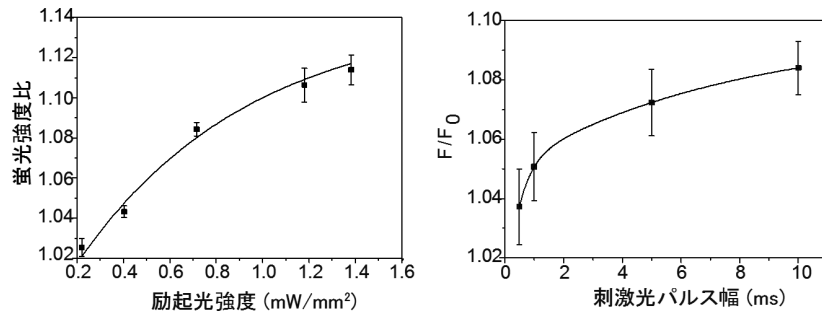


図7 刺激光強度依存的なR-GECO強度変化

昇を捉えることに成功した. Nano-lanternは従来の化学発光タンパク質に比べて格段に明るいとはいえ、その発光シグナルを最大限に検出するためには、蛍光フィルターなど光を減衰する可能性のあるものは極力取り除く必要がある. 今回の計測においても、光刺激照射に必要なダイクロイックミラーを顕微鏡に導入しているのみである. 従って、露光時間中に光遺伝学用の刺激光を照射すると、蛍光観察時以上に刺激光の漏れが観察されることになる. しかし、CCDカメラのデッドタイム中に刺激光を照射することで、露光時間中への漏れを抑えることが可能となる. Nano-lantern (Ca²⁺) による化学発光シグナルを検出中は、刺激光の照射がゼロのため、細胞への入力と細胞応答を観察するための出力が完全に分離でき、細胞への入出力応答を光によって計測することが初めて可能になったといえる.

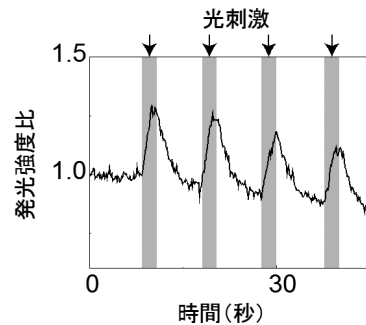


図8 化学発光指示薬 Nano-lantern (Ca²⁺) を用いた、デッドタイム中の光刺激時のCa²⁺応答のグラフ
 光刺激中のCa²⁺濃度上昇のようすを確認することができる.

4. おわりに

CCD カメラのデッドタイム中に刺激光を照射するシステムは、仕組みは非常に簡単であるが、本質的にさまざまな指示薬と光遺伝学ツールを、その励起波長を気にすることなく用いることを可能にした。本システムは、光遺伝学ツールとの併用以外にも、励起光による自家蛍光が実験の妨げとなる、植物細胞における光刺激応答を観察する系にも利用することが可能である。本システムは化学発光タンパク質と組み合わせることで、細胞への入出力応答を強力に研究することができるツールとなる。

文 献

- 1) Zhang, F., Vierock, J., Yizhar, O., Fenno, L.E., Tsunoda, S., Kianianmomeni, A., Prigge, M., Berndt, A., Cushman, J., Polle,

- J., Magnuson, J., Hegemann, P., & Deisseroth K. (2011) *Cell*, 147, 7, 1446-1457.
- 2) Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., & Hahn, K.M. (2009) *Nature*, 461, 104-108.
- 3) Takemoto, K., Matsuda, T., Sakai, N., Fu, D., Noda, M., Uchiyama, S., Kotera, I., Arai, Y., Horiuchi, M., Fukui, K., Ayabe, T., Inagaki, F., Suzuki, H., & Nagai, T. (2013) *Sci. Rep.*, 3, 2629.
- 4) Zhang, F. & Aravanis, A. (2007) *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 577-581.
- 5) Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., & Tonegawa, S. (2012) *Nature*, 484, 381-385.
- 6) Pérez Koldenkova, V. & Nagai, T. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, 1833, 1787-1797.
- 7) Chang, Y.-F., Arai, Y., & Nagai, T. (2012) *Neurosci. Res.*, 73, 341-347.
- 8) Saito, K., Chang, Y.-F., Horikawa, K., Hatsugai, N., Higuchi, Y., Hashida, M., Yoshida, Y., Matsuda, T., Arai, Y., & Nagai, T. (2012) *Nat. Commun.*, 3, 1262.

著者寸描

●新井由之 (あらい よしゆき)



大阪大学産業科学研究所助教。博士（理学）。

■略歴 1977年石川県に生る。2000年大阪大学基礎工学部卒業。06年同大学院基礎工学研究科システム人間系博士後期課程修了。同年大阪大学生命機能研究科特任研究員。08年同特任助教。10年北海道大学電子科学研究所助教。12年より現職。

■研究テーマと抱負 化学発光計測に最適な光学顕微鏡システムの開発や、吸収を計測することの出来る光学顕微鏡の開発等、既存の光学顕微鏡では達成できない新しい顕微鏡システムの開発を通じ、生命現象を新たな切り口で捉えることを目指しています。

■ホームページ <http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/>

■趣味 娘と公園で遊ぶ、ドライブ。

●永井健治 (ながい たけはる)



大阪大学産業科学研究所教授。博士（医学）。

■略歴 1968年大阪府に生る。92年筑波大学生物学類卒業。98年東京大学大学院医学系研究科修了。同年理化学研究所基礎科学特別研究員。2001年JST さきがけ研究員。05年北海道大学電子科学研究所教授。08年JST さきがけ研究者（兼任）。12年より現職。

■研究テーマと抱負 とんがったバイオイメーjing技術の開発とそれを利用してアプローチする少数性生物学。決してすぐには役に立たないけれども、いつかは人々のモノの見方を変えるような発明・発見に結びつく超オモロイ研究をすること。

■ホームページ <http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/>

■趣味 お酒を飲みながらの科学談義。かつ飛びスキー。かつ飛びドライブ。湯船につかりながらの読書。