

BiFCのようにGFPのN末端側、C末端側断片を“非共有結合的”に複合体形成させるのではなく、“共有結合的”に連結させる方法もある。Ozawaらはタンパク質スプライシング活性を持つ酵素を用いて、分割GFPを共有結合的に連結する方法を開発し⁸⁾、その一つの応用例として、細胞内小器官に発現する新規遺伝子を迅速に解析する方法(RING: rapid identification of novel genes)を開発した⁹⁾。RING法はGFPのN末端側、C末端側断片のそれぞれに、タンパク質スプライシング酵素DnaEのN末端側、C末端側断片をフュージョンさせ(それぞれEGFPn-DnaEn, DnaEc-EGFPc)、EGFPn-DnaEnにcDNAライブラリーを、DnaEc-EGFPcに細胞内小器官移行配列をフュージョンした遺伝子を作成し細胞に導入する。cDNA内に目的の細胞内小器官へ移行するタンパク質がコードされていれば、その小器官内でGFPが再構成されて蛍光性になるので、FACSで蛍光性細胞を回収後、cDNAの配列を解析すればどのような遺伝子が発現していたかが判明する。この方法を用いて、Ozawaらはミトコンドリアに発現する新規タンパク質を見出すことに成功した。

3. FRET を利用したバイオセンサー

FRET (Förster resonance energy transfer) とはドナー(エネルギー供与体)の発光スペクトルとアクセプター(エネルギー受容体)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に、ある相対的な位置関係を保ってアクセプターが存在すると、“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し、アクセプターが励起される現象である。この現象を利用して、タンパク質間相互作用やタンパク質立体構造変化をイメージングすることが可能である。そのさきがけとなったのはMiya-wakiらが開発したCa²⁺センサーのcameleonである¹⁰⁾。以来、非常に多くの応用例が報告されてきたが、一つの問題点として、シグナル変化量(ダイナミックレンジ)が小さいという問題があった。しかしながら最近、筆者らによってダイナミックレンジを大きくする方法が開発され、高性能なバイオセンサー開発へ応用されている¹¹⁻¹³⁾。

さて、FRETという単語自体はすっかり人口に膾炙した感があるが、その現象はしっかり理解されていないと感じることが多々ある。例えば、FRETが「ドナーから一旦放出された蛍光がアクセプターに吸収される」という誤解である。この現象は“蛍光の再吸収”であり、FRETがおおよそ10 nm以内の分子間距離で起こるのに対し、

分子間距離に依存しない現象である。厄介なのは“蛍光の再吸収”の場合もドナーの蛍光が減って、アクセプターの蛍光が増えるので、一見FRETが起きているように見えることである。従って、FRETで分子間相互作用を解析しようとしているにもかかわらず、実は“蛍光の再吸収”を観察してしまい、“分子間相互作用が起こっている”と誤認してしまう場合があるので注意しなければならない。FRETが起きているのかどうかを確認する方法としてアクセプターを褪色させてドナーの蛍光強度増加を観察するアクセプター褪色法がしばしば用いられるが、本方法でもFRETと“蛍光の再吸収”を区別することができないことを銘記されたい。細胞膜や核膜など蛍光分子の実効濃度が高く、かつ分子の配向が揃いやすい領域でのタンパク質相互作用をFRETで観察する場合は、蛍光の再吸収が起きやすいため、アクセプター褪色法以外の幾つかの方法で検証することをお勧めする。ドナーの蛍光寿命の増減によりFRETを観察する蛍光寿命イメージング法(FILM)はFRETと“蛍光の再吸収”を区別できる最良の顕微法であるため、FILMの利用も一考されたい。但し、誰もが簡便にFILM観察できる顕微システムがリリースされていないのが現状ではあるが。

4. 蛍光タンパク質を用いて標的分子を壊す

蛍光分子に励起光を与えると程度の大小はあるが、活性酸素が産生される。蛍光分子が強い励起光で褪色してしまうのは、自らが産生した活性酸素によって酸化され不可逆的に発色団の構造が変化してしまうからである。ライブイメージングでは禁忌であるこの現象を逆用すれば、光照射依存的に微小領域に存在する分子を任意の時間に破壊することが可能となる。いわゆるCALI(chromophore-assisted light inactivation)法と呼ばれるこの技術は専らfluoresceinなどの低分子蛍光化合物を用いて行なわれてきたが、最近になって蛍光タンパク質でも可能であることが分かってきた。蛍光タンパク質は発色団が完全にタンパク質の中に埋没しているため、産生された活性酸素はタンパク質内部で反応してしまい、外に出てこない。蛍光タンパク質が丸裸の低分子蛍光化合物ほど光毒性を示さないのはそのためである。ところが、2光子励起をした場合には効果的に活性酸素が蛍光タンパク質外に拡散し、近傍のタンパク質を破壊できることがTanabeらによって示され、MP-CALI(multiphoton excitation-evoked CALI)と命名された¹⁴⁾。本方法は遺伝子ノックアウトやsiRNA法ではなし得ない、細胞内の局所領域に存在するタンパク質を任意

の時間に破壊できる方法として極めて有用な技術であるが、非常に高価な2光子顕微鏡を用いなければならないという弱点を持っていた。そんな折、通常の水銀光源でもCALIが可能な蛍光タンパク質 (KillerRed) を Bulina らが開発することに成功した¹⁵⁾。KillerRed をミトコンドリアマトリクスに発現させて、光照射することにより、ミトコンドリアを破壊し、アポトーシスを誘導したり、PHドメインタンパク質に KillerRed を繋げて細胞に発現させると細胞膜に局在するが、光照射依存的に PHドメインが破壊され、細胞膜から遊離する様子が観察されている。但し、KillerRed は二量体を形成するため、如何なるタンパク質にも応用できるわけではないが、早晚、単量体のものが開発されるのは先ず間違いないであろう。そうなれば蛍

光タンパク質を用いて任意の時間・空間で標的分子破壊を行い、より厳密に目的タンパク質の時空間的機能を解析することができるようになるに違いない。

おわりに

多くのタンパク質を掻き集めて、試験管の中で反応させた結果から、生きた細胞内における反応を類推する、いわゆる生化学的手法は、細胞内のタンパク質間相互作用やタンパク質機能を直接可視化するリアルタイムイメージング法と対比される場合が多いが、これらの解析方法は相補的なものであり、どちらが良い悪いという次元のものではない。それぞれの利点・欠点を理解しつつ自身の研究に取り入れることにより、より包括的な生命現象の理解に迫れる

(A) GFP単独 (B)タンデム連結 (C)GFP内挿入 (D)GFP円順列変異

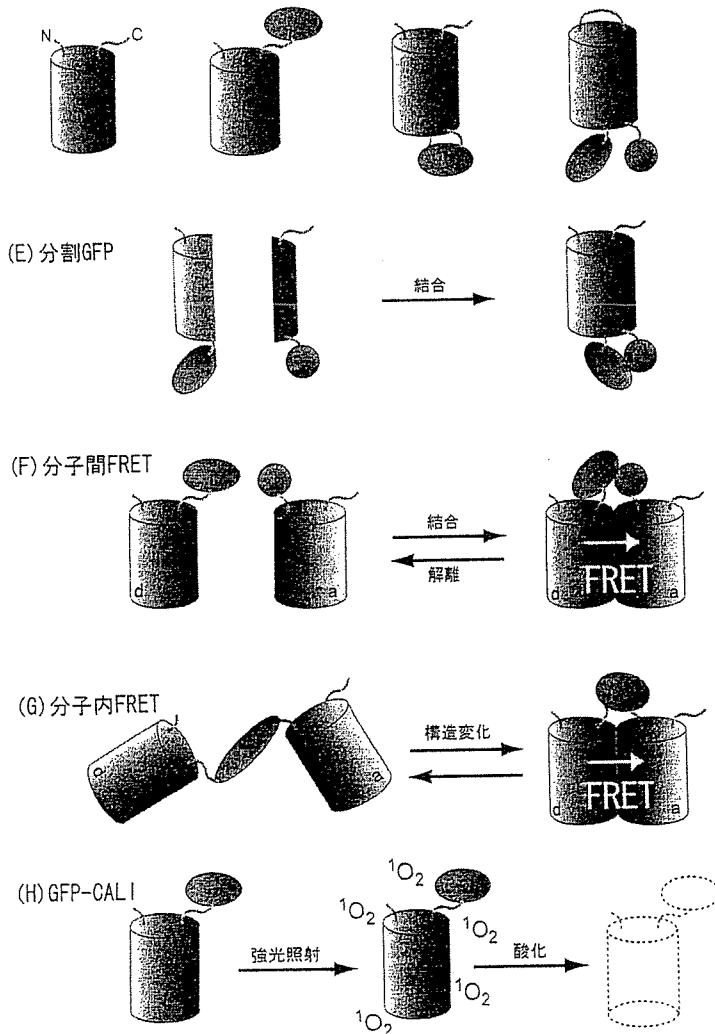


図1 GFPの様々な応用

- (A) GFPの単独発現。細胞の蛍光標識などに使われる。
- (B) 任意のタンパク質とタンデムに連結。細胞内でのタンパク質局在を調べることが可能。
- (C) GFP内部に任意のタンパク質を挿入。挿入したタンパク質の構造変化により、GFPの蛍光強度が変化する。
- (D) GFP円順列変異体のN末端とC末端に相互作用するタンパク質を連結。それぞれのタンパク質の相互作用によってGFPの励起・蛍光スペクトルが変化する。
- (E) GFPをN末端側とC末端側に分割し、それぞれに相互作用するタンパク質を連結。タンパク質相互作用により、蛍光が観察される。
- (F) 分子間FRET。タンパク質相互作用がない時はドナー(d)を励起するとドナーからの発光が、相互作用がある時はアクセプター(a)からの発光が観察される。
- (G) 分子内FRET。リン酸化などの修飾によるタンパク質立体構造変化によってFRETの効率が変化する。
- (H) 蛍光タンパク質を利用した光照射依存的分子不活性化法。強光照射により蛍光タンパク質を介して産生された活性酸素(図中は一重項酸素を表記)が近傍の分子に反応して不活性化する。

