

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注意点や留意点を示す。

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ば、蛍光エネルギー移動法 (FRET : 7章4参照) を利用した方法が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性の点で優れている。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。

■ 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

* 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。

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)

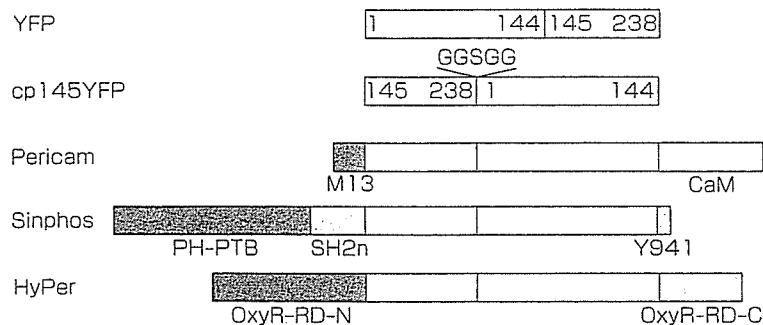


図1 蛍光タンパク質の円順列変異体とそれを利用した機能指示薬
黄色蛍光タンパク質 (YFP) とその円順列変異体 (cp145YFP), ならびにいくつかの機能指示薬のドメイン構造を示す. Pericam : Ca^{2+} 指示薬, Sinphos : リン酸化指示薬, HyPer : 過酸化水素指示薬

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もと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で説明される。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

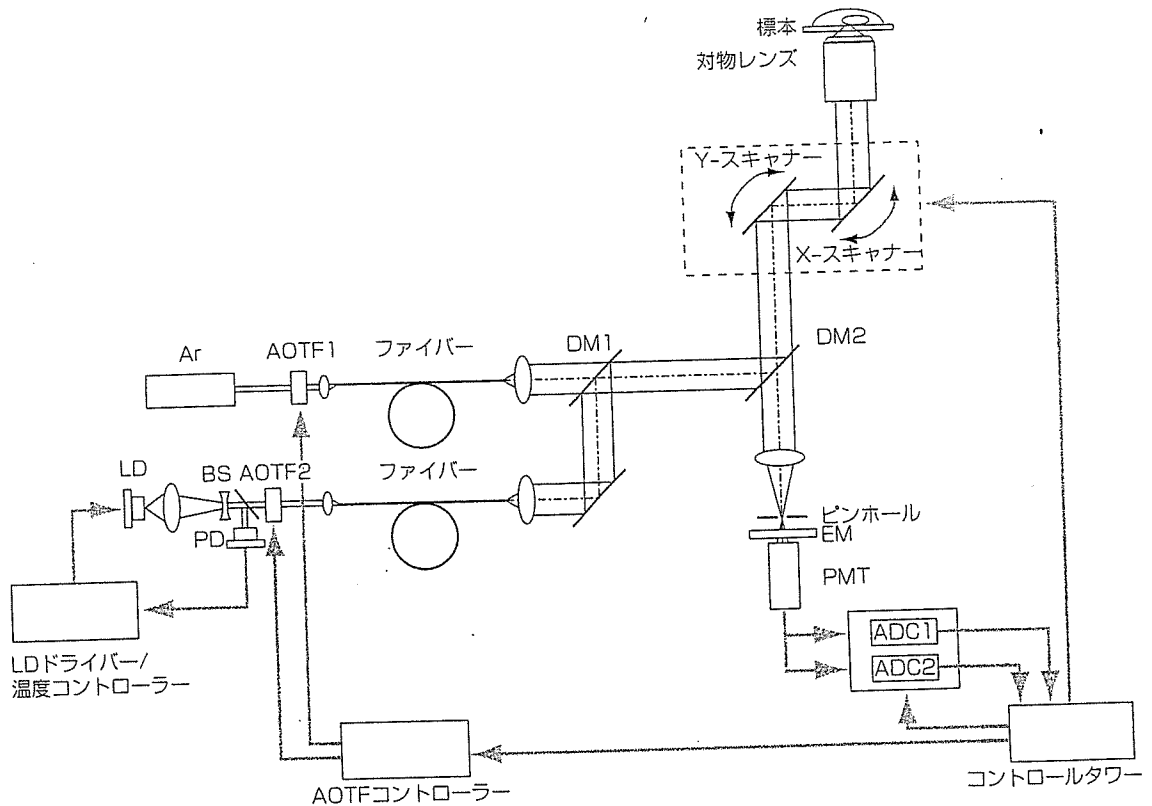


図2 高速2波長励起1波長取得用レーザー共焦点顕微鏡の模式図
 AOTF：音響光学変調フィルター，Ar：アルゴンレーザー（488 nm），LD：レーザーダイオード（405 nm），
 PD：フォトダイオード，BS：ビームスプリッター，DM：ダイクロイックミラー，EM：吸収フィルター，
 PMT：光電子増倍管，ADC：アナログ-デジタル変換機（文献6参照）

