

- for beginners

- "Live Cell Imaging : A Laboratory Manual" Robert DG, et al eds: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2005)
- "Imaging in Neuroscience and Development : A Laboratory Manual" Rafael Y, et al eds: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2005)

疾患モデルとしてのマウス活用のために

細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ

マウス表現型解析 プロトコール

最新刊

形態分析から生理機能解析まで

【編集】理化学研究所ゲノム科学総合研究センター
ゲノム機能情報研究グループ

- A4変型判 ●232頁 ●CD-ROM付属
- 価格4,830円 (5%税込)



 秀潤社

〒101-0054 東京都千代田区神田錦町3-5-1 興和一橋ビル別館3階
TEL: 03-5281-0552 (営業部) FAX: 03-5281-0550
E-mail: info@shujunsha.co.jp URL: http://www.shujunsha.co.jp/

電顕に期待するもの

私と電子顕微鏡（以下、電顕）の関わりは唯一、博士課程の学生のときに作製した遺伝子ノックアウトマウス初期胚の表面構造を“美しく”描写するためにSEMを用いたことくらいで、それ以外はまったく使ったことがない。言わば電顕の超と素人である。現在、もっぱら蛍光タンパク質を用いて生きた細胞内で繰り広げられる生理現象を可視化する技術、特に各種機能プローブとそのプローブが発するシグナルを効率良く捉えることができる光学顕微鏡の開発を行っている。したがって、ある程度“顕微鏡”については精通しているつもりであるが、電顕となるとまったくお手上げである。無知であることを幸いに、いっそのことここでは電顕に対する大いなる“夢”を語ってみたい。

もともと発生学を研究していた私が、バイオイメージング技術に興味を持つようになったきっかけは、単純至極で“生きものは生きたままの状態では解析しないと、様々な生命現象の本質に迫れないのではないか？”と思ったからである。確かに、ゲノム研究やプロテオーム研究の進展により、莫大な量の分子種に関する情報が蓄積し、様々な生理現象に関与する分子カスケードマップが詳細に記載されている。しかしながら、我々の生命に対する理解はここ十数年さほど変わっていないように思われる。どうも情報ばかりが増えて、肝心の“本質”なるものに迫れていない。では、“本質に迫る”とはどういうことか？思うにそれは“何が(what)”ではなく、“どのように(how)”に答えることではなからうか？例えばBZ (Belousov-Zhabotinsky) 反応という化学反応について考えてみるとわかりやすいかもしれない。BZ反応は臭素酸カリウム、臭化カリウム、マロン酸、セリウム塩のたった4種類の分子をシャーレ内で混ぜ合わせると、溶液の色が時間的・空間的に振動する反応で、セリウムイオンが還元状態 (Ce^{3+} 、無色) と酸化状態 (Ce^{4+} 、黄色) で異なる発色をするため、容易に観察することができる。これまでの研究から、4種類の分子の反応経路とその中間体に関する知見、つまり“何(what)”が関与しているかについては明らかになっている。しかし、その情報をいくつなぎ合わせてもBZ反応におけるダイナミックな時空間パターンが“どのように(how)”できるのかは理解できない。“散逸構造”の一例である“反応拡散系 (reaction-diffusion system)”，詳しくは“3次元空間における物質の濃度分布変化は、反応と拡散の共役によって形成され、しかも反応系における抑制因子が活性因子よりも速く拡散する場合に濃度分布の変化が生み出される”という考え方を導入して初めてBZ反応の

時空間パターンができあがる仕組みが理解できるのである¹⁾。生命現象も化学反応によって成り立っており、日周期性、月周期性、年周期性などのリズムや形態形成過程で見られる様々な空間パターンの自発的形形成が存在する以上、その本質的理解のためには反応拡散系の考え方を取り入れる必要があるだろう。実際、近藤らの先駆的な研究により、動物の皮膚模様形成に反応拡散系が関与しているものもあることがわかってきた²⁾。しかしながら、細胞内や体内組織などについてはほとんど研究が進んでいない。なぜか？それは、ある生理現象に関与する分子群がどのような時空間パターンで反応しているのかわかっていないため、反応拡散の観点あるいはその他の散逸構造論的観点から議論ができるのである。そこで必要不可欠になってくるのが顕微鏡技術である。特にダイナミックな現象を理解するためにはダイナミクスを壊すことなく、その中で繰り広げられている分子反応を可視化しなければならない。近年、続々登場する新しい蛍光性物質と光学顕微鏡技術はまさにこのような要求に応えるものであり、生きた細胞内におけるタンパク質の局在変化や遺伝子の活性化、酵素反応などの可視化がごく普通に行えるようになってきた(図1)。今やガラス基板上であればタンパク質1分子の動きや構造変化も“検出”できる。さらにごく最近では非線形光学を利用した超解像により、可視光を利用して15nm程度の空間分解能が達成されており³⁾、このままのペースで進歩すると10nm以下の空間分解能を可視光で達成するのはそう遠い将来でないかもしれない。

では、生きた試料を観察することができない電顕は不要か？というそんなことはない。原子レベルの構造情報があれば、たとえそれが静的な情報であったとしても、分子が“どのように(how)”機能するかが説明できるからである。2003年のノーベル化学賞を受賞したR. MacKinnonがX線結晶構造解析により K^+ チャネルの構造を解き、 K^+ が選択的にチャネルを通過できる機構を明瞭にしたことは、静的な情報からでも動的機能が説明できることを示した典型例である。もちろんこれはすごいことではあるが、あくまでも3次元結晶の中の構造情報に基づいている。より生理的条件下に近い構造から機能を理解するには細胞膜に埋め込まれた状態のチャネルの構造を高い分解能で解く必要があるだろう。また、結晶作製が容易でないタンパク質複合体の構造を理解するためには、試料の急速凍結により“生きた状態”のスナップショットを撮るほうが簡便に思える。このような意味において、数ある電顕技術の中で、今後さらなる発展を

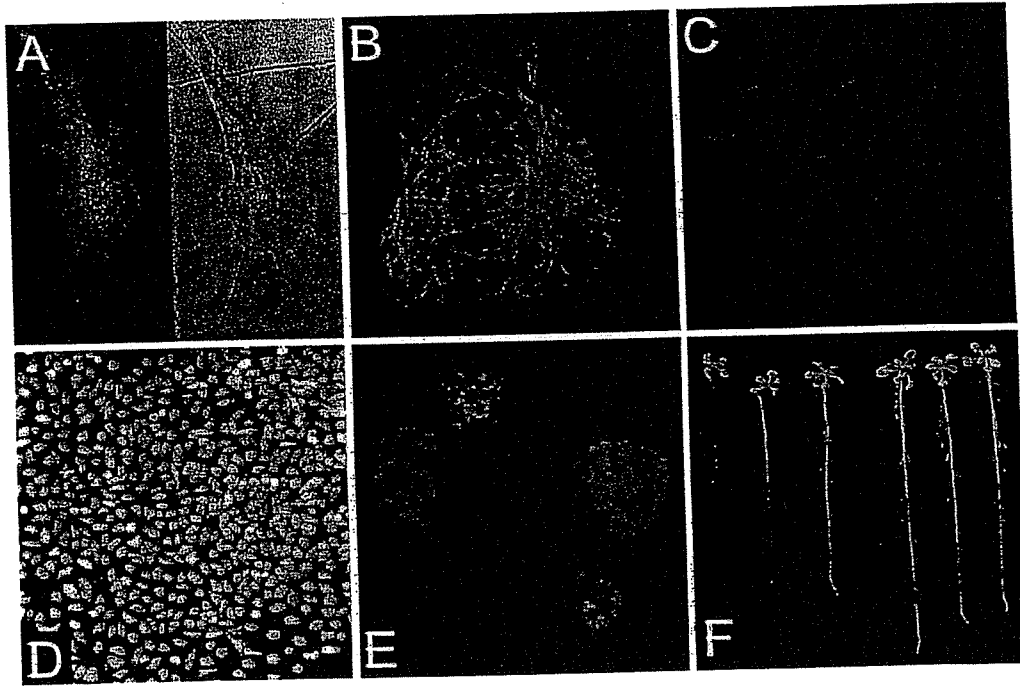


図1. 光学顕微鏡によるバイオイメーキング

A: 神経成長円錐上に存在する受容体分子の1分子蛍光像 (撮影: 谷 知己). B: 細胞骨格タンパク質の可視化例 (撮影: 斎藤健太). C: クロマチンの可視化例 (撮影: 松田知己). D: 色変換蛍光タンパク質 (オレンジ色に変化) による細胞標識の例 (撮影: 永井健治). E: アポトーシス過程におけるカスパーゼ3活性化 (オレンジ色の細胞) の可視化例 (撮影: 竹本 研). F: 蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変植物 (撮影: Derek Goto).