ものと筆者は信じる。本ミニレビューが少しでも読者の研究にプラスの影響を与えることができれば幸いである。図1にここで紹介した技術をまとめたので参考にされたい。

- 1) Baird, G.-S., Zacharias, D.-A., & Tsien, R.-Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11241-11246
- 2) Nagai, T., Sawano, A., Park, E.-S., & Miyawaki, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3197-3202
- 3) Kawai, Y., Sato, M., & Umezawa, Y. (2004) *Anal. Chem.* 76, 6144-6149
- 4) De Angelis, D.-A., Miesenbock, G., Zemelman, B.-V., & Rothman, J.-E. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12312-12316
- 5) Hu, C.-D., Chinenov, Y., & Kerppola, T.-K. (2002) *Mol. Cell* 9, 789-798
- 6) Hu, C.-D. & Kerppola, T.-K. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21, 539-545
- 7) Zhang, S., Ma, C., & Chalfie, M. (2004) *Cell* 119, 137-144
- 8) Ozawa, T., Nogami, S., Sato, M., Ohya, Y., & Umezawa, Y. (2000) *Anal. Chem.* 72, 5151-5157
- 9) Ozawa, T., Sako, Y., Sato, M., Kitamura, T., & Umezawa, Y. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21, 287-293
- 10) Miyawaki, A., Llopis, J., Hein, R., McCaffery, J.-M., Adams, J.-A., Ikukra, M., & Tsien, R.-Y. (1997) *Nature* 388, 882-887
- 11) Nagai, T., Yamada, S., Tomita, T., Ichikawa, M., & Miyawaki, A. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10554-10559
- 12) Nagai, T. & Miyawaki, A. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 72-77
- 13) Mank, M., Reiff, D.-F., Heim, N., Friedrich, M.-W., Borst, A., & Griesbeck, O. (2006) *Biophys. J.* 90, 1790-1796
- 14) Tanabe, T., Oyamada, M., Fujita, K., Dai, P., Tanaka, H., & Takamatsu, T. (2005) *Nat. Methods* 2, 503-505
- 15) Bulina, M.-E. et al. (0000) *Nat. Biotechnol.* 24, 95-99

永井 健治

(北海道大学電子科学研究所ナノシステム
生理学研究部門)

Various applications of fluorescent proteins for cell biology

Takeharu Nagai (Laboratory for Nanosystems Physiology, RIES, Hokkaido University, N12 W6 Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0812, Japan)

血管新生を抑制する新規タンパク質 vaso- hibin

1. はじめに

血管新生(新しい血管網の形成)は、生理的な現象であるが、がんを初めとして様々な病態においても重要な役割を演じていることが明らかになり、血管新生をターゲットとした治療応用に期待が高まっている。血管新生では、周囲の組織との関係を保ちつつ、ヒエラルキー構造を有する秩序だった血管ネットワークを構築する必要がある。それは促進・抑制シグナルの微妙なバランスが巧妙に保たれることで初めて可能になると考えられるが、その詳細な分子メカニズムに関しては不明な点が多い。

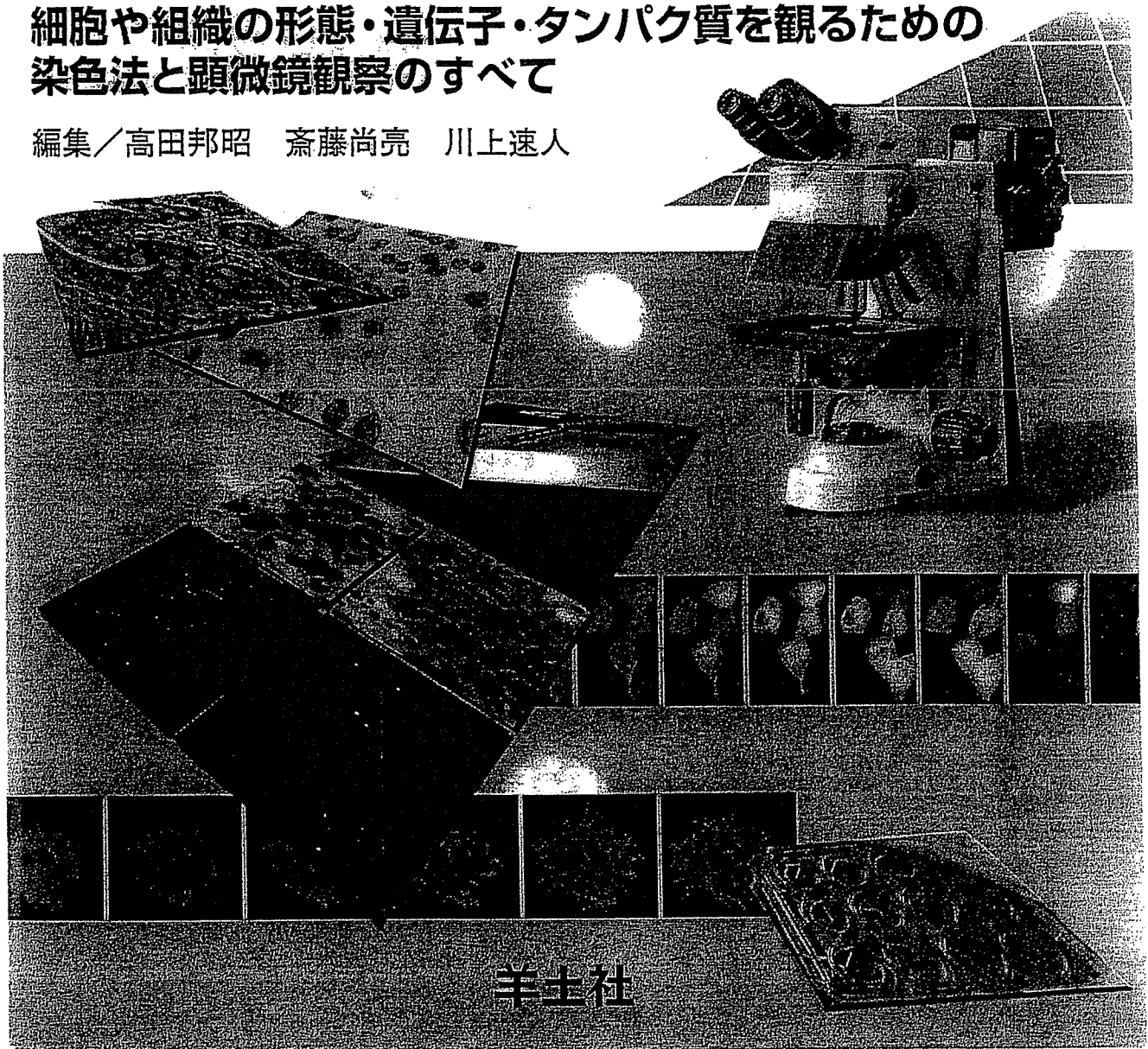
2. 血管新生抑制因子

これまで報告されている血管新生の抑制因子は、大きく2群に分類することができる。すなわち遺伝子にコードされている抑制因子と、血管新生とは全く係わりのない分子の分解あるいは代謝によって生じる抑制因子である。前者には、トロンボスポンジン(thrombospondin: TSP)、PEDF(pigment epithelium derived factor)、マスピン、コンドロモジュリン、IP-10(interferon- γ inducible protein 10)、血小板第4因子(platelet factor 4: PF-4)などがある。TSPは、血小板に含有される大分子量の糖タンパク質であるが、さまざまな細胞でも産生・分泌され、細胞外マトリックスに沈着して存在する。TSPには五つのファミリー分子が存在するが、血管新生抑制活性を有しているのはTSP-1とTSP-2であり、腫瘍組織ではTSP-1の発現は減弱する。PEDFとマスピンはセリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)スーパーファミリーに属する分子である。このうちPEDFは、網膜色素細胞が産生し、神経の分化に寄与する因子として同定されたが、血管新生抑制活性のあることが判明した。マスピンは、正常乳腺上皮細胞に発現するが、がん化によって発現が消失するもので、がん抑制の活性を有しているが、その一環として血管新生抑制作用が報告された。IP-10とPF-4はケモカインスーパーファミリーに属している。IP-10は、さまざまな細胞でインターフェロン γ を初めとして、炎症性の刺激によって誘導される多機能因子であり、その作用の一つとして血管新生抑制作用がある。PF-4は、血小板に含

染色・バイオ イメージング 実験ハンドブック

細胞や組織の形態・遺伝子・タンパク質を観るための
染色法と顕微鏡観察のすべて

編集／高田邦昭 斎藤尚亮 川上速人



羊土社

3. 円順列 GFP 変異体を利用した機能プローブの作製法と2波長励起1波長取得共焦点イメージング

永井健治

本項では、蛍光タンパク質の円順列変異体を利用した機能プローブの作製法と顕微観察法について述べる。また円順列変異蛍光タンパク質を使用する際の問題点や留意点を示す。

はじめに

緑色蛍光タンパク質 (GFP) とその波長変異体を用いた生体機能プローブの作製法と言えは、蛍光エネルギー移動法 (FRET : 7章4参照) を利用した方法を多くの方が思い浮かべるかもしれないが、そのほかにもいくつかの方法があり、中でも GFP の円順列変異体 (cpGFP)¹⁾ を用いる方法は最近応用例が報告されるようになってきた^{2)~4)}。cpGFP 法は蛍光タンパク質自身もつ蛍光の物理化学特性を利用するという点で FRET 法と原理を異にしているため、FRET 法⁵⁾ でうまくいかない時にトライしてみる価値がある。また、cpGFP 法ではレシオイメージング⁶⁾ が行えるため、1波長イメージングよりも定量的な点で優れている。本項では、GFP 蛍光の物理化学的な特性、およびそれをいかにして機能プローブ作製に応用するのか、さらに2波長励起1波長取得共焦点イメージングをどのように行うのかを解説する。



* 1 蛍光観察法において、2つの波長の励起光で励起した2つの蛍光像や、1波長の励起光により発する2波長帯の蛍光像の光量比を扱うこと。本イメージング法により、試料の厚さや、指示薬の分布、あるいは濃度に左右されない生理機能観察ができる。

■ GFP の吸収・発光スペクトル

GFP は 238 個のアミノ酸からできているが、実際に光を吸収し、蛍光発光するのは 65, 66, 67 番目の 3 個のアミノ酸 (それぞれセリン、チロシン、グリシン) から形成される発色団 p-hydroxybenzylideneimidazolone である。この発色団の吸収スペクトルはそれを取り巻くアミノ酸側鎖と構造水分子から成る微小環境によって大きく影響を受ける。野生型 GFP は発色団のフェノール性水酸基がプロトン化した状態とイオン化した状態の 2 状態間で平衡が成立しており、それぞれ 395 nm と 470 nm に極大吸収をもつ。一方、多くの研究者が利用している EGFP は 65 番目のセリンをスレオニンに置換することで、発色団の平衡がイオン化に大きく傾き、490 nm に 1 つの極大吸収をもつようになる。発色団を取り巻くアミノ酸の中でも 148 番目のヒスチジンと 203 番目のチロシンは発色団のイオン化にかかわっており、例えば 203 番目のチロシンをイソロイシンに置換すると発色団の平衡はプロトン化に大きく傾く。ところで、発色団は 2 つの電荷状態を取るにもかかわらず wtGFP、EGFP はいずれも 510 nm に単一の蛍光ピークをもっている。なぜ、蛍光ピークは 2 つではないのか? このことを理解するためにはフェノールのもつ化学的性質を理解しなければなら

Takeharu Nagai : Laboratory for Nanosystems Physiology, RIES, Hokkaido University (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)

