

図1 膜骨格のディープエッチング像。ラット由来の線維芽細胞のアピカル細胞膜の細胞質側表面を観察した。無数のフィラメント構造が重なってメッシュワークを形成している。クラスリン被覆ピット(多格子模様)やカベオラ(渦巻き模様)の膜陥入構造が観察されることから、膜直下であることがわかる。1本1本の線維は約5nmごとのストライプ模様を表す(拡大図)ことから、膜骨格はおもにアクチンフィラメントからなることがわかる。細胞質側表面に広がって形成される膜骨格から細胞質側への繋がり(矢印)も観察されることから、膜骨格が細胞質内部の細胞骨格とも繋がって、3次元的なネットワークを構築していることが分かる。スケールバーは、100nm。

方法、観察された線維を同定する方法などの開発が必要であった。最近になって、筆者らは、急速凍結ディープエッチ免疫レプリカ電顕法と電子線トモグラフィ法の併用により、アクチンフィラメントを主成分とする分子ネットワークが細胞膜全体にわたって、細胞質側表面から数十ナノメートルの領域を覆っていることを、高分解能の電子顕微鏡観察により見出した(図1)²⁰⁾。フリーズレプリカ試料を電子線トモグラフィに適用する、電子線〈フリーズレプリカ〉トモグラフィ法は、世界に先駆けた可視化技術であり、世界的にも非常に大きな注目を集めている。さらに、この新しい可視化法による膜骨格の3次元再構築構造により、最初に述べた細胞膜の仕切り^{20~22)}は、アクチン膜骨格によるものであることが強く示唆された。この研究について、概説する。

2. 膜骨格の3次元可視化法

2.1 細胞膜全体を剥離する方法

まず、培養皿に培養した細胞の上側(培養液側)の細胞膜の細胞質側を観察する方法を開発した(図2)。このためには、細胞の上から、低分子量のカチオン化試薬であるアルシアンブルーでコートした小さいカバーガラスを置き、細胞膜を結合させた後に、カバーガラスを剥がす、という操作をおこなう。試料調製法を細かく工夫することによって、ディープエッチング法で、アピカル側の細胞膜の約1/4程度の大きさの膜断片が、ほとんどいつも観察できるようになった。免疫金コロイド標識(免疫レプリカ)によって膜骨格がどのようなタンパク質で形成されているのかも調べることができた(図3)。

培養ディッシュへの接着面(ベサル側)の細胞膜の観察には、プローブ型の低出力超音波発生装置を利用する²³⁾。これによって、上側の細胞膜と細胞質の大部分を吹き飛ばす。最初、この方法では観察できる領域が狭く、部分的に膜骨格のメッシュワーク構造が壊れて、定量的評価が難しかった。カベオラのような小さな膜陥入構造の観察にも、注意深い試料調製が必要とされた。しかし、最近になって筆者らは直径1ミリ程度のプローブを数ミリワット以下の出力で使用することで、細胞の底面側の細胞質側表面全面で膜骨格やカベオラ・ピットを可視化できるようになった。

従来、細胞膜直下の皮質フィラメントを可視化するためには、界面活性剤(Triton-X100やPolyethylene glycol)による細胞膜の可溶化がおこなわれてきた。しかし、この方法ではカベオラやピットなどの膜裏打ち構造は観察されない。これまでに、血小板や魚のケラトサイト(ケラチン生成細胞、鱗の根元にある細胞)などで、皮質アクチンの形成が明瞭に観察されている^{16,17,24,25)}。

2.2 急速凍結法

細胞質側表面が露出した細胞膜を、次に細胞質側から急速凍結させる。細胞の上側の細胞膜を剥がして観察するにしても、下側に残った細胞膜を観察するにしても、細胞膜の外側表面は、ガラスに結合している。このガラスを上にし、細胞膜の細胞質側表面を下にして、液体ヘリウムで冷却した純銅ブロックの鏡面に圧着させる(メタルコンタクト法)ことにより、細胞膜を急速凍結させる。純銅ブロックの鏡面は、ダイヤモンドペーストで研磨して準備する。この凍結方法では、純銅の高い熱伝導率が液化ヘリウム温度付近で最大となる性質も利用している。極めて急速(10°C/秒)に温度降下がおきるため、圧着面から20ミクロン程度の領域では氷晶形成が生じることなく、良好な凍結が得られる(図2)。

2.3 ディープエッチング法とフリーズレプリカ法

凍結試料は、凍ったまま超高真空(10⁻⁶Pa程度)の装置に入れて、ダイヤモンドナイフなどで、試料表面の水などを削る。一番具合の良いところでは、細胞膜から0.2-1ミクロン程度の厚さの領域が、ガラス上に残るようにする。さらにこの試料の温度をやや上昇させて、-100~-70°Cくらいにし、表面から、氷を昇華させ、細胞膜上の構造が深いところまで氷の上に露出するようにする(1μm程度)。これをディープエッチング(deep etching)と呼んでいる。凍結切断法では細胞膜脂質二分子層の真中で細胞膜が割れた所(細胞膜中央の疎水面)を観察するのに対して、ディープエッチング法では、もっと表面の構造を、水を昇華させることによって露出させて観察する。

ディープエッチング後に、白金・炭素を1~2nmの厚さで低角度(20度程度)回転蒸着する。細胞膜上の構造があると、そこには白金粒子が降り積もり、それによってコントラストを付けることができる。チャンパー内の真空度を上

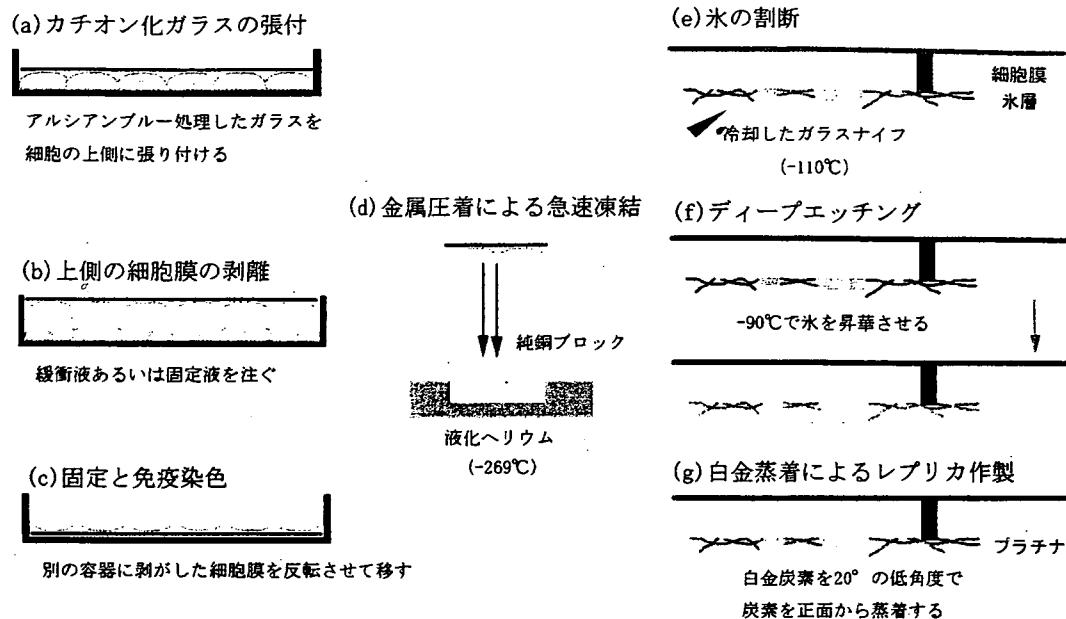


図2 細胞質側表面にある膜骨格の可視化法。(a) プラスチックシャーレに培養された細胞を緩衝液で2回洗浄する。自然乾燥しない程度まで水分を取り除いた後、アルシアンブルーでカチオン化処理したカバーガラスをアピカル側の細胞膜表面に乗せる。(b) 固定液(あるいは緩衝液だけ)をゆっくりシャーレの縁から注ぎ、ガラスが浮く力によって細胞膜を剥離させ、細胞質側表面を裸出させる。(c) さらに固定した後、緩衝液で洗浄する。この段階では、裸出した細胞質側表面に対して、免疫金コロイド染色によって分子標識することも可能である。さらに蒸留水で洗浄後、(d) 細胞質側表面の水分を、自然乾燥が生じない程度まで濾紙で吸収し、液化ヘリウムで浸した純銅ブロックの鏡面に圧着させ、急速凍結する。次に、(e) -110度まで冷却したガラスナイフで凍結面を割断する。(f) チャンバー温度を-90度まで上昇させて、切断面から1 μ m以上の部分をディープエッチングさせる。(g) 白金・炭素は低角度(20度程度)で、次の補強用の炭素は正面(90度)から回転蒸着を行い、「細胞膜の裏打ち構造」のレプリカ膜を調製する。(d) ~ (g) は本文も参照。

げ、試料ステージの温度を下げることにより、プラチナ粒子が細くなり、より微細な構造を反映したレプリカが調製できる(図2)。

2.4 電子線トモグラフィー

基盤とする電子線コンピュータトモグラフィーは90年代に自動化され、現在、研究室で実施されている。

透過型電子顕微鏡を用いた電子線トモグラフィーの原理は、病気の診断で使われるエックス線断層撮影と基本的に同じで、エックス線源を電子線に換えて、微細な構造が見えるようにしたものと考えて良い。すなわち、試料を電子線に対して傾け、一つの視野に対して傾きが異なった画像を多数撮影し、これから、計算によって試料のスライス像を計算によって求める(図4a)。この方法は90年代から自動化され、細胞内部の微細構造を定量的に観察する方法として発展してきた²⁶⁻³⁰⁾。この過程で、以下の3つの主要な要素技術の開発がおこなわれ、現在のように普及し始めるに至った。①サイドエントリー型試料傾斜ホルダーとZ軸補正が可能なトモグラフィー電子顕微鏡の開発、②高感度・高精度CCDカメラの開発、③これらを連動させて、自動的に連続傾斜像を撮影するソフトウェアの開発である。

我々は、細胞膜直下を電子線トモグラフィーにより定量的に可視化し、膜骨格が細胞膜と接している部分の構造を解明しようとした。実際の手順としては、まず、細胞質側を裸出

させた膜試料の同一視野について、 $\pm 70^\circ$ 範囲で、 1° 毎に、傾斜像をCCDカメラで位置補正しながら、合計141枚撮影する(図4a)。次に、これをもとに、計算によって、0.85 nmのスライス厚で120枚程度の連続スライス像を求め、3次元再構築をおこなう。連続傾斜像から連続スライス像への変換計算は、コロラド大学ボルダー校のMcIntosh博士らが開発した演算プログラム「IMOD」³¹⁾で、連続スライス像から3次元構造の再構築はTemplate Graphics社製の「AMIRA」を、我々は用いている。

3. 細胞膜の細胞質側表面は、全面にわたってアクチン膜骨格で覆われている

上記のように、細胞膜の非常に広い範囲にわたって、ディープエッチング電子顕微鏡観察を一気におこなうことができるようになった。それらの結果をまとめて述べる。まず、クラスリン被覆ピット(直径が約200 nmの多角格子模様³²⁾)やカベオラ(直径が約50~80 nmのストライプ模様³³⁾)がきわめて明瞭に観察され(図1)、細胞膜の細胞質側表面が同定できた。また、その表面に、フィラメントのネットワークが観察できた。アクチン線維は、モノマーであるGアクチンの配列により、約5.5 nmピッチのストライプ模様²⁸⁾が理想的な場合には観察されることが分かっていた²⁰⁾。しかし、これが見えるのは、以前は、ほとんどin