期待したいのはクライオ電顕である。現時点で、クライオ電顕の現実的な空間分解能はX線結晶解析に比べると低いが、可視光学系が回折限界を遥かに上回る空間分解能を達成できるようになった現在、電顕でも様々な工夫による大幅な空間分解能の改善が期待できると思われる。0次光と回折光の干渉によって像が形成されるという原理は電顕も同じであるため、光学顕微鏡で用いられている工夫は電顕にも応用可能なはずである。例えば、デコンボリューションにより空間分解能を上げたり、あるいは照射する電子線に非線形性を付与することで空間分解能を上げたり、はたまた両者を融合して大幅な空間分解能の上昇を狙ったりできるかもしれない。電子レベルとまではいかなくてもサブÅの空間分解能が実現でき、分子1個の機能がその構造から“どのように (how)” 生み出されるのかがより詳細に理解できるようになることを期待したい。

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
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かけ研究者、2005年より現所属、教授。

- 文献 -

- 1) 三池秀敏ら: 非平衡系の科学Ⅲ: 反応・拡散系のダイナミクス (講談社サイエンティフィク): 1997
- 2) Kondo S, et al: Nature (1995) 376: 765-768
- 3) Donnert G, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103: 11440-11445

B/O

バイオ
テクノロジー
ジャーナル

研究の現場で活用できる先端技術と実用化の情報誌

バイオテクノロジージャーナル
年6回1,3,5,7,9,11月の1日発行
第6巻第6号(通巻33号)2006年11月1日発
2002年1月30日第三種郵便物認可
ISSN 1349-7448

特集

いますぐ使える

ヒト細胞最新活用法

～遺伝子解析・薬剤開発・再生医療の必須マテリアル～

企画 ● 中村幸夫 Yukio Nakamura

▶ **ご回覧**
ください

◆News◆

【サイエンス・トピックス】

遺伝子工学／マイクロアレイの通信簿 バイオインフォマティクス／リメイクでも面白い物語
ナノテクノロジー／体内からの自己主張 ～量子ドットコンジュゲートを用いたバイオイメージング～

【バイオニュース】

特許／特許行政年次報告書2006 ～産業財産権の現状と課題～
バイオビジネス／どの市場を選ぶか？

◆バイオテクノロジージャーナルインタビュー◆

Jaap Goudsmit (Crucell社CSO)

感染症ワクチンの現状と新たな開発戦略



◆最新蛍光イメージング活用術◆

第10回 HaloTagテクノロジーが拓く さまざまな蛍光イメージングの可能性

◆テクノ・トレンド◆ 大腸菌を利用した抗腫瘍性抗生物質のde novo合成 他

製品特集

顕微鏡とイメージングツールの 最新アプリケーション

最新 蛍光イメージング活用術

監修/宮脇敦史 (理化学研究所附属科学総合研究センター)

第10回 HaloTag テクノロジーが拓くさまざまな 蛍光イメージングの可能性

永井健治 (北海道大学電子科学研究所)

はじめに

生きた細胞内のタンパク質局在や機能を可視化するバイオイメージング技術は、ポストゲノム時代の昨今、必要不可欠な技術として生命科学のみならず、医学、薬学分野など広範な分野の研究者に利用されるようになってきた。蛍光タンパク質の出現がバイオイメージング技術の普及に大きな役割を果たしたのは論を待たない。さまざまな波長変異体に加え、近頃は“第2世代”の蛍光タンパク質として、刺激光の照射により吸収や発光の特性が変化する蛍光タンパク質も開発され、従来の蛍光タンパク質では成しえなかったさまざまな解析を可能にしている。一方、本稿で紹介するような、蛍光標識を任意の時間に、しかも簡便に行える HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology (以下、HaloTag テクノロジー) などの技術も登場し、蛍光イメージングの可能性をさらに広げている。とはいえ、メーカー側が宣伝する「蛍光標識のタイミングを制御することで、蛍光タンパク質では“不可能”であった発現タンパク質の染め分けが容易にできる」という文言 (プロメガ社のカタログを抜粋) を鵜呑みにして利用しているユーザーが少なくない。例えば、PA-GFP や Kaede など第2世代の蛍光タンパク質を用いれば蛍光標識のタイミングは制御できるのに、である。本稿では、メーカーの文言に翻弄されない、より“能動的な”技術利用を喚起する狙いも込めて、HaloTag テクノロジーの可能性に迫る。

HaloTag テクノロジーとは?

プロメガ社から販売されている HaloTag テクノロジーは HaloTag™ タンパク質 (以下、HaloTag) と HaloTag リガンドの結合を利用したタンパク質の蛍光標識技術のことである¹⁾。HaloTag はバクテリア由来のハロアルカン脱ハロゲン化酵素の酵素活性を利用している。本酵素は分子量 33kDa の単量体として機能し、ハロアルカンからハロゲンを解離させる反応を触媒する。この酵素反応は3つのステップ、つまり、①リガンド (ハロアルカン) の酵素活性中心への結合、②酵素活性中心とリガンドの共有結合形成 (中間体形成)、③加水分解反応によるハロゲンの解離、からなる (図 1-A)。この酵素の触媒活性中心に近接する N 末端から 272 番目のヒスチジンをフェニルアラニンに置換したものが HaloTag であり、このアミノ酸置換により酵素反応は②の中間体形成で停止するため、リガンドが共有結合により酵素と連結することになる (図 1-B)。したがって、リガンドに適切な蛍光色素をつなげておけば、HaloTag を自らの酵

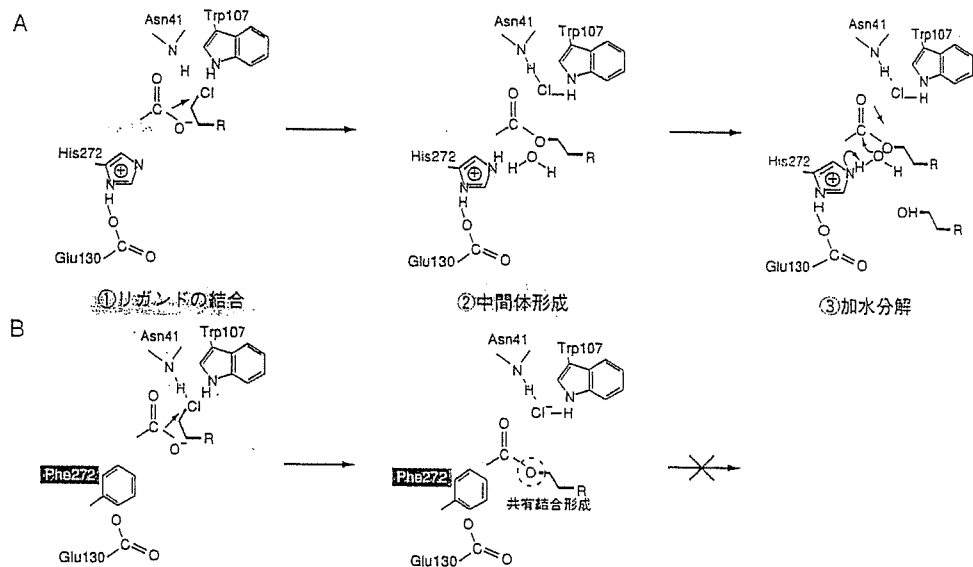


図1 ● HaloTag テクノロジーにおけるリガンドの反応機構

A) 脱ハロゲン化酵素の反応機構。ハロゲン化物 (R-Cl) は酵素の活性中心 (Asp106) で中間体を形成した後、His272によって活性化された水分子による加水分解反応でアルコール (R-OH) となり放出される。B) HaloTag ではH272F変異により、加水分解反応が起きず、HaloTag とリガンドとの間に共有結合が形成されたままになる

素反応により蛍光標識することができるだけでなく、蛍光色素以外の化合物も標識することが可能になる。現在、プロメガ社からは3種類の蛍光リガンドと2種類のビオチン化リガンドや、任意の化合物をリガンドに結合させるための未標識リガンドなどが販売されている(図2)。これら各種のリガンドを使い分けることで、生きた細胞や組織はもちろん固定された試料を蛍光イメージングすることができるのみならず、タンパク質やタンパク質複合体を、生細胞から直接的に、あるいはライセートを調製後、単離・分析することも可能である。それぞれについて詳しく紹介したいところであるが、誌面の都合上、本稿では蛍光イメージングに焦点を絞り、蛍光タンパク質と対峙させつつ HaloTag テクノロジーがもつ特徴、利点、欠点を考察してみる。

● HaloTag の一般的な蛍光イメージング技術への応用

まずは、HaloTag テクノロジーの実験の流れを説明しよう。

目的タンパク質を HaloTag で蛍光標識するためには、以下の3つのステップを必要とする。

- ① 目的タンパク質と HaloTag を融合した遺伝子コンストラクトを作製する。
- ② その遺伝子を適当なトランスフェクション試薬で細胞に導入して融合タンパク質を発現させる。
- ③ トランスフェクション後の適当な時期に蛍光 HaloTag リガンドを培地に加えて細胞に取り込ませ、HaloTag と HaloTag リガンドを共有結合させる。
- ④ 未反応の蛍光 HaloTag リガンドを培地を何回か交換することにより取り除く。

図3はこのようにして染色した例である。未反応のリガンドはほとんどすべて取り除かれ、きわめてコントラストの高い蛍光画像が得られることがわかる³⁾。

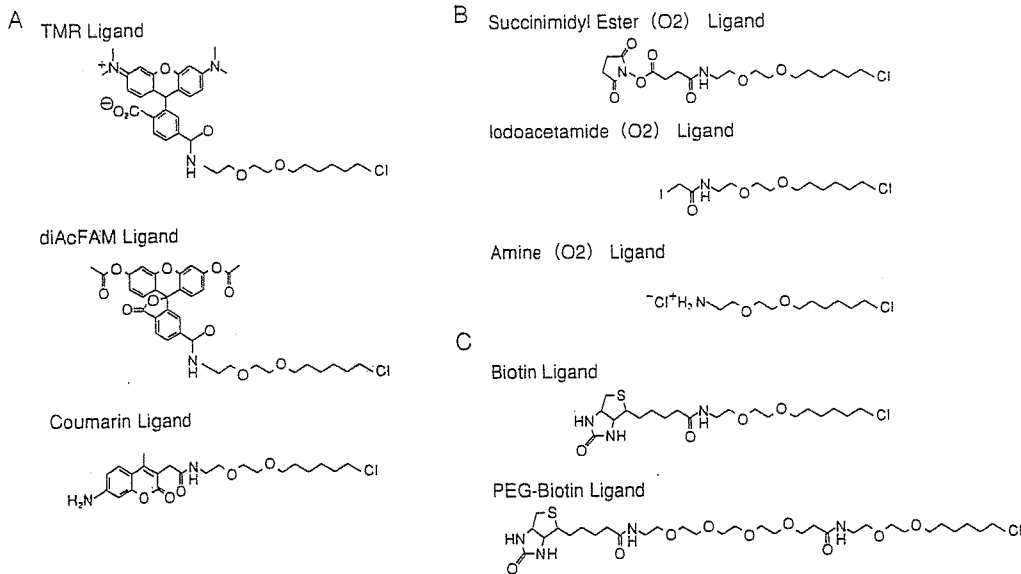


図2 ● HaloTag リガンド

A) 蛍光標識リガンド。TMR, diAcFAM, Coumarin それぞれの極大励起波長/極大蛍光波長は 555 / 585, 494 / 526, 353 / 434 (nm) である。B) 未標識リガンド。C) タンパク質精製用リガンド。すべての化学式において赤色部分は HaloTag と結合するリガンド部分を示す

