

4 Engineering for Visualization of Cellular Functions

4.1 Genetically-Encodable Probes

In the past several years, various probes for cellular functions have been generated using FPs. Those probes employ simple GFP variants, circularly permuted GFP variants [10], or pairs of GFP variants that permit fluorescence resonance energy transfer (FRET) [32, 33]. Because the probes can be introduced by gene transfer techniques, they have significant advantages over conventional organic dyes. For instance, whereas conventional optical imaging of brain tissue stained with voltage-sensitive dyes is a noninvasive technique for recording the activities of a number of neurons simultaneously, it collects signals from all cell types including glial cells, which represent a large fraction of the total membrane surface in brain. By contrast, the selective introduction of genetically encoded probes into certain neurons has enabled the elimination of glial signals. Moreover, it is possible to place the probes within specific subcellular compartments where the desired signals predominate. The following section describes development of the probes that employ simple GFP variants or circularly permuted GFP variants.

4.2 Voltage Sensors

The prototype of the voltage-sensitive fluorescent protein is 'FlaSh' [34]. Insertion of wild-type GFP after the sixth transmembrane domain of a nonconducting mutant of the Shaker potassium channel has led to the generation of the sensor. In the construct, the voltage-driven rearrangement of the channel is converted into the change in fluorescence intensity of the GFP. It shows relatively complex and slow kinetics ($\tau_{\text{off}} > 85$ ms), suggesting that the structural rearrangement is related to the C-type inactivation of the channel. Recently, FlaSh has been significantly improved and diversified [35]. The substitution of various GFP variants has expanded its readout from single wavelength intensity modulating to dual wavelength ratiometric, and has produced probes with fast kinetics. In addition, mutations in the channel domain have tuned the probes. For example, the deletion of the N-terminal ball domain has improved the response rate and the Shaker S4 mutation L366A has negatively shifted the narrow dynamic range by approximately 30 mV, thereby enabling efficient detection of voltage changes around $-60 \sim -70$ mV occurring in retinal neurons.

Another genetically encoded voltage probe has been generated using a similar approach but a different channel. The probe termed 'SPARC' contains a mammalianized wild-type GFP inserted into an intracellular loop of a reversibly nonconducting form of the rat $\mu 1$ skeletal muscle voltage-gated sodium channel [36]. It can detect depolarizing pulses as short as 2 ms without inactivation

during extended depolarizations, which indicates that the fluorescence change is due to gating charge movement of a single domain of the channel.

4.3

Calcium Sensors

Our understanding of the structure-photochemistry relationships of GFP has enabled the development of genetic calcium probes based on a single GFP variant. Camgaroo-1 was constructed by inserting calmodulin (CaM) between positions 145 and 146 of YFP [10]. The Ca^{2+} -dependent conformational change of CaM induces the ionization of the chromophore, resulting in fluorescence increase of up to sevenfold. The chromophore development of this probe has been improved (camgaroo-2) by an amino acid substitution, Q69M [8].

Two groups fused circularly permuted green fluorescent proteins (cpGFPs) in which the amino and carboxyl portions had been interchanged around position 145 and reconnected by short spacers between the original termini, to CaM and its target peptide, M13. Chimeric proteins G-CaMP [37] and pericam [11] are fluorescent and their spectral properties change reversibly with Ca^{2+} concentration, probably due to the interaction between CaM and M13, leading to an alteration of the environment surrounding the chromophore.

G-CaMP is a single wavelength intensity modulating probe for Ca^{2+} . Fast mobilization of Ca^{2+} upon depolarization was observed in myotubes expressing the G-CaMP probe [37]. Recently, G-CaMP was applied to a functional analysis of odor-evoked patterns of activity in the neural assemblies in *Drosophila* antennal lobe [38]. The probe was expressed in olfactory receptor neurons or projection neurons, and patterns of glomerular activity were imaged in the antennal lobe presynaptically or postsynaptically, respectively. Odors elicited specific patterns of glomerular activity that were conserved in multiple flies, and the specific responsivity of a given glomerulus was found to be a consequence of the specificity of a single odorant receptor expressed by the incoming sensory neurons. Those observations are consistent with the "one neuron-one receptor" principle [39] that holds true for both vertebrate and insect olfactory systems.

Three types of pericam have been obtained by mutating several amino acids adjacent to the chromophore [11]. Of these, "flash pericam" becomes bright with Ca^{2+} like G-CaMP, whereas "inverse pericam" dims. On the other hand, "ratiometric pericam" has an excitation wavelength changing in a Ca^{2+} -dependent manner, thereby enabling dual excitation ratiometric Ca^{2+} imaging (Fig. 5A). Ratiometric pericam permits quantitative Ca^{2+} measurement by minimizing the effects of several artifacts that are unrelated to changes in free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) (Fig. 5B). It has been successfully used to monitor changes in $[\text{Ca}^{2+}]$ in cardiomyocyte mitochondria. That study has demonstrated that mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ oscillates synchronously with cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ during beating [40]. A laser-scanning confocal microscopy (LSCM) system has been modified for obtaining confocal images of Ca^{2+} using ratiometric pericam [41]. Rapid

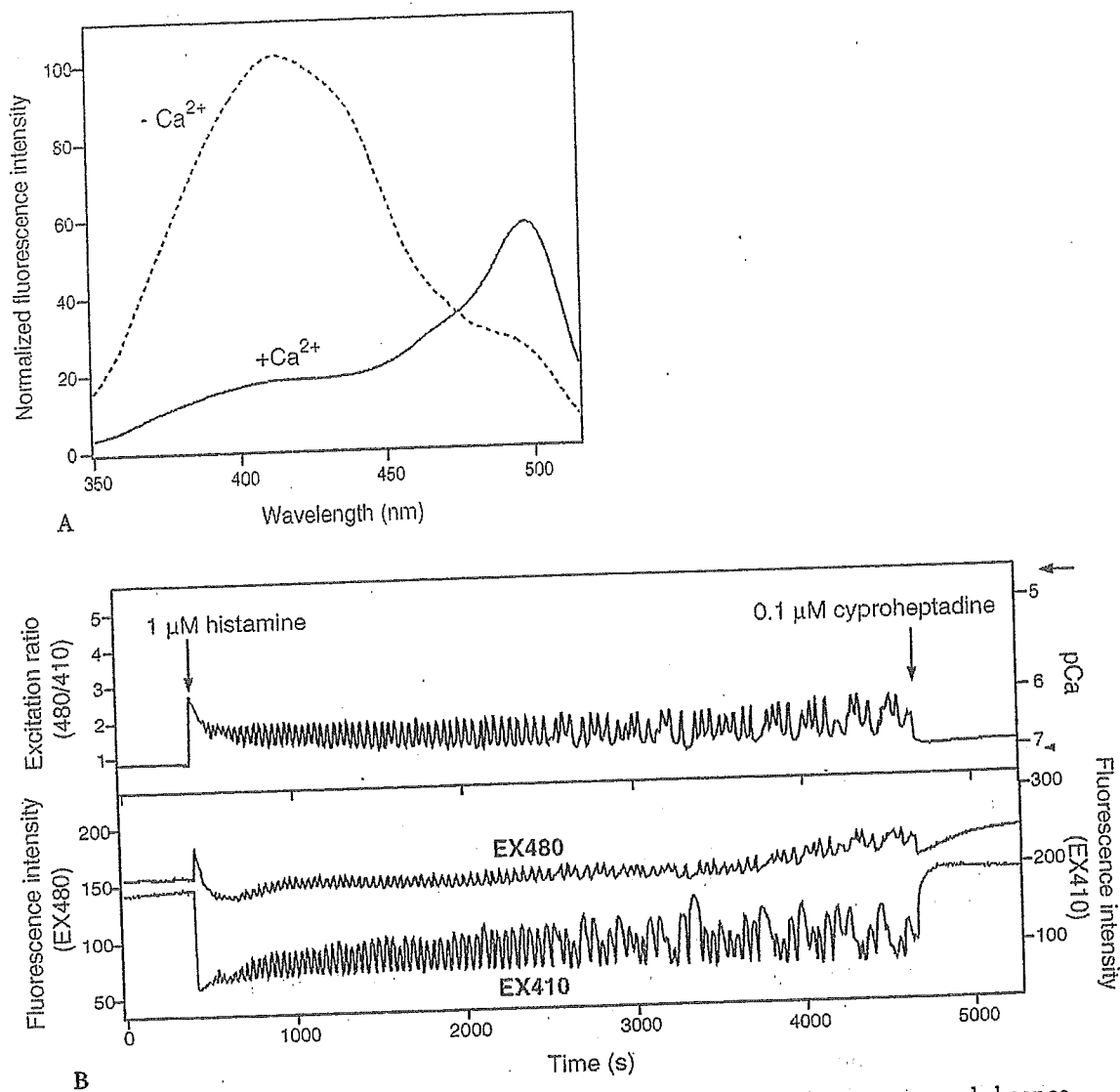


Fig. 5 A Excitation and emission spectra of ratiometric pericam in the presence and absence of calcium. B Typical $[Ca^{2+}]_i$ transients and oscillations induced by receptor-stimulations in HeLa cells expressing ratiometric-pericam. The sampling interval was 3~5 s. The right-hand ordinate calibrates $[Ca^{2+}]_i$ in μM with R_{max} and R_{min} indicated by an arrow and arrowhead, respectively. Reprinted with permission from Nagai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3197 (2001). Copyright © 2001 National Academy Sciences, USA