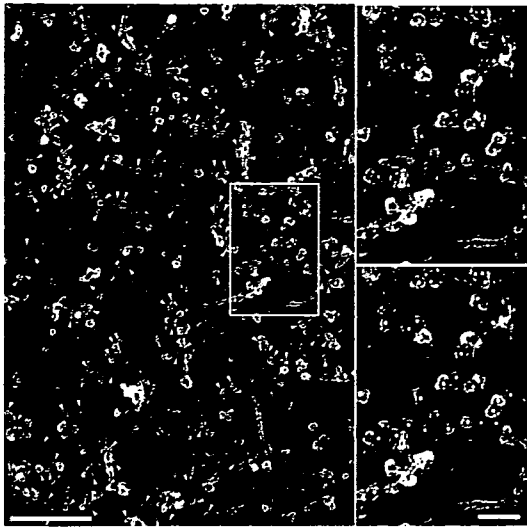


図3 膜骨格はアクチンフィラメントからなる。アクチンプロブの免疫金コロイド (5 nmφ) で標識した細胞膜のレプリカ像。膜骨格フィラメント上に並んでいる白い小さな点がプロブである (矢印)。白くはっきりした点の周囲にハロが見えるのが金コロイドプロブの特徴である (上拡大図)。金コロイドが黄色で強調されている (下拡大図)。スケールバーは 100 nm である。

vitro で調製されたアクチン線維であり、細胞中では、まれに、少数の線維が、5.5 nm ピッチのストライプを示す程度であった。我々は、試料調製条件を細かく調整し、細胞膜上のほとんど全ての線維は、5.5 nm ピッチのストライプを示すことを証明した。これによって、膜骨格のほとんどは、アクチン線維から構成されていることが明らかになった。

試料を急速凍結する前に、免疫金コロイドで標識すると、ディープエッチング像で金コロイド粒子を観察することにより、見えている構造の構成分子が同定できる。本研究では、アクチンに結合する免疫金コロイド標識 (直径 5 nm) をおこなった。膜骨格を形成するフィラメント上に、金コロイド標識が並んで観察され、上記の 5.5 nm 毎のストライプパターンに加えて、膜骨格がアクチンでできていることが再確認された (図 3)。併せて、これまでにスペクトリン、アンキリン、フィラミン、テーリン、アデューシン、Arp2/3 など、線維上に同定されている。すなわち、膜骨格はアクチン線維を主成分とし、それに多数のアクチン結合タンパク質が結合してできていることがわかった²⁰⁾。細胞質側表面に並行に広がる膜骨格から細胞質側への繋がりも観察され (図 1 矢印)、膜骨格のネットワークが細胞質内部の細胞骨格とも繋がって、3 次元的な広がりがあることが分かってきた。

4. 膜骨格により細胞膜はコンパートメント化されている

最近、「細胞膜が膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質で仕切られている」という、細胞膜の流動モザイクモデルをさらに深化させた「新しい細胞膜構造モデル」⁶⁾ が提唱されている。このモデルを検証するため、細胞膜直下の膜骨

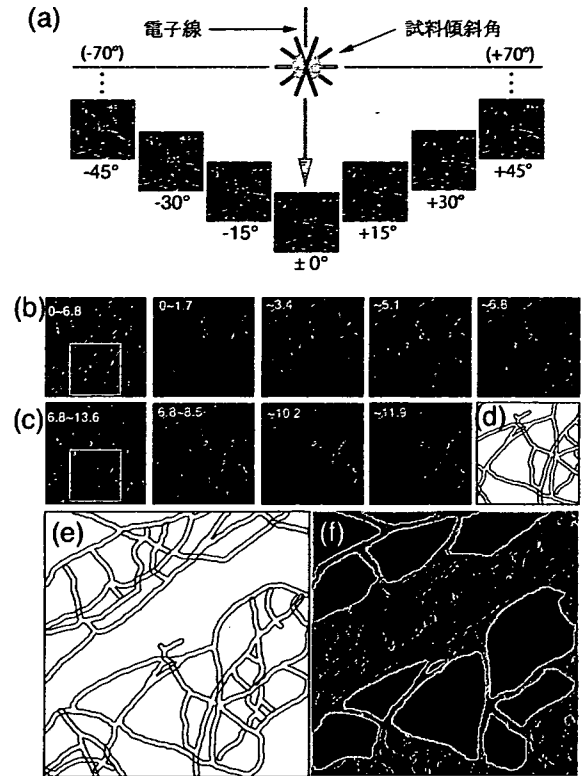


図4 電子線トモグラフィーにより細胞膜骨格を3次元的に選択した。(a) 筆者らは同一視野に対して ± 70 度の試料傾斜角度範囲を1度ステップで連続撮影した合計141枚のCCD画像をインテグレートしている。これらの連続傾斜像からzスライス像を計算により求める。最終的には、それらの連続スライス像と細胞質側表面からの部分的立体再構築像 [(b) 0~6.8 nm や (c) 6.8~13.6 nm の範囲を1.7 nm ごとに計算した像群] を相互に比較することで、細胞質側表面に再近接したフィラメント群を選択して、これらを「細胞膜直下の膜骨格」と決定した。(d, e) の緑色で縁取りされたフィラメントが細胞質側表面に、また赤色が細胞質に接近して局在していることが分かった。そのため、この緑色の成分が「細胞膜骨格」であり、この膜骨格で囲まれた領域 [(f) 黄色で縁取りされ、緑色で塗られたところ] が、細胞膜のコンパートメントである。

格のメッシュサイズの分布と、リン脂質の拡散から推定されるコンパートメントの大きさの分布を比較した。アクチン線維は、白金蒸着試料では、太さ (厚さ) が約 10 nm 程度になる。そこで、細胞膜の細胞質側表面から 10 nm 程度の厚さに局在するアクチンフィラメントを3次元再構築像において同定した (図 4, 5)。これらが、細胞膜分子の側方拡散運動に影響を与える膜骨格構造と考えられるからである。細胞質側表面から 1.7 nm ごとの部分的な3次元構築像 (図 4b, c) や 0.85 nm 毎の連続スライス像のムービーにより、フィラメントの3次元的位置を識別した。図 4d, e で、緑の線維は細胞膜から 10 nm 以内に局在する線維であり、赤の線維は、その上に載っている線維である。緑の線維で囲まれた領域が、細胞膜上での膜骨格で囲まれたメッシュであると考えられるので (図 4f)、その領域の面積を多数測定しヒストグラムにした (図 5)。このヒストグラムを、脂質の高速

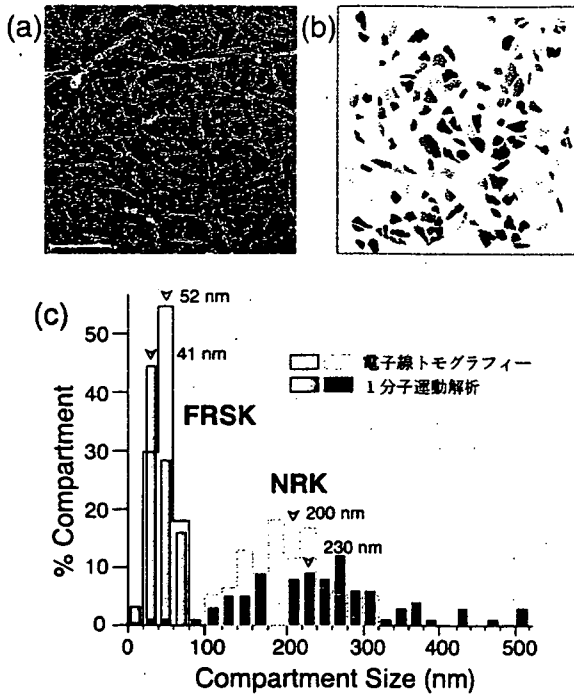


図5 電子線トモグラフィーと1分子運動解析で細胞膜のコンパートメントサイズが一致した。急速凍結・ディープエッチング法で観察した細胞質側表面 (a) には、膜骨格のメッシュワークで囲まれた膜コンパートメント (b) が存在することがわかった。色分けされた領域が1つ1つの膜コンパートメントを表している。(c) 2種類の細胞 (FRSKとNRK細胞) で電子線トモグラフィーと超高速カメラによる1分子運動解析で決定したコンパートメントサイズを比較してみると、平均値と中央値を含めてヒストグラム表示全体ではほぼ一致した。スケールバー: 100 nm。

1分子追跡によって求めた、膜分子に対する拡散障壁によるコンパートメントサイズ²⁰⁻²²⁾と比較した。そうすると、これらは、2種類の全くコンパートメントの大きさが異なる細胞 (NRKとFRSK細胞) ではほぼ一致した。これは、「膜骨格フェンスモデルおよび膜骨格にアンカーされた膜貫通型タンパク質のビケットモデル」を強く支持するものである。

おわりに

急速凍結・ディープエッチ・白金蒸着によるレプリカ法と、電子線トモグラフィー法との組み合わせにより、細胞膜の構造の定量的研究は、大きく進んだ。この方法を様々な細胞に、また、刺激前後での変化の検討に応用することにより、膜骨格の機能解析がさらに大きく進むことが期待される。

謝 辞：本研究の遂行にあたり、(株) 三菱化学生命科学研究所の瀬藤光利先生、国立精神・神経センター神経研究所の湯茂茂樹先生、米国ワシントン大学医学部のジョン・ホイザー先生にお世話になりました。謹んでお礼を申し上げます。