さて、上述の一連のステップのなかで、HaloTag テクノロジーを特徴付けるのが③のステップである。HaloTag リガンドの添加濃度や添加時間を変えることにより、標識効率^{*1}を変えることが可能だからである。これはさまざまなイメージングを実践するうえで非常に重要なポイントとなる。例えば、分子の並進拡散速度を自己相関法により求める FCS (fluorescence correlation spectroscopy) (図4-A) や分子動態を直接可視化する蛍光1分子観察では視野中に存在する蛍光分子の数を少なくする必要があるが、HaloTag テクノロジーを利用すれば、比較的容易に適量の蛍光標識を行うことができる。このような蛍光量の調節は通常の蛍光タンパク質を利用した場合、トランスフェクションする遺伝子の量を減らしたり、発現した蛍光タンパク質を敢えて光褪色させて達成可能となるが、なかなか調整が難しい。特に後者は細胞全体にわたって、強光を一定時間照射するため生細胞に対する光毒性を考慮する必要も出てくる。一方、刺激光照射により蛍光性になる PA-GFP などの蛍光タンパク質を用いれば、刺激光の強度と照射時間を変えることで、容易に蛍光量を調節することができるので、上記の蛍光標識は HaloTag テクノロジーだからこそできる“技”という訳ではない。

では、どのような“技”が HaloTag テクノロジーならではのであろうか？ 蛍光 HaloTag リガンドには TMR (テトラメチルローダミン) 標識されたものがあるが、この TMR はきわめて光安定性が高く、蛍光1分子観察によく利用されている。蛍光タンパク質も1分子観察されているが、いかんせん長時間観察^{*2}は絶望的に難しい。というのも、蛍光タンパク質を用いると、文字通り「あつと言う間」に光褪色してしまうからである。蛍光1分子観察といえば、まだまだガラス基板上に固定したタンパク質の動きを観る研究がほとんどであるが、生理的条件下におけるタンパク質分子の振る舞いを解析するために、近い将来、生きた細胞内で蛍光1分子観

*1: 標識効率
ここで言う標識効率とは細胞内に存在する全 HaloTag タンパク質の内、何個のタンパク質が蛍光標識されたのかを表す。

*2: 長時間観察
長時間観察といってもせいぜい数十秒のオーダーである。

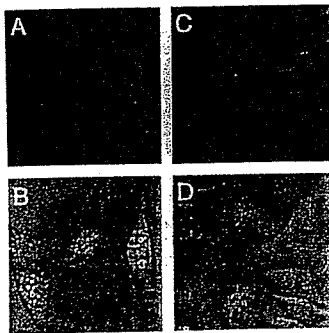


図3 ● HaloTag テクノロジーによる生細胞の蛍光染色

- A) 核に発現させた HaloTag を diAcFAM リガンドで染色した蛍光像。
- B) A とその微分干渉画像を重ね合わせたもの。
- C) 細胞質に発現させた HaloTag を TMR リガンドで染色した蛍光像。
- D) C とその微分干渉画像を重ね合わせたもの。

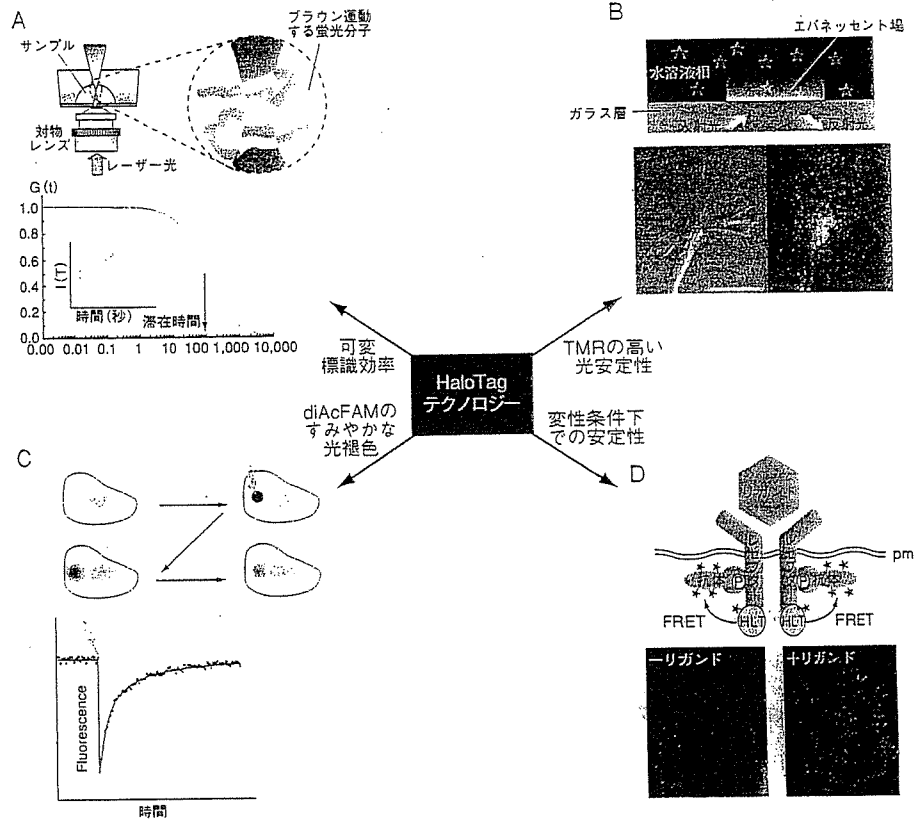


図4 ● HaloTag テクノロジーのさまざまな蛍光イメージング法への応用

- A) 簡便 FCS 試料調製。 B) 生細胞での 1 分子観察。 C) 生細胞に優しい FRAP。 D) 固定試料での FRET

察する研究が増えてくると考えられる (図4-B)。そのためには目的タンパク質を光安定性の高い蛍光分子で標識する必要があるので、TMR リガンドを用いた HaloTag テクノロジーが威力を発揮するに違いない。実際、細胞質ダイニンの分子挙動が TMR を用いた HaloTag テクノロジーで数十秒にわたって観察され、いくつかの知見が見出されている²⁾。

さて、“光安定性”という観点からすると、もう1つの蛍光 HaloTag リガンドである diAcFAM (diacetyl-fluorescein-acetoxymethylester) はあまり良くない。TMR に比べるとかなり速く光褪色する。これは一見すると、欠点のようにも見えるが、光褪色させた領域への蛍光分子の流入を観ることで、分子の拡散定数や分子間の結合の強さを解析する FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法 (図4-C) に利用するうえではむしろ好ましい。何故なら FRAP ではきわめて短時間に、ある領域内の蛍光分子を光褪色させる必要があり、そのためにかかり強い励起光 (> 10W/cm²) を照射するが、時にはその光により細胞内の生理機能が狂うこともありうるからである。これを回避するためには、極力弱い励起光で光褪色し、かつ通常の観察に用いる励起光強度では褪色しない程度の光安定性をもつ蛍光色素を使う必要が出てくる。「生体にやさしい FRAP 解析」という観点では diAcFAM はきわめて望ましい蛍光色素であり、是非お奨めしたい。

次に、HaloTag テクノロジーのその他の特性を利用した解析法を考えてみたい。蛍光タンパ

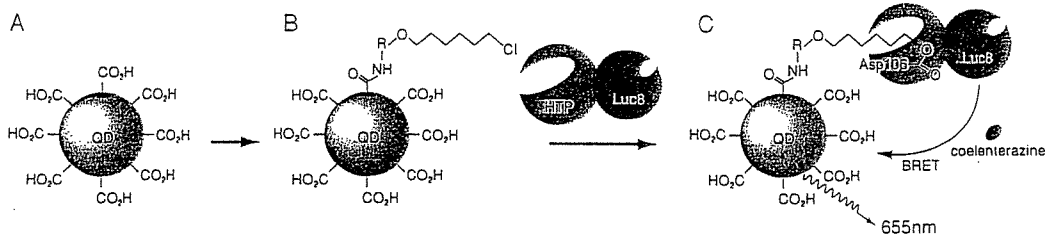


図5 ● HaloTag テクノロジーによるルシフェラーゼと量子ドットの連結

A) 未標識量子ドット。B) ハロアルカンでコートした量子ドット。カップリング剤として EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride) を使用。C) HaloTag (HTP) とルシフェラーゼ (Luc8) の融合タンパク質を連結した量子ドット。Luc8 から量子ドットへの BRET により 655nm の発光が起こる (文献 4 より引用改変)

ク質と異なり、HaloTag の蛍光リガンドは変性条件下でもきわめて安定であるため、生きた細胞内における分子動態観察のみならず、固定試料での蛍光検出も可能となる。ライブイメージング華やかかなりし昨今ではあるが、何でもライブイメージングすれば良いと考えるのは間違いで、固定試料を用いた解析でこそ得ることができる、あるいは得やすい情報もある。例えば、タンパク質間相互作用を解析する方法の1つである FRET (Förster resonance energy transfer) 法^{*3}はライブイメージングよりも蛍光免疫染色した固定試料の方が検出しやすい場合が多い (図4-D)。理由は至極単純で、蛍光免疫染色の場合、ドナーとアクセプターの量比が1対1ではなく、多対多になりエネルギー移動の確率が増えるからである^{*4}。これはドナーとアクセプターの量比が1対多の場合も当てはまる。したがって、HaloTag テクノロジーと蛍光免疫染色の組み合わせで比較的効率良くタンパク質相互作用を解析できる。例えば、目的タンパク質を HaloTag と融合して発現させ、青色発光する Coumarin リガンドで標識した後、細胞を固定する。相互作用を調べたいタンパク質は Alexa488 などの青色光を吸収する蛍光色素で標識した抗体で染色する。もし両者が相互作用していれば FRET が起こり、Coumarin を励起することで Alexa488 からの蛍光が観察されるはずである。もちろん、蛍光タンパク質もある程度このような使い方が可能であるが、利用できる固定液に制限があるため、特殊な固定法を要求する抗体との組み合わせで使用することはできない。この点においては、煮沸しても、脱水状態でも蛍光性を失わない HaloTag リガンドが圧倒的に優れている。