exchange between two laser beams has been achieved using acousto-optic tunable filters. Samples are scanned on each line sequentially by a violet laser diode (408 nm) and a diode-pumped solid state laser (488 nm). In this way, the ratios of the excitation peaks can be obtained at frequencies of up to 200 Hz, which enables visualization of Ca^{2+} dynamics within a motile mitochondrion.

Acknowledgements This work was supported by grants from CREST of JST (Japan Science and Technology), the Japanese Ministry of Education, Science and Technology, and HFSP (Human Frontier Science Program).

References

1. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) *Gene* 111:229
2. Tsien RY (1998) *Annu Rev Biochem* 67:509
3. Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zarakisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA (1999) *Nat Biotechnol* 18:969
4. Labas YA, Gurskaya NG, Yanushevich YG, Fradkov AF, Lukyanov KA, Lukyanov SA, Matz MV (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4256
5. Remington SJ (2002) *Nat Biotechnol* 20:28
6. Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK, Tsien RY (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11990
7. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) *Nat Biotechnol* 20:87
8. Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY (2001) *J Biol Chem* 276:29188
9. Reid BG, Flynn GC (1997) *Biochemistry* 36:6786
10. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11241
11. Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3197
12. Rekas A, Alattia JR, Nagai T, Miyawaki A, Ikura M (2002) *J Biol Chem* 277:50573
13. Mizuno H, Sawano A, Eli P, Hama H, Miyawaki A (2001) *Biochemistry* 40:2502
14. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11984
15. Sacchetti A, Subramaniam V, Jovin TM, Alberti S (2002) *FEBS Lett* 525:13
16. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7877
17. Bevis BJ, Glick BS (2002) *Nat Biotechnol* 20:1159
18. Terskikh AV, Fradkov AF, Zarakisky AG, Kajava AV, Angres B (2002) *J Biol Chem* 277:7633
19. Terskikh A, Fradkov A, Ermakova G, Zarakisky A, Tan P, Kajava AV, Zhao X, Lukyanov S, Matz M, Kim S, Weissman I, Siebert P (2000) 290:1585
20. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J (2002) *Science* 297:1873
21. van Thor JJ, Gensch T, Hellingwerf KJ, Johnson LN (2002) *Nat Struct Biol* 9:37
22. Ando R, Hama H, Yamamoto-Hino M, Mizuno H, Miyawaki A (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12651
23. Mizuno H, Mal TK, Tong KI, Ando R, Furuta T, Ikura M, Miyawaki A (2003) *Mol Cell* 12:1051
24. Chudakov DM, Feofanov AV, Mudrik NN, Lukyanov S, Lukyanov KA (2003) *J Biol Chem* 278:7215
25. Chudakov DM, Belousov VV, Zarakisky AG, Novoselov VV, Staroverov DB, Zorov DB, Lukyanov S, Lukyanov KA (2003) *Nat Biotechnol* 21:191
26. Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:906
27. Gurskaya NG, Fradkov AF, Terskikh A, Matz MV, Labas YA, Martynov VI, Yanushevich YG, Lukyanov KA, Lukyanov SA (2001) *FEBS Lett* 507:16
28. Karasawa S, Araki T, Yamamoto-Hino M, Miyawaki A (2003) *J Biol Chem* 278:34167
29. Wiedenmann J, Elke C, Spindler KD, Funke W (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14091
30. Yanushevich YG, Staroverov DB, Savitsky AP, Fradkov AF, Gurskaya NG, Bulina ME, Lukyanov KA, Lukyanov SA (2002) *FEBS Lett* 511:11

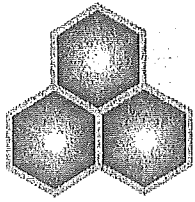
31. Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) *Science* 296:913
32. Miyawaki A (2003) *Curr Opin Neurobiol* 13:591
33. Miyawaki A (2003) *Dev Cell* 4:295
34. Siegel MS, Isacoff EY (1997) *Neuron* 19:735
35. Guerrero G, Siegel MS, Roska B, Loots E, Isacoff EY (2002) *Biophys J* 83:3607
36. Ataka K, Pieribone VA (2002) *Biophys J* 82:509
37. Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) *Nat Biotechnol* 19:137
38. Wang JW, Wong AM, Flores J, Vosshall LB, Axel R (2003) *Cell* 112:271
39. Wang F, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (1998) *Cell* 93:47
40. Robert V, Gurlini P, Tosello V, Nagai T, Miyawaki A, Di Lisa F, Pozzan T (2001) *EMBO J* 20:4998
41. Shimozone S, Fukano T, Nagai T, Kirino Y, Mizuno H, Miyawaki A (2002) *Sci STKE* 125:PL4

遺伝子医学MOOK別冊/分子生物学実験シリーズ

図・写真で観る
タンパク構造・
機能解析実験
実践ガイド

別刷

株式会社 メディカルドゥ



4. 細胞レベルによる機能解析

1) GFPを利用した蛍光バイオセンサーの作製法と生体機能の可視化

北海道大学電子科学研究所ナノシステム生理学研究分野 教授¹
 理化学研究所脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム チームリーダー²
 永井 健治¹, 宮脇 敦史²

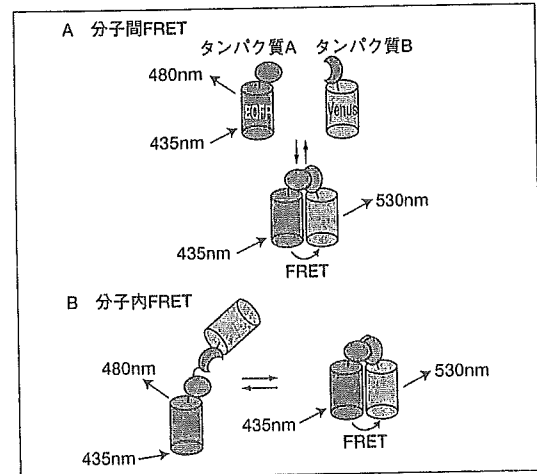
はじめに

緑色蛍光タンパク質とその変異体（以下、蛍光タンパク質）は遺伝子導入するだけで細胞内に蛍光を作り出すことができるため、生きている細胞内でのタンパク質の局在や動態をリアルタイムに追跡するための道具として多くの研究者に利用され、数多くの情報が蓄積している。一方で、興味あるタンパク質の局在や動態が変化する過程で、いつ活性化・不活性化するのか、どこで他の分子と相互作用しているのかに関する知見はまだまだ少ない。いわゆる生体機能イメージング研究が注目されつつある理由は、抗体染色や蛍光タンパク質をフュージョンしたタンパク質の観察だけではうかがい知れないタンパク質活性化の空間パターンや時間的変動など、より本質的な生理現象の理解に必要な情報を得ることができるからである。そのためには蛍光タンパク質の物理化学的性質や蛍光タンパク質間の蛍光のエネルギー移動（FRET）を巧みに利用して、生体機能の時空間的活性化動態を可視化する蛍光バイオセンサーを作製することが要求される。ところが、この蛍光バイオセンサーの作製がかなりの厄介もので、多くの研究者がつまずくところである。マニュアル本が多数出回っている分子生物学的技法と異なり、蛍光バイオセンサー作製は遺伝子工学的に可能とはいえ一筋縄ではいかず試行錯誤を必要とするからである。本稿では、少しでもこの困難を緩和すべく、筆者らが最近開発した作製技術、バイオセンサー、およびそれらを用いたイメージングの実際を解説する。