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1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。

プロトコール

細胞の準備と遺伝子導入

- 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

- ② 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
- ③ 1×10⁵個程度の細胞をディッシュに播き、37℃で培養*1
- * 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。
- ④ 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
- ⑤ 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

- ⑥ FV1000を立ち上げる
- ⑦ 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

* 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なる。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。

- ⑧ 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

* 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。

- ⑨ 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

* 4 この設定により、2波長の励起光がラインごとに変換されるようになる。

- ⑩ 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かを設定する（図3）
- ⑪ 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
- ⑫ 培養液を吸い取る
- ⑬ 観察用培地を2 ml加える*5

* 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。

- ⑭ 顕微鏡ステージの上に設置する
- ⑮ 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
- ⑯ アーク励起光を遮断する

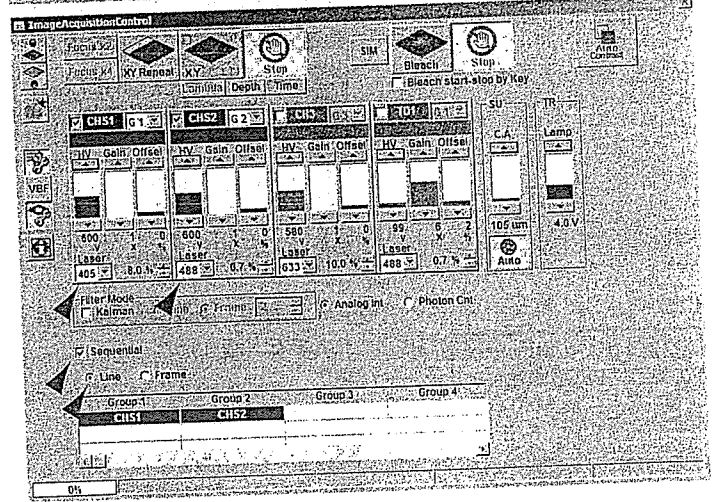
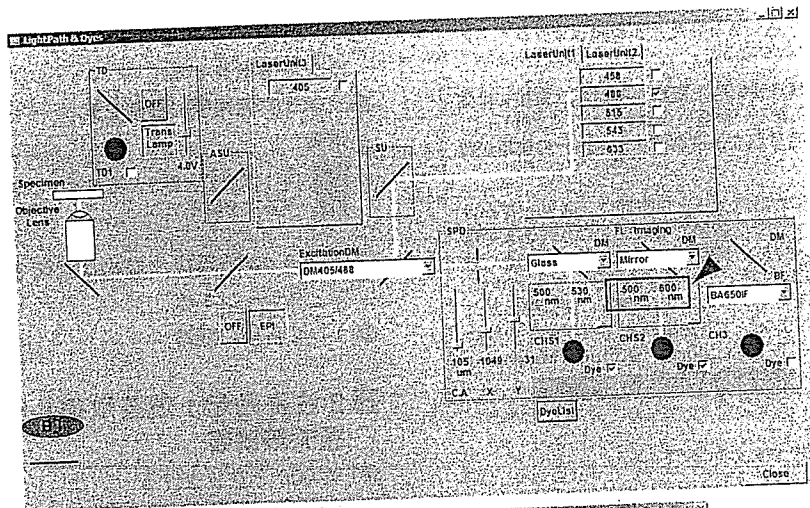


図3 倒立型共焦点顕微鏡FV1000による2波長励起1波長取得用の光路図(上)とコントロールボックス(下) サンプルからの蛍光(極大蛍光518 nm)を可能な限り明るく取得するために、波長幅を500~600 nmと広く取ってある(上図の赤色矢頭)。405 nmと488 nmのレーザーを用いて2波長励起1波長取得するためには、下図の矢頭の部分を図のようにセットする