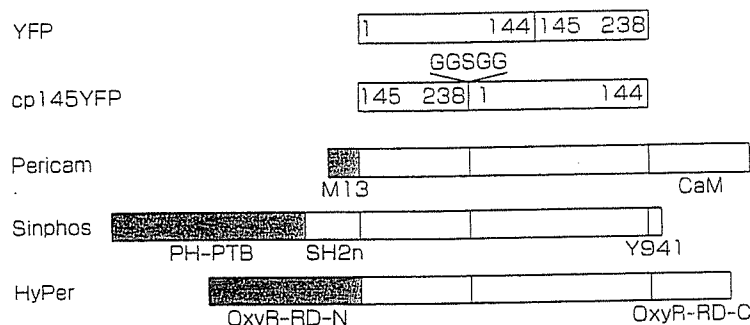


図1 蛍光タンパク質の円順列変異体とそれを利用した機能指示薬
 黄色蛍光タンパク質 (YFP) とその円順列変異体 (cp145YFP), ならびにいくつかの機能指示薬のドメイン構造を示す。Pericam : Ca^{2+} 指示薬, Sinphos : リン酸化指示薬, HyPer : 過酸化水素指示薬



生体分子の動態をみる

ない。実はフェノールは光励起によって10万倍以上酸性度が増大し、その結果平衡がイオン化側に偏るのである。したがって、フェノール性水酸基をもつwtGFPのプロトン化発色団を395 nmの光で励起すると蛍光発光する前にイオン化が起こり、イオン化発色団を励起した場合と同じ励起状態から蛍光を放出して基底状態に戻るようになる結果、蛍光ピークは1つになるわけである。

図 蛍光タンパク質の円順列変異体を用いた機能指示薬

タンパク質間相互作用をGFP発色団の平衡状態の変化に変換できれば、吸収ピークの変化からタンパク質間の相互作用を間接的に測定することが可能となる。タンパク質間相互作用が、ある酵素の活性化に依存して起こるのであれば、その酵素活性の指示薬をGFPを利用して作製できる。では実際にどのようにすればよいのか？例えば、EGFPのN末端とC末端に相互作用するタンパク質を連結したフュージョンタンパク質を考えてみよう。筆者もそのようなコンストラクトを作製した経験があるが、相互作用の有無にかかわらずスペクトルの変化は見られなかった。GFPの β -can構造がいかに強固であるかがここからわかる。この構造にメスを入れて柔らかくし、タンパク質間相互作用の影響を発色団の平衡状態変化に結びつけることを可能にしたのが円順列変異である(図1)。円順列変異とはおおよそのタンパク質の内部に新たなN末端とC末端を設定し、もとのC末端とN末端を適当なアミノ酸配列で連結する変異である。例えば、黄色発光

変異体(YFP)の145番目のアミノ酸を新たなN末端にもつ円順列YFP変異体(cp145YFP)はその極大吸収が515 nmから420 nmに変わる。これは円順列変異によって発色団とその周囲のアミノ酸側鎖の位置関係が変化したため、発色団の平衡状態がプロトン化状態に傾いたということによって説明される。このcp145YFPのN末端とC末端にある環境下(酵素の活性化、イオン状態の変化など)で相互作用するタンパク質を連結すれば、環境の変化に応じてタンパク質間相互作用が起き、それがcp145YFPの吸収波長変化として観察される。このような原理を利用して、これまでに Ca^{2+} 、タンパク質リン酸化、 H_2O_2 の指示薬などが開発されており(図1)²¹⁻²⁴⁾、FRET法同様にさまざまな機能指示薬が今後開発されるものと期待される。

図 観察方法

Fura-2に代表される2波長励起1波長測光型レシオメトリック色素は、2つの励起波長を交互に切り替えながら励起を行い、1つの蛍光波長を取得する。このようなレシオメトリック観察は色素の不均一な分布や細胞の形態変化に伴う蛍光強度の変化をキャンセルできるため、1波長励起1波長観察よりも定量性に優れている。しかしその反面、それぞれの励起波長を取得する時間にずれが生じてしまうため、励起波長を切り替える時間の間に反応がどんどん進行してしまう場合には取得したデータの解釈に注意を要する。励起波長を切り替える方法はいくつかあるが、ここでは誌面の都合上、単点走査型レーザー共焦点顕微鏡を使って、2波長励起1波長イメージングを高い空間分解能

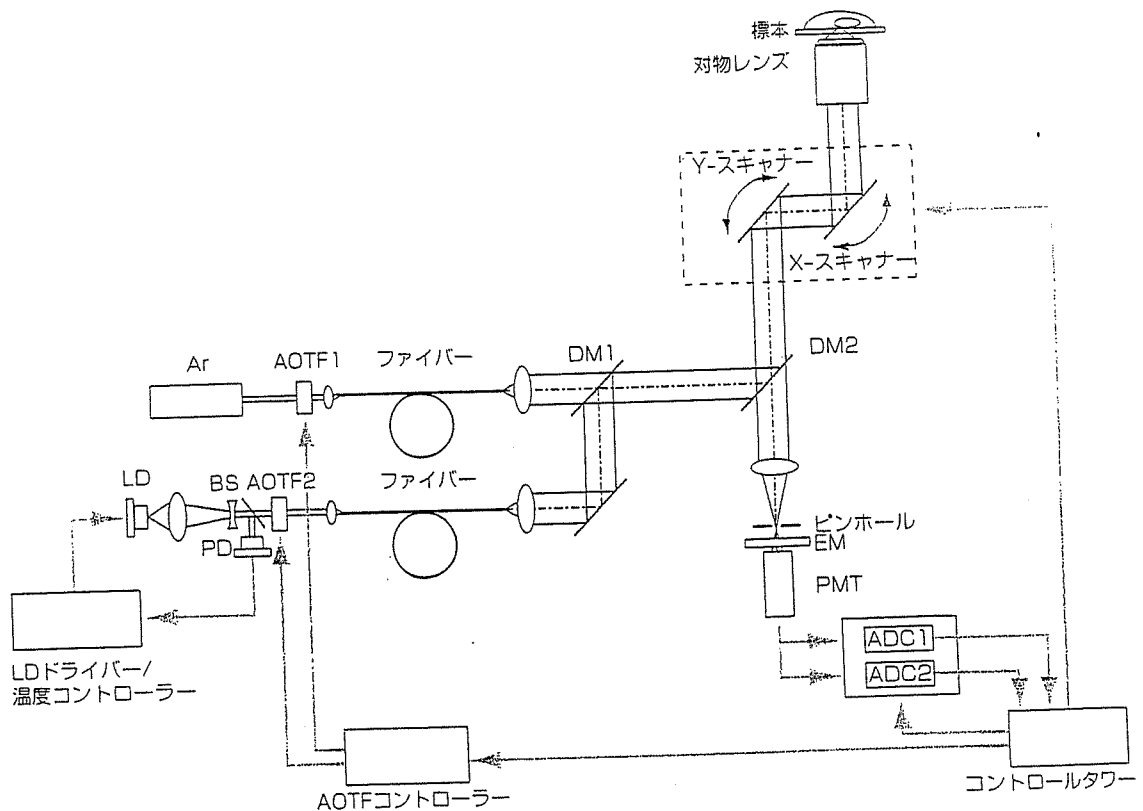


図2 高速2波長励起1波長取得用レーザー共焦点顕微鏡の模式図
 AOTF：音響光学変調フィルター、Ar：アルゴンレーザー（488 nm）、LD：レーザーダイオード（405 nm）、
 PD：フォトダイオード、BS：ビームスプリッター、DM：ダイクロイックミラー、EM：吸収フィルター、
 PMT：光電子増倍管、ADC：アナログ-デジタル変換機（文献6参照）

で行う方法についてのみ記す。

2波長励起1波長測光による共焦点顕微鏡観察の原理

単点走査型レーザー共焦点顕微鏡を用いて、例えば 512×512 ピクセルの解像度で画像を取得するには、およそ1秒かかる。したがって、1画像取得ごとに励起波長を切り替えて画像を取得すると、各ピクセル間の取得時間におよそ1秒の開きができてしまう。高速で変化する生理現象のイメージングには、ピクセル間の取得時間の開きは小さければ小さいほどよいが、そのような方法の一つとして、素早い波長切り替えを可能にする音響光学変調フィルター（AOTF）を用いて走査ラインごとに励起波長を切り替える方法が考案された（図2）⁶⁾。この方法により、最大200 Hzのレシ

オ測定が可能になり、画像サイズに応じて1~10 Hzの共焦点画像を取得できる。ちなみに、市販品でこのような機能がオプションで搭載可能なのはオリンパス社のFV1000しかない。

<器具・機器類>

- 倒立型共焦点顕微鏡（オリンパス、FV1000）^{*1}
- 温度制御チャンバー（東海ヒット、INUG2-ONI）^{*2}
- 画像解析ソフト（Molecular Devices社、MetaMorph Offline）^{*3}

*1 培養細胞の観察であれば正立型よりも倒立型を用いる方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、空間解像度の高い観察が可能になる（7章9参照）。残念ながら2波長励起1波

長取得に対応できる共焦点顕微鏡はオリンパスのFV1000のみである。

* 2 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℃に設定可能な温度制御チャンバーの使用が望まれる。

* 3 得られた画像データに空間フィルターをかけたりLUT（9章2参照）を変更したり、あるいは擬似カラーレシオ表示させたりするためには、共焦点顕微鏡に付随している画像解析ソフトよりも、汎用画像処理ソフトの方が圧倒的に使い勝手がよい。さまざまなソフトが出回っているが、われわれはもっぱらMetaMorph Offline（Molecular Devices社）を利用している。

<試薬・溶液類>

- 機能指示薬発現用プラスミド*4
 - poly-L-Lysineまたはcollagen*5
 - リポフェクション試薬（Invitrogen社、Lipofectamine2000など）
 - 35 mm ガラスボトムディッシュ（マツナミガラス、D111300など）*6
 - 細胞観察用培地*7
- | | |
|--------|---------------------|
| 150 mM | NaCl |
| 5 mM | KCl |
| 1 mM | MgCl ₂ |
| 2 mM | CaCl ₂ |
| 10 mM | Glucose |
| 25 mM | HEPES-NaOH (pH 7.2) |

* 4 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）、PEG沈殿法などを用いて精製したものを使用すること、われわれは圧倒的に安価なPEG沈殿法を用いている。

* 5 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影響を及ぼす場合がある。ガラス面上で細胞が正常に接着しない場合にはpoly-lysineなどでコーティングし、接着性を高める必要がある。

* 6 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0.17 mm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0.17 mmに近いもの（JIS規格No.1-S (0.15~0.18 mm)）を選ぶこと。

* 7 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、バックグラウンド蛍光を増加させてしまうので、蛍光観察の際には上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。数日間のタイムラプス観察を行う場合には血清を10%加える。