* 3 : FRET (Förster resonance energy transfer) 法
2つの蛍光分子 (ドナーとアクセプター) の間で起こるエネルギーの移動のことでドナー (エネルギー供与体) の蛍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、アクセプターが蛍光分子であればそれ固有の蛍光が観察される

● HaloTag を用いたその他の蛍光イメージング技術

以上は蛍光 HaloTag リガンドを使用した蛍光イメージングに関するものであるが、HaloTag の特性を利用したその他の応用も報告されだした。その1つが、半導体ナノ結晶 (量子ドット) を任意のタンパク質で標識するというものである。量子ドットはきわめて明るく輝く蛍光分子として、近年バイオイメージング分野への応用が盛んである。例えば、マウスなどの個体内における分子動態の解析などに威力を発揮している。ところが量子ドットの蛍光を観察するためには励起光を照射しなければならず、その励起光により試料から自家蛍光が放出され、ノイズの増加を引き起こしていた。一方、励起光を必要としない化学発光観察はコントラストの良い個体レベルでの分子動態観察法として注目されている。しかしながら、出てくるシグナル強度が小さいため、長時間露光を必要とし、その結果時間分解能を犠牲にしなければならなかった。

* 4 :
一般に、1抗体分子当たり複数の蛍光分子が標識される

FRETの上手な使い方

永井健治

ある蛋白質がいつ、どこで、どの程度の強さで、どのくらいの時間、活性化/不活性化するのか、あるいは他の分子と相互作用するのかを生き細胞の中で解析する重要性が高まってきた。蛋白質の大きさ程度の距離で生じる蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用すれば、そのような解析が可能になる。しかし、そう簡単にはまともなデータは得られない。本稿では、原理の簡単さに比べて結構トリッキーなFRET法を攻略するために、(1) FRETの物理化学的基礎、(2) 高性能FRET指示薬の作製法、(3) 顕微鏡下で微弱なFRETを観察する方法、(4) FRETの有無を判別する方法について解説する。

▶▶KEY WORDS : FRET 蛍光共鳴エネルギー移動 蛍光蛋白質 イメージング 顕微鏡

はじめに：蛍光の物理化学

FRETは蛍光という物理現象と密接に関連した現象であるため、その本質的理解のためにはまず蛍光とは何か¹⁻³⁾ということを入念に入れておかねばならない。

蛍光とは、基底一重項状態 (S_0) にある蛍光分子内の電子 (通常は π 電子) が、特定波長の光子と相互作用することで励起一重項状態 (S_1) へ遷移し、ふたたび、 S_0 に戻る際に、光子を放出する現象、またはその際に放出される光のことをいう (図1)。この一連の過程はさらに細分化される。まず、電子が光のエネルギーを吸収すると S_1 のさまざまな振動レベルに遷移する (吸収過程)、フランク-コンドン状態とよばれるこの不安定な状態は、過剰な振動エネルギーをまわりの分子との衝突などで散逸し、 S_1 の最低次の振動レベル (S_{1-m}) まで落ちる (振動緩和過程)。この状態が励起状態のなかでは最も安定な状態であり、一連の蛍光過程のなかでこの状態にとどまる時間が最も長い。いわゆる蛍光寿命とよばれる時間はこの S_{1-m} にどの程度留まっているのかを表す。したがって、蛍光寿命以外に励起寿命といういい方をする場合もある。蛍光寿命がどの程度の時間になるのかは、次に起こる S_{1-m} から S_0 へ遷移する速度によって規定される。いま、時刻 $t=0$ で S_{1-m} 状態に N_0 個の蛍光分子が存在し、 S_{1-m} から S_0 への遷移の速度定数を k とすると、時刻 t に S_{1-m} 状態に留まっている蛍光分子の数 $N(t)$ は

$$N(t) = N_0 \cdot \exp(-kt) \dots\dots ①$$

で表される。ここで、

$$k = \frac{1}{\tau_D} \dots\dots ②$$

で定義される時定数 τ_D が、蛍光寿命である。

ところで、実際には S_{1-m} から S_0 への遷移は、蛍光を放出する発光遷移と熱を放出する無輻射遷移、項間交差による三重項への遷移という3つの確率過程が競合している。したがって、発光、熱および項間交差各過程の速度定数をそれぞれ k_f , k_{nr} , k_T とすると、

$$k = k_f + k_{nr} + k_T = \frac{1}{\tau_D} \dots\dots ③$$

と表され、①は

$$\begin{aligned} N(t) &= N_0 \cdot \exp[-(k_f + k_{nr} + k_T)t] \\ &= N_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) \dots\dots ④ \end{aligned}$$

となる。蛍光寿命が k_f の逆数ではなく、 $k_f + k_{nr} + k_T$ の逆数であることを銘記されたい。

次に、蛍光強度の時間変化を考えてみよう。単位時間に放射される蛍光の数 $I(t)$ は S_{1-m} 状態の分子数と蛍光過程の速度定数に比例するから、

$$I(t) = k_f \cdot N(t) \dots\dots ⑤$$

となる。④を⑤に導入して、

$$I(t) = k_f \cdot N_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_D}\right) \dots\dots ⑥$$

ここで、 I_0 は $t=0$ (励起直後) における蛍光強度で、

Takeharu Nagai, 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
Effective use of fluorescence resonance energy transfer

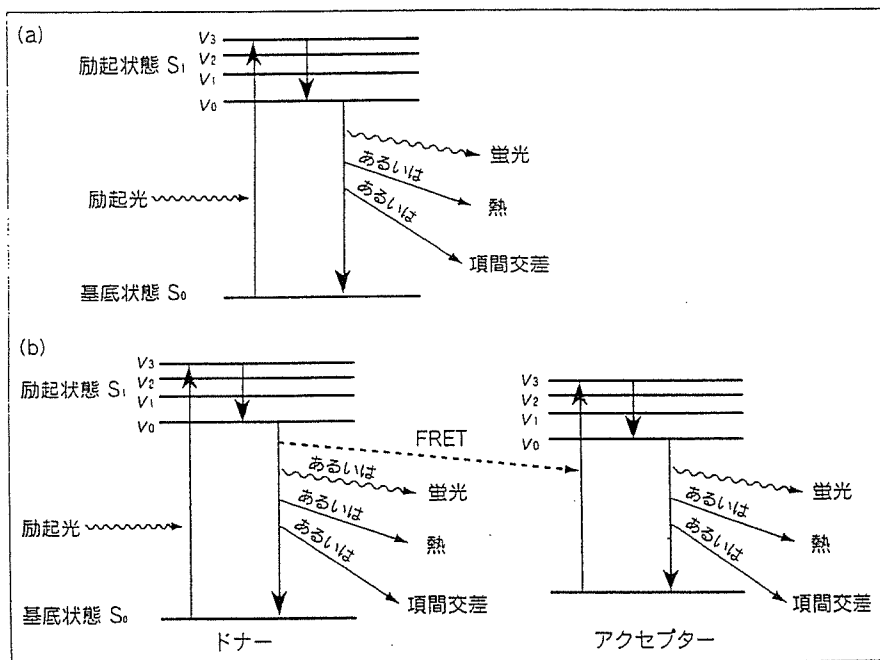


図1 励起分子の生成とそのエネルギー緩和過程の概略

(a) FRETのない状態。
 (b) FRETが起こっている状態。v₀, v₁, v₂, v₃は振動準位を表す。

$I_0 = k_f \cdot N_0$ である。

⑥は蛍光減衰曲線といい、この式から τ_D だけ時間が経つと蛍光強度が I_0 よりも $1/e$ (約 37%) 減少することがわかる。パルス光源で蛍光分子を励起し、時間を追って蛍光強度の変化を測定することにより、励起寿命 τ_D を求めることができる。

I. FRETの物理化学

さて、いよいよここから本題のFRETに関連した話に突入する。FRETは励起された蛍光分子が、発光や熱放出をする前に、そのエネルギーの一部を別の蛍光分子に与える現象である¹⁻³⁾。どの励起状態の蛍光分子からエネルギーが与えられるかという、やはり滞在時間の長い S_{1-v_m} からである(図1)。 S_{1-v_m} 状態にある蛍光分子の近傍に別の蛍光分子が、ある条件下で存在すると、前者の励起エネルギーが後者へ無輻射的に移動する確率が生じるのである。前者の蛍光分子をドナー(エネルギー供与体)、後者をアクセプター(エネルギー受容体)といい、エネルギー移動によってドナーからの発光は消光し、アクセプターからの増感蛍光が観察される。FRETの速度定数を k_{fret} とすると、発光、熱、項間交差、FRETの各

過程は競合するので、FRETが起こっているときのドナーの蛍光寿命 τ_{DA} は

$$k_f + k_{nr} + k_T + k_{fret} = \frac{1}{\tau_{DA}} \quad \dots\dots(7)$$

で表され、③との比較から、 $\tau_D > \tau_{DA}$ つまりFRETが起こっているときのドナーの励起寿命は起こっていないときに比べて短くなることが理解できよう。

さて、Föersterによると、双極子-双極子相互作用であるFRET過程の速度定数 k_{fret} とドナーの蛍光速度定数 k_f の関係は、

$$k_{fret} = \left[\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 n^4 N_A} \kappa^2 R^{-6} J \right] k_f \quad \dots\dots(8)$$

と表される。さらに、FRETが起こっていないときのドナーの蛍光

量子収率 Φ_D が、

$$\Phi_D = \frac{k_f}{k_f + k_{nr} + k_T} \quad \therefore k_f = (k_f + k_{nr} + k_T) \Phi_D \quad \dots\dots(9)$$

で表されることを利用することで⑧は

$$k_{fret} = \left[\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 n^4 N_A} \kappa^2 R^{-6} J \right] \Phi_D (k_f + k_{nr} + k_T) \\ = \left[\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 n^4 N_A} \kappa^2 J \Phi_D \right] R^{-6} (k_f + k_{nr} + k_T) \quad \dots\dots(10)$$

ここで、 n は溶媒の屈折率、 N_A はアボガドロ数、 κ^2 は配向因子とよばれ、ドナーの発光遷移双極子モーメント E_D とアクセプターの吸収遷移モーメント A_A の向きに関係した量である。 R はドナーとアクセプターの分子間距離、 J は E_D と A_A の共鳴エネルギーに関係した量で、

$$J = \frac{\int \epsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda} = \int \epsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad \dots\dots(11)$$

で表される。 $\epsilon_A(\lambda)$ はアクセプターのモル吸光係数、 $F_D(\lambda)$ はドナーの発光強度に関する量で全波長域の発光強度の和を1に規格化したときの各波長における発光強度を表す。 λ は波長である。⑪からわかるように J はドナーの発光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なり程度を示す量となり、したがって spectral

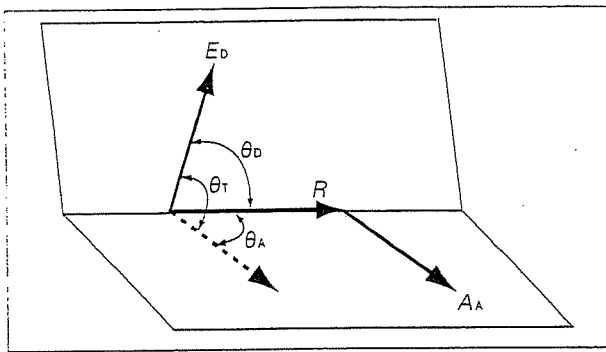


図2 共鳴エネルギー移動のベクトル関係

R : ドナーからアクセプターへのベクトル, θ_T : E_D と A_A のなす角度, θ_D : E_D と R のなす角度, θ_A : A_A と R のなす角度.

overlapとよばれる. この値が大きいドナーとアクセプターのペアを選ぶとFRETが起りやすくなる.

