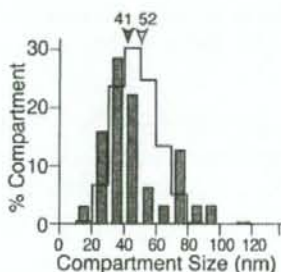
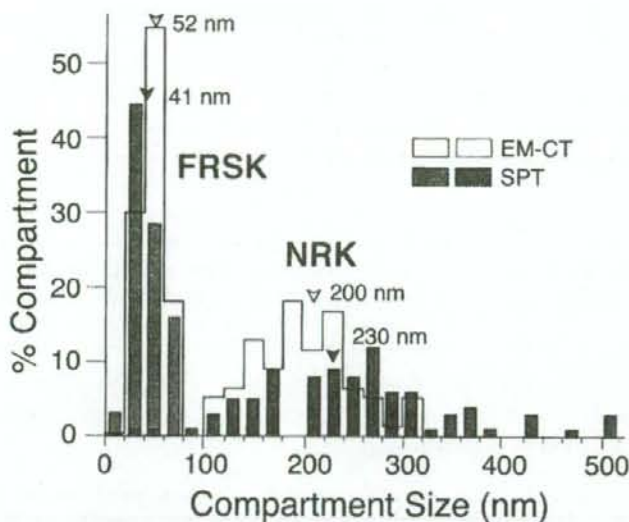


bound to the membrane skeleton for a long time. Assuming that the boundary region between the compartments is 10 nm wide, it takes about 10  $\mu$ s for a molecule to traverse this region. Therefore, the zeroth approximation is that if a transmembrane protein is bound to the membrane skeleton for at least 10  $\mu$ s, then it becomes an effective picket to participate in the formation of the diffusion barrier. Note that, in this model, the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton are coupling the membrane skeleton, which is located on the cytoplasmic surface of the membrane, with the phospholipids that are located in the outer leaflet of the membrane.

Here, the evidence supporting the anchored-protein picket model (and membrane-skeleton fence model) is summarized.

- (1) As described in point 5 for the membrane-skeleton fence model, the hop diffusion of DOPE depends on the integrity of the membrane skeleton [12, 37, 39]. Similar cautionary remarks can be applied to DOPE diffusion. Furthermore, hop diffusion cannot be found in liposomes and in membrane blebs, where the membrane skeleton is largely absent [12]. In these membranes, the membrane molecules undergo rapid, simple Brownian diffusion that can be characterized by a single diffusion coefficient, in the range of 5–10  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  for DOPE, in all of the observation time scales (0.025 ms–1 s, i.e., by a factor of 40 000).
- (2) Using electron tomography of rapidly frozen, deeply etched specimens of plasma membranes, Morone et al. [35] determined the distribution of the mesh size of the actin-based membrane skeleton right on the cytoplasmic surface of the plasma membrane, and found that it agrees well with that for the compartment size determined from the DOPE diffusion data (Figure 19.10). Good agreements between the electron tomography data and the DOPE diffusion results were observed for two cell types, NRK and FRSK cells, which exhibited quite different compartment sizes for DOPE diffusion, 230 nm and 42 nm, respectively, further supporting the anchored-protein picket model. In addition, their results showed that the cytoplasmic surface of the entire plasma membrane is coated with the actin-based membrane skeleton, except for the locations of the internalization apparatus and cell adhesion structures.
- (3) In the case of the human erythrocyte ghost, the compartment size determined from the diffusion measurements of transmembrane proteins and lipids is consistent with the mesh size of the spectrin-based membrane skeleton on the cytoplasmic surface of the ghost membrane, determined by AFM [70, 72].



**Figure 19.10** Comparison of the distributions of the membrane-skeleton mesh size on the cytoplasmic surface of the plasma membrane estimated by electron tomography (open bars), with that of the compartment size determined from the phospholipid diffusion data (closed bars, adapted from Fujiwara et al. [12] and Murase et al. [37]), for NRK (magenta)

and FRSK (blue) cells. Within the same cell type, the MSK mesh size and the diffusion compartment size exhibited similar distributions (compare the open and closed bars with the same color). The actual sizes are quite different between NRK and FRSK cells. The bottom figure shows the histograms for FRSK in more detail.

- (4) Mild treatments with jasplakinolide, which stabilizes the actin filaments, reduced the macroscopic diffusion coefficient, without strongly affecting the compartment size, by decreasing the hop frequency [12,37,39].
- (5) As mentioned in point 8 for the membrane-skeleton fence model (oligomerization-induced trapping found for E-cadherin), the oligomerization of DOPE by crosslinking gold probes considerably reduced the inter-

compartmental hop rate, without affecting the compartment size, which thus decreased the macroscopic diffusion coefficient [37]. This entails the oligomerization-induced trapping of a phospholipid. This dependence of the diffusion coefficient on the diffusant size can easily be explained by the anchored-protein picket model, due to the steric effects, but not by other models.