プロトコル

細胞の準備と遺伝子導入

- 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

* 10 cm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 × 10⁵ 個程度の細胞をディッシュに播き、37℃で培養*

* 1 細胞の大きさ、分裂速度に応じて適宜、播種する数を調整する。

- およそ24時間後、適当な試薬を用いてトランスフェクションする

- 1~2日後に観察

2波長励起1波長取得レーザー共焦点顕微鏡観察

- FV1000を立ち上げる

- スキャナーボックスの左側にある2波長励起1波長測光用外部スイッチをONにする*

* 2 本スイッチをONにすることにより、励起波長1によって生じた蛍光と、励起波長2によって生じた蛍光を、同一のPMT（光電子増倍管、ホトマル）で検出しつつ、データとしては2つのチャンネル（CHS1とCHS2）に分離して記録できるようにする。また、このスイッチのON/OFF切り替えはアプリケーションソフトやFV1000システムを再起動しなくても、即座に反映される。

- 2波長励起1波長測光用に照明・観察光学系をセットする（図3）*

* 3 使用するレーザーと取得する蛍光の波長に応じて、適宜ダイクロイックミラーと蛍光波長域を決めるスリット幅を決定する。蛍光取得波長域を広く取れば取るほど、得られる蛍光強度が増加するため、その分励起光強度を下げる事が可能である。

- コントロールボックスの「Sequential」をチェックし、「Line」を選択する（図3）*

* 4 この設定により、2波長の励起光がラインごとに交換されるようになる。

- CHS1とCHS2のホトマルで検出する蛍光が、どのレーザーで励起したものを設定する（図3）

- 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ーから取り出す

- 培養液を吸い取る

- 観察用培地を2 ml加える*

* 5 観察用培地はあらかじめ37℃に暖めておいたものを使用すること。

- 顕微鏡ステージの上に設置する

- 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

- アーク励起光を遮断する

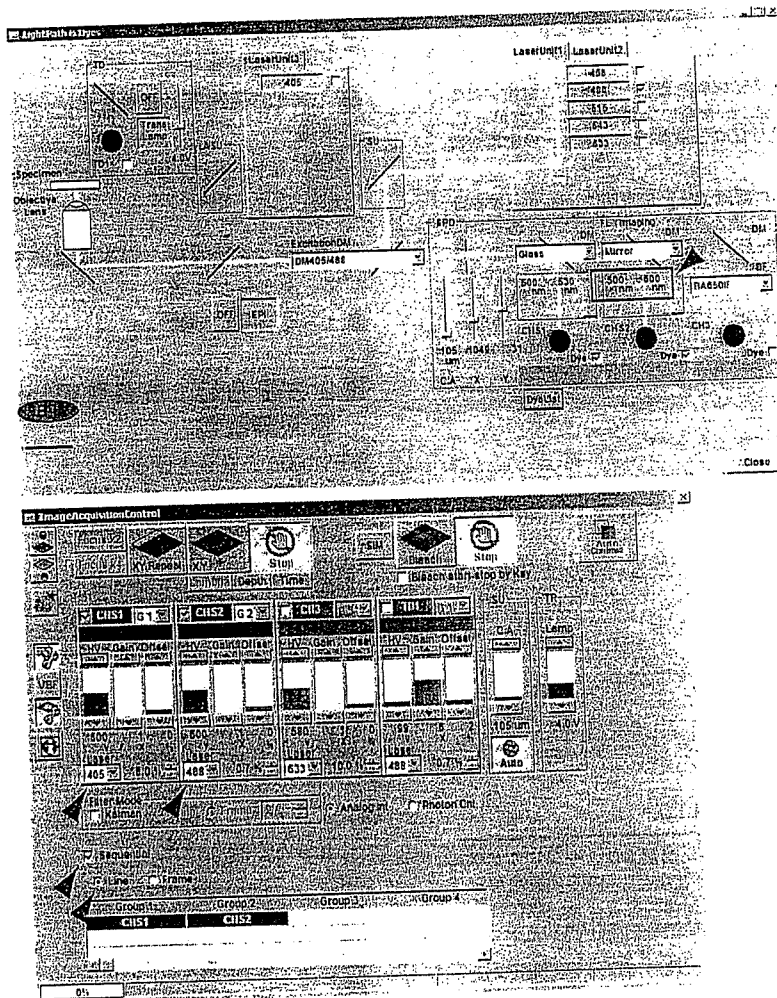


図3 倒立型共焦点顕微鏡 FV1000 による 2 波長励起 1 波長取得用の光路図 (上) とコントロールボックス (下) サンプルからの蛍光 (極大蛍光 518 nm) を可能な限り明るく取得するために、波長幅を 500 ~ 600 nm と広く取っている (上図の赤色矢頭)、405 nm と 488 nm のレーザーを用いて 2 波長励起 1 波長取得するためには、下図の矢頭の部分を図のようにセットする

④ Focus モードで XYZ 位置、画角、ホトマルの HV (high voltage : 印加)、レーザーパワーの調整をする

⑤ 実際にタイムラプス観察を行う条件で 1 枚画像を撮り、画像の良さしを確認する

⑥ タイムラプス観察開始 *6



* 6 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 10 枚/秒、カルシウム振動ならば 5 秒間隔など。

⑦ 適当な刺激薬剤を加える *7



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

⑧ 画像取得続行

⑨ 画像取得終了

⑩ データ保存

⑪ 画像解析 (9 章参照)

⑫ 保存した画像データを「Raw 16bit tiff」に変換する *8

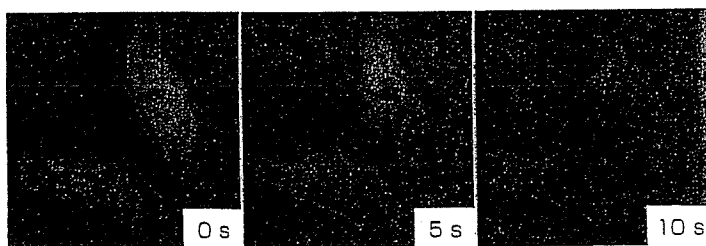


図4 rPericamを発現したHeLa細胞のヒスタミン刺激によるカルシウム濃度変化を共焦点顕微鏡観察した例
画像は1秒ごとに取得したうちの、任意の3枚を選んだ。CHS2 (488 nm) の画像をCHS1 (405 nm) の画像で除したものをIMD表示している。赤いほどカルシウム濃度が高いことを示す



生体分子の動態をみる



* 8 元画像が擬似カラー表示されている場合は、グレースケールに変換しておく、tiffフォーマットに変換の際、「RGB 24bit tiff」や「8bit tiff」で保存しないこと、16bit tiffでないこと、その後の画像操作が行えないことがある。

MetaMorphの「Build in Stuck-Numbered Names」機能で一連のtiffファイルをスタックファイルに変換する。2つのスタックファイルができあがる

画像処理（明るさ、コントラスト、空間フィルター処理）を行う*



* 9 画像の使用目的に応じて適宜使用する。フィルター処理は画像の“見た目”を改善するが、実際には画像の情報量が減る結果、解像度が下がってしまうので注意を要する。

MetaMorphの「ratio images」機能でレシオ画像を作製する*



* 10 この機能は一方の画像を他方の画像で割り算し、得られた値に適切な擬似カラーをつけて表示するものである。擬似カラー表示はいくつかの色調（Hue）を選択可能であるが、われわれは8つの色調で表すことが多い。さらに、擬似カラーに画像の明るさを反映させる機能であるIMD（intensity modified display）を使えば“見た目”がかなり改善する。

画像保存*



* 11 まずはstkファイルとして保存しておき、必要に応じて「Montage」や「Make Movie」機能などを利用してモンタージュ画像やさまざまな長さ、速さの動画を作製する。

実験例

HeLa細胞にrPericamを発現させ、ヒスタミン刺激による小胞体からのカルシウム動員の様子を共焦点顕

微鏡観察した。カルシウムが細胞内を伝播する様子が高い空間分解能でとらえられている。対物レンズはPlanApo×60 NA1.4、ズーム3倍、画像解像度は512×512、レーザー走査速度は2μs/pixel、励起レーザーには405nmの半導体レーザーとアルゴンレーザーの488nmラインを使用した（図4）。

おわりに

GFPの円順列変異体を利用した機能指示薬以外にも同様の吸収スペクトル変化を示す機能指示薬がGFPを用いて開発されている。例えば、pH指示薬のrationetric-pHluorin⁷⁾や酸化還元指示薬のroGFP⁸⁾などである。このような蛍光指示薬を用いた高い空間分解能観察にも、ここで紹介した方法が利用可能である。

参考文献

- 1) Baird, G. S. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 : 11241-11246. 1999
- 2) Nagai, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98 : 3197-3202. 2001
- 3) Kawai, Y. et al. : Anal. Chem. 76 : 6144-6149. 2004
- 4) Belousov, V. V. et al. : Nat. Methods. 3 : 281-286. 2006
- 5) Miyawaki, A. : Dev. Cell. 4 : 295-305. 2003
- 6) Shimozono, S. et al. : Science STKE. 26 : 125. PL4. 2002
- 7) Miesenböck, G. : Nature. 394 : 192-195. 1998
- 8) Dooley, C. T. et al. : J. Biol. Chem. 279 : 22284-22293. 2004

ナノテクでバイオと医療をかえるナノメディシン

2006

Bionics

7

生命理工の
R&Dから
産業応用まで

[バイオニクス] <http://www.e-bionics.jp>

Special Issue

ナノテクの医療応用 ナノメディシン

- 概論・ナノメディシンとは
- 生細胞内ではたらく分子を可視化する
- チャンネルタンパク質測定技術

Mining Column

脳神経科学と ニューロエシックス

Series

よみがえる心臓
国産人工心臓、
ヨーロッパへ

Series

現場で役立つ
バイオイメージング
細胞内蛍光1分子
可視化法(応用編)

掲載誌

オーム社

生細胞内ではたらく 分子を可視化する

永井健治 北海道大学電子科学研究所

細胞内で機能するさまざまな分子を可視化する
バイオイメーキング技術は、生物学研究はもちろんのこと、
医学、薬学、農学などの諸分野で非常に重要な技術になってきた。
とりわけ遺伝子にコードされた蛍光性の
機能指示薬(分子スパイ)は、遺伝子導入技術の進歩により、
今後、その需要が高まるものと予想される。分子スパイの開発にせまる。

化学発光タンパク質と 蛍光タンパク質

この世の中、思っている以上に“光る生物”がたくさん存在する。たとえば、バクテリア、クラゲ、サンゴ、ホヤ、ウミウシ、ミミズ、ムカデ、藻、キノコなど。何のために光るのかについては、外敵への威嚇、自己防衛、外敵からの逃走、食餌動物の誘引、同種族間の標識、雌雄の合図、はたまた生物が活動する際に生み出される有害な“活性酸素”を除去するためなど、諸説飛び交っているが、本当の意義はよくわかっていない。意義というものは人間が勝手につけたがっているだけかもしれない。