- 1) Singer, S.J. and Nicolson, G.L.: *Science*, 175, 720-731 (1972)
- 2) Sheetz, M.P.: *Semin. Hematol.*, 20, 175-188 (1983)
- 3) Saxton, M.J.: *Biophys. J.*, 55, 21-28 (1989)
- 4) Edidin, M., Kuo, S.C. and Sheetz, M.P.: *Science*, 254, 1379-1382 (1991)
- 5) Kusumi, A. and Sako, Y.: *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 566-574 (1996)
- 6) Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R.S., Kondo, J. and Fujiwara, T.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34, 351-378 (2005)
- 7) Luna, E.J. and Hitt, A.L.: *Science*, 258, 955-964 (1992)
- 8) Jacobson, K., Sheets, E.D. and Simson, R.: *Science*, 268, 1441-1442 (1995)
- 9) Tsukita, S., Tsukita, S. and Ishikawa, H.: *J. Cell Biol.*, 85, 567-576 (1980)
- 10) Branton, D., Cohen, C.M. and Tyler, J.: *Cell*, 24, 24-32 (1981)
- 11) Mohandas, N. and Evans, E.: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 787-818 (1994)
- 12) Byers, T.J. and Branton, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6153-6157 (1985)
- 13) Bennett, V.: *Physiol. Rev.*, 70, 1029-1065 (1990)
- 14) Takeuchi, M., Miyamoto, H., Sako, Y., Komizu, H. and Kusumi, A.: *Biophys. J.*, 74, 2171-2183 (1998)
- 15) Bornens, M., Paintrand, M. and Celati, C.: *J. Cell Biol.*, 109, 1071-1083 (1989)
- 16) Hartwig, J.H., Chambers, K.A. and Stossel, T.P.: *J. Cell Biol.*, 108, 467-479 (1989)
- 17) Hartwig, J.H. and DeSisto, M.: *J. Cell Biol.*, 112, 407-425 (1991)
- 18) Hirokawa, N. and Heuser, J.E.: *J. Cell Biol.*, 91, 399-409 (1981)
- 19) Hirokawa, N., Tilney, L.G., Fujiwara, K. and Heuser, J.E.: *J. Cell Biol.*, 94, 425-443 (1982)
- 20) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 174, 851-862 (2006)
- 21) Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 157, 1071-1081 (2002)
- 22) Murase, K., Fujiwara, T., Umemura, Y., Suzuki, K., Iino, R., Yamashita, H., Saito, M., Murakoshi, H., Ritchie, K. and Kusumi, A.: *Biophys. J.*, 86, 4075-4093 (2004)
- 23) Heuser, J.: *Traffic*, 1, 545-552 (2000)
- 24) Svitkina, T.M., Verkhovskiy, A.B., McQuade, K.M. and Borisy, G.G.: *J. Cell Biol.*, 139, 397-415 (1997)
- 25) Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S.S.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 138-145 (2001)
- 26) Fung, J.C., Liu, W., de Ruijter, W.J., Chen, H., Abbey, C.K., Sedat, J.W. and Agard, D.A.: *J. Struct. Biol.*, 116, 181-189 (1996)
- 27) Perkins, G.A., Renken, C.W., Song, J.Y., Frey, T.G., Young, S.J., Lamont, S., Martone, M.E., Lindsey, S. and Ellisman, M.H.: *J. Struct. Biol.*, 120, 219-227 (1997)
- 28) Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G. and Baumeister, W.: *Science*, 298, 1209-1213 (2002)
- 29) McIntosh, R., Nicastro, D. and Mastronarde, D.: *Trends Cell Biol.*, 15, 43-51 (2005)
- 30) Lucic, V., Forster, F. and Baumeister, W.: *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 833-865 (2005)
- 31) Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. and McIntosh, J.R.: *J. Struct. Biol.*, 116, 71-76 (1996)
- 32) Heuser, J.E. and Anderson, R.G.: *J. Cell Biol.*, 108, 389-400 (1989)
- 33) Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G.: *Cell*, 68, 673-682 (1992)
- 34) Heuser, J.E. and Kirschner, M.W.: *J. Cell Biol.*, 86, 212-234 (1980)

急速凍結ディープエッチング法による細胞膜のナノドメイン解析

諸根信弘 国立精神・神経センター 神経研究所
Nobuhiro Morone

臼倉治郎 名古屋大学 エコトピア研究所
Jiro Usukura

急速凍結ディープエッチング法は、細胞膜直下に形成される構造群（カベオラ、クラスリン被覆ピット、膜骨格）を始め、ベシクルやフィラメントなどの構造形成を対象可能とする *in vivo* ナノレベルイメージングである。最近では、膜骨格の三次元定量解析により、細胞質側表面から数ナノメートルの厚みの範囲にある膜骨格で仕切られた膜コンパートメントが解明され、電子線トモグラフィーにも適用範囲を広げている。

key words 液化ヘリウム、急速凍結ディープエッチング、カベオラ、クラスリン被覆ピット、膜骨格

はじめに：液化ヘリウムと細胞生物学

液化窒素の温度は -196°C 、それよりもはるかに低い、 -269°C が液化ヘリウムの世界になる。1979年5月に出版された John E. Heuser と Tom S. Reese 両博士らによる論文¹⁾で、極低温の細胞生物学に多くの研究者が驚嘆したに違いない。液化ヘリウムで冷却した純銅ブロックに生物組織試料を圧着することで初めて実用可能になった「急速凍結法」の登場である。彼らは、このヘリウム急速凍結法により「シナプス小胞の開口放出」を可視化し、これが量子様の神経伝達物質の放出と大きく関係していることを示すのに成功した。これらの電子顕微鏡画像群は、1970年にノーベル医学生理学賞（“their discoveries concerning the humoral transmitters in the nerve terminals and the mechanism for their storage, release and inactivation”）を受賞した Sir Bernard Katz, Ulf von Euler, Julius Axelrod 博士らが予言した、“神経終末構造がシナプス小胞のエキソサイトーシスにより神経伝達物質の放出および放出を行う”という仮説を見事に実証している。また、その後の神経科学の発展に多大な影響を与えたばかりでなく、現在でも Eric R. Kandel 博士（2000年ノーベル医学生理学賞受賞）らの書籍²⁾を始め、世界中の教科書に掲載されている。2007年3月に開催された、John E. Heuser 博士による国立精神・神経センター国際セミナーでは当時の歴史が生き生きと語られ、多くの参加者に改めて深い感銘を残した。

我が国の研究室でも、ほぼ同時期に独自にヘリウム急速凍結法が開発され³⁾、欧米の研究グループとともに、著しく発展することになる。本稿では、“急速凍結・ディープエッチング法”について、試料調製法の実際から、“免疫レプリカ”や“電子線トモグラフィー”への展開を紹介したい。

I. 急速凍結法

現代の急速凍結技法は大きく3種類（ヘリウム冷却型メ

タルコンタクト法、浸漬法、加圧法）に分類される。

1. ヘリウム冷却型メタルコンタクト法

ヘリウム冷却型メタルコンタクト法では、純銅の高い熱伝導率が液化ヘリウム温度付近でさらに最大となる性質を利用している。あらかじめ、ダイヤモンドペースト（あるいはアルミナ粉末）で研磨した純銅の鏡面を準備する。液化ヘリウムに、下側を浸漬させた純銅の上側の鏡面に対して試料を圧着することで、急速凍結を行う。きわめて急速（ $10^6^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ ）に温度降下が起きるため、圧着面から $20\mu\text{m}$ 程度の領域では氷晶形成が生じることなく、良好な凍結が得られる。ガラス面に培養された細胞（線維芽細胞、内分泌細胞、神経細胞）などの膜直下の構造群⁴⁾を観察する目的には、このヘリウム冷却メタルコンタクト法が有効である。この装置は、日立ハイテクフィールドイングなどから入手できる。

2. 浸漬法

浸漬法では、沸点と融点の温度差の大きな冷媒（液化エタン、液化プロパン）の性質を利用している。実際、試料浸漬

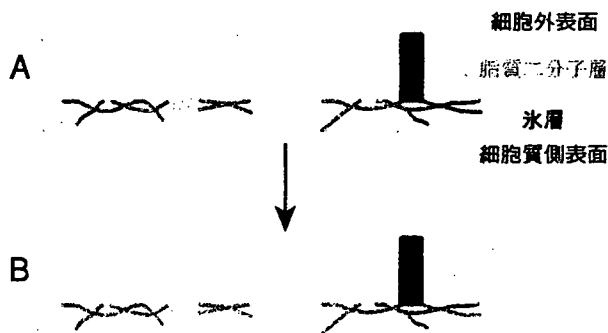


図1. ディープエッチング法の概略

急速凍結により氷包埋された細胞質側表面(A)が、高真空下でディープエッチングされると氷成分が昇華して(B)、多くのフィラメント(赤)や膜直下の構造群(橙；クラスリン被覆ピット、緑；カベオラ)、膜貫通タンパク質の集まり(青)が現れ、観察できるようになる。

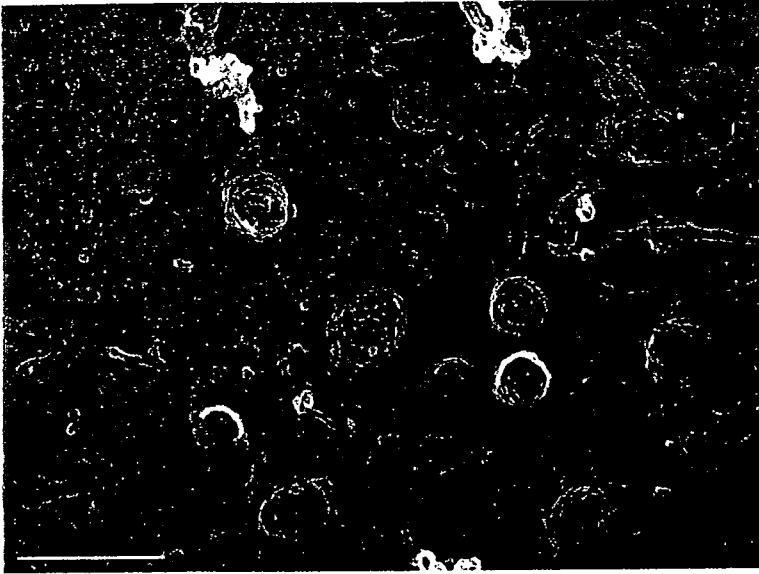


図2. 細胞質側表面に形成されるカベオラのディープエッチング像

線維芽細胞 (NRK) の細胞膜の細胞質側表面では、直径50~80nm程度で小さな膜陥入構造としてカベオラが観察される。このように、ディープエッチング像では渦巻き状の被覆構造としてカベオラを直接的に同定することができる。カベオラは主にカベオリンやコレステロールから成ることが予想されているが、詳しい三次元構造は未定のままである。スケールバーは100nm。

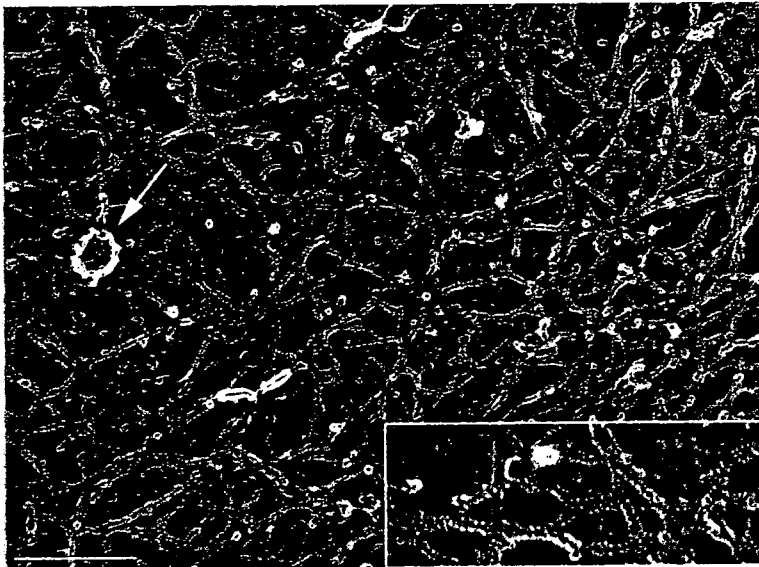


図3. 細胞質側表面に形成される膜骨格のディープエッチング像

表皮細胞 (FRSK) の細胞膜の細胞質側表面では、カベオラやクラスリン被覆ピッドのほかに、網目状の膜骨格構造が観察される。各々のフィラメントが細かいストライプ模様を呈する(拡大図)ことから、膜骨格の主成分はアクチンフィラメントであることがわかる。スケールバーは100nm。