- (6) The hop diffusion is not affected by removing the major fraction of the extracellular domains of transmembrane proteins and the extracellular matrix [12,37], indicating that these are not the major causes for the induction of hop diffusion.
- (7) The removal of cholesterol has no major effects on the hop diffusion [12, 37], suggesting that lipid rafts are not the primary causes for membrane compartmentalization or hop diffusion.
- (8) The compartment sizes detected by transmembrane proteins (transferrin receptor,  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor) and the phospholipid DOPE are the same in all of the cell types examined thus far ([12, 48], Fujiwara, Iwasawa, and Kusumi, unpublished observations, Murase and Kusumi, unpublished observations), supporting the membrane-skeleton fence and anchored-protein picket models.
- (9) Monte Carlo simulations reproduced the experimentally observed residency times when only 20–30% of the compartment boundaries were occupied by the anchored transmembrane protein pickets [12,37,39]. This represents the anchoring of only about 15% of the total transmembrane proteins in the plasma membrane.
- (10) The instances of hops are clearly visible and also are detectable with a computer program in the analysis of single-molecule observations with sufficient time resolution [12,37].

The anchored transmembrane protein pickets would be operative on any molecules incorporated in the membrane, including transmembrane proteins. Therefore, the diffusion of transmembrane proteins will be doubly suppressed in the membrane. Both the fence and picket will act on transmembrane proteins.

The oligomerization-induced trapping described above in point (5) indicates that the intercompartmental hop rate, or the residency time within a compartment, strongly depends on the oligomer size. Therefore, the correct residency time for monomeric DOPE (or other molecules) within a compartment was estimated, using the macroscopic diffusion coefficient obtained from single fluorescent-molecule tracking (SFMT) at a video rate and the compartment size obtained from the high-speed SPT (this should not be affected



by oligomerization) with the use of the equation  $[\text{compartment size}]^2/4D$ . In the slow frame-rate regime, the diffusing molecule can be modeled as that hopping between the centers of adjacent compartments. This was necessary because, with single fluorophore observations, obtaining trajectories with both a sufficient length and time resolution is difficult, due to poor signal-to-noise ratios and photobleaching.

How universal is this plasma membrane compartmentalization? Using the unsaturated phospholipid DOPE, Murase et al. [37] found such plasma membrane compartmentalization in all of the nine mammalian cells they examined. This list has slightly expanded since then, and in the 11 types of cultured mammalian cells we have analyzed, we detected the hop diffusion of DOPE incorporated in the plasma membrane. Among the different cell types, the compartment size varies greatly, from 30 nm up to 230 nm, and the residency time of DOPE varies between 1 and 17 ms.

Several recent studies reported the failure to detect such hop diffusion, but the experimental methods employed in these studies appear to be suboptimal, with unsuitable spatial resolutions, low frame rates, short overall observation durations for a single molecule, and wrong time scales for tracking etc [30, 78, 79].

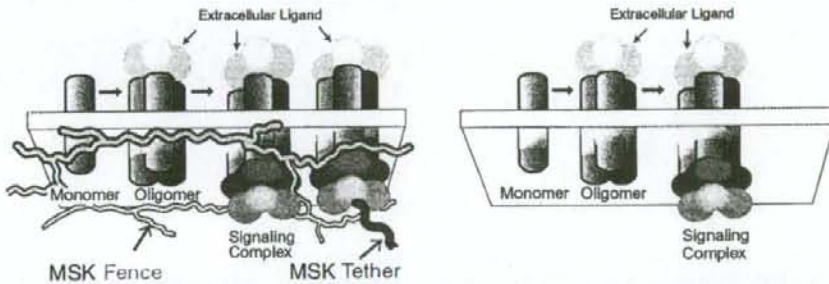
## 19.7

### The Biological Significance of Oligomerization-Induced Trapping Based on the Membrane-Skeleton Fences and Pickets

In the earlier part of this review, it was stated that one of the two long-standing problems for biophysicists studying molecular diffusion in the plasma membrane is that we do not understand why the macroscopic diffusion coefficients considerably decrease when membrane molecules, including receptor molecules and other signaling molecules in the membrane, form oligomers or molecular complexes [17, 18, 40]. These observations are completely opposite from the general view of membrane biophysicists. The theory by Saffman and Delbrück (1975) and experiments by Peters and Cherry [43] and Vaz et al. [75] consistently showed that translational diffusion is very *insensitive* to the diffusing size.