- ⑫ 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
- ⑬ 実際にタイムラプス観察を行う条件で1枚画像を撮り、画像の良し悪しを確認する
- ⑭ 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。
- ⑮ 適当な刺激薬剤を加える*7

*7 薬剤添加にはいろいろ方法がある。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。

- ⑯ 画像取得続行
- ⑰ 画像取得終了
- ⑱ データ保存
- ⑲ 画像解析 (9章参照)
- ⑳ 保存した画像データを「Raw 16bit tiff」に変換する*8

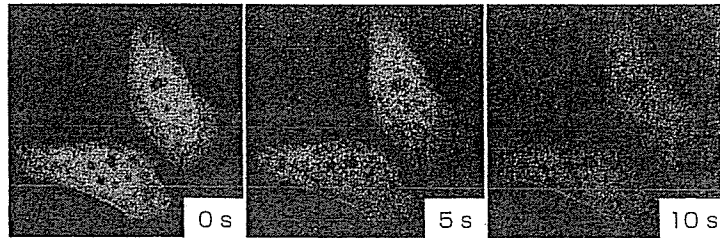


図4 rPericamを発現したHeLa細胞のヒスタミン刺激によるカルシウム濃度変化を共焦点観察した例
 画像は1秒ごとに取得したうちの、任意の3枚を選んだ。CHS2 (488 nm) の画像をCHS1 (405 nm) の画像で除したものをIMD表示している。赤いほどカルシウム濃度が高いことを示す



* 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でないと、その後の画像操作が行えないことがある。

④ 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

⑤ 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



* 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。

⑥ MetaMorphの「ratio images」機能でレシオ画像を作製する*¹⁰



* 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。

⑦ 画像保存*¹¹



* 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ニタージュ画像やさまざまな長さ、速さの動画を作製する。

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2 μs/pixel、励起レーザーには405 nmの半導体レーザーとアルゴンレーザーの488 nm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ratiometric-pHluorin⁷¹や酸化還元指示薬のroGFP⁸¹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) Shimoazono, S. et al. : Science STKE, 26 : 125, PL4, 2002
- 7) Miesenbock, G. : Nature, 394 : 192-195, 1998
- 8) Dooley, C. T. et al. : J. Biol. Chem., 279 : 22284-22293, 2004