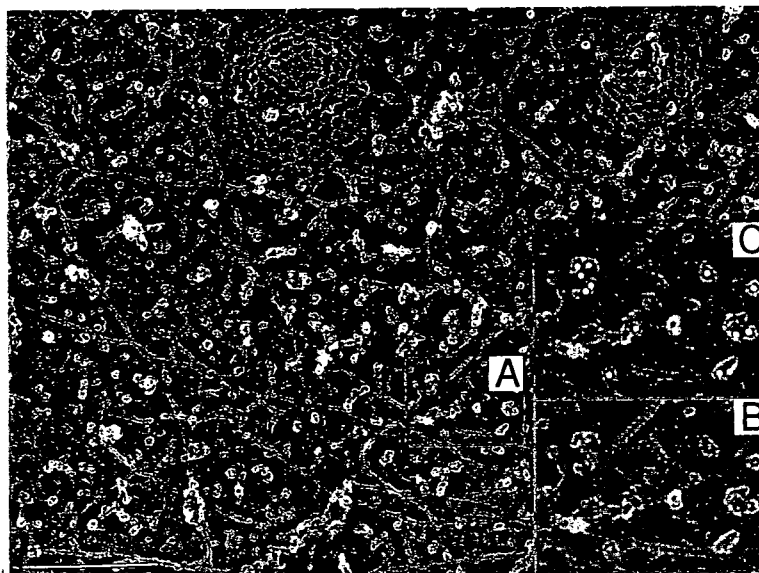


図4. ディープエッチングされた細胞質側表面での免疫レプリカ像

ホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸 (PIP₂) を直径5nmの金コロイド粒子で標識している。領域Aを拡大したものが領域B、Cで、金コロイド標識を黄色で強調している。スケールバーは100nm。

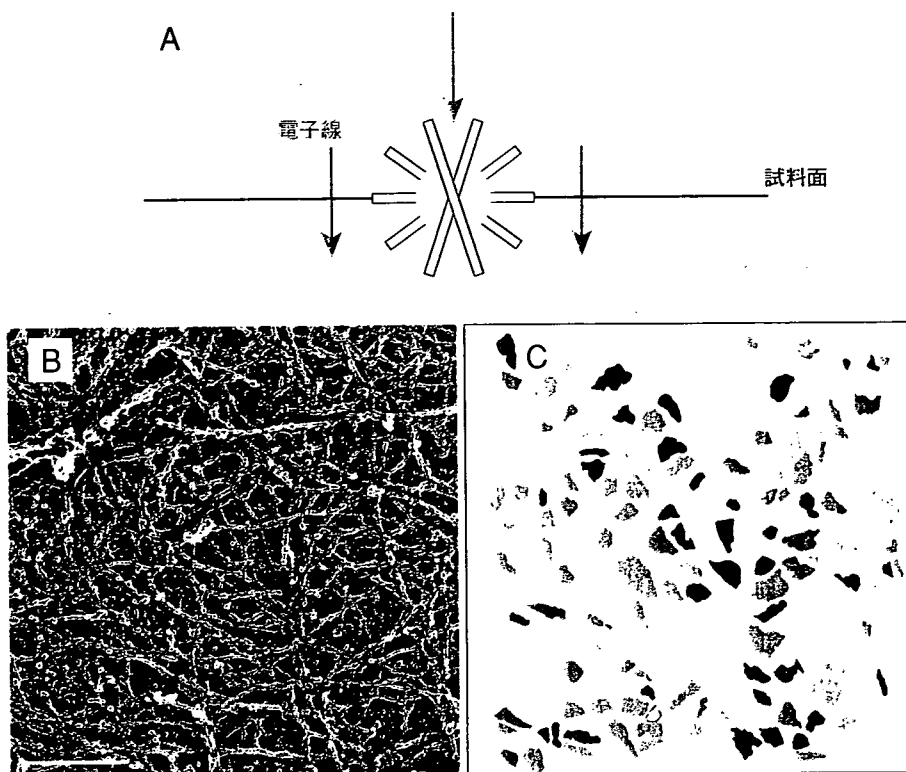


図5. ディープエッチング試料に対する電子線トモグラフィ

A: 細胞質側表面のディープエッチング像について、電子線に対して±70°の範囲を1°ステップで合計141枚をCCDカメラで撮影する。この連続傾斜像群の位置精度が非常に重要であり、そのためには高精度の試料傾斜ホルダーを搭載した電子顕微鏡と位置補正アプリケーションが必要となる。電子線トモグラフィにより、Bに示された細胞質側表面には、Aのような膜骨格で囲まれた膜コンパートメントが存在することがわかった。色分けされた領域が1つ1つの膜コンパートメントを表している。スケールバーは100nm。

B, CはMorone N, et al: J Cell Biol (2006) 174: 851-862より転載。

の際のパブリックが少なく、凍結面の細胞構造が損なわれない。細胞膜、結晶化させたタンパク質分子など熱容量の小さな試料に対して有効であるため、クライオ電子線トモグラフィや電子線結晶回折法の水包埋試料などに利用されている。現在でも、エフイー・アイ (旧フィリップス) やライカ製の装置を入手できる。

3. 加圧法

加圧法では、2,000bars以上に加圧した液化窒素の性質が利用されている。驚くべきことに、100~500μmの深度領域で、良好な凍結が得られる。熱容量の大きな組織断片、細胞壁をもつ酵母、微生物や細菌などの懸濁試料に有効とされている。最も新しい急速凍結法の1つであるが、最近ではバルテックやライカ製の加圧凍結装置が普及し始めている。本稿では、“ヘリウム冷却型メタルコンタクト法”を利用した研究について、以下に詳述する。

II. ディープエッチング法

急速凍結試料に対するディープエッチング (deep etching) とは、超高真空下 (10^{-6} Pa 程度) で凍結試料面の水を深く (0.1~1 μm 程度) 凍結させたまま昇華させることを意味する。凍結切断法では細胞膜脂質二分子層の疎水面が可視化されるのに対して、ディープエッチング法では細胞膜表面での分子構築、特に細胞質側表面でのカベオ

ラ・クラスリン被覆ピット・フィラメントの形成や、受容体タンパク質の集積などを観察することができる (図1)。ここでは、細胞膜の直下の構造を観察するために、筆者らが組み立てた試料調製法を説明したい⁴⁾。実際の作法としては、① プラスチックディッシュに培養された細胞を緩衝液で洗浄する。ディッシュより水分を除き、カチオン化処理したカバーガラスを細胞上面の細胞膜に載せる。② 化学固定剤を含む緩衝液 (あるいは緩衝液のみ) をディッシュに注意深く注ぎ、緩衝液の表面張力によりカバーガラスに吸着した細胞膜を剥離させ、細胞質側表面を露出させる。③ 化学固定し、緩衝液で洗浄した後、免疫標識が必要なときはここで行う。④ 蒸留水で1分程度洗浄する。細胞質側表面の過剰な水分を濾紙で吸収し、液化ヘリウムに浸した純銅ブロックの鏡面に圧着させ、急速凍結する。良好な凍結領域が凍結面から10~20 μmであるため、自然乾燥が生じない程度まで水分をよく除いておく必要がある。⑤ -110℃まであらかじめ冷却したガラスナイフで凍結面にある氷層を切断する。⑥ チャンバー温度を-90℃まで上昇させて後、10分程度待つことで切断面から1 μm程度の表層を真空乾燥させて、細胞質側表面を露出させる。この操作を“ディープエッチング”と呼んでいる。このとき重要なことは、温度コントロールに加えて、チャンバー内の真空排気速度や到達真空度である。⑦ プラチナ・カーボンとは試料面に対して低角度 (20°前後) で、カーボンは正面 (90°) から回転蒸着を行い、細胞

膜の直下の構造のレプリカを調製する。図2と3に、培養線維芽細胞の細胞質側表面に形成される、膜直下の構造群の1つであるカベオラや膜骨格のディープエッチング像を示している。カベオラ⁵⁾は直径が50~100nm程度で、渦巻き状の模様を示す膜陥入構造であるため、多格子模様のクラスリン被覆ピット⁶⁾と併せて、ディープエッチング像では特異的な構造として同定できる。しかし、陥入程度の小さいカベオラや細胞質側表面から10nm程度の深さに構築されるアクチン膜骨格では、凍結面の氷をしっかりとディープエッチングしてやらないと、カベオラやアクチンフィラメントに特有な渦巻き様の被覆構造やストライプ模様の線維構造が明瞭に観察されない。カベオラは、脂質ラフト⁷⁾と部分的に重なる機能を持つと推測され、コレステロール、GPI(グリコシルホスファチジルイノシトール)アンカー型タンパク質、スフィンゴ糖脂質などの濃縮ドメインと考えられている。様々なシグナル伝達のクロストークや膜分子の複合体形成の局所場(ナノドメイン)となっているに違いない。

III. 免疫レプリカ

ディープエッチング像の中で分子の局在がわかれば、簡易版ではあるが“局所的な生化学解析”が実現されることになる。対象とするシグナル分子について、ラフト、カベオラ、クラスリン被覆ピット、アクチン膜骨格、その他のバルク領域への局在に加えて、それらが集合するドメインの大きさを推定することも可能となる。実際には、既述のディープエッチングの過程³⁾で以下のような免疫金コロイド染色を併せて行う。実際の作法としては、①細胞質側が裸出した細胞膜をリシン・グリシン・塩化アンモニウムを含む緩衝液でインキュベーションすることで、未反応のアルデヒド基をクエンチングする。②洗浄後、BSA溶液でブロックする。③1次抗体による染色の後、2次抗体を結合させた金コロイド溶液でインキュベーションする。④洗浄後、2%グルタルアルデヒド含有緩衝液で固定する。⑤洗浄後、さらに蒸留水で1分程度洗浄し、急速凍結へ進む。このように、免疫金コロイド染色が施されたフリーズレプリカ試料を“免疫レプリカ”と呼ぶ。もともと三次元的に観察されるディープエッチング像の特性を活かして、膜陥入構造であるカベオラやクラスリン被覆ピットの陥入頂点や辺縁部への局在も詳しく調べられる。このような細胞質側が裸出した試料では、抗体が認識する抗原部の多くが表面に出ていて、抗原-抗体間の反応は容易に進行すると予想される。そのためか、蛍光抗体染色により濃く染色できる一次抗体であれば、免疫レプリカについても適用可能である。タンパク質に対するIgG抗体のほか、脂質に対するIgM抗体でも問題なく染色できる。図4は、イノシトールリン脂質のホス

ファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸(PIP₂)をプローブとした免疫レプリカ像である。白い小さな点がプローブの免疫金コロイドである。白く明瞭に観察できる点の周囲に縁取りが見えるのが特徴である。赤枠Aを拡大したものが、赤枠B, Cで金コロイドが黄色で強調されている。

IV. トモグラフィー

透過型電子顕微鏡を基盤とする電子線コンピュータトモグラフィー(electron computerized tomography)は1990年代に自動化され、細胞内部構造の*in vivo*解析ツールとして著しく発展してきた。原理的には、1979年のAllan M. CormackとGodfrey N. Hounsfield両博士のノーベル医学生理学賞(“the development of computer assisted tomography”)に遡ることができる。この当時に用いられたX線を電子線に換えて、空間分解能をミリからナノへと飛躍的に向上させたものが、現在の電子線トモグラフィーと考えていいだろう。これを可能としたのは、以下の3つの開発による。最初の2つは“高精度サイドエントリー型試料傾斜ホルダーを含めたZ軸補正が可能なトモグラフィー電子顕微鏡”と“それに同調する高感度CCDカメラ”のハード面で、最後の1つは“それら機器で観察した連続傾斜像を連動させ、三次元構造を構築するアプリケーション”などのソフト面の開発といえる。現在では、電子顕微鏡メーカー3社(エフイー・アイ、日本電子、日立)より各々独自に開発した機器を購入することができる。筆者らがこれまで利用してきた、①連続傾斜像から連続スライス像への変換計算はMcIntosh博士ら(University of Colorado at Boulder)が開発した演算プログラム“IMOD”⁸⁾(<http://bio3d.colorado.edu/imod/>)で、また②連続スライス像から再構築像への変換計算はTemplate Graphics Inc.製の“AMIRA”(http://www.amiravis.com/)であったが、最近になってエフイー・アイから“Xplore3D”として統合化された。これは一例であるが、このように毎年多くの部分が改良されており、今後も発展の傾向にあるといえる。