I 原理

FRETとは2つの分子間におけるエネルギー供与体（ドナー）からエネルギー受容体（アクセプター）へのエネルギー移動のことをいう。より具体的には、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルに重なりがあり、励起状態にあるドナーの近傍（～10 nm以下）に、ある相対的位置関係を保ってアクセプターが存在するとき、無輻射的にドナーの励起エネルギーがアクセプターに移動する結果、アクセプターが励起され、アクセプターが蛍光分子であれば、それ固有の蛍光が観察される現象がFRETである。この現象を利用すれば光学顕微鏡の空間分解能を超えたナノスケールの変化、生物学的にはタンパク質間相互作用（分子間FRET, 図1A）やタンパク質立体構造変化（分子内FRET, 図1B）を蛍光の変化

図1 ECFPをドナー、YFP変異体Venusをアクセプターとして用いた分子間FRETと分子内FRETの模式図



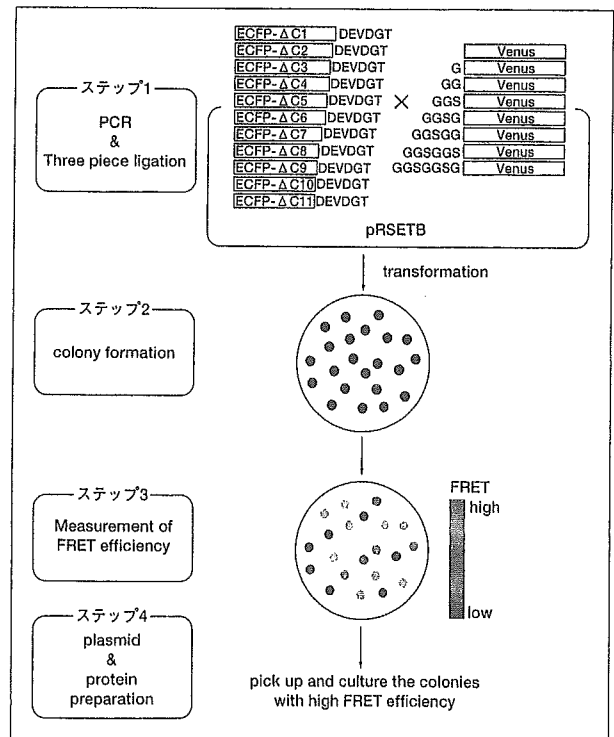
として捉えることが可能になる¹²⁾。

GFP間FRETを利用する際の銘記すべき注意点が3つある。

第1点は、GFP蛍光の環境依存特性を念頭に置いてFRETのドナーとアクセプターを選択するということである。FRETはちょうどアメフトのパスにたとえると、ボールを投げる側とレシーブする側双方の能力に依存して、その効率が決定される¹³⁾。レシーバーのキャッチ能力が周囲の状況に左右されている場合はパスの成功率が低下する。GFP変異体であれば、FRETのペアとしてはCFP (cyan fluorescent protein), YFP (yellow fluorescent protein) がそれぞれドナー、アクセプターとして最も頻繁に利用されているが、一般的に用いられているClontech社のEYFPはその吸収特性がpHをはじめとする様々な要因によって影響を受けるためアクセプター (レシーバー) として好ましくない。したがって、CFPとYFPを基にしたFRETにおいてはpH変動などによるアーティファクトを常に念頭に置かねばならない。例えば、細胞外刺激によってpHが下がっただけでFRET量が減少し、あたかも分子間の解離が起こったかのように見えるからである。より信頼のおけるFRET観察のためには、EYFPの上記欠点を克服した変異体 (Citrine¹⁴⁾, Venus¹⁵⁾) をアクセプターとして使用することをお薦めする。

2点目は蛍光タンパク質と目的タンパク質との間にどのようなアミノ酸配列をリンカーとして挿入するかである。これは蛍光バイオセンサーのシグナル変化量 (ダイナミックレンジ) に大きく関わってくる。これまでに報告されたFRETを利用したバイオセンサーのダイナミックレンジは数10%であり、多くても100% (2倍の変化) に満たない。ダイナミックレンジが小さいと非常にわずかなシグナル変化を見逃すことになってしまう。あらゆるシグナル変化を効率よく、かつ簡便に捉えるためにはバイオセンサーのダイナミックレンジは大きければ大きいほどよい。さて、あるシグナルに依存したタンパク質構造変化を分子内FRETで捉えるためのバイオセンサーを作製する際、ドナーおよびアクセプター-GFPをシグナル依存的な構造変化が期待されるタンパク質につなぐ必要があるが、この時どのようなアミノ酸配列を介してつなげるかによってFRET効率が劇的に変化するということを必ず経験する。ダイナミックレンジの大きなセンサーを作るためには最適なアミノ酸配列を試行錯誤の末見つけなければならないが、この作業には手間と時間がかかる。筆者らは、機能ドメインを含めた1つのタンパク質分子上でドナーからアクセプターへ効率のよいFRETを実現することがまず重要と考えている。そのために短時間で簡便にリンカー配列を最適化する方法を報告した⁶⁾。この方法はまず、あらかじめPCR法により様々な長さのグリシンとセリンからなるアミノ酸配列をもつ蛍光タンパク質を用意しておき (ドナー、アクセプターそれぞれ10種類程度)、目的タンパク質cDNAおよび大腸菌用タンパク質発現ベクターと混ぜ合わせてライゲーションさせる。理論上

図2 単一分子内で高効率FRETを達成するためのハイスループット法 (文献6より)

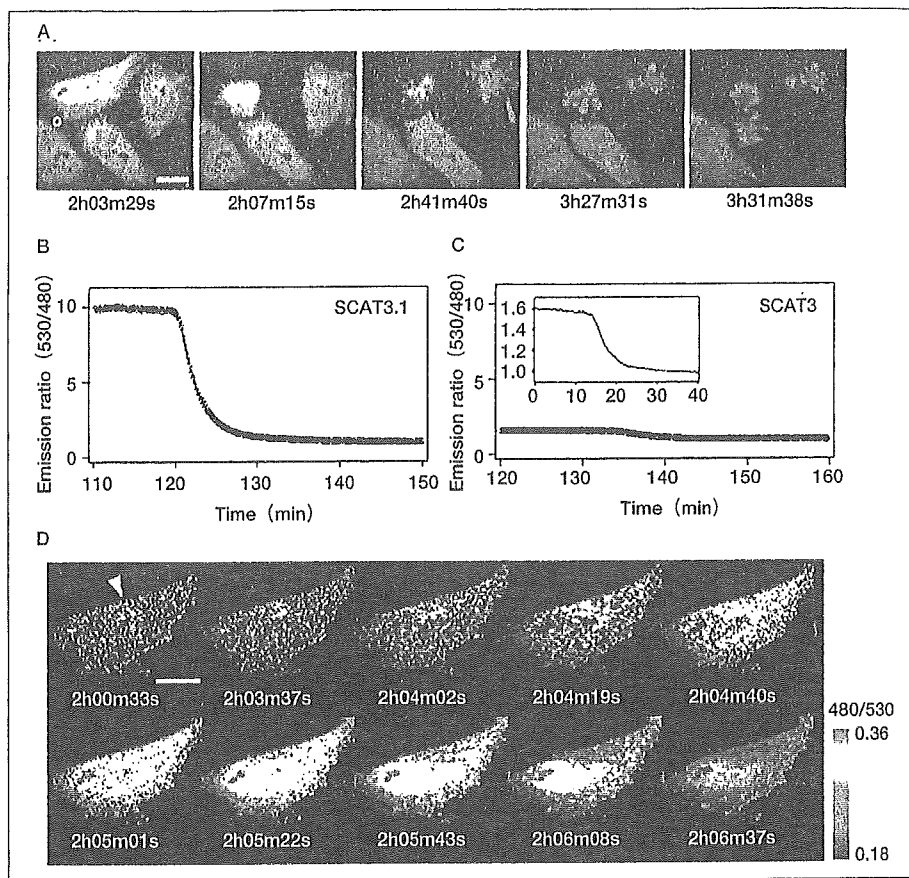


100種類程度のバイオセンサー発現プラスミドが出来上がるわけである。次に、そのプラスミド混合液で大腸菌をトランスフォームし、LBプレート上で培養すれば、様々なFRET効率をもつコロニーが現れる。その中からFRET効率の高い大腸菌をスクリーニングする(図2)。およそ1週間で高効率FRETを示すコンストラクトを得ることができる。これを材料にして、様々なバイオセンサーが開発できる。また、プロテアーゼ活性などタンパク質の切断を伴う現象を可視化するバイオセンサーのスクリーニングには、本方法が直接利用できる。活性化型カスパーゼ3センサーであるSCAT3³¹⁾の改変を試みた結果、90%のダイナミックレンジをもつセンサー(SCAT3.1)を作製することができた³¹⁾(図3)。