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

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

バイオイメージング技術は、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

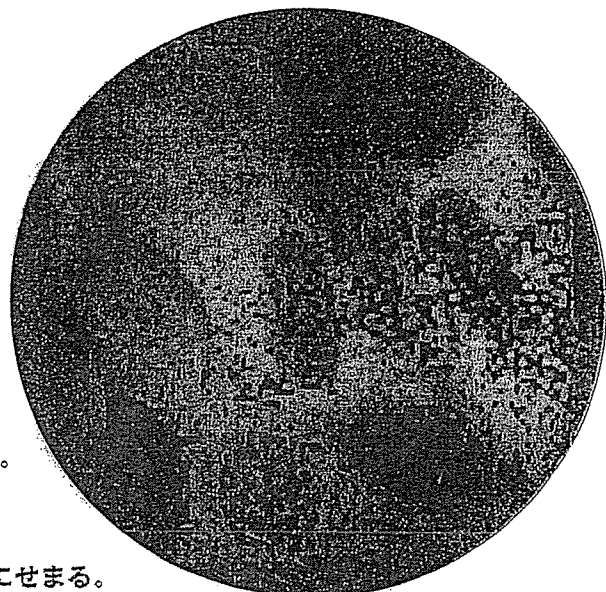


図1 化学発光タンパク質と蛍光タンパク質の発光メカニズム

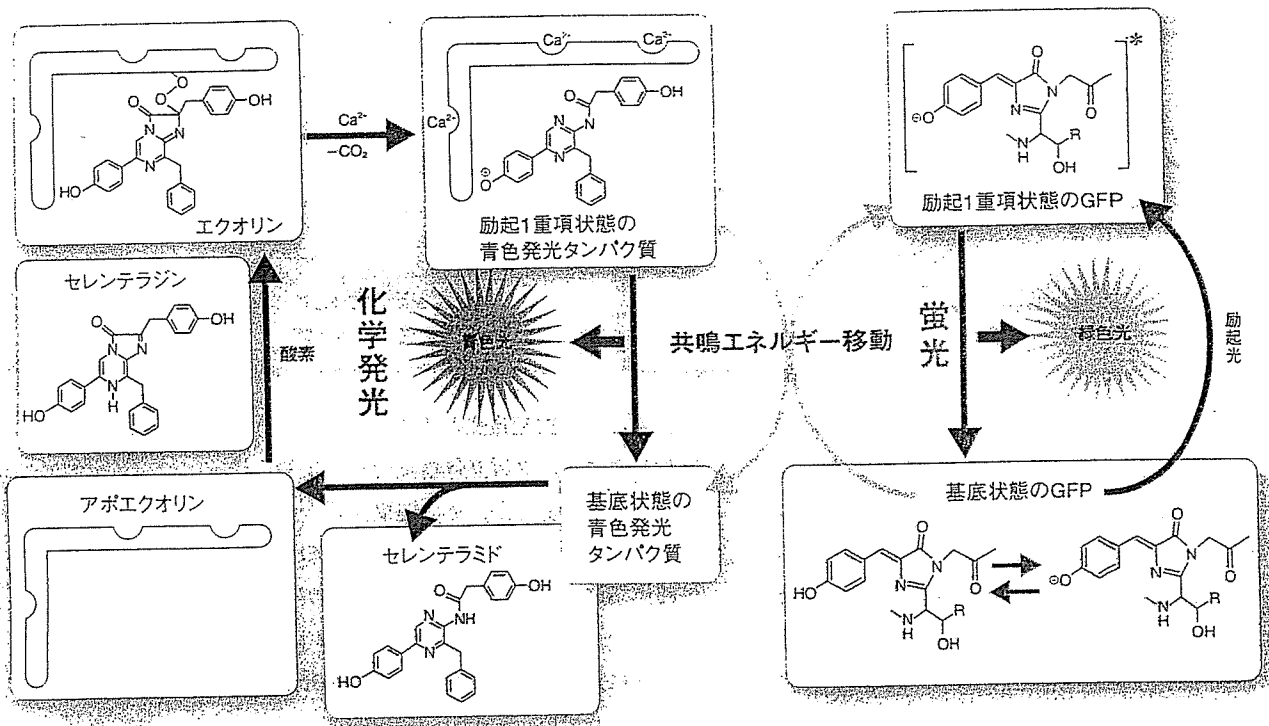
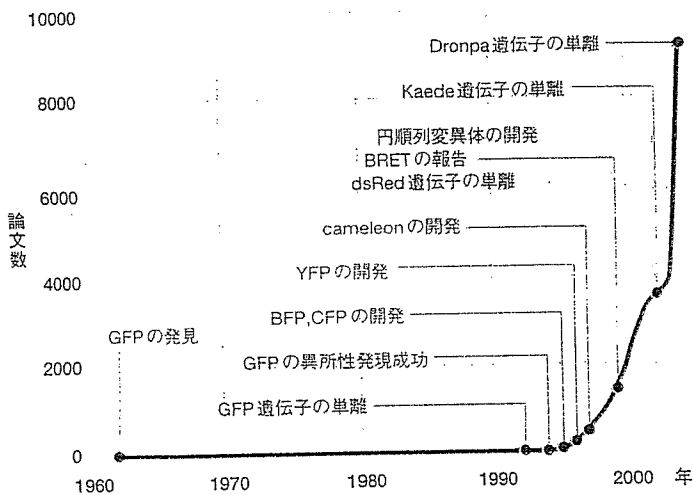