電子線トモグラフィーの醍醐味は、細胞のような複雑な非対称構造の三次元再構築が可能なところにある。以下に、筆者らがやってきた膜骨格などの細胞膜直下の構造の三次元観察を紹介したい(膜骨格とは、細胞骨格のうちで細胞膜の細胞質側表面に接している部分を意味する)。ここでは、ディープエッチングしたフリーズレプリカ試料をトモグラフィーに初めて適用した。このような技術の組み合わせは世界的にも注目を集めた。筆者らの研究目的は、最近提唱されている“細胞膜が膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質で仕切られている”という、細胞膜の流動モザイクモデルをさらに深化させた“新しい細胞膜構造モデル”を構築

解析の点から検証することにある。そのために、細胞膜直下の膜骨格構造を定量的に解くことにより、膜骨格が細胞膜と接している部分の構造を解明しようとした。実際の作法としては、①細胞質側を露出させた膜試料の同一視野について、 $\pm 70^\circ$ 範囲で合計141枚の連続傾斜像をCCDカメラで位置補正しながら撮影することから始めた(図5A)。②これをもとに計算した連続Zスライス像から、細胞質表面から厚さ100nm程度(各々の連続スライス厚は0.85nm)の三次元再構築像を得た。特に細胞質側表面から10nm程度の厚さに局在するアクチンフィラメントが、膜貫通型タンパク質の細胞膜中での側方拡散運動に影響を与える膜骨格構造と考え、これら領域で仕切られる膜ドメインの大きさを定量化した(図5B, C)。この結果は、超高速度カメラを用いた1粒子追跡法で明らかにされた膜分子の運動軌跡から推定される膜ドメインの大きさ^{9), 10)}と一致したため、新しい細胞膜構造モデルである“膜骨格フェンスあるいは膜貫通型タンパク質ピケットモデル”の確立に大きく寄与できるのではないかと考えている⁴⁾。

おわりに

組織や細胞に作られたナノレベルの微細構造を、ライブに近い状態で明瞭(立体的かつハイコントラスト)に観察するために、急速凍結・ディープエッチング法は誕生したといえる。この手法により、カベオラやクラスリン被覆ピットのような膜陥入構造ばかりでなくアクチン膜骨格についても、線維表面のストライプによって同定できる。免疫レプリカを併用すれば、膜面で生じるシグナルに関係する受容体タ

ンパク質や脂質との複合体形成についても、*in vivo*での定量的可視化解析が可能となる。最近では、細胞質側表面構造の*in vivo*での電子線トモグラフィ(京都大学再生医科学研究所楠見研究室との連携研究)により、アクチン膜骨格の三次元イメージングシステムが構築され、これまで未知であった膜骨格の機能・構造の相関が解かれつつある。

謝辞 本研究の機会を与えて下さった京都大学再生医科学研究所ナノバイオプロセス研究領域の楠見明弘先生に、この場を拝借して改めて深く感謝申し上げます。(株)三菱化学生命科学研究所分子加齢医学研究グループの瀬藤光利先生、国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部の湯浅茂樹先生、米国ワシントン大学医学部細胞生物学科のジョン・ホイザー先生にお礼申し上げます。

諸根信弘 国立精神・神経センター 神経研究所

E-Mail: morone@ncnp.go.jp

厚生労働省国立精神・神経センター神経研究所 室長。1999年京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻退学(同年京都大学博士)。科学技術振興機構ERATO膜組織能プロジェクト研究員、(株)三菱化学生命科学研究所分子加齢医学グループ主任研究員を経て、2005年より現職。

臼倉治郎 名古屋大学 エコトピア研究所

E-Mail: usukuraj@esi.nagoya-u.ac.jp

名古屋大学教授(エコトピア科学研究所)。1981年東京大学大学院医学系研究科修了(東京大学医学博士)、同年、東京大学助手(医学部)。1983~1985年カリフォルニア大学ロサンゼルス校客員研究員。1988年名古屋大学助教授(医学部)を経て、2006年より現職

文献

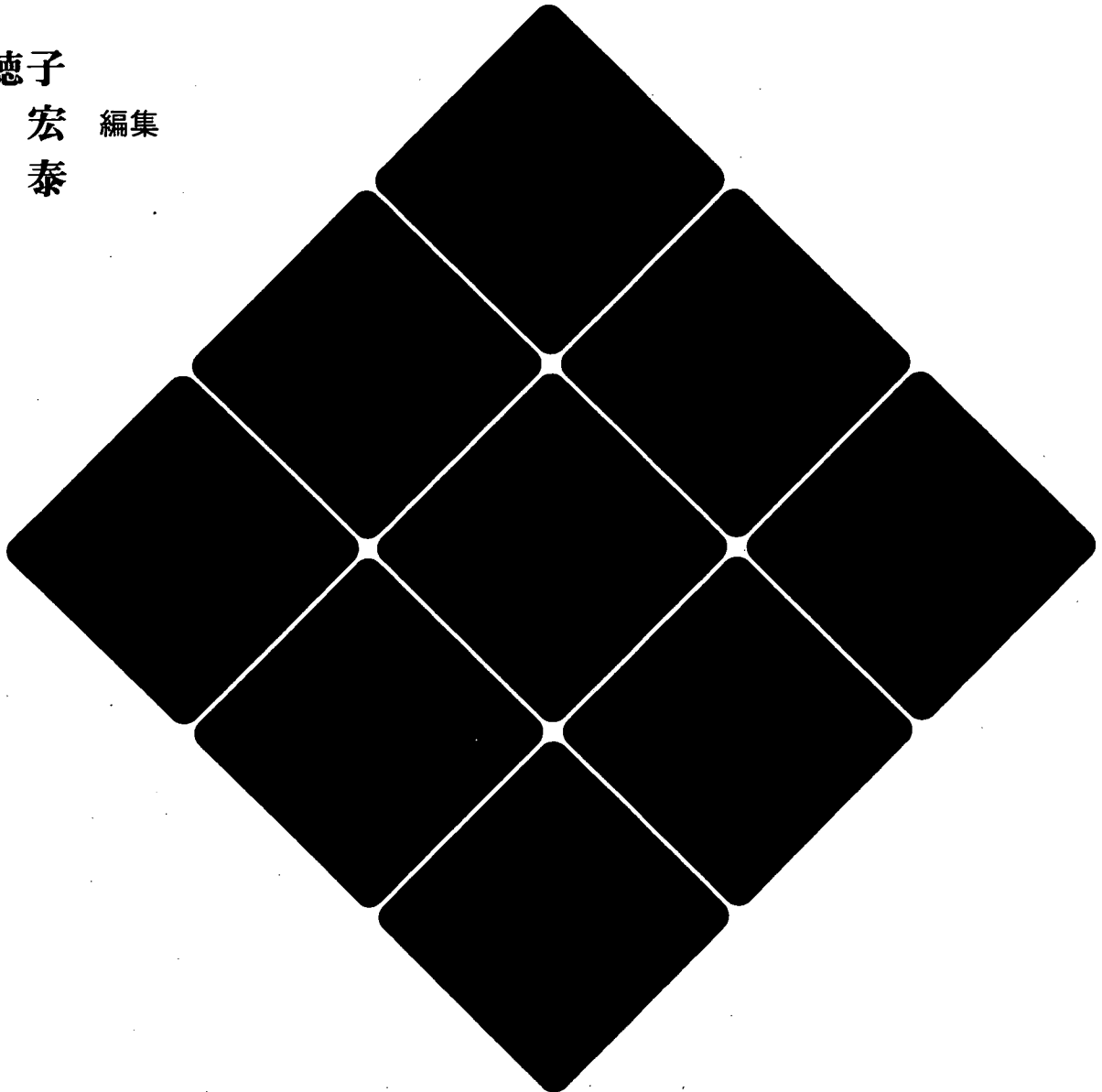
- 1) Heuser JE, et al: J Cell Biol (1979) 81: 275-300
- 2) Kandel ER, et al eds: Principles of Neural Science (McGraw-Hill, New York): 264-265 (2000)
- 3) Usukura J, et al: J Electron Microsc (1980) 29: 376-382
- 4) Morone N, et al: J Cell Biol (2006) 174: 851-862
- 5) Rothberg KG, et al: Cell (1992) 68: 673-682
- 6) Heuser JE, et al: J Cell Biol (1989) 108: 389-400
- 7) Simons K, et al: Nature (1997) 387: 569-572
- 8) Kremer JR, et al: J Struct Biol (1996) 116: 71-76
- 9) Fujiwara T, et al: J Cell Biol (2002) 157: 1071-1081
- 10) Kusumi A, et al: Annu Rev Biophys Struct (2005) 34: 351-378

講義と実習

生細胞蛍光イメージング

阪大・北大 顕微鏡コースブック

原口徳子
木村 宏 編集
平岡 泰



共立出版

第8章

改変型蛍光タンパク質の利用

GFPなどの蛍光タンパク質は、ほとんどの場合、目的のタンパク質や細胞に“目印”を付ける目的で使用されている。このようなオーソドックスな利用法にとどまらず、蛍光タンパク質の特質を知り、それを活かすことによって、生体（細胞）内のpH環境やタンパク質分解、分子間相互作用など、さまざまな生命活動を観察できる。本章では、蛍光タンパク質が光る仕組み（発色団の物理化学変化）を解説するとともに、蛍光タンパク質を利用した「生理機能の可視化プローブ」や「タンパク質機能のノックダウン法」など、蛍光タンパク質の新しい利用法についても紹介する。

① 蛍光タンパク質はなぜ光るのか？ [1]

1. GFP発色団の形成と蛍光発光のしくみ

オワンクラゲ *Aequorea victoria* から単離された GFP (AqGFP) は、238個のアミノ酸から構成されている。この230個程度のアミノ酸がフォールディングすることで、蛍光タンパク質に特徴的な11個の β シートで編まれたバレル（樽）とその中を上下に貫く1本の α ヘリックス構造、いわゆる“ β バレル構造”が形成される（図1.1）[2]。その後、 α ヘリックス内にある65番目から67番目の3つのアミノ酸（それぞれセリン、チロシン、グリシン）が環状化、脱水、酸化の化学反応過程を経て、発色団 *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone が形成される（図1.2）[3]。この発色団がもつ π 共役系の電子（図1.2の水色部分）は特定波長の光子と相互作用することで基底一重項から励起一重項へ遷移し、振動緩和ののち、光を放出して基底一重項へ戻る。このときに放出される光がいわゆる「蛍光」である。

2. GFP発色団の構造による蛍光スペクトルの決定

GFPやその変異体は、それぞれ異なる吸収・蛍光スペクトルをもっているが、それはどのように決まっているのであろうか。wtGFP（野生型）は、中性条件下で395 nmに大きな吸収極大と470 nmに小さな吸収極大をもつ（図1.3）。この2峰性の吸収極大は酸性条件下では395 nmに、逆に塩基性条件下では470 nmに単一極大をもつように変化する[4]。一方、発色団自身を構成している65番目のセリンをスレオニンに置換した変異体（GFP-S65T）は490 nmに単一の吸収極大を示す[5]。wtGFPとGFP-S65TのX線結晶構造を比較すると、wtGFPの発色団はチロシン由来のフェノール性水酸基にプロトンが付いた状態（非イオン化状態）であるのに対し、