3点目は蛍光タンパク質円順列変異体の利用である。これも2点目同様FRET効率の変化に関わること

である。FRET効率はもっぱらドナー-アクセプター間距離に大きく依存すると考えられがちであるが、蛍光タンパク質のような巨大分子を用いる場合にはドナー-アクセプター間の相対的角度も極めて重要なファクターとなる。例えば分子間FRETの場合、目的とするタンパク質の組み合わせ如何によっては、ドナーとアクセプターがぶつかり合う程度(<3 nm)に近接していたとしてもFRETが起こらなかったり、逆にそれらが多少離れていてもある程度のFRETが起こったりすることが起こりうる。前述したリンカー配列の改変により、ある程度ドナーとアクセプターの相対的位置関係を変えることができるかもしれないが、やはり限界がある。そこで筆者らはより積極的に相対的位置関係を改変するための方法を開発した³¹⁾。一般的に蛍光タンパク質を他のタンパク質に融合する場合、N末端またはC末端につなげるのが普通であるが、蛍光タンパク質の円順列変異体を使用すれば、本来のN末端、C末端とは全く異なる位置で他のタンパク質と融合することが可能に

図3 高性能バイオセンサーSCAT3.1を用いたアポトーシス過程におけるカスパーゼ3活性化の可視化(文献6より)



A. SCAT3.1を発現したHeLa細胞を3 CCDとCSU21で捉えた共焦点カラー画像。カスパーゼ3の活性化に伴いSCAT3.1の蛍光色が黄色からシアン色に変化し、その後、アポトーシスに典型的な細胞の収縮が起きる。抗Fas抗体を投与後の時間を各画像の下に示した。スケールバーは10 μ m。
B,C. SCAT3.1 (B) およびSCAT3 (C) の経時的レシオ(535/480)変化。
D. A内左上部の細胞におけるSCAT3.1のレシオ変化を擬似カラーで表示したもの。細胞質のある領域(矢印)からカスパーゼの活性化が起きていることがわかる。スケールバーは10 μ m。

(グラビア頁参照)

なる。したがって、蛍光タンパク質の様々な円順列変異体を用いれば様々な方向で蛍光タンパク質を融合することができるようになり、FRET効率を変えることができる。この発想に基づきカルシウムセンサーであるcameleon (YC3.12)³⁾の改変を行ったところ、173番目のアミノ酸を新たなN末とする円順列変異Venus (cp173Venus) をアクセプターにもつcameleon (YC3.60) ではダイナミックレンジが大幅に改善し、カルシウムの有無で600%の変化量をもつまでに至った (図4)。

II 実験の準備

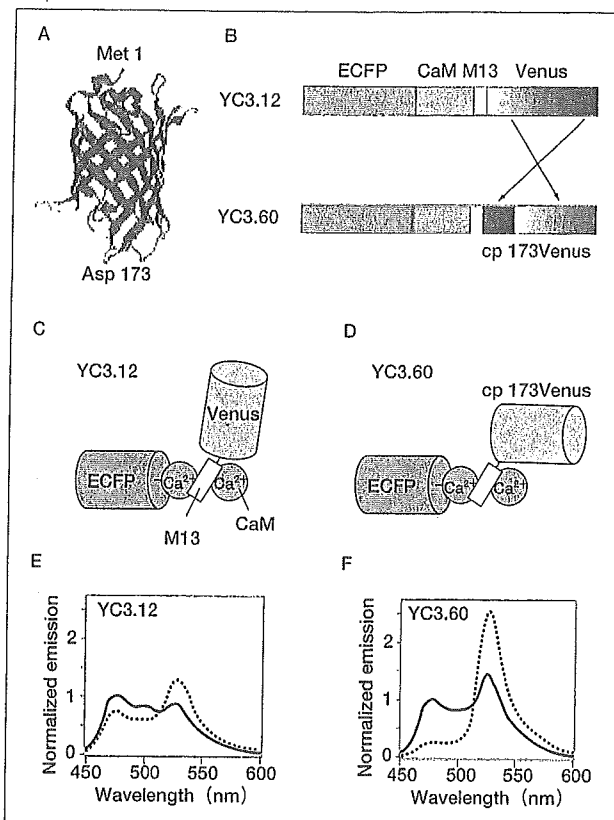
1. 器具・機器類

- ・倒立顕微鏡 (オリンパスIX-71など)
培養細胞の観察であれば正立型よりも倒立型を用いるほうがより大きな開口数をもつ対物レンズを選択できるため、空間分解能の高い観察が可能になる。また、開口数の大きな対物レンズは小さなものに比べて、同じ励起光強度で励起した場合、より明るい蛍光像を取得できるという利点もある。
- ・温度制御チャンバー (オリンパス MI-IBC-Iなど)
- ・CSU10またはCSU21 (横河電機) (図5)
CSUはニポウディスクを用いた共焦点観察ユニットである。ニポウディスクによって多点を走査するため、ガルバノミラースキャンと異なり、共焦点画像をCCDで検出することができる。また、多点走査ゆえに単点走査型よりも画像取得レートが速いという特長 (CSU10で最大30フレーム/秒, CSU21で最大1000フレーム/秒) をもつ。
- ・430DPSSレーザー (Meles Griot社)
CFP-YFP間のFRET観察では他に442nmのHeCdレーザーや405nm半導体レーザー、マルチアルゴンレーザーの458nmラインを使用できる。ただし、405nmを使用するとYFPの光褪色が他のレーザーに比べて激しい。また、458nmではYFPのクロス励起が起これ、センサーのダイナミックレンジ低下を引き起こしてしまう。
- ・3 CCD (浜松ホトニクス) (図5)
カラーカメラをFRET観察に使用する際はFRET観察実験の項を参照のこと。
- ・アクアコスモス画像解析ソフト (浜松ホトニクス)

2. 試薬・溶液類

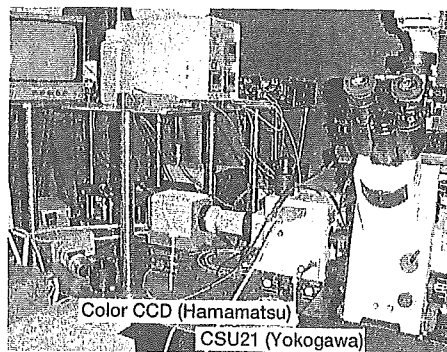
- ・刺激薬

図4 円順列変異GFPを利用したバイオセンサーの性能改善例 (文献8を一部改変)



- A. GFPの立体構造。1番目と173番目のアミノ酸 (それぞれメチオニン、アスパラギン酸) の位置を示した。
- B. YC3.12とYC3.60の構造模式図。YC3.60ではアクセプターにcp173Venus (173番目のアミノ酸を新たなN末とする円順列変異体) をもつ。
- C, D. YC3.12とYC3.60のカルシウム結合型立体構造概念図。これらはあくまでも想像である。アクセプター分子の結合角度が円順列変異体の使用によって変わること注意到。
- E, F. YC3.12とYC3.60のスペクトル変化。赤がカルシウム結合時、青がカルシウム非結合時を示す。励起波長は435 nm。YC3.12に比べYC3.60のカルシウム有無でのスペクトル変化がはるかに大きいことに注目。(グラビア頁参照)