さて、一口に“発光”というがその機構は、酸素の酸化エネルギーを利用する“化学発光型”と、光のエネルギーを利用する“蛍光発光型”に分けられる(図1)。化学発光型の典型例がホタルの発光であり、ルシフェラーゼと呼ばれるタンパク質が発光の主役である。「ルシフェラーゼ」という言葉は化学発光を触媒する酵素の総称で、「発光酵素」ともよばれる。このルシフェラーゼによって酸化されて発光するさまざまな化合物の総称を「ルシフェリン」といい、発光する生物それぞれに固有のルシフェリンをもつ。たとえば、カルシウム結合によって発光するエクオリ

ンのルシフェリンは、セレンテラジンである。

一方、蛍光発光型の例として名高いのが、オワンクラゲから単離された緑色蛍光タンパク質(GFP)である。その遺伝子は1992年にクローニングされ、さらに2年後の1994年に、GFP遺伝子の導入によって他の生物にも蛍光をつくり出せることが証明された。この実験結果の意味するところは非常に大きい。なぜならGFPの蛍光獲得には、オワンクラゲ特有の酵素も必要なければ補助因子も必要がないことが判明したからである。つまり遺伝子さえ導入できれば、さまざまな生物のさまざまな部位に蛍光をつくり出すことができるのである。それゆえ、1994年以降GFPを用いた研究は急速に増加し、現在も累増中である(図2)。

もちろんその後の技術的進化も、この爆発的な応用研究の増加に一役買っている。たとえば、GFPにさまざまなアミノ酸変異を導入することで、青色、シアン色、黄色の各蛍光タンパク質が開発されたり、さらにはスナギンチャクというサンゴの一種から赤色の蛍光タンパク質がクローニングされた。青色から赤色まで一連の蛍光タンパク質シリーズが出そろったというのは意義深い。それだけでなく、近年では、紫外線照射によって蛍光を放つもの(光活性化)、蛍光色が変わるもの(光変換)、光ったり消えたり

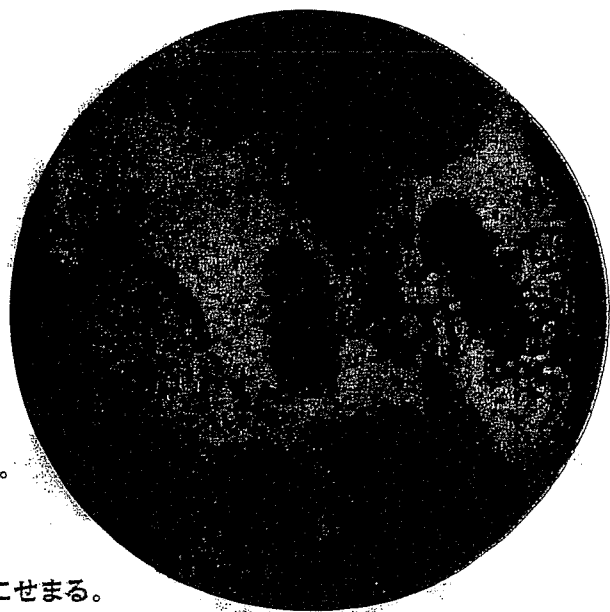


図1 化学発光タンパク質と蛍光タンパク質の発光メカニズム

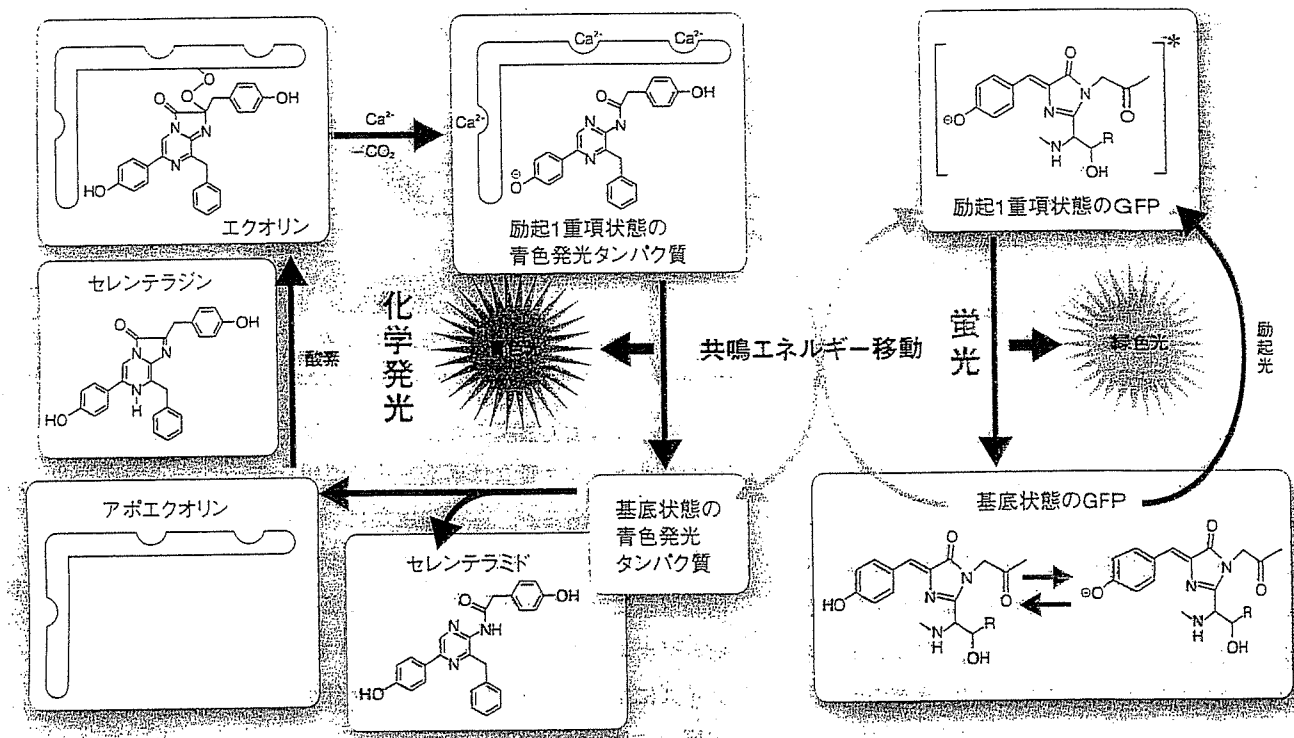
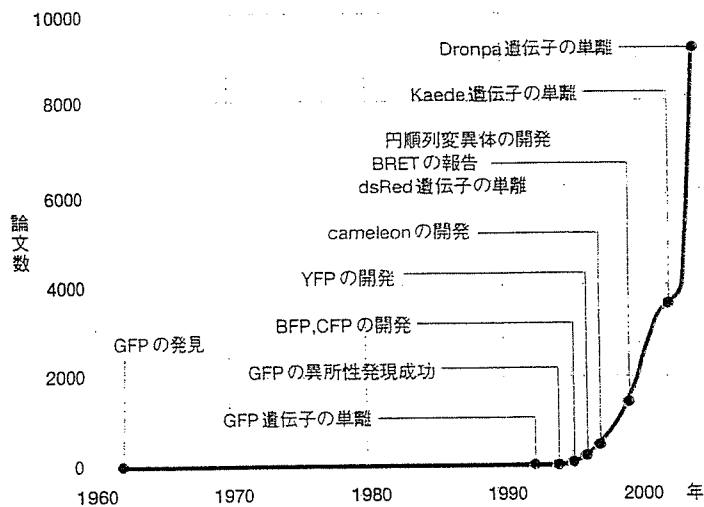


図2 GFP関連論文の数を年別にプロットしたグラフ



するもの(光異性化)など、さまざまな特徴を備えた蛍光タンパク質も報告されている。

さて、これら蛍光タンパク質の利用法であるが、もっともオーソドックスなものとしては、興味あるタンパク質に蛍光タグとして連結して、生きた細胞内での局在を観察したり、任意の遺伝子プロモーターの下流に蛍光タンパク質遺伝子をつなげて細胞に導入して、蛍光タンパク質の蛍

光強度の増減で遺伝子の活性化をモニターする、といったものが挙げられる。さらなる応用例としては、後述するような生理機能指示薬(分子スパイ)が開発されるようになってきた。

エネルギー移動を利用して分子スパイをつくる

オワンクラゲやウミシイタケは、化学発光タンパク質と蛍光タンパク質の双方を発現している。しかしながら、その生物発光は蛍光タンパク質由来の緑色のみで、化学発光由来の青色発光はみられない。なぜなら蛍光タンパク質が化学発光タンパク質の青色の光を緑色の光にシフトさせているからである。この波長シフトには、「共鳴エネルギー移動 (RET)」と呼ばれる物理現象が使われている。

RETとは、ドナー(エネルギー供与体)の発光スペクトルとアクセプター(エネルギー受容体)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(およそ10nm以下)に、ある相対的な位置関係を保ってアクセプターが存在する場合、無輻射的にドナーの励起エネルギー

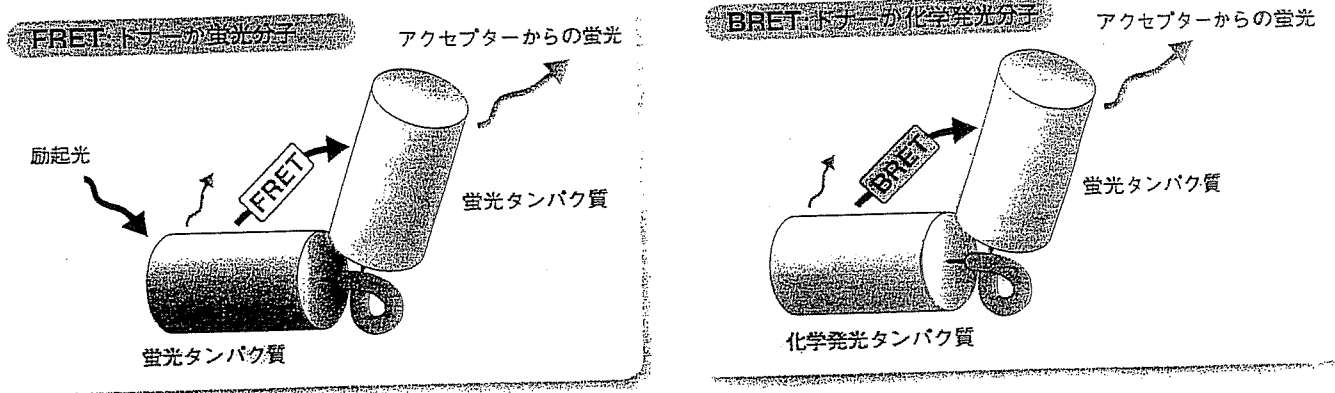


図3

FRETとBRETのちがい

FRETはドナーに蛍光タンパク質を用いるため励起光が必要になる。一方、BRETはドナーに化学発光タンパク質を用いるため励起光は必要としないが、化学発光基質をロードする必要がある。