図2 GFP関連論文の数を年別にプロットしたグラフ



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。

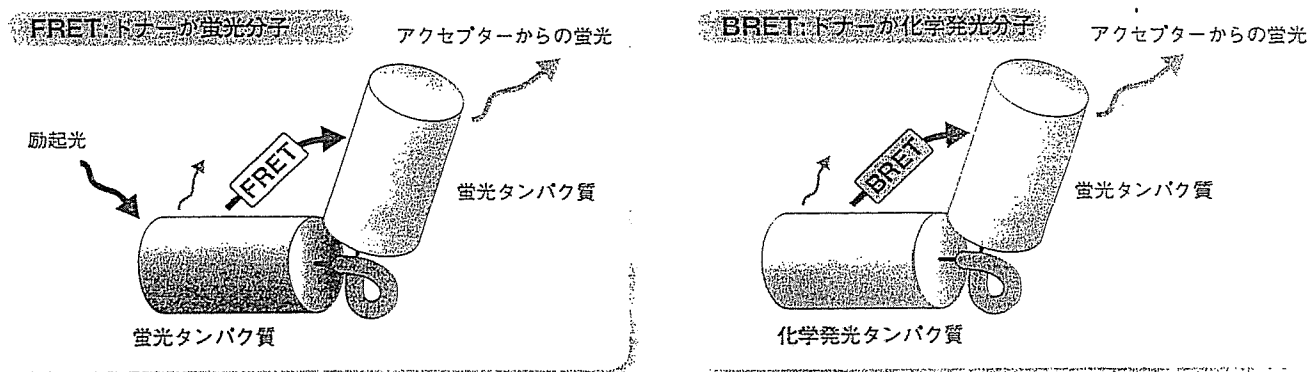
さて、これら蛍光タンパク質の利用法であるが、もっともオーソドックスなものとしては、興味あるタンパク質に蛍光タグとして連結して、生きた細胞内での局在を観察したり、任意の遺伝子プロモーターの下流に蛍光タンパク質遺伝子をつなげて細胞に導入して、蛍光タンパク質の蛍

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



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シタケも、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開発できる。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

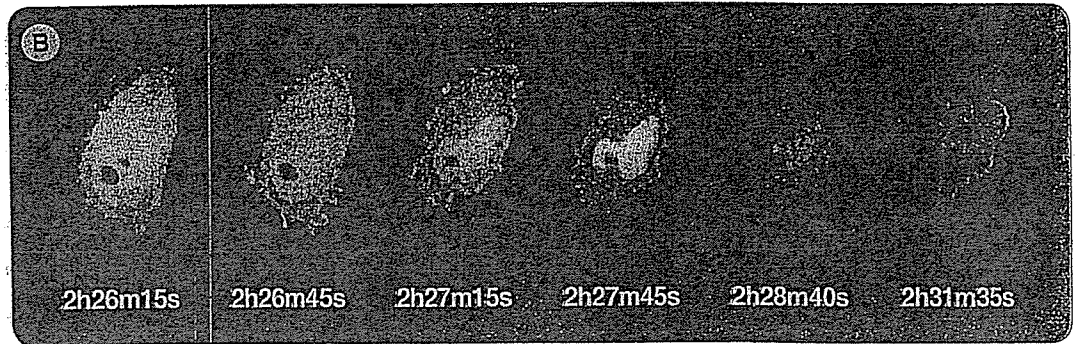
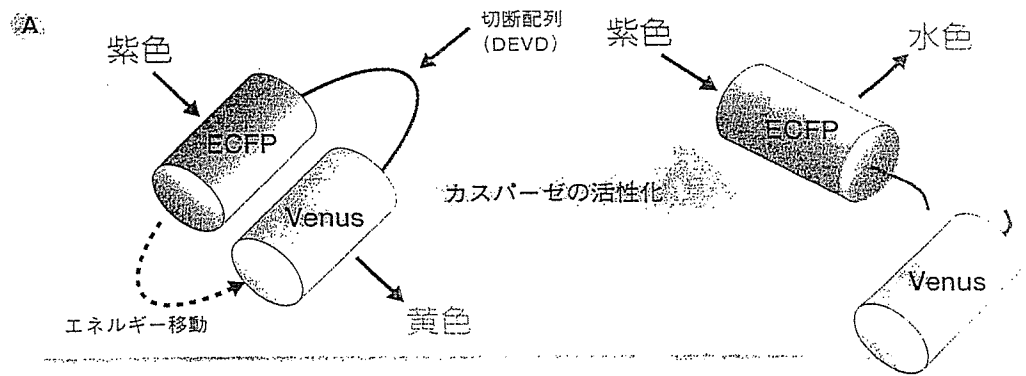
FRETはドナーに蛍光タンパク質を用いるため励起光が必要になる。一方、BRETはドナーに化学発光タンパク質を用いるため励起光は必要としないが、化学発光基質をロードする必要がある。

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度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