図5 共焦点FRET顕微鏡観察システム



ここでは細胞内カルシウム動員のためにATP (Sigma社) を、細胞死誘導のために抗Fas抗体 (MBL社, 医学生物学研究所) を使用する。

・ガラスコーティング試薬

細胞種にもよるが一般的にはガラス面上には細胞は接着しにくく、細胞形態や生理機能に異常をきたす場合がある。ガラス面上で細胞が正常に生育しない場合はpoly-L-lysineやコラーゲンなどでコーティングし、接着性を高める必要がある。ただし、細胞によってはコーティングする試薬によって生理機能が変化することもありうるので、コーティング剤の選別が必要である。

・トランスフェクション試薬

われわれはHeLa, HEK293, Cos7, NIH3T3などへの遺伝子導入にはSuperfect (Qiagen社) を用いている。様々なトランスフェクション試薬が市販されているが、ものによっては細胞毒性の強いものもあるので、自分が使用する細胞に適したものを選別すること。

・35mmガラスボトムディッシュ (マツナミガラス D111300など)

生物顕微鏡の対物レンズでカバーガラスを通して観察するタイプのものは、カバーガラス厚を0.17mmとして設計されている。したがって、ガラスボトムディッシュに貼り付けられているガラスの厚さも0.17mmに近いものを選ぶこと。

・細胞観察用溶液

通常の細胞培養用培地には蛍光性のフェノールレッドが入っており、バックグランド蛍光を増加させてしまうので、蛍光観察の際には下記の組成の培地に交換するか、フェノールレッド・フリーのDMEM (Gibco社) などを使用する。

150mM NaCl

5mM KCl

1mM MgCl₂

2mM CaCl₂

10mM Glucose

25mM HEPES-NaOH (pH 7.2)

・蛍光バイオセンサー発現用プラスミド

ここではカルシウム濃度変化観察用にYC3.60⁹⁾ を、カスパーゼ3活性化観察用にSCAT3.1⁹⁾ を使用。プラスミドはイオン交換カラムやシリカカラム (Qiagen社, Sigma社など) やPEG沈殿法などを用いて精製したものを使用すること。

III 試料の調製

細胞種にもよるが、一般的にトランスフェクション前日に細胞を播種し、70~80%コンフルエントになったところでトランスフェクションする。筆者らはHeLa, HEK293, Cos7, NIH3T3, MDCKなどへの遺伝子導入にはSuperfect (Qiagen社) を用いている。理由は多くの細胞種に導入可能で、操作が簡便だからである。Superfectは細胞毒性が高いとよく言われているが、プラスミドDNAとSuperfectの量を調整すれば全く問題ない。以下、われわれ

が行っている35mmディッシュ1枚へのトランスフェクションの手順を示す。

1. 前日（およそ24時間前）

- 1) ガラスボトムディッシュをクリーンベンチ内で10分間UV滅菌する。
①
- 2) ガラスボトムディッシュのガラス部分に50 μ Lのコラーゲン希釈液（滅菌水で10倍に薄めたもの）を滴下する。
①
- 3) PBS（－）を2.5mL加える。
①
- 4) 室温で3分静置。
①
- 5) PBS（－）を吸い取る。
①
- 6) 2mLの培養液を加える。
①
- 7) 10cmディッシュ中で培養している細胞をトリプシンで分散させる。
①
- 8) 1×10^6 個程度の細胞をディッシュに播き、37 $^{\circ}$ Cで培養。

2. 当日

- 1) 0.5～1 μ gのプラスミドDNAを100 μ LのDMEMまたはOPTI-MEMが入った1.5mLポリプロピレンチューブに加え、ボルテック後、スピンドウン。
①
- 2) 4 μ LのSuperfectを加え、10回ピペッティング。
①
- 3) 室温で10分静置。
①
- 4) 前日から細胞を培養しているディッシュへ、DNA-Superfect混合液を滴下する。この際、培地を交換する必要はない。
①
- 5) ディッシュを左右前後にゆする。
①
- 6) 37 $^{\circ}$ Cで12～48時間培養。途中で培地を交換する必要はない。

IV 実験の実際および手順

1. FRET観察実験

FRETを観察するにはドナーを励起したときのドナーおよびアクセプターの蛍光画像（それぞれDD, DAと略す）を取得するいわゆる1波長励起2波長観察が一般的である。蛍光フィルターを電動で交互に入れ替えることによる画像取得が最も簡便な方法であるが、DDとDAの画像取得に時差が生じるため、カルシウム動態などの早い生理反応を観察するのに適さない。異なる波長域の2画像を同時取得する方法としてW-View（浜松ホトニクス）

やDual-View (Optical Insights社) を用いてドナーとアクセプターをCCDの異なる面に投影する方法とカラーカメラを利用する方法がある。浜松ホトニクスではCFP-YFP間のFRET観察に特化した特性をもつカラーカメラ (3つのCCDチップとプリズムを内蔵) を販売しており、付属の画像取得・解析ソフトウェアと併用することにより、CFP-YFP間のFRETを通常のカラー画像取得と同様、簡単にイメージングすることができる。もしZ軸空間分解能を上げたい場合にはスピニングディスク共焦点ユニット (横河電機, CSU10, CSU21) を利用する。CSUを利用すればガルバノミラー走査型共焦点顕微鏡では不可能なフルフレームのリアルタイム観察 (30Hz以上) が可能となり、空間分解能だけでなく時間分解能も向上する。もちろん数秒または数分おきのタイムラプス画像取得も可能である。

- 1) トランスフェクション済み細胞培養ディッシュをインキュベータから取り出す。
①
- 2) 培養液を吸い取る。
①
- 3) 観察用培地を2mL加える。
①
- 4) 顕微鏡ステージの上に設置する*1。
①
- 5) キセノンまたは水銀のアーク光源を用いて、蛍光性細胞を探す*2。
①
- 6) 励起光を遮断する。
①
- 7) カメラによる画像取得開始。
①
- 8) CSUのシャッターを開け励起レーザーを照射する*3。
①
- 9) カメラのセッティングが終了したら、すぐにCSUのシャッターを閉じる。
①
- 10) タイムラプス観察開始*4。
①
- 11) 刺激薬剤を加える*5。
①
- 12) 画像取得続行*6。
①
- 13) 画像取得終了。
①
- 14) 光学系をアクセプターブリーチング用に変更する*7。
①

実践ポイント*1

哺乳類培養細胞を観察する場合、室温では生理反応がうまくいかない場合が多い。したがって、37°Cに温度設定可能な温度制御チャンバーの使用が望まれる。

実践ポイント*2

CFP-YFPペアを利用した蛍光バイオセンサーを発現させている場合は、420DF40 (励起フィルター) /455DRLP (ダイクロイックミラー) /470LP (ブロックフィルター) を用いて観察する。この際、励起光強度はND (ニュートラルデンシティ) フィルターで1~5%に減光しておく。眼が暗順応するまで見えにくいかもしれないが、我慢する。強い励起光を当てながら細胞を探すと、蛍光タンパク質が褪色してしまうし、細胞への光毒性も顕著になる。導入遺伝子由来の蛍光が自家蛍光よりも10倍以上は明るいものが望ましい。ただし、明るすぎる細胞は選ばないこと。過剰に発現した蛍光バイオセンサーが細胞内生理機能を攪乱するおそれがある。

実践ポイント*3

励起レーザーについても最初はNDフィルターで10%程度に減光したものを照射し、カメラの感度を考慮しながら、徐々に強度を上げていく。高速に感度よく画像取得したい場合はカメラのビンギングを4に上げ、さらにゲインを最大にする。高い空間解像度で画像取得したい場合はビンギングを1または2にする。

実践ポイント*4

画像取得間隔は観る現象に応じて適宜調整する。例えば、カルシウム波の伝播を観察したい場合はビデオレート (30枚/秒)、細胞死を観察する場合は10秒間隔など。

実践ポイント*5

薬剤添加にはいろいろな方法がある。ピペットを利用して滴下する方法は簡便ではあるが、滴下位置のばらつきがそのままデータのばらつきにつながる場合もある。灌流による薬剤添加のほうが再現性のあるデータが出やすい。

実践ポイント*6

場合によっては画像取得間隔を変更してもよい。

実践ポイント*7

アクセプターブリーチング用のフィルターとして、われわれは以下のものを用いている。

励起フィルター: 525AF25
ダイクロイックミラー: 560DRLP
蛍光フィルター: 590AF60
このフィルターセットを用いるとCFPの蛍光に影響を与えず、かつアクセプターの褪色過程を3 CCDの赤チャンネルでモニターできる。