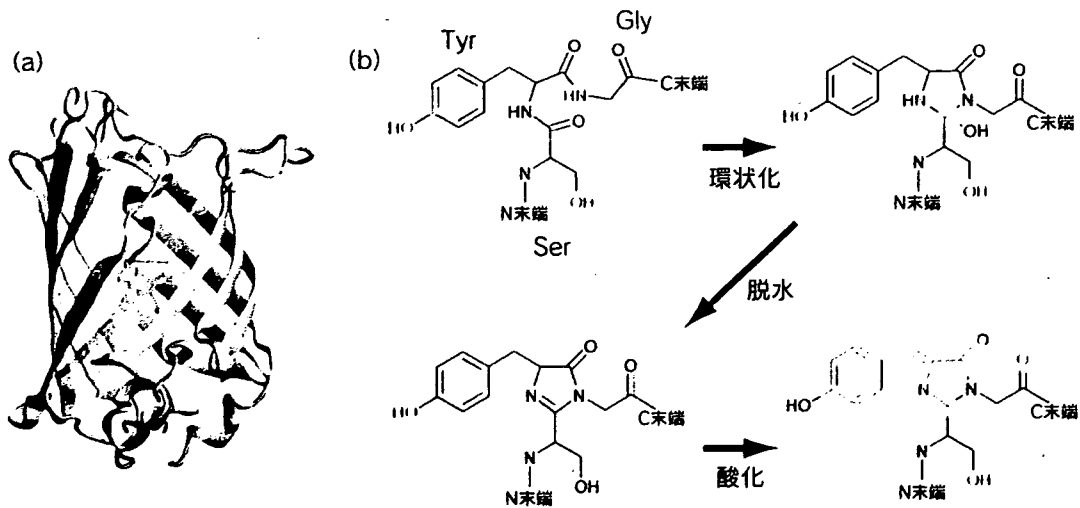


図1 AqGFPの立体構造と発色団の形成過程

(a) Protein Data Bankから入手したGFPに関するデータ (PDBコード: 1EMB) を基にVMD (フリーソフトウェア) を用いてリボン表示したもの. 発色団 (水色) をスティック表示した. (b) セリン (Ser), チロシン (Tyr), グリシン (Gly) の3つのアミノ酸から発色団が形成される過程を示す. 成熟発色団の共役 π 電子系を水色で表した. [文献3より改変]

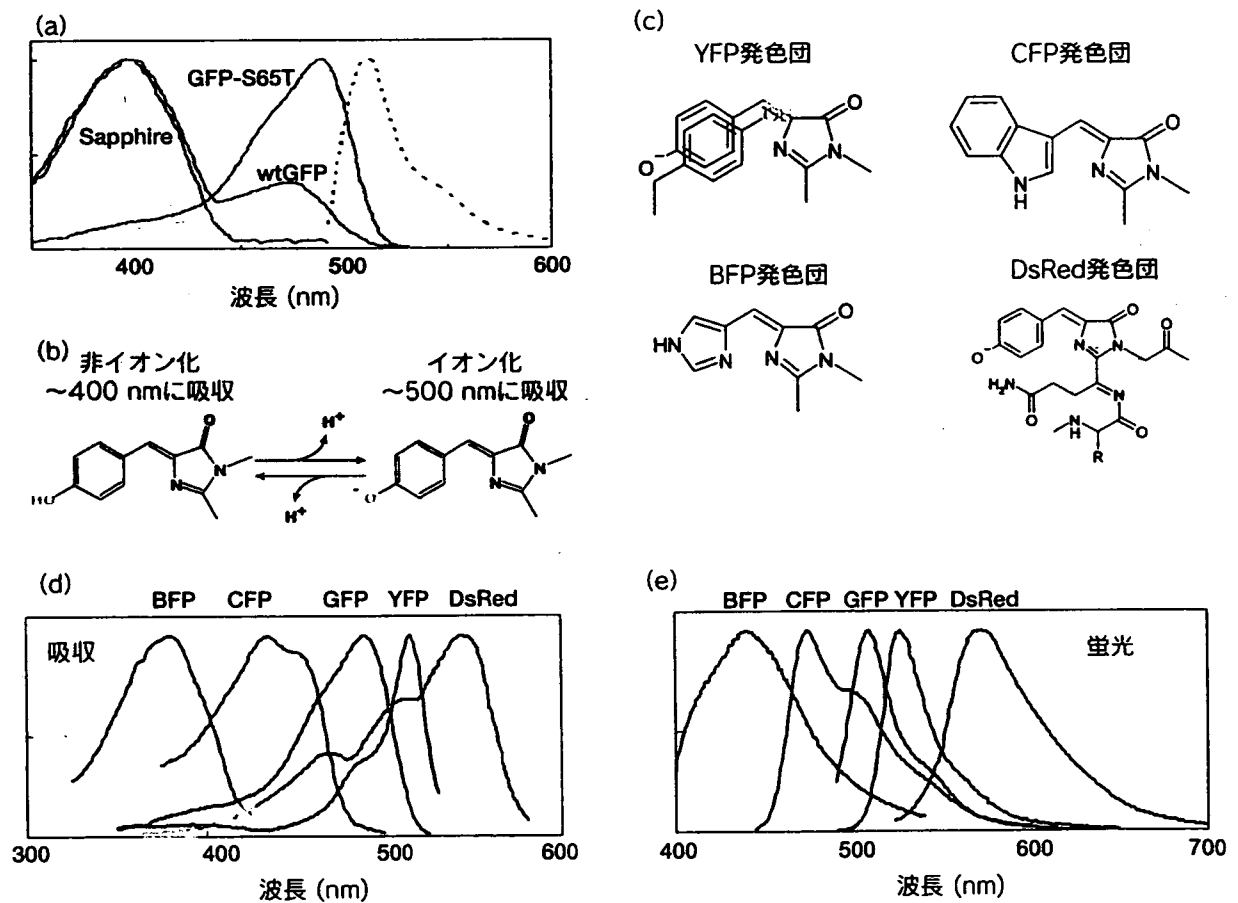


図2 AqGFP変異体の発色団構造とスペクトル

(a) wtGFP, GFP-S65T, Sapphireの励起スペクトル (実線) と蛍光スペクトル (破線). (b) AqGFP発色団の電荷状態と吸収波長の関係. (c) YFP, CFP, BFP, DsRedの発色団の化学構造. (d) おもな蛍光タンパク質の吸収スペクトル. (e) おもな蛍光タンパク質の発光スペクトル. ⇒口絵9参照

GFP-S65Tの発色団はプロトンが外れたイオン化状態になっていることがわかった(図2b)[6]。以上の結果から、非イオン化発色団は395 nmに、イオン化発色団は480 nm付近に吸収極大をもつことが明らかとなった。

では、2峰性の吸収スペクトルをもつwtGFPと単峰性の吸収スペクトルをもつGFP-S65Tのいずれもが510 nmに単一の蛍光極大をもつのはなぜであろうか？ この現象は、発色団を形成するチロシン残基内に存在するフェノールの化学的性質によって理解できる。フェノールは、光励起によって酸性度が10万倍以上増大し、その結果、平衡が「イオン化」側に偏る(たとえば、基底状態で9.5の酸解離定数をもつ2-ナフトールのそれは、励起すると2.5まで低下する)。つまり、wtGFPの「非イオン化」発色団を395 nmの光で励起すると、そこに存在するフェノールの酸性度が増加し、「非イオン化」「イオン化」の平衡が素早く「イオン化」にシフトする。その結果、「非イオン化」状態の蛍光スペクトルが「イオン化」状態のそれと同じ510 nmになるのである。

S65T変異とは逆に、T203IやF99W変異では、基底状態における発色団のイオン化が抑制される。SapphireやGFP-uvがそれである。これらはいずれも400 nm付近に励起極大をもつが、この場合も400 nmの光励起によって発色団が「イオン化」され、蛍光スペクトルの極大は510 nmとなる(図2a)。

GFPの変異体のうち、YFP(yellow fluorescent protein)は、203番目のスレオニンがチロシンに置換されていることにより、530 nmという最も長い蛍光極大波長をもつ。一般に可視域に蛍光性をもつ有機化合物は、その構造に必ず π 電子を有しており、この π 電子が、分子内の、より広範囲に局在すればするほど、蛍光波長が長波長側にシフトすることが知られている。YFPにおいては、203番目のチロシン側鎖に由来するフェノール環と発色団由来のフェノール環が重なることで、 π 電子を介した相互作用(π - π スタッキング)が起きる(図2c)。その結果、 π 電子がより広範囲に分布し、長波長側へ吸収極大(515 nm)、蛍光極大(530 nm)がシフトしたのである(図2d,e)[2]。この他に、66番目のチロシンをトリプトファンに置換することで、発色団にインドール環を導入したCFP(cyan fluorescent protein. 吸収極大:435 nm, 蛍光極大:475 nm)(図2c,d,e)[7]や、同じく66番目をヒスチジンに置換することによりイミダゾール環を導入したBFP(blue fluorescent protein. 吸収極大:383 nm, 蛍光極大:447 nm)(図2c,d,e)[7]が波長変異体として開発されている。

3. AqGFP以外の蛍光タンパク質

花虫類(Anthozoa)の六放サンゴ類に属するスナギンチャク(*Zoanthus*)から、YFPより長波長の蛍光を出す蛍光タンパク質が単離された。DsRedと命名されたこのタンパク質は、さらに π 電子が非局在化し、558 nmに吸収極大、583 nmに蛍光極大を示す(図2c,d,e)[8]。DsRedはX線結晶構造解析の結果、GFPと同様、 β バレル構造を有していることが明らかとなった[9]。ただし、GFPが単量体であるのに対し、DsRedは4量体を形成するため、任意のタンパク質と融合する目的に使うにははなはだ不都合であった。そこでCampbellらは、DsRedの構造情報に基づいて、多量体形成に関与するアミノ酸に点変異を導入し、さらにタンパク質全長にわたってランダム変異を導入することで、単量体型DsRed(mRFP1)を作製することに成功した[10]。

表1 代表的な蛍光タンパク質とその特性

色	名称	励起極大	蛍光極大	モル吸光係数	蛍光量子収率	構造
青	EBFP	377	446	31,000	0.15	単量体
	SBFP2	383	448	34,000	0.47	単量体
	EBFP2	383	448	32,000	0.56	単量体
	Azurite	384	450	22,000	0.59	単量体
	mBlueberry	402	467	52,000	0.48	単量体
青緑	ECFP	433	475	32,500	0.4	単量体
	cerulean	433	475	43,000	0.62	単量体
	CyPet	435	477	35,000	0.51	単量体
	TagCFP	458	480	37,000	0.57	単量体
	AmCyan1	458	489	44,000	0.24	4量体
	mTFP1	462	492	64,000	0.85	単量体
	Midoriishi Cyan	472	495	27,300	0.9	2量体
緑	TurboGFP	482	502	70,000	0.53	2量体
	TagGFP	482	505	58,000	0.59	単量体
	Azami Green	492	505	55,000	0.74	4量体
	mAG1	492	505	42,000	0.81	単量体
	AcGFP1	475	505	50,000	0.55	単量体
	ZsGreen1	493	505	43,000	0.91	4量体
	EGFP	484	507	56,000	0.6	単量体
	T-Sapphire	399	511	44,000	0.6	単量体
黄緑/黄	EYFP	513	527	83,400	0.61	単量体
	Venus	515	528	92,200	0.57	単量体
	Citrine	516	529	77,000	0.76	単量体
	Ypet	517	530	104,000	0.77	単量体
	PhiYFP	525	537	124,000	0.39	2量体
	TurboYFP	525	538	105,000	0.53	2量体
	ZsYellow1	529	539	20,200	0.42	4量体
	mBanana	540	553	6,000	0.7	単量体
橙/赤	mKO1	548	559	110,000	0.45	単量体
	Kusabira-Orange1	548	561	51,600	0.6	2量体
	mOrange	548	562	71,000	0.69	単量体
	TurboRFP	553	574	92,000	0.67	2量体
	TdTomato	554	581	138,000	0.69	2量体
	DsRed2	563	582	75,000	0.79	4量体
	mTangerine	568	585	38,000	0.3	単量体
	DsRed monomer	556	586	35,000	0.1	単量体
	AsRed2	576	592	56,200	0.05	4量体
	mStrawberry	574	596	90,000	0.29	単量体
	mRFP1	584	607	50,000	0.25	単量体
	J-Red	584	610	44,000	0.2	-
	mCherry	587	610	72,000	0.22	単量体
	eqFP611	559	611	780,000	0.45	4量体
	dKeima-Red	440	616	25,000	0.31	2量体
	HcRed1	588	618	20,000	0.015	2量体
	mKeima-Red	440	620	14,000	0.24	単量体
	mRaspberry	598	625	86,000	0.15	単量体
	mPlum	590	649	41,000	0.1	単量体
AQ143	595	655	90,000	0.04	4量体	