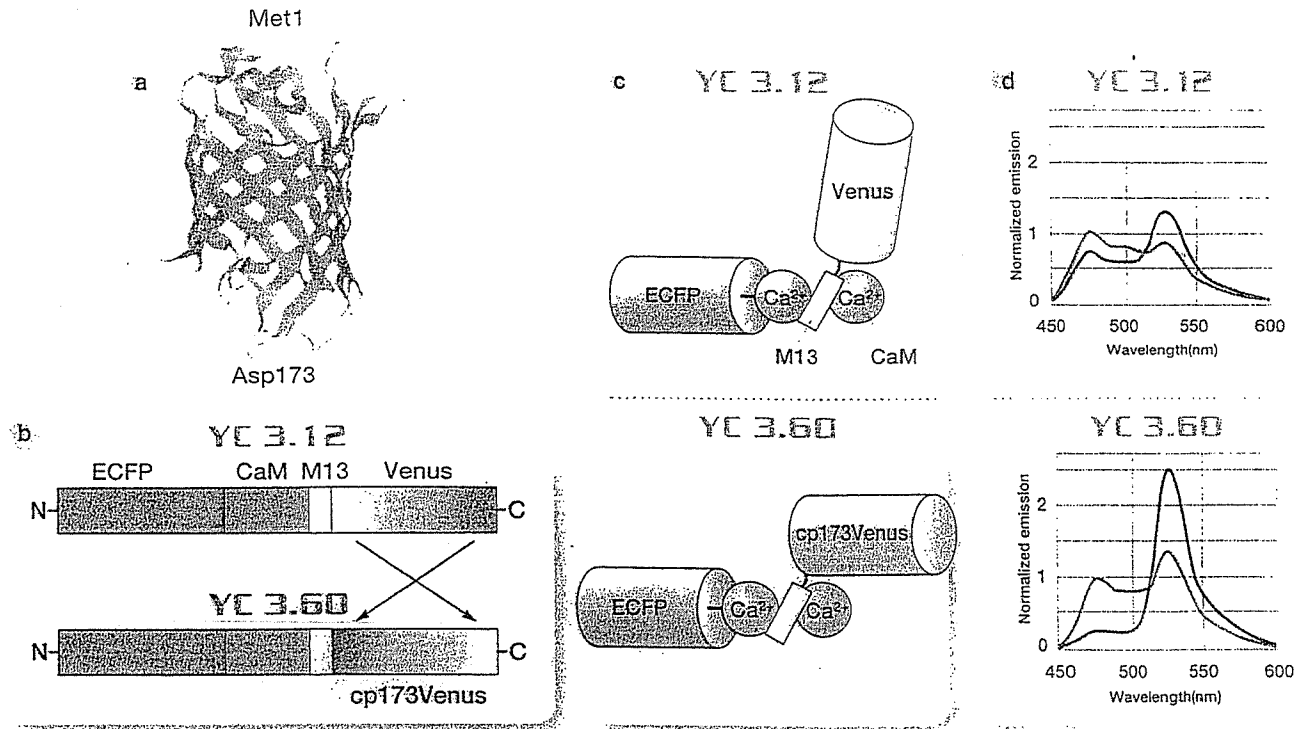


図5
円順列変異の
FRET法への応用

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り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も、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、

(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末端とする円順列変異体)をもつ。

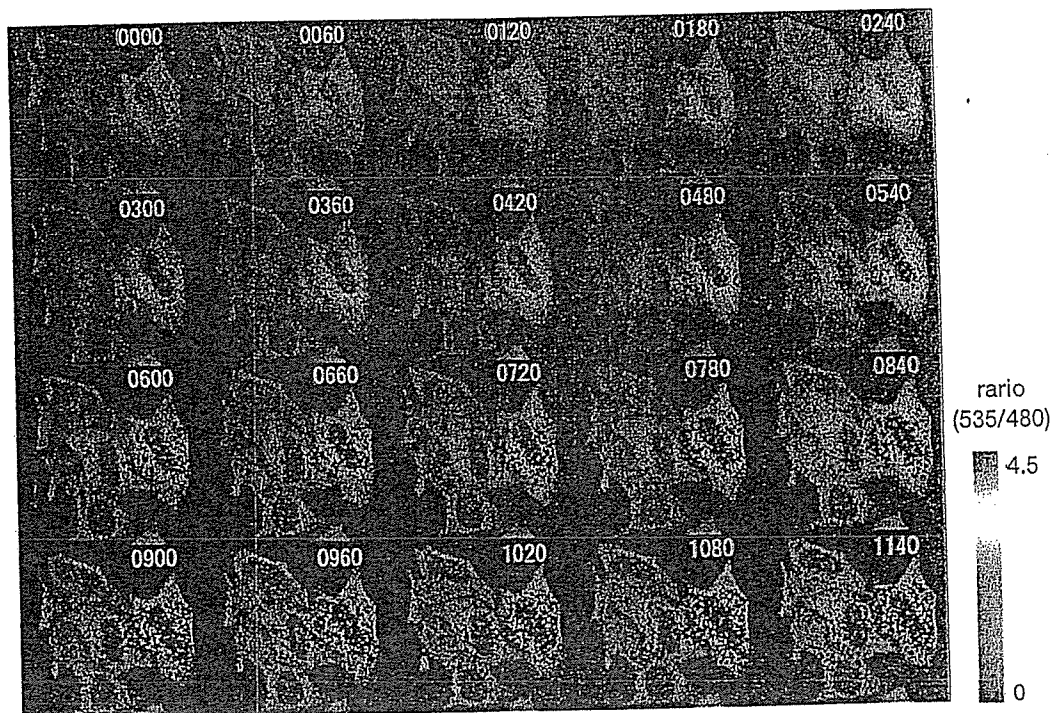
(c) YC3.12とYC3.60でカルシウム結合配位構造概念図。これらはいまでも想像である。アクセプター分子の結合角度が円順列変異体の使用によって変わることによる。