- 15) アクセプターブリーチング**。
- ①
- 16) ドナー画像の取得**。
- ①
- 17) データ保存。
- ①
- 18) レシオ画像とFRET効率などの計算。
- ①
- 19) 経時変化解析。

実践ポイント*8

アクセプターをブリーチングすることにより、FRETが起きていたかどうかを確認することができる。詳細は「FRETの評価と定量化」を参照のこと。

実践ポイント*9

ブリーチングが終了したら、速やかに光学系を元に戻し、ドナーの蛍光画像を取得すること。この画像の蛍光強度 (F_0) とタイムラプス観察中のドナー画像の蛍光強度 (F_{DA}) からFRET効率の変動が求められる。しかしながら、 F_0 と F_{DA} の取得に時差があるため、測定中に形態変化をする試料では、正確なFRET効率を求めることができない。アクセプターブリーチングはあくまでもFRETがどの程度起こっているかの目安を知るための方法であると考えたほうがよい。

2. FRETの評価と定量化

FRETの変化を画像で表示する方法として、ドナー画像 (DD) とアクセプター画像 (DA) 間の割算を行い、適当な擬似カラーを割算の値 (レシオ値) に応じた色調で表示する方法がよく用いられる。本方法 (レシオ画像化) の利点は、比を計算することで、励起光の照射むらや細胞の厚み、蛍光バイオセンサーの不均一な分布などによるFRETに依存しない蛍光強度の差をキャンセルし、FRETに依存した蛍光の変化を抽出することができることである。また、 Ca^{2+} イメージングの場合、画像取得終了後にionomycinなどのイオノフォアにより細胞膜の透過性を高めたうえで、mMオーダーの Ca^{2+} を添加した場合のレシオ値 (R_{max}) とEGTAなどで Ca^{2+} をキレートした場合のレシオ値 (R_{min}) を測定し、使用した Ca^{2+} センサーと Ca^{2+} との結合に関する情報 (解離定数, Hill係数) から細胞内の Ca^{2+} 濃度を計算することができる。計算には下記の式を用いる。

$$[Ca^{2+}] = K'd \times \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right)^{\frac{1}{n}}$$

[Ca^{2+}]: カルシウム濃度

$K'd$: Ca^{2+} センサーと Ca^{2+} の見かけの解離定数

R: 各測定点におけるDA/DDの値

R_{min} : すべての Ca^{2+} センサーが Ca^{2+} と結合していないときのR

R_{max} : すべての Ca^{2+} センサーが Ca^{2+} と結合しているときのR

n: Hill係数

レシオ画像によるFRET変化の表示は、ドナー-アクセプター画像間の割算だけを行えばよいので極めて簡便である。しかしながら、ドナー-アクセプター強度比の値は相対的な値であり、使用する光学系により変化してしまう。ドナー励起によりアクセプターが直接励起されたり、アクセプター蛍光を測定するチャンネルにドナーの蛍光が紛れ込んだりすると、FRETに依存しない蛍光も同時に測定してしまうからである。より絶対的な値を求める

には、FRET効率を算出すればよい。蛍光寿命測定法、アクセプターブリーチング法、ドナーブリーチング法、3フィルター法など様々な方法がある。本稿ではアクセプターブリーチング法を紹介した。原理としてはアクセプターをブリーチすることによりエネルギーを受け取る相手がいなくなり、その結果ドナーの蛍光強度が増加するというものである。この増加の割合からFRET効率 (E_T) が以下の式により算出される。

$$E_T = 1 - F_{DA} / F_D$$

F_{DA} : ブリーチング前のDDの蛍光量

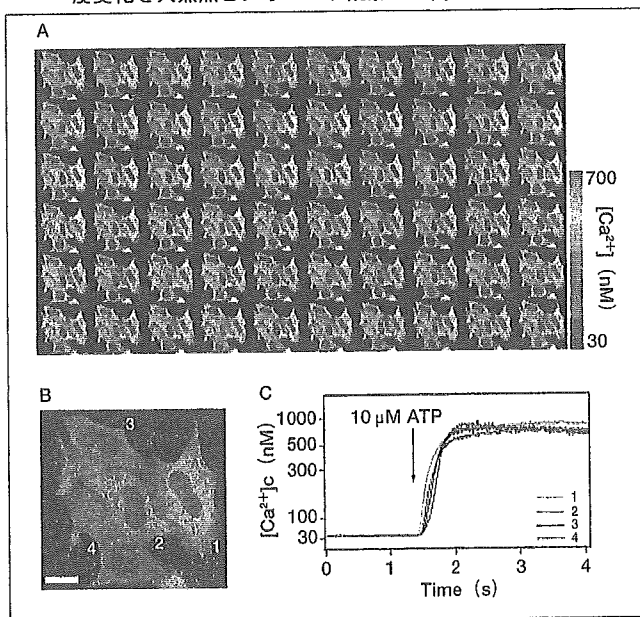
F_D : ブリーチング後のDDの蛍光量

ただし、前述したように F_D と F_{DA} の取得に時差があるため、測定中に形態変化をする試料では、正確なFRET効率を求めることができないことを銘記されたい。

V 実験結果

HeLa細胞にYC3.60を発現させ、ATP刺激による小胞体からのカルシウム動員の様子をビデオレイトで共焦点観察した。励起レーザーにはアクセプターであるVenusのクロス励起が最も少ない430nmを使用した。3CCDカメラのビニングは4とし、ゲインは最大、露光時間は約30msでバースト取得した。画像取得後バックグラウンド画像を減算し、アクアコスモソフトウェアのレシオ表示・カルシウム計算機能を用いて、「アクセプター画像/ドナー画像」の計算と、カルシウム濃度計算を行った。図6に結果を示す。YC3.60はダイナミックレンジが極めて大きいため、S/N比が非常に悪い観察を余儀なくされる共焦点ビデオレイト観察においてもコントラストの高い画像取得が可能であることがわかる。

図6 YC3.60を発現したHeLa細胞のATP刺激によるカルシウム濃度変化を共焦点ビデオレイト観察した例



A. ATP刺激後2秒間の全面像(33ms間隔)をモンタージュしたもの。グラデーションバーは各色に対応したカルシウム濃度を示す。
 B. カラー3CCDとCSU21で捉えたYC3.60を発現するHeLa細胞のリアルカラー画像。スケールバーは10 μ m。
 C. B内の数字で表した各細胞のカルシウム濃度変化。(グラフィア頁参照)

おわりに

蛍光タンパク質を利用した生体機能イメージングに関しては、何といつてもセンサーの出来不出来がその後の実験の良し悪しを決定してしまう。今回は蛍光タンパク質間FRETについての解説を行ったが、FRET以外にも蛍光タンパク質内挿入⁹⁾や蛍光タンパク質の円順列変異体^{9,10)}などを用いた方法があることを知っておいて損はないであろう。どうしてもFRETではうまくいかないという時にはそれらの方法も試してみるとよい。

引用文献

- 1) van Roessel P, Brand AH : Nat Cell Biol 4, E15-E20, 2002.
- 2) Miyawaki A : Dev Cell 4, 295-305, 2003.
- 3) 宮脇敦史 : 細胞工学 23, 227-230, 2004.
- 4) Griesbeck O, et al : J Biol Chem 276, 29188-29194, 2001.
- 5) Nagai T, et al : Nat Biotechnol 20, 87-90, 2002.
- 6) Nagai T, Miyawaki A : Biochem Biophys Res Commun 319, 72-77, 2004.
- 7) Takemoto K, et al : J Cell Biol 160, 235-243, 2004.
- 8) Nagai T, et al : Proc Natl Acad Sci USA 101, 10554-10559, 2004.
- 9) Baird GS, Zacharias DA, et al : Proc Natl Acad Sci USA 96, 11241-11246, 1999.
- 10) Nagai T, et al : Proc Natl Acad Sci USA 98, 3197-3202, 2001.

参考図書

- † 宮脇敦史 編 : 実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座3 GFPとバイオイメージング, 羊土社, 2000.
† 高田邦昭 編 : 注目のバイオ実験シリーズ 実験医学別冊 初めてでもできる共焦点顕微鏡活用プロトコール, 羊土社, 2004.