さらに Shaner らは、mRFP1 にさまざまなアミノ酸変異を導入し、550 nm から 610 nm までのさまざまな蛍光特性を示す変異体、いわゆるフルーツシリーズを開発した [11]。mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, mCherry がそれである。表 1 に、これまでに開発された代表的な蛍光タンパク質とその特性を示す。

III 蛍光特性の環境依存性—pH 指示薬としての利用—

前節で述べたように、蛍光タンパク質の発色団は、プロトンの有無によってイオン化状態が変化し、それによって波長特性が変化する。したがって、すべての蛍光タンパク質（変異体を含む）は多かれ少なかれプロトン（水素イオン）に感受性を示し、酸性 pH で蛍光が弱まる（図 3）。そのため、ライブセルイメージングで蛍光強度を定量化し解析する場合には、蛍光強度の変化が、pH の変化に由来する可能性のあることを常に念頭に置いてもらいたい。一方、この性質を利用すれば、蛍光タンパク質を用いて細胞内の pH を可視化することができる [12]。AqGFP にいくつかのアミノ酸変異を導入することで、pH によって吸収スペクトルが変化する pHluorin [13] や、蛍光スペクトルが変化する deGFP [14]、GFpH [15] などが開発されている。これらの指示薬は、2 波長励起 1 波長測光 (pHluorin, GFpH)、1 波長励起 2 波長測光 (deGFP, GFpH) を行うことができるので、観察対象が動いてしまうときに起こる問題や、指示薬の濃度の違いによって起こる問題を回避することができ、定量的な pH 測定を行うことが可能である。このような蛍光タンパク質性 pH センサーを用いて、アポトーシスに伴って起こるミトコンドリア内の pH 上昇や、細胞質の pH 減少などが観察されている [16]。

III 高効率に発光する蛍光タンパク質

蛍光タンパク質は、タンパク質に翻訳されるや否や蛍光性となるわけではなく、蛍光性をもつまでにある程度の時間がかかる。それは、翻訳されてから発色団が形成される過程に時間がかかるからである。したがって、蛍光タンパク質を、プロモーター活性を測るレポーターとして用いる場合には、プロモーターの活性化時期を正確に知ることはできない。また、いったん成熟した蛍光タンパク質はプロテアーゼなどに対してきわめて高い抵抗性があり、細胞種にもよるが、約 1 日の寿命をもつ場合もある。このため、蛍光タンパク質の蛍光強度の減少を指標に、プロモ-

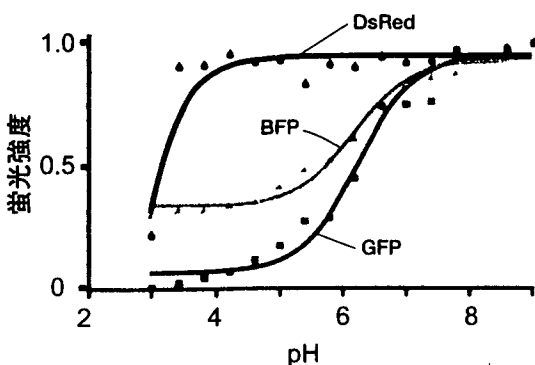


図 3 蛍光タンパク質の pH 滴定曲線

BFP, GFP, DsRed の各 pH 緩衝液における蛍光強度を測定し、最大蛍光強度を 1 に規格化したときの曲線を示す。各蛍光タンパク質で異なる pH 感受性をもつことがわかる。

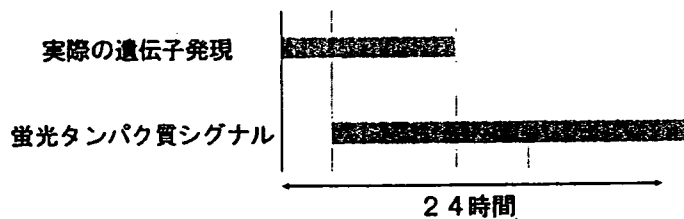


図4 遺伝子発現のレポーターとして蛍光タンパク質を使用したときに見られる、実際の遺伝子発現と蛍光タンパク質シグナルのずれ

蛍光タンパク質は翻訳されたのち、蛍光を放つようになるまでにある程度の時間（数十分程度）を要する。また、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質のシグナルを検出するためには十分量の蛍光タンパク質分子が細胞内に蓄積されなければならない。したがって、遺伝子プロモーターが活性化してから実際に蛍光シグナルが検出されるまでには数十分から数時間程度（検出器の感度に依存する）かかると考えられる。また、いったん蛍光性を獲得した蛍光タンパク質は比較的長い（1日程度）寿命をもつため、たとえ遺伝子プロモーターの活性がオフになったとしても、蛍光シグナルは検出され続ける。

ターの不活性化の時期を知ることもまったく不可能である（図4）。蛍光タンパク質の寿命を短くするために、タンパク質分解の標的となる PEST 配列を C 末端につなげた destabilized GFP などが作られているが、蛍光性が出る前に分解されてしまうものが多く、その結果、蛍光強度がきわめて低くなり、使えない場合が多い。このような欠点を克服するために Citrine, Venus など、成熟過程を速めた YFP 変異体が開発されている [17, 18]。さらに Cerulian [19] や SBFP2 [20] など、それぞれ CFP と BFP に類似の蛍光スペクトルをもつ成熟変異体も開発されている。これらの蛍光タンパク質を利用することで、従来の蛍光タンパク質では困難であった蛍光観察が実現している。たとえば、Venus を利用することによって、生きた大腸菌内で 1 分子のタンパク質が新規に産生される様子を観察することが可能となった [21]。この成功は、1 分子の挙動を生きた細胞内で解析する新たな道を開くものである。また、Nagoshi らは、繊維芽細胞を用いて、概日リズムをもつ遺伝子の活性化を、PEST 配列をつなげた Venus によって可視化し、概日時計と細胞分裂時計との連関を明らかにした [22]。

④ 蛍光特性の光感受性—光による蛍光特性の制御—

観察データ（蛍光強度）を定量的に解析するためには、GFP の光退色や光異性化に十分な注意を払わなければならない。“光退色”とは、発色団の不可逆的な構造変化による、吸光能力の恒常的な消失のことである。一方、“光異性化”は、特定の波長の光による発色団の化学構造変化であり、吸収スペクトルや蛍光スペクトルが一時的に変化するものの、異なる波長の光や熱により元の状態に戻ることができる可逆的な反応である。これらの現象は、観察データを定量化する場合にとくに問題となる。これらは励起光を強く当てた場合に起こりやすいので、それを回避するためには励起光強度を極力小さくすることが肝要である。そのため、定量的蛍光イメージングの基本は、「当てる光を極力抑え、出てきた蛍光は余すことなく利用すること」であるということを銘記されたい。

一方、光異性化の特性を、むしろ積極的に利用したイメージングもなされている。その代表的な例が、光活性化 GFP (photoactivatable GFP; PA-GFP) を用いた分子運動性の定量的解析で

ある。ここで、光活性化とは、光照射によって、分子の特性が無蛍光状態から蛍光状態へ変化することをいう。光照射前には 395 nm の励起極大しかもたないが、紫（外）光照射によって 470 nm の励起極大が出現する。光照射後に、観察用の励起光（470 nm 付近）で観察すると、実に蛍光強度が 100 倍も高くなり、きわめて高いコントラストで蛍光を出現させることが可能である [23]。この特性により、細胞内の特定の場所に局在する融合タンパク質を光活性化させ、その場所での目的分子の動きやすさを定量する（拡散速度を求める）ことができる。これとは反対に、FRAP 解析は光退色を利用して分子運動性を定量的に解析するものである（第 10 章「FRAP の基礎」と第 19 章「FRAP の定量的解析」参照）が、光活性化を用いた方法のほうが、はるかに少ないエネルギーで活性化できることや、活性化した蛍光を直接観察することができる点で、FRAP 解析より優れている。

Ando らは、紫外光照射によって“可逆的”に蛍光特性を変化させることができる Dronpa を開発した [24]。Dronpa は、紫色（405 nm）と青色（488 nm）の光を交互に照射することで、蛍光（518 nm）の ON と OFF をくり返し行うことができるという特徴をもつ。その特徴は、分子動態の時間的変化を解析することに絶大な威力を発揮する。

さらに、Ando らは、紫外光を照射することで吸収スペクトル・蛍光スペクトルの双方が不可逆的に変化し、蛍光が緑色から赤色に変化する光変換蛍光タンパク質 Kaede も開発した [25]。Kaede は 4 量体を形成して発色するため、任意のタンパク質と融合して細胞内での動態を解析する目的には適さない。しかし、色変化によるコントラストの高さゆえ、細胞や細胞内小器官を特異的にマーキングし、それらの動態変化を解析することについては威力を発揮する。たとえば、複雑な形態をとっている神経細胞が折り重なって存在している高密度培養下において、神経細胞に Kaede を発現させておけば、注目する神経細胞の色を紫外光で変えることで、絡みあう他の神経細胞と明瞭に区別し解析することが可能となる。

表 2 おもな光活性化・光変換蛍光タンパク質とその特性

名称	刺激波長	観察波長<励起>	観察波長<蛍光>	色変化	構造
PA-GFP	UV&紫	488	517	無→緑	単量体
PA-mRFP1	UV&紫	578	605	無→赤	単量体
KFP-Red	緑	580	600	無→赤	4量体
Dronpa	UV&紫 (ON) 緑 (OFF)	503	518	無⇄緑	単量体
Kaede	UV&紫	508	518	緑→赤	4量体
		572	580		
KikGR	UV&紫	507	517	緑→赤	4量体
		583	593		
EosFP	UV&紫	506	516	緑→赤	単量体
		571	581		
PS-CFP	UV&紫	400	468	青緑→緑	単量体
		490	511		
Dendra	UV&紫	490	507	緑→赤	単量体
		553	573		

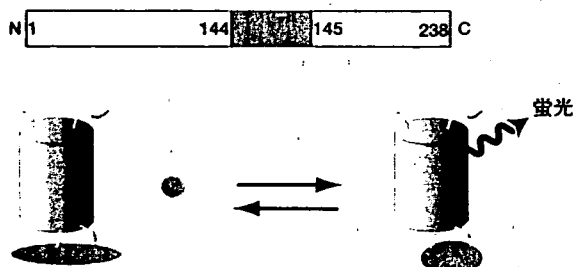
PA-GFP, Dronpa, Kaede の他にも, KFP [26], EosFP [27], PS-CFP [28], KikGR [29], PA-mRFP [30], Dendra [31] などが開発されている. 表 2 に, これまでに単離または開発されたおもな光活性化・光変換蛍光タンパク質とその特性を示す.