(d) YC3.12とYC3.60のスペクトル図。黄色のシグナルはカルシウム結合時を示す。赤のシグナルはカルシウム非結合時を示す。励起波長は435 nm。

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。

ながいたけはる
“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 Function 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、今や生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。

□ 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, 脾臓や脳で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り, 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ERAI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^{注3}FRET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うものである。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)^{注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す。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。

- 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

最新刊

マウス表現型解析 プロトコール

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 ④

永井健治
Takaharu 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

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。言わば電顕の超ど素人である。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数十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？と思うにそれは“何が(what)”にではなく、“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、その情報をいくらつなぎ合わせても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、日周性、月周性、年周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、反応拡散的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でき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

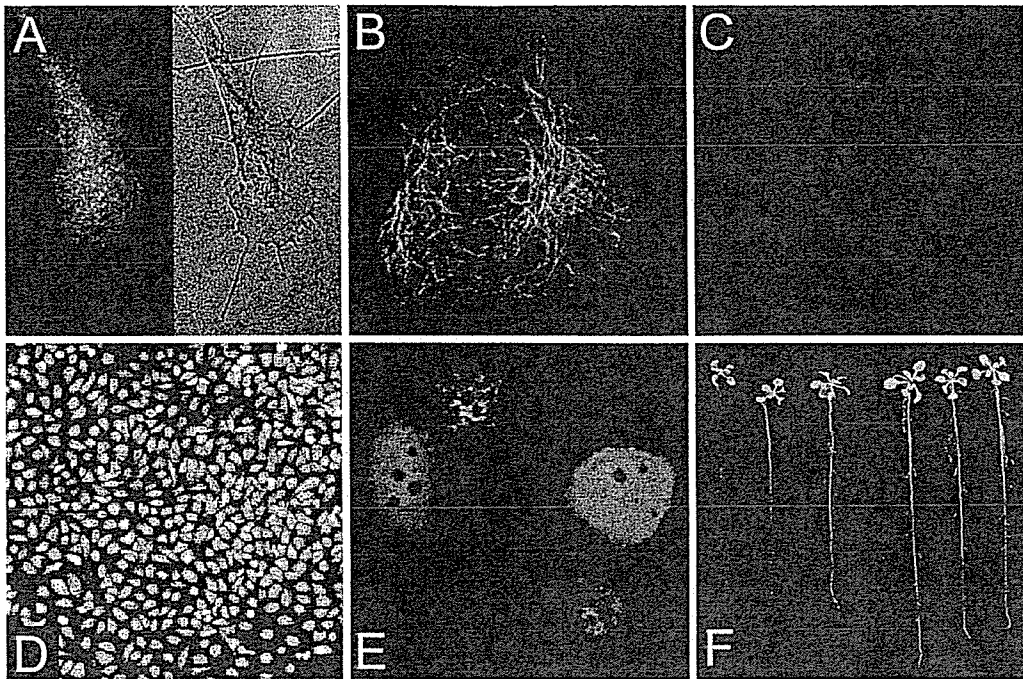


図1. 光学顕微鏡によるバイオイメーjing

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: 齊藤健太). 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, 可視光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がけ研究者. 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

BIO

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1号(通巻33号)2006年
2002年1月30日第三種郵便物
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**
くださし

◆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