関連ホームページ

- PHOGEMON PROJECT公式マニュアル <http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/shuyouvirus/phogemon/index.htm>
(大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス分野)
Evrogen Fluorescent Proteins <http://www.evrogen.com/pl.shtml>
BD Biosciences Clontech <http://www.clontech.com/clontech/>
(株)医学微生物学研究所 <http://www.mbl.co.jp/res/flprotein.html>

Genetic Probes for Calcium Dynamics

Atsushi Miyawaki, Takeharu Nagai, and Hideaki Mizuno

Riken Brain Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351-0198, Japan

To investigate how a neural circuit operates as an ensemble in the nervous system, or how contraction of a group of muscles is coordinated, Ca^{2+} dynamics are monitored as a signal that results from electrical activity. Over the past few years, several calcium probes have been generated using fluorescent proteins (Miyawaki 2003a,b), in particular, the green fluorescent protein (GFP) (Tsien 1998) from the bioluminescent jellyfish, *Aequorea victoria*. These probes employ simple GFP variants, circularly permuted GFP variants (Baird et al. 1999), or pairs of GFP variants that enable fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Miyawaki et al. 1997). Because these probes can be expressed using gene transfer techniques, they have significant advantages over conventional organic fluorescent dyes. For instance, although the conventional optical imaging of brain tissue stained with voltage-sensitive dyes is a noninvasive technique for recording the activity of a number of neurons simultaneously, it collects signals from all cell types including glial cells, which represent a large fraction of the total membrane surface in the brain. In contrast, the selective introduction of genetically encoded probes into certain neurons will eliminate signals from glial cells. Moreover, it is possible to place the probes in specific sub-cellular compartments where the desired signals predominate. In this chapter, we focus on cameleons (Miyawaki et al. 1997) and ratiometric pericams (Nagai et al. 2001), both of which enable dual-ratio Ca^{2+} imaging. The molecular structures of these probes are shown in Figure 1.

CAMELEONS

FRET between two fluorophores is highly sensitive to the relative orientation and distance between the two fluorophores. This technique is amenable to emission ratioing, which is more quantitative than single-wavelength monitoring, and is also an ideal readout for fast imaging by laser-scanning confocal microscopy. Cameleons are chimeric proteins composed of a short-wavelength mutant of GFP, calmodulin (CaM), a glycylglycine linker, the CaM-binding peptide of myosin light-chain kinase (M13), and a long-wavelength mutant of GFP. Ca^{2+} binding to the CaM moiety of the cameleon initiates an intramolecular interaction between the CaM and M13 domains (Porumb et al. 1994). This interaction changes the chimeric protein from an extended conformation to a more compact one, thereby increasing the efficiency of FRET from the short- to the long-wavelength mutant of GFP (Miyawaki et al. 1997).

Since the prototype cameleon was released in 1997, several improvements have been made so that the cameleon (1) can be shifted to longer wavelengths, (2) is less sensitive to acidic pH, (3) exhibits more efficient maturity in mammalian cells at 37°C, and (4) exhibits a significantly wider dynamic range. First, whereas the original version has blue and green mutants of GFP as donor and acceptor, respectively, CFP and YFP have been substituted to make yellow cameleons (YCs). Subsequently, red cameleons have been constructed by incorporating RFP (DsRed) as an acceptor (Mizuno et al. 2001). Second, the original

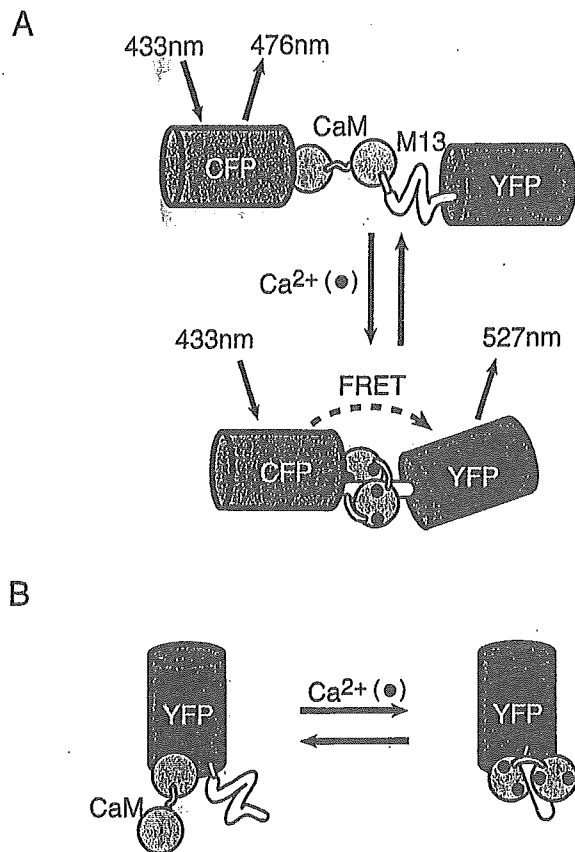


FIGURE 1. Schematic drawings of two genetically encodable indicators for Ca^{2+} . (A) Yellowameleon; (B) Pericam. (Modified, with permission, from Tsien 2000.)

version of the YC (YC2.0) has high pH sensitivity because its acceptor, enhanced YFP (EYFP), is quenched by acidification with a pKa of 7. The pH sensitivity of YCs has been markedly reduced by introducing the V68L and Q69K mutations into EYFP (EYFP.1) (Miyawaki et al. 1999). The improved YCs, including YC2.1 and YC3.1, permit Ca^{2+} measurement without perturbation by pH changes between pH 6.5 and 8.0. Third, two bright versions of YFP, citrine (Griesbeck et al. 2001) and Venus (Nagai et al. 2002), which mature efficiently at 37°C , have recently been developed. The rapid maturation of Venus in YC2.12 or YC3.12, for example, allows the immediate detection of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients after gene introduction in freshly prepared brain slices. Fourth, a new YC has been developed by substituting a circularly permuted variant of Venus in YC3.12. The resulting YC, YC3.60, shows five- to sixfold larger dynamic range than YC3.12. In this way, YCs have been improved mainly by optimizing the YFP component.

Responses of YC2.1 and YC3.1

YC2.1 yields an approximately twofold increase in emission ratio between zero and saturating Ca^{2+} (see Fig. 2A). YC2.1 shows a biphasic Ca^{2+} dependence (apparent dissociation constant K'_d , 100 nM and $4.3 \mu\text{M}$; Hill coefficient n , 1.8 and 0.6) and is most responsive near basal cytosolic Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Fig. 2B). YC3.1 displays a monophasic Ca^{2+} response curve (K'_d , $1.5 \mu\text{M}$; n , 1.1) and is expected to be helpful in quantifying relatively large $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients (Fig. 2B). Figures 2C and 2D compare the emission ratio responses of YC2.1 (C) and YC3.1 (D) to a supramaximal dose of histamine (0.1 mM) in HeLa cells. The initial peak and the subsequent plateau in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nearly saturated the YC2.1 response, although in one cell, a sustained oscillation with a mean frequency of 0.05 Hz was superimposed on the plateau. The application of cyproheptadine, a histamine antagonist, caused a large decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to previous resting values. In contrast, YC3.1 showed apparently much