がアクセプターに移動する現象のことをいう。アクセプターが蛍光分子であれば、アクセプター固有の蛍光発光が観察される。オワンクラゲもウミシイタケも、超高効率にこのRETをおこなっているため、青色ではなく緑色の発光が観察されるのである。RETはドナーが化学発光分子に限らず、蛍光分子の場合でもおこり、両者を区別してそれぞれBRET(生物発光エネルギー移動)またはCRET(化学発光エネルギー移動)、FRET(蛍光エネルギー移動)と呼んでいる(図3)。

さて、RETがおこる10nm以下という空間スケールはちょうどタンパク質の大きさと同程度であるため、RETを利用すれば、タンパク質間相互作用やタンパク質の立体構造変化を可視化できる分子スパイが作成できる。実際、異なる色のGFP変異体間におけるFRETを利用して、カルシウム、低分子量Gタンパク質、チロシンリン酸化やカスパーゼの活性化をモニターする分子スパイが開発され⁽¹⁾、ルシフェラーゼ-GFP間のBRETを利用したタンパク質間相互作用が観察されている⁽²⁾。このような分子スパイは生きた細胞内の情報を随時報告してくれるため、生物学の基礎研究はもちろんのこと、医療診断や創薬におけるリード化合物のスクリーニングなど、非常に広範囲な研究領域・産業領域への応用が期待されている。

しかしながら現状はというと、それほど活発に応用が進んでいるとはいえない。そのもっとも大きな理由として、これまで開発されてきた分子スパイの性能の低さが挙げられる。分子スパイ

イはもっぱら蛍光強度の変化として、分子間相互作用やタンパク質立体構造変化の情報を送ってくるわけであるが、その強度変化がノイズの変化と同程度である場合、シグナルの受け手は情報解読に手間取ってしまう。したがって、送信シグナルの強度変化(ダイナミックレンジ)がノイズに比べて格段に大きな高性能分子スパイが要求されていた。

高性能分子スパイの開発に向けて

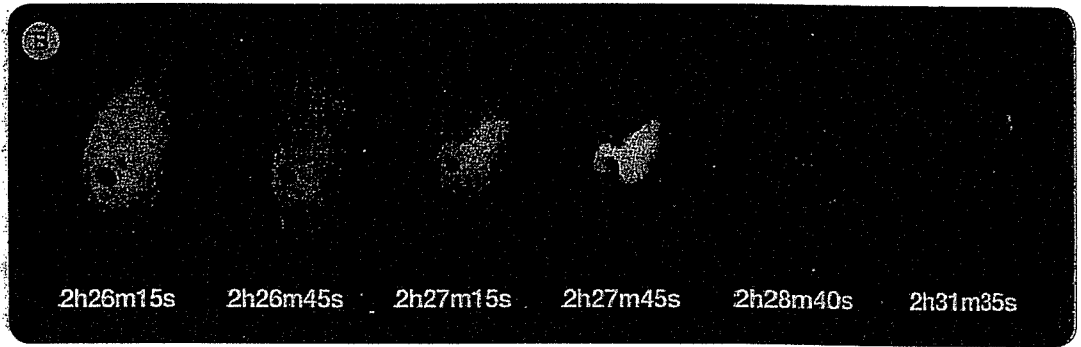
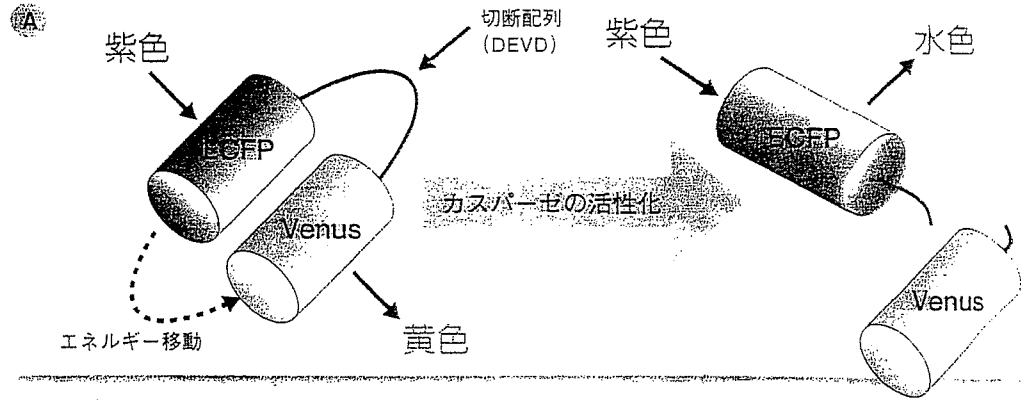
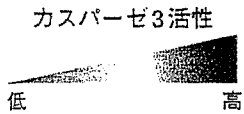
そのためには再度、RETとはどのような物理現象であるかを考察しなければならない。すでに述べたようにRETがおきるためには「励起状態にあるドナーの近傍に、ある相対的位置関係を保ってアクセプターが存在する」必要がある。「ある相対的位置関係」をより詳しく書くと、「ドナーの発光遷移モーメントとアクセプターの吸収遷移モーメントのなす角度」となり、物理学的表現では「角度因子」となる。量子力学的な制約により、両遷移モーメントの向きが平行であればあるほどRETがおきやすく、逆に直交しているとまったくRETはおきない。

このように、角度因子はRETがおきるためにきわめて重要なファクターであるにもかかわらず、実はこれまであまり重要視されてこなかった。大抵の論文に「角度因子は蛍光分子がその励起寿命の間にランダム回転しているものと仮定する」と書かれている。この仮定があるからこそ、RETはドナーとアクセプターの間の距離のみに依存する物理量になり、したがっ

図4
高性能分子スパイ
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

(A) SCAT3.1の構造とカ
スパーゼ3の活性化により
蛍光色が変わるしくみ

(B) HeLa細胞をTNF- α
によりアポトーシスを誘導
した時のカスパーゼ3活性
化の時空間変化。赤い程、
活性化していることを示し
ている。各パネルの下に示
す時間はTNF- α を加えて
からの時間



てRET効率を測定すればドナーとアクセプ
ターの距離を算出できることになるのである。
RETが“molecular ruler”とよばれるゆえんであ
る。しかし、本当にそうなのであろうか？

何事にも疑い深い筆者は、実際に実験によっ
て調べてみた。詳細は省くが蛍光分子の回転速
度を調べるためには、定常状態の“蛍光異方性”
を測定すればよい。その結果わかったことは、
蛍光分子の回転相関定数は励起寿命よりも10倍
程度長いということである。過去の文献もあれ
これ調べてみると、確かにほぼ同じ値を記載し
ている論文が存在した。こうなると上記の仮定は
成り立たない。蛍光タンパク質をドナーとアク
セプターにもつ分子スパイを高性能化するため
には、ドナーとアクセプターの相対的角を最適
化する必要があるわけである。

理想的には、分子スパイ内の蛍光タンパク質
を除く基本構造部分のタンパク質が構造変化
するのにともない、角度因子が平行から直交へ、
またはその逆の変化をするように設計すればよ
い。

蛍光タンパク質 円順列変異体の利用

それではどのようにして、ドナーとアクセプ
ターの相対角度を改変するのか？一つには、基
本構造部分のタンパク質とドナー・アクセプ
ター蛍光タンパク質をつなぐリンカー配列のア
ミノ酸を変えたり、あるいは長さを変えたりす
ることで、ある程度角度改変は可能である。実
際、このような方法により、ダイナミックレンジ
がきわめて大きなカスパーゼ3活性化分子スパ
イを開発することができた⁽³⁾。本分子スパイ
を用いて、細胞が自殺する過程(アポトーシス)
におけるカスパーゼ3の活性化パターンを詳細
に観察することに成功している(図4)。

しかしこの方法は、アミノ酸間のペプチド結
合による角度変化を利用しているため、改変角
度に限界があった。そこで、より積極的に相対
角度を改変するための方法をあれこれ考え、結
局たどりついたのが、蛍光タンパク質円順列変
異体⁽⁴⁾の利用である。円順列変異とはおおも

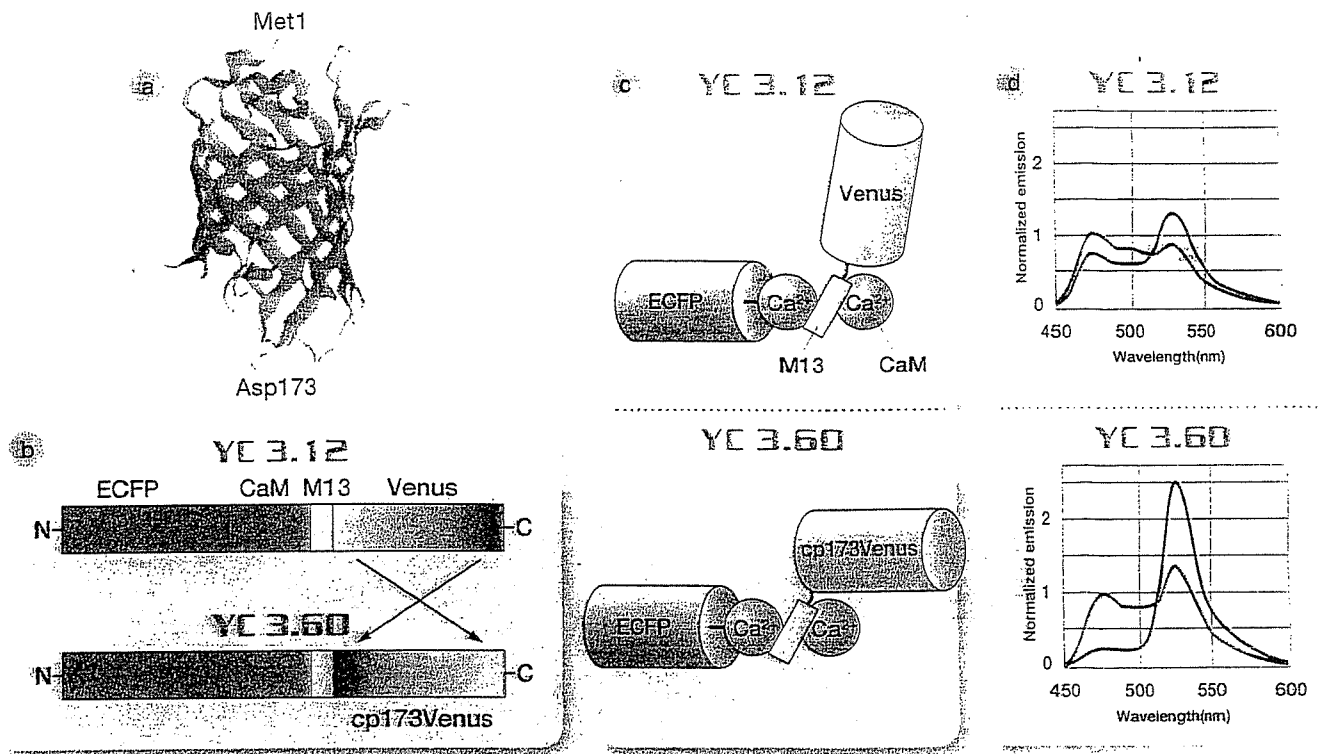


図5
円順列変異の
FRET法への応用

(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とアスパラギン酸)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) YC3.12とYC3.60のカルシウム結合型立体構造概念図。これらはい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には注意。