さて, ⑧における変数は n , κ^2 , R , J となるが, 生体試料を扱う場合, 溶媒は水なので n は一定(1.33), また J も使用する蛍光分子によって一義的に決まるので一定となる. したがって, 変数は κ^2 と R のみ, つまりドナーとアクセプターの配向と距離の2つだけとなり, これらのパラメーターによって k_{fret} が決定される.

ところで配向因子 κ^2 は, 図2に示される角度 θ_T , θ_D , θ_A を用いて

$$\kappa^2 = \left[E_D \cdot A_A - \frac{3(E_D \cdot R)(A_A \cdot R)}{R^2} \right]^2$$

$$= [\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cdot \cos \theta_A]^2 \dots \dots \textcircled{12}$$

(ただし, $|E_D| = |A_A| = 1$)

となり, 理論上 $0 \leq \kappa^2 \leq 4$ の値をとりうる. しかしながら, 実験的にこの値を求めるためにはドナーとアクセプターの発光, 吸収遷移モーメントのなす角度を決定する必要があるが, 事実上不可能である. そこで, 通常はドナーとアクセプターが蛍光寿命と比べて速い回転ブラウン運動を行っている, つまり E_D と A_A が等方的に分布しているという仮定を設け, $\kappa^2 = 2/3$ の値を利用している. 結局, ⑧のなかで未知数はドナーとアクセプターの分子間距離 R だけとなり, FRETの速度定数を求めることができれば, R を求めることが可能になる. FRETが分光学的定規といわれる所以である.

さて, いま50%のFRET効率を与えるドナーとアクセプターの距離 R_0 (Förster distance)を考えたい. FRET効率 E_T は k_f , k_{nr} , k_T , k_{fret} を用いて

$$E_T = \frac{k_{fret}}{k_f + k_{nr} + k_T + k_{fret}} \dots \dots \textcircled{13}$$

で表され, これが50%つまり0.5であるから

$$\frac{k_{fret}}{k_f + k_{nr} + k_T + k_{fret}} = 0.5$$

$$\therefore k_{fret} = k_f + k_{nr} + k_T \dots \dots \textcircled{14}$$

となる. ⑭を⑩に代入して, $R = R_0$ とおき, 整理すると

$$R_0^6 = \left[\frac{9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 n^4 N_A} \right] \kappa^2 J \Phi_D$$

$$= 8.79 \times 10^{-5} (n^{-4} \kappa^2 J \Phi_D) (\text{\AA}) \dots \dots \textcircled{15}$$

が導出される. ⑮に $n = 1.33$, $\kappa^2 = 2/3$ と蛍光分子ペアに固有の J と Φ_D を導入し, R_0 を求める. たとえば, 蛍光蛋白質のCFPとYFPのペアであれば $J = 1.89 \times 10^{-13} \text{M}^{-1} \text{cm}^3$, CFPの蛍光量子収率0.4を導入して $R_0 = 49.2 \text{\AA} = 4.92 \text{nm}$ を得る. FRETがナノメートルの空間スケールで起こることが理解できよう.

ところで, すでにお気づきかもしれないが, FRETというエネルギー移動の本質が, "S_{1-m}状態にある分子の励起エネルギーが近傍に存在する分子へ無輻射的に移動する現象である" わけであるから, S_{1-m}状態にある分子であれば蛍光分子である必要はまったくない. ドナーに蛍光分子を使用するFRET以外にも, 化学発光分子を使用する化学発光共鳴エネルギー移動 (chemiluminescence RET:CRET) や, 生物がもつルシフェラーゼなどの化学発光蛋白質を利用する生物発光共鳴エネルギー移動 (bioluminescence RET:BRET) などの方法もある(図3). いずれの方法を用いても, 光学顕微鏡の空間分解能をはるかに超えたナノスケールの現象を測定・可視化することが可能となる. 実際, CFPとYFPのように異なる色のGFP変異体間におけるFRETや, あるいはルシフェラーゼからGFPへのBRETを観察することで蛋白質間相互作用を可視化したり(分子間エネルギー移動), あるいはシグナル伝達に応じた蛋白質構造変化をCFPからYFPへのFRET効率の変化に結び付けて, カルシウム, cAMP, 低分子量G蛋白質, チロシリン酸化やカスパーゼの活性化などを可視化する機能指示薬が開発されている(分子内エネルギー移動)⁴⁵⁾. ところが, これまでに報告されている数多くの機能指示薬を用いて誰でもすぐに再現データが出せるかということ, そうは簡単にはいかない. どちらかという結構難しい. なぜならば, ほとんどの機能指示薬のシグナル変化量(ダイナミックレンジ)がきわめて小さいからである. FRETを観察するための顕微鏡がしっかりセットアップされていないという理由もありうるかもしれないが, やはり大き

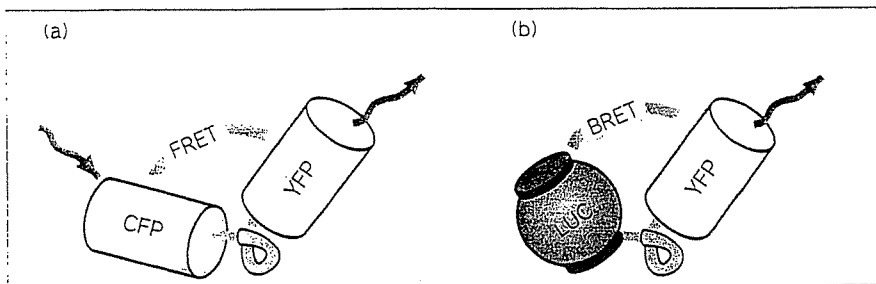


図3 FRETとBRETの概念図

FRET (a) はドナーに蛍光分子を用いるため、励起光を必要とするのに対し、BRET (b) は化学発光分子をドナーに用いるため、励起光を必要としない。ただし、発光基質の導入やATPなどのエネルギー源を必要とする。LUC：ルシフェラーゼ。

な原因は指示薬側にあるのは間違いない。FRET指示薬を開発したある論文の文章中には「XXXの刺激により、細胞内のYYYが活性化した」という記載が見受けられたりするが、図を見るかぎりほとんど判別不能で、著者の独断偏見ではないかと思われるものまである。レフェリーがなぜ突っ込まなかったのかと疑問に思ってしまう。このような論文を書かないようにするためにも、機能指示薬は誰が使用しても再現性が得られる高性能なものを作製したいものである。ではどうすればそのような指示薬を作製することができるのか？

II. GFP間FRETを利用した高性能機能指示薬の作製法

⑫式の説明のところでも「ドナーとアクセプターが蛍光寿命に比較して速い回転ブラウン運動を行っているので、 $\kappa^2 = 2/3$ の値を利用する」と記載した。何にでもいちゃもんを付けたがる筆者は「ほんまかいな？」と疑い、フルオレセインとGFPの回転速度を調べるために、定常状態蛍光異方性を測定した経験がある。それぞれおよそ0.01, 0.3というデータが得られた。

蛍光異方性 r がわかるとペランの式

$$r = \frac{r_0}{1 + 3\tau/\rho} \dots\dots\dots \textcircled{16}$$

から、分子回転の速さに関する情報が得られる。ここで、 r_0 は分子回転がいつさいない場合に観測される蛍光異方性で、どの分子も一般的には0.4である。 τ は測定分子の蛍光寿命、 ρ は回転緩和定数である。フルオレセインもGFPも、ともに蛍光寿命を3nsとして ρ を計算してみてもらいたい。フルオレセインの回転緩和定数は蛍光寿命よりも10倍大きく、一方GFPは10倍小さいことがわかるはずである。過去の文献を調べたが、確かにほぼ同じような値が記載されている⁹⁾。ということはどうか…、GFPは速い回転運動をしていないので、

$\kappa^2 = 2/3$ の近似が使えないということである。となると⑮用いて R_0 を算出することもできなければ、FRET効率から分子間の距離を算出することも不可能である。過去の論文でGFP間FRETを用いて分子間距離の算出を行っているものは多数存在するが、ほとんど誤りであるといっても過言ではないであろう。他方、GFP間FRETではドナー、アクセプター双方がゆっくり回転するので、ドナーとアクセプターの相対角度がFRET効率に対してきわめて大きなインパクトをもつことになる。つまり、GFP間FRETにおいては、 E_D と A_A がタンデムに並んでいれば($\kappa^2 = 4$)非常に効率のよいFRETが起こり、逆に直交すると($\kappa^2 = 0$)ドナーとアクセプターがたとえ数ナノメートル以内に近接していてもFRETが起らない場合がありうるということである。これは実は朗報で、ドナーとアクセプターの相対角度を最適化さえすれば、ダイナミックレンジの大きな機能指示薬ができることを示唆しているのである。