The partitioning of the plasma membrane into many small compartments could explain why the diffusion in the plasma membrane is very sensitive to oligomerization or the formation of molecular complexes (Figure 19.11, left), in contrast to the prediction from the two-dimensional continuum fluid model (Figure 19.11, right). These points have been already touched upon as evidence to support the fence and picket models, but they are more comprehensively described here. Monomers of membrane molecules may hop across the

picket-fence with relative ease, but upon oligomerization or molecular complex formation, the oligomers or the complexes as a whole, rather than single molecules, have to hop across the picket-fence all at once, and therefore, much more free space that lasts longer is required for the passage of these oligomers across the picket-fence of the intercompartmental boundary. Hence, these complexes are likely to have a much slower rate of hopping between the compartments, as found with oligomers of DOPE [37]. In addition, molecular complexes are more likely to be bound or tethered to the membrane skeleton, perhaps temporarily, which also induces (temporary) immobilization or trapping of molecular complexes. Such enhanced confinement and binding effects induced by oligomerization or molecular complex formation were collectively termed "oligomerization-induced trapping" [18,24].



**Figure 19.11** Oligomerization-induced trapping model, indicating how slowing or immobilization of membrane molecules may be induced upon oligomerization or the formation of greater molecular complexes. Upon oligomerization or molecular complex formation (left), the hop rate across the intercompartmental barrier would be reduced greatly, because, in contrast to monomers, in the case of molecular complexes, all of the molecules that form the complex have to hop across the picket-fence simultaneously, which re-

quires greater and longer openings in the intercompartmental boundaries. In addition, due to the avidity effect, molecular complexes are more likely to be tethered to the membrane skeleton, perhaps temporarily, which also reduces their overall diffusion rate. This enhanced confinement and the binding effects induced by oligomerization or molecular complex formation are collectively termed "oligomerization-induced trapping" [18]. This would not occur in the absence of membrane skeleton fences and pickets (right).

This oligomerization-induced trapping might play very important roles in the temporary localization of signal transduction complexes (Figure 19.11, left). When an extracellular signal is received by a receptor molecule, the receptor often forms oligomers and signaling complexes by recruiting cytoplasmic signaling molecules. Due to the "oligomerization-induced trapping", these oligomeric complexes tend to be trapped in the same membrane skeleton compartment as that where the extracellular signal was initially received. Therefore, the membrane skeleton fence and the anchored transmembrane-protein pickets help to temporarily localize the initiation of the cytoplasmic signal to the place where the extracellular signal was received. Such spatial



confinement is particularly important for signals that induce local or polarized reorganization of the cytoskeleton or chemotactic events.

This would not occur in the absence of membrane skeleton fences and pickets (Figure 19.11). If there were no such structures, then even when the signaling complex is formed, the diffusion rate of such a complex would be almost the same as that of the single receptor molecules, as diffusion theory teaches us (Saffman and Delbrück, 1975).

Therefore, in the plasma membrane, oligomerization or molecular complex formation is tied to immobilization by the membrane skeleton fence and anchored-protein pickets.

### 19.8

#### **A Paradigm Shift of the Plasma Membrane Structure Concept is Necessary: From the Simple Two-dimensional Continuum Fluid Model to the Compartmentalized Fluid Model**

As described above, the membrane-skeleton "fence" and the anchored-protein "picket" together solved the two long-standing problems of molecular diffusion in the plasma membrane: (1) the oligomerization-induced slowing of diffusion and (2) the reduced diffusion coefficients of membrane molecules in the plasma membrane, relative to those found in artificial membranes, by a factor of  $\sim 20$ . These results could not be explained by the two-dimensional continuum fluid model. The two-dimensional continuum fluid model is just fine, as long as the spatial scale is limited to the size of the original cartoon depicted by Singer and Nicolson ([66], although at the smaller limit of the molecular scale, the continuum model would also fail), which is about  $10 \text{ nm} \times 10 \text{ nm}$ , based on the number of lipid molecules in the cartoon (Figure 19.3 inset). However, in spatial scales over several 10s of nm in the plasma membrane, simple-minded extensions of the fluid-mosaic model of Singer and Nicolson and the theory by Saffman–Delbrück fail. The cell seems to have developed (during evolution) means to control the long-range diffusion of membrane molecules and to make this control sensitive to the diffusant size. The long-range control of diffusion appears to be carried out by the actin-based membrane skeleton, as indicated by the partitioning (corralling) effect of the membrane skeleton and the rows of anchored-protein pickets.

Furthermore, when the cell needs to build a macroscopic diffusion barrier that blocks the diffusion of even phospholipids over the barrier region, like that found in the initial segment region of the neuronal cell membrane, the cell achieves this task by forming very dense picket-fences in the barrier region, effectively blocking the diffusion of membrane molecules across this region [19, 39, 80].

As such, a paradigm shift for the concept of plasma membrane structures in the space scales greater than 10 nm is required, from the two-dimensional continuum fluid to the compartmentalized fluid, in which its constituent molecules undergo hop diffusion over the compartments.