⑤ GFP 発色団の電荷状態を利用したバイオセンサー

上述したように, wtGFP の発色団は, 電荷状態の違いにより 395 nm (非イオン化) と 470 nm (イオン化) に吸収極大をもち, かつ電荷状態の変化によって吸収スペクトルが変化する. したがって, タンパク質の構造変化やタンパク質間相互作用を, この「発色団の電荷状態の変化」に結びつけることができるならば, GFP の吸収スペクトルの変化を観察することによって, それらを測定できるかもしれない. この発想に基づき, Baird らは, Ca^{2+} 指示薬として camgaroo を開発した [32]. camgaroo は, YFP の 144 番目と 145 番目のアミノ酸の間に, Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルモデュリン (CaM) を挿入したキメラタンパク質で, CaM の Ca^{2+} 結合に伴う立体構造変化により発色団近傍の電荷状態が変化し, その結果, Ca^{2+} の有無で蛍光強度が 7 倍変化する (図 5 a).

一方, 筆者らは YFP の円順列変異体 (cpYFP) を用いることにより, Ca^{2+} 指示薬 pericam を開発した [33]. 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, 元の 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 (図 5 b). Pericam は, 145 番目のアミノ酸を新たな N 末端とする cp145YFP の N 末端と C 末端に, M13 ペプチドと CaM を連結している. M13 と CaM の Ca^{2+} 依存的な相互作用に伴う立体構造変化を利用して, 発色団の電荷状態を変化させることを原理としている (図 5 b). 蛍光強度が, Ca^{2+} の結合により 8 倍増加する flash-pericam, 逆に 7 倍減少する inverse-pericam, 励起スペクトルが変化する

(a) 受容体挿入法



(b) 円順列変異法

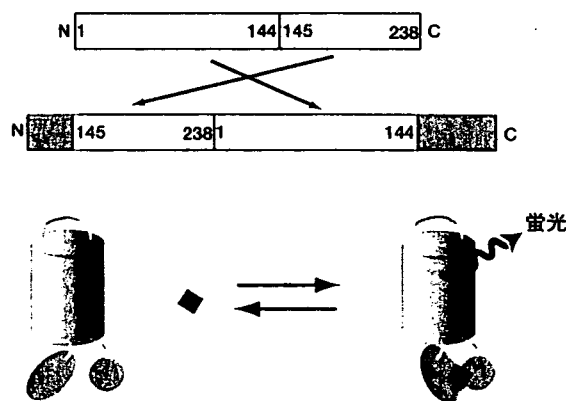


図 5 蛍光タンパク質を利用した機能指示薬の概念図

(a) 受容体挿入法では YFP の 144 番目と 145 番目の間にリガンド (●) などの刺激により立体構造が変化するタンパク質 (青) を挿入する. リガンドが青タンパク質に結合すると, YFP の構造にも影響を与え, その結果, 蛍光特性が変化する. (b) 円順列変異法では, 145 番目のアミノ酸を新たな N 末端とする YFP の円順列変異体の両末端にリガンド (◆) などの刺激により相互作用するタンパク質を融合する. リガンド刺激による青タンパク質とグレータンパク質の相互作用が YFP の立体構造に影響を与え, その結果, 蛍光特性が変化する.

radiometric-pericam の3種類が開発されている。最近では、円順列変異蛍光タンパク質を用いたタンパク質リン酸化 [34] や過酸化水素 [35] の指示薬も作製されており、本手法によるさまざまなバイオセンサーの登場が期待できる。

分割 GFP によるタンパク質間相互作用の可視化と特異的な細胞標識

Huらは、GFPをN末端側とC末端側の2つの断片に分けて発現させると、いずれの断片も蛍光性をもたない(図6a)が、それぞれの断片に相互作用するタンパク質をつなげると、タンパク質間相互作用を介してGFPが再構成され(図6b,c)、蛍光発光する(図6d)ことを見いだした[36]。BiFC(bimolecular fluorescence complementation)とよばれるこの方法により、bZIPタンパク質ファミリーとRelタンパク質ファミリー間の相互作用が培養細胞を用いて観察されている。さらに彼らは、GFP波長変異体(青, シアン, 緑, 黄)のN末端側, C末端側断片をさまざまに組み合わせることによって、スペクトルが異なる7種類の蛍光タンパク質ができることを突き止め、多種類のタンパク質間の相互作用を1つの細胞内で観察する方法も開発している[37]。

BiFC法はタンパク質間相互作用を可視化する方法だけでなく、特定の組織だけを特異的に標識する方法としても注目されている。Zhangらは、組織特異性が異なる2つの遺伝子プロモーターのそれぞれにGFPのN末端側, あるいはC末端側の遺伝子を連結させた。それぞれの遺伝子プロモーター活性がオーバーラップする細胞ではBiFCが起こり、蛍光性になるという仕組みで

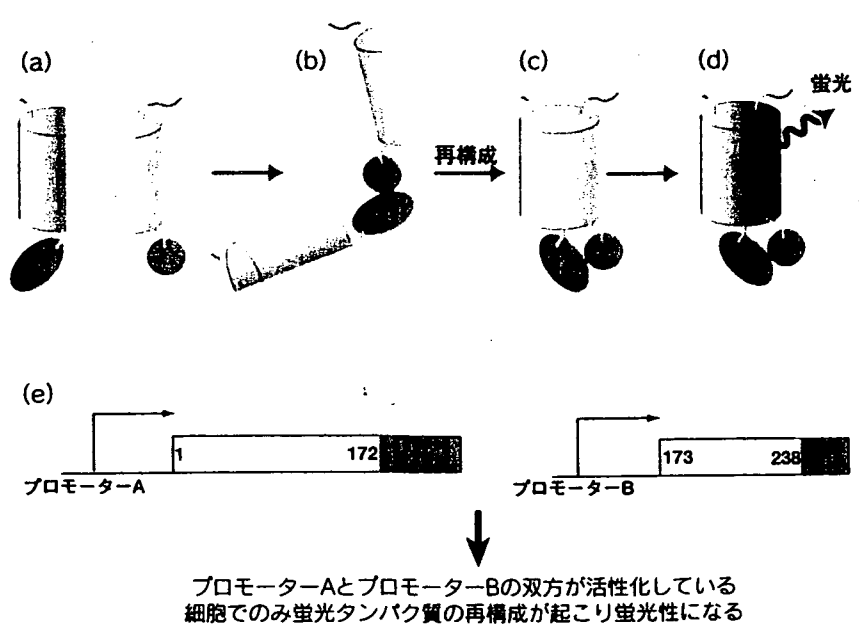


図6 分割 GFP を利用したタンパク質相互作用の検出

(a) 相互作用を調べたいタンパク質(青とグレー)に蛍光タンパク質のN末端側半分, C末端側半分を融合し, 細胞に発現させる。(b) 細胞内で青タンパク質とグレータンパク質が相互作用する。(c) 青タンパク質とグレータンパク質の相互作用を介して蛍光タンパク質のN末端側半分とC末端側半分も相互作用する。(d) 蛍光タンパク質の構造形成に伴い発色団も形成され蛍光を放つようになる。(e) N末端側半分とC末端側半部分を異なる遺伝子プロモーターの制御下で細胞に発現させると, 双方のプロモーター活性がオーバーラップする細胞のみが蛍光性になり, より特異的な細胞標識が可能になる。

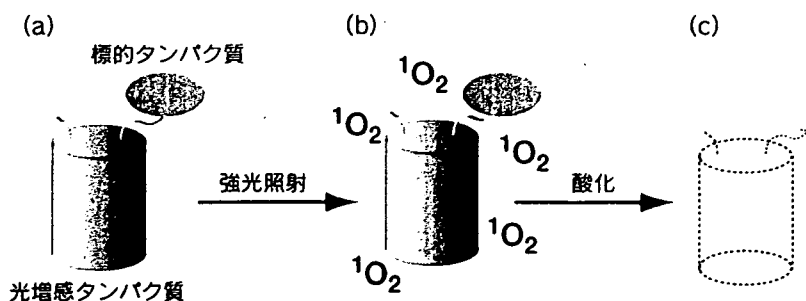


図7 蛍光タンパク質を光増感分子として利用し、標的タンパク質を光照射依存的に不活性化する方法
 (a) 不活性化したいタンパク質あるいはその結合タンパク質を光増感タンパク質 KillerRed と融合して細胞に発現させる。(b) 細胞内の任意の場所に強い緑色光 (たとえば 532 nm のレーザーなど) を照射し、KillerRed から活性酸素 (1 重項酸素) を産生させる。(c) 活性酸素は近傍の分子を酸化し不活性化させる。

て標的分子破壊をすることができるようになるに違いない。

蛍光タンパク質は、ただの蛍光タグとして利用するだけでなく、光る仕組みを知ることによって、応用範囲が大きく広がることを理解していただけたことであろう。原理を知っていてこそはじめて、適切な応用が可能となる。本章で記載したことを単に知識として覚えるだけでなく、実際の実験を通して蛍光タンパク質に対する理解を深めてほしい。それによって、新たな発見がなされ、そこから思わぬ突破口が開けるのだと常々思う。読者諸氏の奮闘を期待する。

文献

- [1] Tsien, R. Y.: *Annu. Rev. Biochem.*, **67**: 509-544, 1998
- [2] Ormo, M. *et al.*: *Science*, **273**, 1392-1395, 1996
- [3] Reid, B. G. *et al.*: *Biochemistry*, **36**, 6786-6791, 1997
- [4] Ward, E. E. *et al.*: *Biochemistry*, **21**, 4535-4540, 1982
- [5] Heim, R. *et al.*: *Nature*, **373**, 663-664, 1995
- [6] Brejc, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2306-2311, 1997
- [7] Heim, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12501-12504, 1994
- [8] Matz, M. V. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **17**, 969-973, 1999
- [9] Wall, M. A. *et al.*: *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1133-1138, 2000
- [10] Campbell, R. E. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7877-7882, 2002
- [11] Shaner, N. C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1567-72, 2004
- [12] Llopis, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6803-6808, 1998
- [13] Miesenbock, G. *et al.*: *Nature*, **394**, 192-195, 1998
- [14] Hanson, G. T.: *Biochemistry*, **41**, 15477-15488, 2002
- [15] Awaji, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 457-462, 2001
- [16] Matsuyama, S. *et al.*: *Nat. Cell Biol.*, **2**, 318-325, 2000
- [17] Griesbeck, O. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 29188-29194, 2001
- [18] Nagai, T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 87-90, 2002
- [19] Rizzo, M. A. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **22**, 445-449, 2004
- [20] Kremers, G. J. *et al.*: *Biochemistry*, **46**, 3775-3783, 2007
- [21] Yu, J. *et al.*: *Science*, **311**, 1600-1603, 2006
- [22] Nagoshi, E. *et al.*: *Cell*, **119**, 693-705, 2004
- [23] Patterson, G. H. *et al.*: *Science*, **297**, 1873-1877, 2002
- [24] Ando, R. *et al.*: *Science*, **306**, 1370-1373, 2004