それではものは試しということで、GFP間FRETを利用した機能指示薬の先駆けであるcameleon⁷⁾をモデルに用いて、実際にドナーとアクセプターの相対角度を円順列変異GFPを利用していろいろ変えてみた(図4)⁸⁾。GFPをある蛋白質と融合させる場合、N末端またはC末端につなげるのが一般的であるが、円順列変異GFP⁹⁾を使用すれば本来のN末端、C末端とはまったく異なる位置で他の蛋白質と融合することが可能になる。したがって、GFPのさまざまな円順列変異体を用いれば、さまざまな方向でGFP蛋白質を融合することができる⁹⁾。実際に、N末端が異なるいくつかのYFP円順列変異体を作製し、従来型cameleonのYFPと置換したところ、それぞれの円順列変異に応じて異なるFRET効率およびダイナミックレンジを示した。とくに、173番目のアミノ酸を新たなN末端とするYFP円順列変異体(cp173Venus)をアクセプターにもつ改変cameleon(YC3.60)ではダイナミックレンジが大幅に改善し、驚

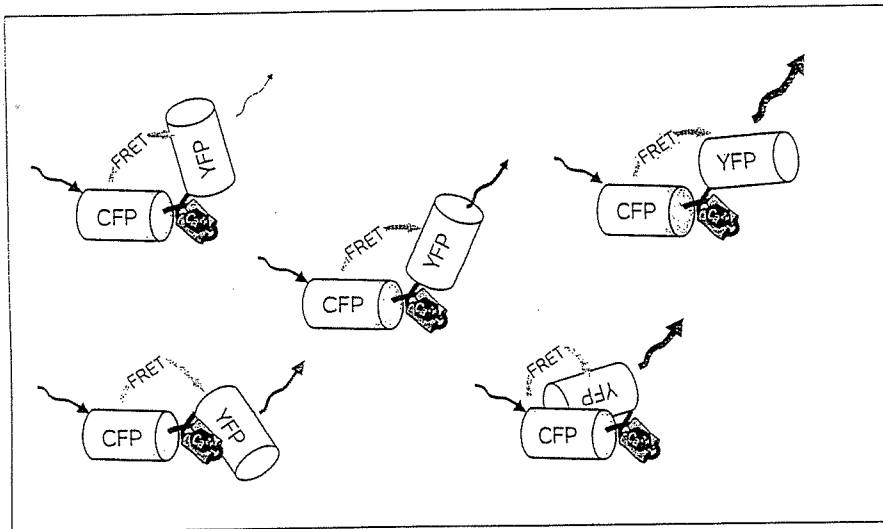


図4 蛍光蛋白質を用いたFRET指示薬におけるドナーとアクセプター間の相対角度とFRET効率の概念図

図はカルシウム指示薬であるcameleon分子内におけるYFPの角度を円順列変異体を利用して変化させたときの立体構造予想図を示す。CFPとYFPの色素団が平行に並ぶと κ^2 が大きくなるためFRET効率も高くなり、逆に直交すると κ^2 が小さくなるためFRET効率はゼロに近づく。

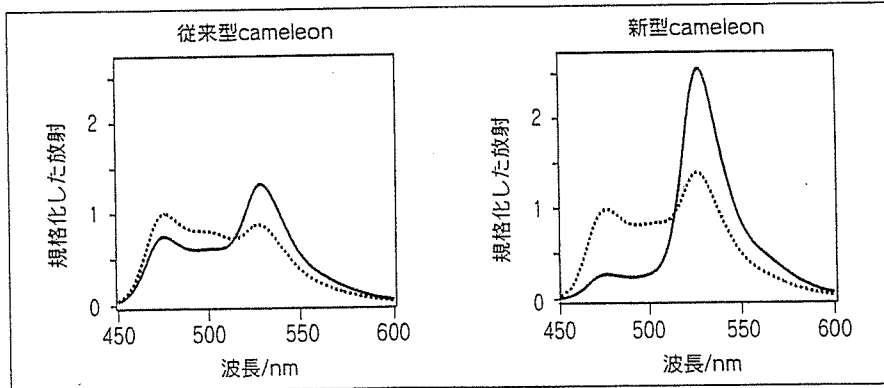


図5 新旧cameleonのダイナミックレンジ比較

従来型cameleon (YC3.12)と173番目のアスパラギン酸を新たなN末端とするVenus円順列変異体をYFPにもつ新型cameleon (YC3.60)のカルシウムの有無におけるスペクトル変化。530 nmの蛍光強度を480 nmのそれで除したレシオ値の変化量を比較すると従来型がおおよそ100% (2倍の変化量)であったのに対し、新型では600%まで大きくなった。点線が Ca^{2+} なし、実線が飽和 Ca^{2+} 。

いたことに、カルシウムの有無で600%の変化量をもつまでになった⁹⁾ (図5)。FRETに基づく可逆的な機能指示蛋白質としては世界一の変化量を誇る機能指示薬ができたわけである。ドナーとアクセプターの相対角度がFRET効率に対してきわめて大きなインパクトをもつことが確かに証明された。新型cameleonはダイナミックレンジがきわめて大きいため、シグナル量が極端に少なくなる共焦点高速観察 (100フレーム/秒) においてもコントラストの高い画像を取得することが可能である。N末端やC末端にシグナル配列や他の蛋白質を連結してもダイナミックレンジの大幅な劣化はないので、細胞膜直下や核内などの細胞内コンパートメントにおけるイメージングも楽にこなせる (図6)。

本方法の有効性はcameleonに留まらず、その他の機能指示薬にも適応可能であり、実際に高性能な機能指示薬を開発した例が海外の研究室から発表された¹⁰⁾。これまではドナーを固定し、アクセプター側だけ円順列変異体により角度を変えていたが、ドナーとアクセプタ

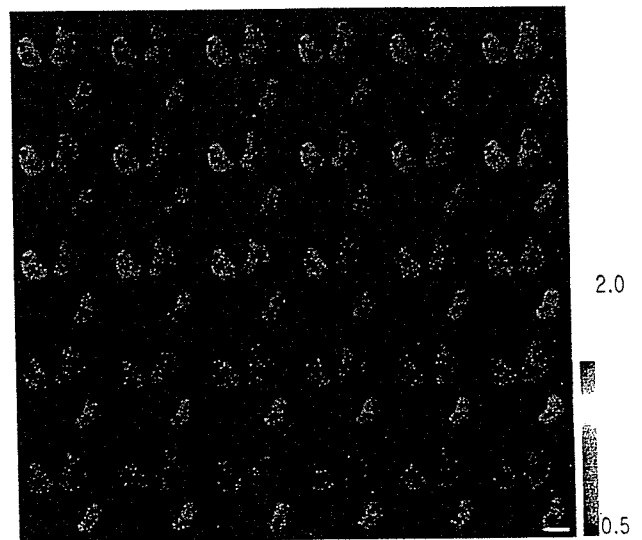


図6 新型cameleonを核に発現させた培養細胞のATP刺激によるカルシウム濃度変化を共焦点ビデオレート観察した例。ATP刺激後1秒間の全画像 (33 ms 間隔) をモニターしたものの、グラデーションバーは530の蛍光強度を480のそれで除したレシオ値に対応した表示色を示す。スケールバー: 10 μm。

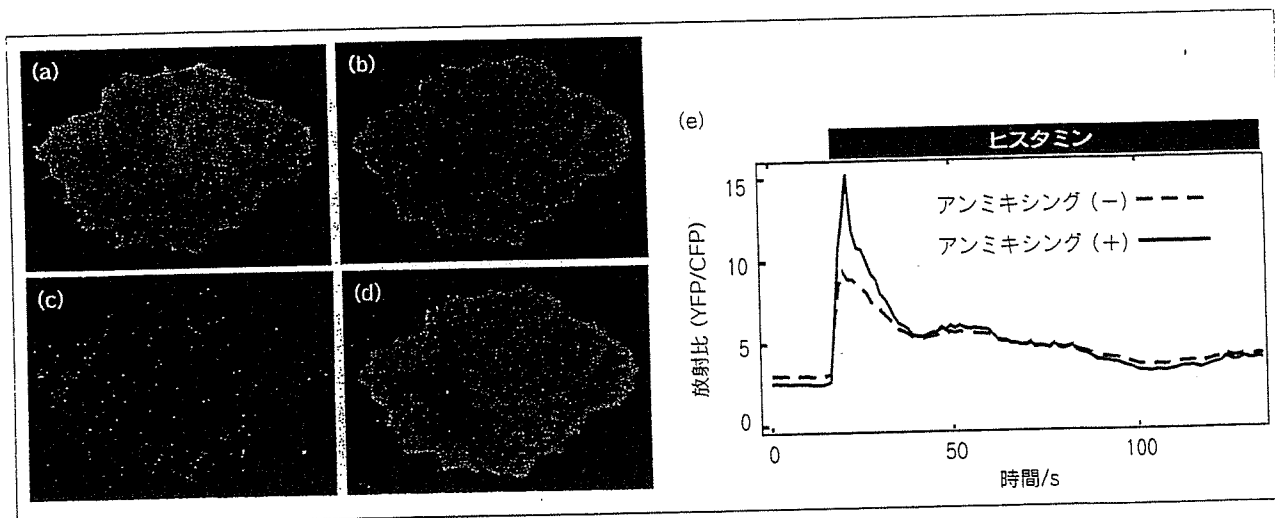


図7 高効率FRET検出法

(a)~(d)はスペクトルイメージングとスペクトルアンミキシングによるFRETシグナルの可視化例。EGFR-Venusを発現するHeLa細胞をEGF刺激して4分後にホルマリン固定し、Cy3標識抗チロシンリン酸化抗体で染色した。

(a) 488 nm励起により520 nmから580 nmまで波長スキャンした画像をすべてスタックした画像。

(b) スペクトルアンミキシング後のドナー(EGFR-Venus)蛍光画像。

(c) 同、FRET(Cy3標識抗チロシンリン酸化抗体)蛍光画像。

(d) (b)、(c)を重ね合わせた画像。

抗チロシンリン酸化抗体は細胞内のさまざまな蛋白質と結合するが、EGFにより活性化され、チロシンリン酸化されたEGFR-Venusに結合したもののみVenusからのエネルギー移動により発光する。EGF刺激により、細胞辺縁部のEGFRが活性化されていることがわかる。画像取得・解析はオリンパスFV1000を用いた。