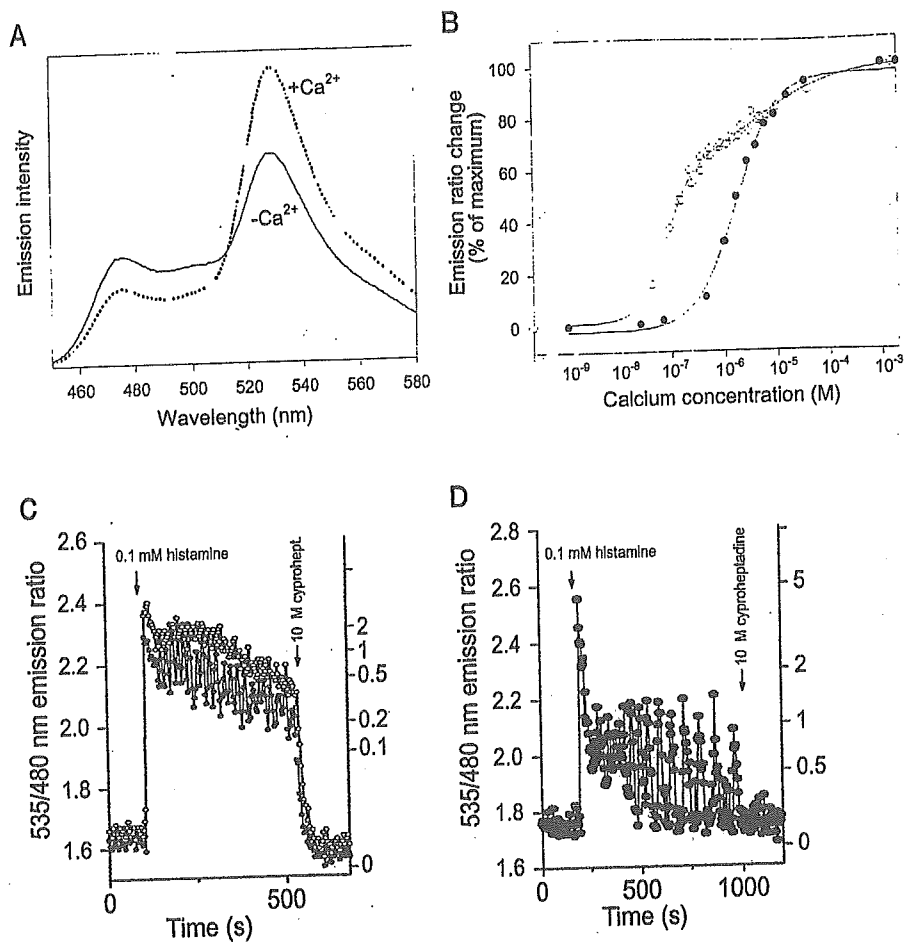


FIGURE 2. Characterizations of yellow cameleons. (A) Emission spectra of YC2.1 (excited at 432 nm) with 100 μM EGTA (solid line) and 100 μM CaCl_2 (dotted line) at pH 7.3. (B) Ca^{2+} titration curves of YC2.1 (open circles) and YC3.1 (closed circles). (C, D) Typical Ca^{2+} transients reported by YC2.1 (C) and YC3.1 (D) in HeLa cells induced by 0.1 mM histamine. (B, C, D, Reprinted, with permission, from Miyawaki et al. 1999 [© National Academy of Sciences].)

sharper $[\text{Ca}^{2+}]_c$ spikes. All spikes except the first reached only approximately halfway between R_{\min} and R_{\max} , indicating that their amplitudes were approximately equal to the K'_d of YC3.1 for Ca^{2+} , 1.5 μM . However, the relatively weak Ca^{2+} affinity also prevented the detection of the sustained plateau elevation between spikes. Therefore, the only apparent effect of cyproheptadine was to stop the oscillations.

Expansion of Ca^{2+} Responses of YCs

To achieve a Ca^{2+} -dependent large change in the relative orientation and distance between the fluorophores of CFP and YFP, a very recent work (Nagai et al. 2004) has used circularly permuted YFPs (cpYFPs), in which the amino and carboxyl portions were interchanged and reconnected by a short spacer between the original termini (Baird et al. 1999). Circular permutation was conducted on Venus, and new termini were introduced into surface-exposed loop regions of the β -can. One of the variants, cp173Venus, was given a new amino terminus at Asp-173, which is far removed at the opposite end of the β -can from the original amino terminus, Met1 (Fig. 3A). YC3.60 was generated by replacing Venus in YC3.12 with cp173Venus (Fig. 3B). Compared to YC3.12, YC3.60 is equally bright, but shows five- to sixfold larger dynamic range (Fig. 3C). Thus, YC3.60 gives a greatly enhanced signal-to-noise ratio (SNR), thereby enabling Ca^{2+} imaging experiments that were not possible with conventional YCs. YC3.60 shows a monophasic Ca^{2+} response curve (K'_d , 0.25 μM ; n , 1.7).

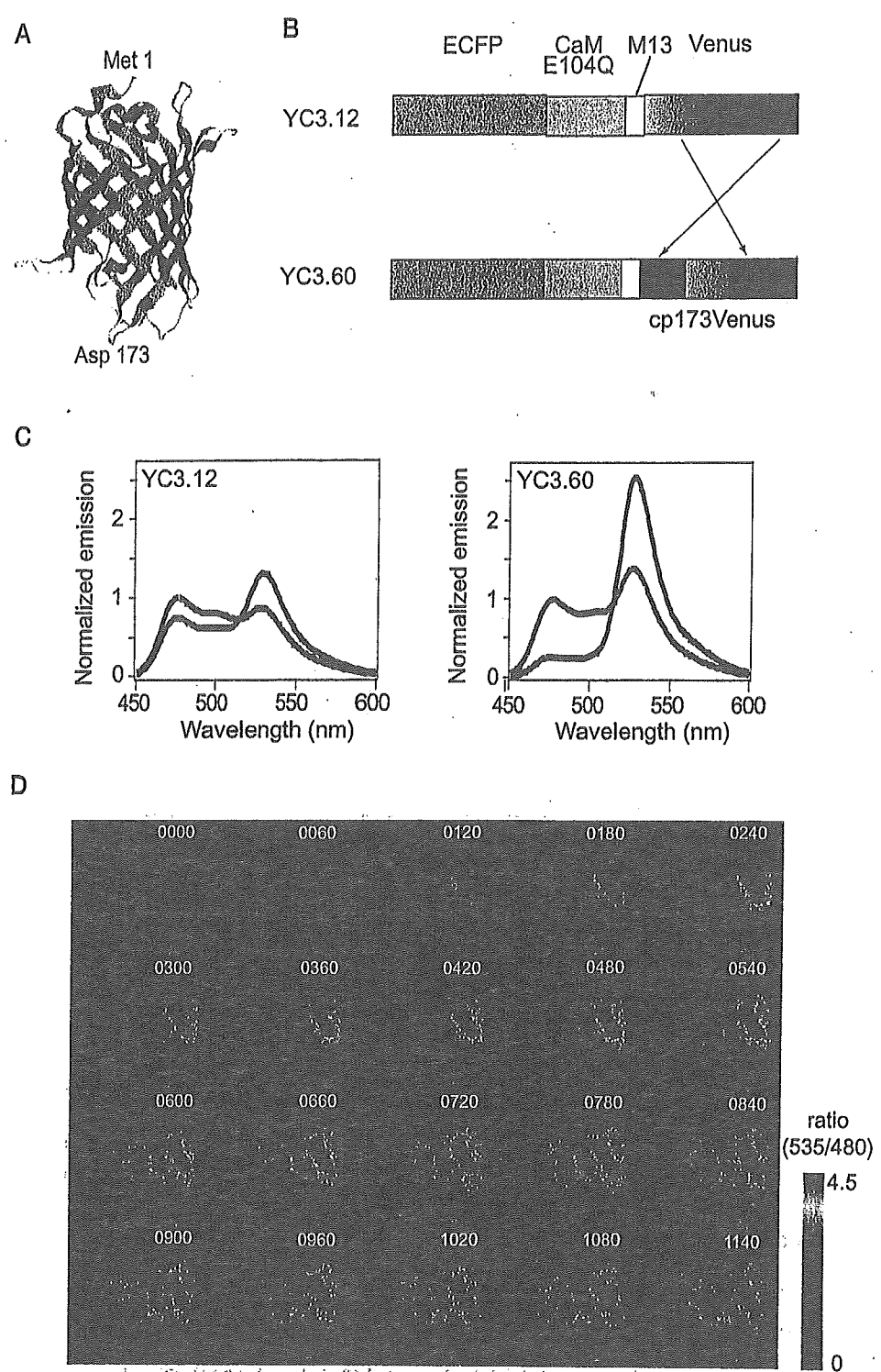


FIGURE 3. Development and performance of YC3.60. (A) The three-dimensional structure of GFP with the positions of the original (Met1) and the new (Asp173) amino termini indicated. (B) Domain structures of YC3.12 and YC3.60. (CaM) *Xenopus* calmodulin; (E104Q) mutation of the conserved bidentate glutamate (E104) at position 12 of the third Ca²⁺-binding loop to glutamine. (C) Emission spectra of YC3.12 (left) and YC3.60 (right) (excitation at 435 nm) at zero (blue line) and saturated Ca²⁺ (red line). (D) A series of confocal pseudo-colored ratio images showing propagation of [Ca²⁺]_c in HeLa cells that expressed YC3.60.