(d) 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。

とのタンパク質を内部で切断し、N末端部位とC末端部位を入れ替えて適当なリンカーアミノ酸で繋ぐ変異をいう(図5)。円順列変異体のN末端とC末端はおおもとのタンパク質のものとはまったく異なる場所に位置するため、このようなタンパク質を利用すれば、より積極的にドナー・アクセプター間の相対角度を改変できるはずである。

とはいえ、「こんな大胆な変異を導入したタンパク質がちゃんと機能するのか?」と思われる方も多いだろう。点変異や欠失変異に比べてあまり耳慣れない変異だからかもしれない。実は円順列変異を利用した研究は1970年代から報告があり、ずいぶん歴史がある方法である。すべてのタンパク質がこの変異を許容するわけではなく、一般的にN末端とC末端が近接するタンパク質が円順列変異を許容しやすい傾向にある。また、そのようなタンパク質でも、どの部位を新たなN末端にするかも重要である。GFPの場合、loop構造内に新たなN・C末端を設置しないと、円順列変異体は蛍光を発光しない。

筆者らはFRETを利用したカルシウムセンサー

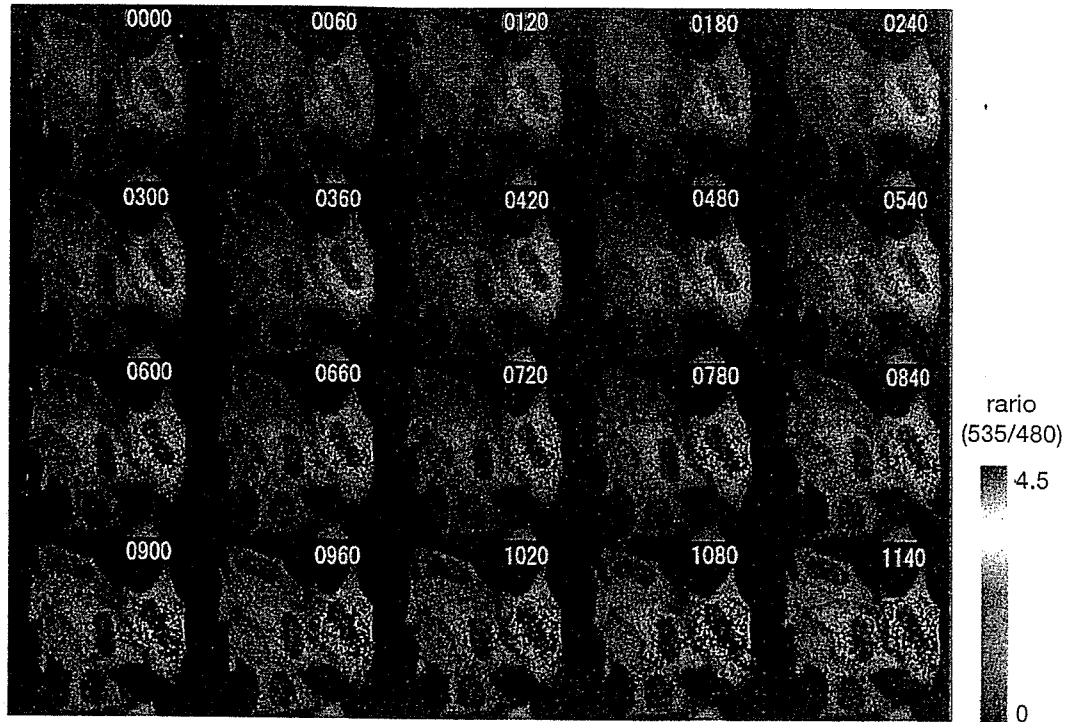
cameleonを用いて、蛍光タンパク質円順列変異体によるダイナミックレンジの改善を試みた。具体的にはcameleon(YC3.12)内のFRETアクセプターである黄色蛍光タンパク質Venus⁽⁵⁾の円順列変異体を複数作成して連結した。その結果、173番目のアミノ酸を新たなN末端とする円順列変異Venusをもつcameleon(YC3.60)ではダイナミックレンジが大幅に改善し、カルシウムの有無で600%の変化量をもつまでに至った(図5)⁽⁶⁾。

蛍光光度計のモニターに映し出されるシグナル変化をみて非常に驚いたことをいまでも鮮明に覚えている。そもそもヒトの頭脳は大したものではなく、思いついたアイデアのほぼすべてが失敗に終わるのが通例であるが、このときは予想と結果が一致し、身震いしたものである。YC3.60はきわめて大きなダイナミックレンジをもつため、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ート観察において、コントラストの高い画像を取得することが可能となった(図6)。従来型cameleonでは細胞膜にぶら下げて、細胞膜直下のカルシウム動態を測定することはできなかったが、

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ート観察した例

パネル内の数字は ATP 添加後の時間 (ミリ秒) を示す。赤いほどカルシウム濃度が高いことを示している。



YC3.60 では可能となった。やはりダイナミックレンジは大きければ大きいほどよいことが再認識できた。

その後、円順列変異を利用したドナー・アクセプターの相対角度改変は *cameleon* のみならず、ほかの分子スパイでも有効であることが示されている^(7,8)。もちろん、FRET だけでなく BRET にも利用可能である。本方法を利用して、今後より高性能な分子スパイが開発されることを期待したい。

学際領域科学の発展をめざして

前述のように、分子スパイの開発のためには生物学の知識だけではまったく太刀打ちできず、物理学や化学などの知識も要求される。また、開発された分子スパイの用途は基礎生物学研究だけでなく、医学、薬学、農学などへの応用も見込まれる。したがって、分子スパイ技術は学際領域科学を担う技術の一つであるといっても過言ではない。

“学際融合科学”や“複合領域科学”あるいは“異分野融合科学”はたまた“境界領域科学”の促進が声高に叫ばれるようになって久しい。しかしながら現実的にはそれほど進展していないと感じる。われわれがもつ技術を通じて、さま

ざまな研究分野の融合に貢献できれば幸いである。と同時に、さまざまな研究分野の知識・技術を積極的に取り込み、まったく新しい原理に基づく分子スパイやその応用技術を開発していくことができればと思う昨今である。

ながいだけはる

“生命とは何か?”を解き明かしたいと思い、学部頃から学問の枠に囚われない生物研究を志す。興味は“少数分子による自己組織化”。その解明のために分子スパイの開発とスパイが送信してくる情報を的確にキャッチする顕微鏡の開発、そしてそれら最新技術を駆使した発生学的研究を押し進めている。キャッチフレーズは「自我作古たる研究に勤む」。
<http://nano.es.hokudai.ac.jp/>

引用文献

- [1] Miyawaki A: "Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling" *Dev Cell* 4 (2003) 295-305
- [2] Pflieger K, Eidne K: "Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)" *Nat Method* 3(2006) 165-174
- [3] Nagai T, Miyawaki A: "A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis" *Biochem Biophys Res Commun* 319 (2004) 72-77
- [4] Baird GS et al: "Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins" *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 11241-11246
- [5] Nagai T et al: "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for biological application" *Nat Biotechnol* 20 (2002) 87-90
- [6] Nagai T et al: "Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins" *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 10554-10559
- [7] Mank M et al: "A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change" *Biophys J* 90 (2006) 1790-1796
- [8] Palmer AE et al: "Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-Peptide pairs" *Chem Biol* (2006) 521-530

特集 組織・個体レベルの最新ライブイメージング技術

序：組織・個体レベルでの機能イメージングに向けて

Towards Imaging of Biological Functions in Tissues and Whole Organisms

永井健治

Takeharu Nagai

過去10年ほどの間における顕微鏡技術と蛍光タンパク質技術などの発展により、今や細胞内におけるタンパク質分子動態や分子間相互作用、遺伝子活性化などが簡単にイメージングできるようになってきた。それまで、免疫組織学的染色法や生化学的手法など“固定した試料”あるいは“数十万個の細胞をすり潰した試料”の解析が主流であった細胞生物学研究の領域が、生きた試料”を扱ったリアルタイム機能解析法を積極的に取り入れつつある。この流れは今後、診断医学や発生生物学などの“組織”や“個体”を扱う様々な研究分野に波及していくことは間違いないであろう。そこで本特集では蛍光や化学発光による組織・個体レベルでの機能イメージング技術に焦点を当てるとともに、顕微鏡技術の新たな展開についても紹介する。

① 永井健治 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 E-mail:tnagai@es.hokudai.ac.jp

URL: <http://nano.es.hokudai.ac.jp/>

1992年筑波大学生物学類卒業、1998年東京大学大学院医学系研究科博士課程修了、博士(医学)、1998年理化学研究所基礎科学特別研究員、2001年科学技術振興機構さきがけ研究者、2005年より現所属、教授。

はじめに

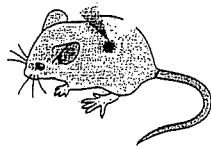
“分子イメージング”という言葉をよく耳にするようになった。生きた生物個体内の生体分子の挙動を低侵襲的に画像化するこの技術は、ポストゲノム時代に突入した現在、基礎に留まっていた分子生物学の成果を臨床応用に結び付けようとする国際的な戦略として位置付けられている。特に、核医学診断法の1つであるPET (positron emission tomography, 陽電子放射断層撮影) は個体深部における細胞活動状態などの“生理機能”を画像化できるため、各種病変や疾患のメカニズム解明に貢献するだけでなく、その成果が創薬や予防医学に結び付くと期待され、分子イメージングの中心的技術として注目されている。PETは放射性同位元素で標識した糖やアミノ酸など生理機能に重要な物質またはその類似化合物を個体に投与し、その“分布”を画像化することで組織の血流や代謝などの生理学的機能を診断する。したがって、任意のタンパク質の発現量や構造変化、あるいは他のタンパク質との相互作用などを解析することには向いていない。一方、本特集で取り上げる“可視光”を利用する手法は、蛍光タンパク質や化学発光タンパク質の遺伝子改変技術と組み合わせることで、きわめて多様な生理機能の可視化が行える。しかしながら、そのほとんどが細胞レベルのイメージングに留まっており、組織・個体レベルへの応用例は希少である。PETで検出するγ線に比べると、可視光は圧倒的に組織透過能力が低いといううえに、蛍光法の場合には試料からの自家蛍光がノイズとして加わるため、正確なデータが得られないというのが主な理由である。しか