(e) チャネルアンミキシングの例。新型cameleon(YC3.60)を発現するHeLa細胞をヒスタミンで刺激したときのドナー蛍光とFRET蛍光を浜松ホトニクス社のW-Viewで分光し、CCDカメラにて1秒間隔で画像取得した。画像取得後マルチバンドイメージングソフトウェア(浜松ホトニクス)を利用してFRET画像からドナーCFPの漏れ光(ブリードスルー)を除去し、FRETによるYFP発光のみを示す画像を作成した。この操作をする前(点線)と後(実線)のレシオ値(YFP/CFP)を計算しグラフにプロットした。アンミキシング後のほうが変化量が大きくなっているのがわかる。

一の双方に複数の円順列変異体を用いればドナー-アクセプター間相対角度の組合せが増え、最適化の成功率が高まるであろう。

III. 波長分離を利用してFRETの検出感度を上げる

作製したプローブをいくら改変してもダイナミックレンジの改善がみられない場合はどうするか? プローブ性能の不足分は顕微鏡、あるいは画像解析で補うほかない。近ごろは画像取得に際してスペクトル情報を取り込み(スペクトルイメージング)、蛍光スペクトルのクロストークを取り除く機能(スペクトルアンミキシング機能)を備えた顕微鏡が各社から市販されている。多重染色した試料において、発光波長が近接した蛍光色素でも、スペクトルの違いによって識別し、クロストークを減じる画像処理機能であり、蛍光スペクトルの変化を鋭敏に検

出することが可能になる¹¹⁾。この機能を利用すれば非常にわずかなFRETの変化(スペクトルの変化)もとらえることができるようになる。スペクトルイメージングとスペクトルアンミキシングによりYFP変異体Venus¹²⁾からCy3へのFRETを可視化した例を図7a~dに示す。この例では3nmの波長分解能でスペクトルイメージングしたデータを用いており、FRETによるCy3からの蛍光を鮮明に浮かび上がらせることができています。

スペクトルイメージング以外にも、複数の蛍光チャンネルで取得した蛍光画像に対して、あらかじめ取得された各蛍光色素の画像情報をもとに演算を行い、個々の色素の分布を示す分離画像を作成する方法もある¹³⁾(チャネルアンミキシング)。この方法も多重染色試料の観察はもちろん、FRETにおけるドナーとアクセプター間の蛍光クロストークを除去することを可能にするため、FRETシグナルを増加させることができる。図7eではW-Viewシステムで取得したFRET画像をチャネルア

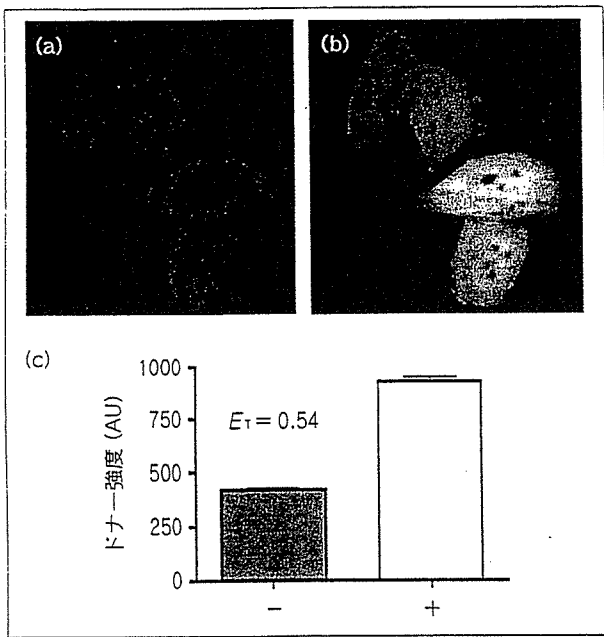


図8 アクセプターフォトブリーチングによるFRETの評価
CFP-YFP間FRETを利用した活性化型カスパーゼ3指示薬であるSCAT3.1¹⁵⁾を培養細胞に発現させ、YFPを特異的に褪色させる515 nmの強光を1分間照射する前後のCFP画像を430 nm励起で取得した。

(a) アクセプターブリーチ前のCFP蛍光像。
(b) アクセプターブリーチ後のCFP蛍光像。
(c) アクセプターブリーチをする前(-)と後(+)
のCFPの蛍光強度を棒グラフで表示した。この2つの値を⑩の式に代入してFRET効率を求めると0.54 (54%) という値が算出される。

ンミキシングにかけてその効果を調べた結果を示した。アンミキシング後のほうが処理前に比べてFRET変化量が大きくなっていることが一目瞭然である。

IV. FRETの確認方法：アクセプターブリーチングの是々非々

FRETの有無を定量的に評価するにはいくつかの方法がある。最もオーソドックスな方法はドナーを励起したときのドナーからの蛍光とアクセプターからの蛍光を交互に、あるいは同時に取得する方法である。ドナーとアクセプターの蛍光強度がレシプロカルに変動することでFRETの有無を評価できる。

より積極的なFRET評価法としてはアクセプターブリーチング法が挙げられる¹⁴⁾。これはアクセプターを光学的に褪色(ブリーチング)させたときにドナーの蛍光回復が起こるかどうかがFRETを評価する方法であ

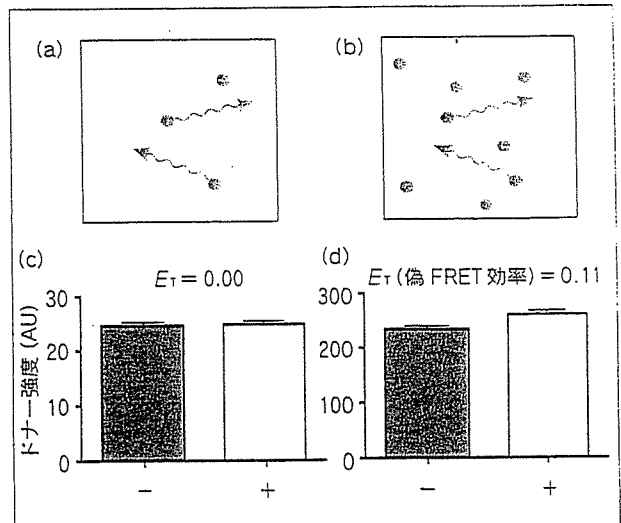


図9 偽FRETの検出

(a), (b) 細胞質内にCFP (水色の丸) とYFP (黄色の丸) を単独で発現させたとき、CFP, YFPともに適度な量(最大吸収波長の光学濃度(OD)が0.05以下)であれば、CFPから放射された蛍光はそのまま検出器に入る(a)のに対し、CFP, YFPの発現量が多いときには、いったんCFPから放射された蛍光がYFPによって吸収され、YFPからの蛍光(黄色波線)が検出器に入る(b)。(a)の場合YFPをブリーチする前(-)と後(+)
で、CFPの蛍光強度は上昇しないが(c)、(b)の場合は上昇する(d)。

る。エネルギーを渡す相手(アクセプター)がいなくなるので、消光していたドナーがふたたび発光できるようになるという原理を利用している。この方法ではドナーの蛍光回復量からFRET効率という物理量を算出することも可能である。算出方法はきわめて簡単で、アクセプターが存在するときのドナーの蛍光強度を F_{DA} 、アクセプターがない(ブリーチした)ときのドナーの蛍光強度を F_D とすると、FRET効率 E_T は

$$E_T = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \dots\dots ⑩$$

で導出される(図8)。

原理的にも手技的にもシンプルなこの方法はFRETを評価するうえで、非常に信頼性の高い方法であるが、完全無欠ではない。なぜなら本方法ではFRETと再吸収機構(trivial mechanism)が区別できないからである。蛍光分子の濃度が高いと、ドナーから放射された蛍光が試料中のアクセプターになりうる蛍光分子に再吸収され、もう一度蛍光として放射される確率が高くなる。その結果、ドナーの蛍光強度は減少し、アクセプターの蛍光強度は増加する(図9)。一見、FRETが起こっているときと同じことが観察されるのであるが、この現象はド

ナーとアクセプターの距離に依存しないため、何ら物理的な情報を引き出すことができない。したがって偽FRETともいわれる。不運なことに、再吸収機構が起こっているときにアクセプターを褪色させると、ドナーからの発光が増加するので、FRETとの区別がまったくできない。蛍光蛋白質を細胞膜や核膜などの微小空間に発現させると、蛋白質の濃度が高くなり、かつ蛋白質の配向が揃いやすくなるため、再吸収機構が起こりやすくなるので注意を要する。細胞質のような場所であっても蛍光蛋白質の発現量が多すぎると、やはりFRET偽陽性の測定結果が出てしまう。極端に明るく光る細胞はFRETの観察対象からは外すべきであろう。

では、FRETと偽FRETはどうやって見分ければよいのだろうか？ 両者の唯一の違いはアクセプターへのエネルギー移動がそれぞれ無輻射的か輻射的かという点である。FRETではドナーは4つの競合過程（発光，熱，項間交差，FRET）によりエネルギーを散逸するのに対し、再吸収機構による偽FRETが起こっているときはFRETが起こっていないときと同じ3つの競合過程（発光，熱，項間交差）でエネルギーを失う。ということは、それぞれの蛍光寿命は⑦と③で表され、偽FRETはFRETが起こっていないときと同じ蛍光寿命となることがわかる。したがって、FRETと偽FRETはドナーの蛍光寿命を顕微鏡下で観察することで、見分けることが可能となる。しかし残念ながら、現状では蛍光寿命イメージングはまだ難しいことに加え、最もポピュラーな蛍光蛋白質のFRETペアであるCFPとYFPを用いる場合には、CFPの蛍光寿命が複数成分含まれるために計測が困難であるという事情もあり、誰もが使える技術にまで成熟していない。

もう一つ、FRETと偽FRETを判別する方法として、ドナーを光学的に褪色させ、褪色の速度を調べる方法（ドナーブリーチング法）がある¹⁶⁾。FRETが起こっていると褪色速度が遅くなるので判別ができる。これは項間交差の量子収率がFRETが起こると減少することで説明される。ちょうど、蛍光量子収率がFRETにより減少するのと同じ理屈である。いま、FRETが起こっているときと起こっていないときの項間交差量子収率をそれぞれ Φ_{LDA} 、 Φ_{LD} とすると、

$$\Phi_{LDA} = \frac{k_f}{k_f + k_{nr} + k_t + k_{fret}} \dots\dots(18)$$

$$\Phi_{LD} = \frac{k_f}{k_f + k_{nr} + k_t} \dots\dots(19)$$

と表され、確かに $\Phi_{LDA} < \Phi_{LD}$ となる。ところで、なぜ、項間交差量子収率が減少すると褪色速度が遅くなるのか？ それは活性酸素などのラジカル産生が関係しているのである。項間交差により三重項励起状態になった蛍光分子は基底状態の酸素（三重項酸素）を励起してきわめて反応性の高い一重項酸素（活性酸素の一種）を産生したり、他の分子種と反応してさまざまなラジカルを発生させたりするわけであるが、これらのラジカル種が、蛍光分子自身を酸化し、不可逆的に蛍光性（吸光性）をもたない化学構造へ変化させてしまうのである。本方法はアクセプターブリーチング法と同様、通常の蛍光顕微鏡があれば実行可能であり、かつFRETと偽FRETを見分けることができるという点で最も信頼のおける方法であると思われる。ただし、ドナーを褪色させる光によって直接アクセプターも褪色してしまうと、まったくデータの評価ができなくなるので、褪色に強いアクセプターを用いる必要がある。

【おわりに】

非常にダイナミックな細胞核の世界を理解するためには核内で繰り広げられる蛋白質間相互作用や各種酵素の活性化、不活性化などをリアルタイムに観察する技術が欠かせない。そのためには顕微鏡技術と並んでプローブ技術の習得も必要になる。蛍光蛋白質を自分が見たい蛋白質につなげるだけならいざ知らず（これも難しい場合がある）、アイデアをめぐらせて機能指示薬をつくるとなるとまったくお手上げという人が多いかもしれない。でも、怯むことなかれ。前進あるのみである。なせばなる。なさねばならぬ。もし機能指示薬の作製を考えている方がおられたら、まずは今回紹介した方法をチャレンジしてもらいたい。少しはましな機能指示薬ができるはずである。しかし、今回紹介した作製技術だけでは不十分極まりない。ますます多くの人たちが生細胞内における興味ある現象をリアルタイムに可視化することによって新たな発見をなすことができるよう、筆者らは今後も新たな技術を開発していくつもりである。もちろんわれわれだけでなくGFPを使っている、もしくはこれから使おうと考えておられる読者諸氏の斬新なアイデアとその実践が一番大事である。

文 献

- 1) Lakowicz, J. R. : Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed., Plenum Publishers, New York (1999)
- 2) 木下一彦・御橋広真 編 : 蛍光測定—生物化学への応用, 日本分光学会測定シリーズ3, 学会出版センター (1983)
- 3) 井上晴夫・高木克彦・佐々木政子・朴 鐘震 : 光化学 I, 基礎科学コース, 丸善 (1999)
- 4) Miyawaki, A. : *Dev. Cell*, 4, 295-305 (2003)
- 5) Pflieger, K. D., Eidne, K. A. : *Nat. Methods*, 3, 165-174 (2006)
- 6) Swaminathan, R., Hoang, C. P., Verkman, A. S. : *Biophys. J.*, 72, 1900-1907 (1997)
- 7) Miyawaki, A. *et al* : *Nature*, 388, 882-887 (1997)
- 8) Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554-10559 (2004)
- 9) Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11241-11246 (1999)
- 10) Mank, M. *et al* : *Biophys. J.*, 90, 1790-1796 (2006)
- 11) Zimmermann, T., Rietdorf, J., Peppperkok, R. : *FEBS Lett.*, 546, 87-92 (2003)
- 12) Nagai, T. *et al* : *Nat. Biotechnol.*, 20, 87-90 (2002)
- 13) Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H. *et al.* : *Biophys. J.*, 74, 2702-2713 (1998)
- 14) Miyawaki, A., Tsien, R. Y. : *Methods Enzymol.*, 327, 472-500 (2000)
- 15) Nagai, T., Miyawaki, A. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319, 72-77 (2004)
- 16) Jovin, T. M., Arndt-Jovin, D. J. : *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 18, 271-308 (1989)

原子間力顕微鏡 (AFM) による 蛋白質のイメージング

山越葉子¹ 中澤憲一² 土屋利江³

Protein imaging by atomic force microscopy

¹Yoko Yamakoshi, ²Ken Nakazawa, ³Toshie Tsuchiya

¹Associate Researcher, Department of Chemistry and Biochemistry,
University of California at Santa Barbara

²Division of Pharmacology, ³Division of Medical Devices,
National Institute of Health Sciences

Abstract

Atomic force microscopy (AFM) has been used for imaging of non-conductive surface using a cantilever with a sharp probe to mediate the atomic force interaction between the probe and substrate. The application of AFM for the imaging of protein including transmembrane protein has been studied and revealed their single molecular structure on a nanometer scale. Especially for the transmembrane proteins that lack of 3D structural information obtained by X-ray crystallography, AFM imaging has significant advantages. Since the imaging is capable in the aqueous solution, the obtained images are expected to provide information that reflects structures found in the living cells. Additionally, the force curve measurement for intra- or inter-molecular non-covalent interaction such as protein folding or ligand-receptor interaction will be explained.

Key words: atomic force microscopy, protein imaging, recombinant P2X₂ receptor

1. 蛋白質の構造解析

生体の主要構成成分の一つである蛋白質は、生体内での有機化合物の代謝(酵素など)、情報伝達(受容体など)、組織骨格形成などにかかわる機能性分子であり、その機能に関連する構造の解析は現在の化学の分野で最もホットな分野の一つである。一般にアミノ酸配列を決定する一次構造解析は、繁用法があり、その結果から、 α -ヘリックスや β -シートなどの二次構造が推定される。しかし生体内での蛋白質の機能に大

きくかかわっている三次元構造の決定は困難な点が多い。

現在行われている蛋白質三次構造決定法としては、X線結晶構造解析法と核磁気共鳴(nuclear magnetic resonance: NMR)分光法などがあげられる。X線解析法は解析対象とする蛋白質の単結晶を調製し、X線の照射回折を行い、三次元的画像を得るもので、解像度が非常に高い(Åレベル)という利点がある。特に近年の放射光を用いた測定法の開発により、解析される蛋白質の数は飛躍的に伸びた。しかし、本法は単

¹カリフォルニア大学サンタバーバラ校 ²国立医薬品食品衛生研究所薬理部 ³同療品部

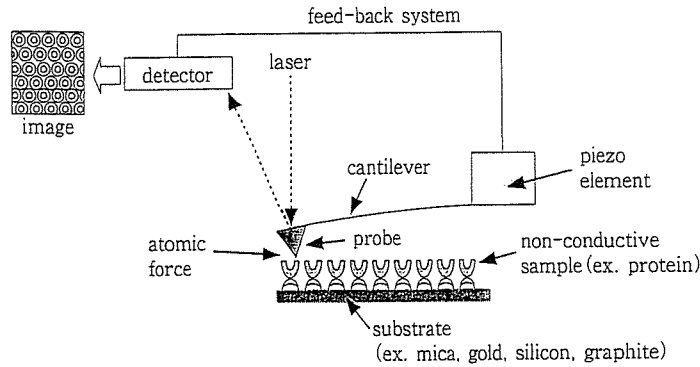


図1 原子間力顕微鏡(AFM)の模式図

結晶の調製が困難である難溶性の蛋白質の解析にはあまり向いておらず、また、得られる構造が結晶格子内における分子構造であるため、動的な構造ではなく、活性型の蛋白質の構造との相関には不明な点が残る。後者のNMR法は溶液中での測定法であり、生体内の蛋白質の挙動に近い情報を求めることが期待され、また、核オーバーハウザー効果(nuclear overhauser effect: NOE)などの手法を用いると、核の間の空間的距離の情報が得られ立体的構造に関する解析も可能である。ただし、蛋白質をNMRで測定して得られるスペクトルは、非常に複雑で解析が難しく、 ^{15}N -enrichした試料の調製が必要になる場合もある。また、試料としては高濃度溶液が必要であるため、難溶性あるいは微量しか発現していない蛋白質の解析にはあまり向いていない。

2. なぜ原子間力顕微鏡(AFM)で蛋白質の画像化を行うのか？

原子間力顕微鏡(AFM)を用いた蛋白質の解析の目的は蛋白質の大まかな構造と機能を知ることである。現在のところ、AFMの解像度はX線解析に遠く及ばない(大まかに言って1/10程度である)が、AFMを用いることの利点を以下にあげる。

- (1) 試料の量が微量で済む。
- (2) 高濃度溶液や単結晶の調製が不要である。
- (3) 溶液中測定も可能であり、より生体内環境に近い条件下での測定が可能である。

(4) 経時的測定モードによりダイナミックな構造情報が得られる。

(5) 単一分子測定が可能である。

3. AFMからどんな情報が得られるのか？

a. 装置の概略とイメージング

AFMが最初に発表されたのは、1986年にPhysical Review Letters誌に掲載されたIBM-チューリヒの研究者達の報告¹⁾においてである。同研究グループはその数年前に、走査型トンネル顕微鏡(scanning tunneling microscope: STM)を発表し、原子像の画像化に成功しているが(1986年ノーベル物理学賞受賞)、トンネル電流を利用したSTM²⁾が電導性のサンプルの測定のみに適応されるのに対し、AFMは非電導性のサンプルの測定も可能であり、DNAや蛋白質などの生体高分子の新しい解析手法として、威力を発揮することが期待されている。

機器の基本的な構造は、主に以下の4つの部分からなる(図1)。

- (1) 試料の表面を走査する微細な探針(probe)
 - (2) 探針と試料表面との間に働く原子間力を増幅する微小な板ばね(cantilever)
 - (3) 探針および板ばねの高さや位置を調節する圧電(ピエゾ)素子
 - (4) 板ばねの変位を測定するレーザー光と、その反射を検出するフォトダイオード検出器
- 試料と原子間力を介して直接相互作用するのは板ばねに結合した探針の先端で、その位置制御は微細な圧電素子の動きによって行われ