しながら、プローブ側に巧みな仕掛けを加えたり、あるいはシグナルを検出する装置に工夫を凝らすことで、不可能が可能になる場合もある。本特集では斬新奇抜なアイデアを実践している研究を取り上げ、個体レベルのイメージングを成功させるうえで、何がポイントとなるのかを中心に解説する。

I. 蛍光 vs. 化学発光

岩脇氏は小胞体ストレス^{注1}を生きた細胞内で可視化するため、小胞体ストレス時に発現レベルが上昇する*BiP*遺伝子のプロモーターに蛍光タンパク質Venusを繋げた遺伝子コンストラクトを作製した。この遺伝子コンストラクトは培養細胞レベルでは小胞体ストレスの有無で蛍光シグナルの強度に変化が見られたが、個体レベルでは有意差のある蛍光シグナルの増減は観察されなかった。これは小胞体ストレスの有無におけるシグナル強度比が数倍程度であったため、弱いながらも生理的な小胞体ストレスがかかる可能性のある動物個体では蛍光強度の変化を検出するのが困難であったからだと彼らは結論している。そこで彼らの取った方法は、小胞体ストレスに依存して起こるXBP1-Venus mRNAのスプライシングとそれに伴うフレームシフトにより、XBP1-Venus融合タンパク質が産生されるというもの(ERA1システム)である。スプライシングを行うIRE1タンパク質の活性が厳密に制御されているため、小胞体ストレス応答の有無で細胞の蛍光強

注1 小胞体内に未成熟タンパク質や構造異常タンパク質が蓄積することで生じる小胞体機能への過度のストレス。

組織・個体レベルの
ライブイメージング

蛍光法	応用例
● 蛍光タンパク質+スプライシング (岩脇氏)	小胞体ストレス
● 蛍光タンパク質+分解シグナル (吉田氏ら)	薬物動態
● 多光子励起+FRET (岡本氏ら)	分子間相互作用
● 多光子励起+CARI (山岡氏ら)	生体分子の機能抑制
化学発光法	
● 化学発光タンパク質+スプライシング (岩脇氏)	小胞体ストレス
● スプリット化学発光タンパク質 (小澤氏)	分子間相互作用
● 化学発光タンパク質+スプライシング (小澤氏)	
無染色法	
● 第2高調波 (藤田氏)	高い極性を持つ構造体
● ラマン散乱 (藤田氏)	分子振動
● コヒーレントアンチストークスラマン散乱 (藤田氏)	特定の分子振動

図1. 可視光を利用した個体レベルの機能イメージングおよび機能阻害への取り組み

度比(コントラスト)が大きくなった結果、マウス臓器における小胞体ストレス応答をライブイメージングすることが可能になった。この事例からわかるように、個体レベルでの蛍光機能イメージングのポイントは“高いコントラスト”である。

岩脇氏が蛍光タンパク質の“合成”に工夫を凝らしたのに対し、吉田氏・田中氏・三輪氏らの研究グループは蛍光タンパク質の“分解”を巧みに利用してコントラストの上昇を達成している。彼らは変異TetR(テトラサイクリン受容体)と緑色蛍光タンパク質EGFPの融合タンパク質(Tetデグラトンプローブ)がテトラサイクリン誘導体のDox(Doxycycline)存在下で蛍光を発し、Doxがない状態ではユビキチン-プロテアソーム系によって積極的に分解されることを利用している。Tetデグラトンプローブを全身性に発現するマウスを作製してDoxを投与すると、臓器や脳でEGFPの蛍光がコントラスト良く観察された。このことからDoxがこれらの臓器に集積していることが診断できる。他の薬剤にも応用が期待でき非常に興味深い。

さて、個体レベルのイメージングを行う場合、空間解像度を犠牲にした“全身観察”と、特定の部位をクローズアップした“局部観察”がある。全身観察で例えば脳にシグナルが観察された場合、さらに脳のどの細胞からのシグナルなのかを調べたいのが科学者心理であろう。吉田氏らはそのようなことを可能にする顕微鏡観察技術として内視鏡的な利用ができる“スティックレンズ”を紹介している。本技術は大きな開腹や頭蓋骨の取り外しを必要としないため、個体に与えるダメージが少ないという利点を持つ。

以上は蛍光をプローブに用いているので、特定波長の励起光を照射する必要があるが、全身観察する場合、励起波長に

よっては皮膚からの自家蛍光が無視できなくなる。特に、プローブの発現量が少ない場合には自家蛍光成分がノイズとなりプローブからのシグナルを観察するのはほぼ絶望的となる。このような微弱なシグナルを高いコントラストで検出したい場合には、励起光を必要としない化学発光法が有利になる。岩脇氏は先述のERAISシステムにおけるレポーターを化学発光タンパク質であるホタルルシフェラーゼに変更することで、蛍光では捉えることのできなかった妊娠マウスの胎仔内における小胞体ストレスシグナルを検出できることを示している。

さらに、小澤氏は二分したルシフェラーゼ(スプリットルシフェラーゼ)の再構築を利用した、タンパク質間相互作用の検出プローブを開発し、マウス個体内でのアンドロゲンレセプターがDHT(ジヒドロテストステロン)の投与に依存して核内移行する様子を画像化している。この方法はinteinによるプロテインスプライシングを利用してスプリットルシフェラーゼを共有結合的に連結する“タンパク質再構成系”とスプリットルシフェラーゼが近接してリフォールディングする“タンパク質相補系”の2つに分類される。すでに国内外から複数の事例が報告されており、個体レベルでの有力なタンパク質間相互作用イメージング法として期待される。

II. 多光子励起の利用

さて、タンパク質間相互作用をライブ観察する方法としては蛍光共鳴エネルギー移動(fluorescence resonance energy transfer; FRET^{注2})を利用した方法が有名であるが、

注2 励起状態にある蛍光分子からごく近傍の蛍光分子へ励起エネルギーが移動する現象。

励起光が必要な蛍光を利用することから、やはり組織・個体レベルへの応用はきわめて少ない。岡本氏・林氏の研究グループは脳の記憶・学習過程における神経の樹状突起棘の形態変化がアクチンの重合・脱重合状態と密接に関係することを多光子励起³FRET法で突き止めた例を紹介している。この場合では海馬の培養スライスを利用しているが、多光子励起を利用して、ラット個体の脳を取り出すことなく神経細胞の活動が観察されている例があることから、FRETと多光子励起を組み合わせれば、個体レベルでのタンパク質間相互作用観察が可能になるはずである。

ところで本特集のテーマである、生体分子の機能や動態を個体レベルでイメージングすることは現時点では非常に難しいことではあるが、近い将来それは当たり前の作業になることは必然である。岡本氏らも述べているように、今後はイメージング技術だけでは不十分であり、生体内の特定領域にある特定分子の機能を特定時間に活性化または不活性化させる技術の開発が必要になってくると考えられる。山岡氏・田邊氏・高松氏らの研究グループはそのような技術として、多光子励起標的分子機能阻害法 (MP-CALI) を開発した。MP-CALIはEGFPを多光子励起することで発生する活性酸素により、ごく近傍の生体分子機能を不活性化させるといふものである。その応用例として、哺乳類細胞間をつなぐギャップ結合を構成するConnexin43や細胞分裂時におけるAuroraBとボレアリンをMP-CALIにより機能阻害した実験結果を紹介している。遺伝子ノックアウト法やRNA干渉 (RNAi) 法などによるタンパク質ノックダウンの実験系では困難な、時空間的にきわめてダイナミックな生理現象で機能する分子の不活性化を行えるという点で今後有望な解析技術になるものと期待される。

Ⅲ. 無染色によるイメージング

これまで蛍光分子や化学発光分子をプローブに用いたイメージングについて紹介してきた。いずれも重要で有益な技術である。しかし、その根本原理として外からプローブを導入する必要がある以上、そのプローブによる生理活性への影響を排除することができない。もし、何らプローブを導入することなく、つまり無染色で生体分子の動態をイメージングできればそれに越したことはないであろう。その可能性があるイメージング法として、藤田氏は第2高調波 (SHG) 顕微鏡、ラマン散乱顕微鏡、コヒーレントアンチス

トークスラマン散乱 (CARS)⁴ 顕微鏡を紹介している。SHGは非中心対称な構造を持つ分子が入射光と相互作用することで発生する入射光の半分の波長(倍の振動数)の光のことで、生体内ではコラーゲンや筋原線維、紡錘糸などがSHGを発生する。ラマン散乱は入射光を分子に照射したときに散乱される光のうち、入射光と異なる振動数を持つ光のこと(同じ振動数を持つ光はレイリー散乱と呼ばれる)で、振動数のずれは赤外吸収で観測される分子振動に対応している。レイリー散乱に比べその強度は 10^{-6} 程度も低いため、観測が難しかったが、検出器の高性能化で生きた細胞内のラマン散乱観察が可能になってきた。ラマン散乱スペクトルには非常に多くの分子情報が含まれるため、スペクトル解析技術と組み合わせることで、細胞内の抗癌剤分布といった医学・生物学に有益な情報を得ることが可能である。さらに、より高感度にラマン散乱を検出する方法として期待されているのがCARSである。本方法では特定の分子振動を励起できるため、その振動数を持つ分子の分布をイメージングすることが可能である。いずれの顕微鏡も近赤外光を光源として利用できるため、細胞レベルのみならず個体レベルのイメージングにも応用が可能である。しかしながら、これらの3つのイメージング技術は医学・生物研究において普及しているとは言いがたく、また、今後一般的なバイオイメージング技術になりうるかどうかは未知であるが、従来の顕微鏡と異なる情報を得ることができるという点において潜在能力の高い技術であり大いに期待したい。

おわりに

本稿で紹介した様々なアプローチ法を図1にまとめた。これまで、細胞レベルのイメージングで培われてきた蛍光・化学発光による機能イメージングの技術を組織・個体レベルのイメージング技術として確立していくためには、光学系や検出系の工夫はもちろんのこと、プローブデザインに斬新なアイデアが必要になるであろう。我々生物学者が粉骨碎身、あれこれ工夫してできるのはもっぱらプローブデザインくらいであるが、常にアンテナを張り巡らせて新しい光学技術や検出技術に関する情報を取り入れ、時には物理系の研究者やメーカーと共同研究するなどして、個体レベルのイメージングに対し、総合的に取り組む姿勢が必要かもしれない。誌面の都合上、限られた研究しか取り上げることができなかったが、本特集を機に1人でも多くの読者諸氏がイメージング技術に興味を持っていただければ幸いである。最後に、貴重な時間を割いてご協力いただいた執筆者の方々に心より感謝する次第である。

注3 1つの蛍光分子が複数の光子を同時に吸収して励起状態となること。
注4 波長の異なる2つの光が物質に入射したとき、どちらの光とも異なる波長の光が発生する現象。