An important corollary of these results is that all of the diffusion coefficients obtained by FRAP, single-molecule techniques at slow rates (like a video rate), or fluorescence correlation spectroscopy (FCS) must be considered as "the effective diffusion coefficients", which may be useful only when the involved time-space window is specified [10, 12, 15, 38, 54, 55, 62, 67]. One should be clearly aware that membrane molecules do *not* undergo simple Brownian diffusion, although they may undergo "effective simple Brownian diffusion" in limited time-space windows, generally in time scales longer than several 10s of milliseconds and in spatial scales greater than 0.3  $\mu\text{m}$ .

We emphasized the importance of tracking single molecules at enhanced frame rates. Thus far, the frame rate has been up to 40 000 frames per second (fps, 25  $\mu\text{s}$ /frame) for single-particle tracking and 300 fps for single fluorescent-molecule tracking. The improvements have been continued in our laboratory, and currently, the frame rates are 250 000 fps (4  $\mu\text{s}$ /frame) for single-particle tracking and 20 000 fps (50  $\mu\text{s}$ /frame) for single fluorescent-molecule tracking. Since the rotational (reorientational) correlation times for monomeric proteins in the membrane (monomeric rhodopsin in reconstituted membranes, Kusumi and Hyde [21], Kusumi et al. [23] and for 40-nm colloidal gold particles in water are both about a few microseconds, further improvements in the frame rate would make the tracking too sensitive to rotational diffusion, and obscure the true displacement of molecules in space. Therefore, this time resolution of 4  $\mu\text{s}$  is just about the useful limitation of the frame rate in studying molecular diffusion in the cell membrane using single-particle tracking. In the present article, we pay special attention to the short-range regulation mechanisms. However, the cell might also use some means for long-range regulations, perhaps combining the corralling and dragging effects of the cytoskeleton [24, 27]. For the detection of such long-range mechanisms, slower rate of observations would be required.

### Acknowledgments

This research was supported in part by Health and Labour Sciences Research Grant nano-001 to N. Morone, and Grants-in-Aid for Scientific Research from the MEXT to N. Morone and A. Kusumi, and that on Priority Areas from the MEXT to A. Kusumi.



## References

- 1 Borgdorff, A.J., and Choquet, D. *Nature* 2002, 417, 649–53.
- 2 Bussell, S.J., Hammer, D.A., and Koch, D.L. *J. Fluid Mech.* 1994, 258, 167–190.
- 3 Bussell, S.J., Koch, D.L., and Hammer, D.A. *Biophys. J.* 1995, 68, 1836–49.
- 4 Dumas, F., Destainville, N., Millot, C., Lopez, A., Dean, D., and Salome, L. *Biophys. J.* 2003a, 84, 356–66.
- 5 Dumas, F., Destainville, N., Millot, C., Lopez, A., Dean, D., and Salome, L. *Biochem. Soc. Trans.* 2003b, 31, 1001–5.
- 6 De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Moeremans, M., and De Mey, J. *Cytobios.* 1985, 43, 273–83.
- 7 De Brabander, M., Nuydens, R., Geerts, H., and Hopkins, C.R. *Cell Motil. Cytoskelet.* 1988, 9, 30–47.
- 8 De Brabander, M., Nuydens, R., Ishihara, A., Iffelfield, B., Jacobson, K., and Geerts, H. *J. Cell Biol.* 1991, 112, 111–24.
- 9 Dietrich, C., Volovky, Z.N., Levi, M., Thompson, N.L., and Jacobson, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98, 10642–7.
- 10 Feder, T.J., Brust-Mascher, I., Slattery, J.P., Baird, B., and Webb, W.W. *Biophys. J.* 1996, 70, 2767–73.
- 11 Frick, M., Schmidt, K., and Nichols, B.J. *Curr. Biol.* 2007, 17, 462–7.
- 12 Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., and Kusumi, A. *J. Cell Biol.* 2002, 157, 1071–81.
- 13 Gambin, Y., Lopez-Esparza, R., Reffay, M., Sieracki, E., Gov, N.S., Genest, M., Hodges, R.S., and Urbach, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103, 2098–102.
- 14 Gelles, J., Schnapp, B.J., and Sheetz, M.P. *Nature* 1988, 331, 450–3.
- 15 Ghosh, R.N., and Webb, W.W. *Biophys. J.* 1994, 66, 1301–18.
- 16 Harms, G.S., Cognet, L., Lommerse, P.H., Blab, G.A., Kahr, H., Gamsjäger, R., Spaink, H.P., Soldatov, N.M., Romanin, C., and Schmidt, T. *Biophys. J.* 2001, 81, 2639–46.
- 17 Hegener, O., Prenner, L., Runkel, F., Baader, S.L., Kappler, J., and Ilaberlein, H. *Biochemistry* 2004, 43, 6190–9.
- 18 Iino, R., Koyama, I., and Kusumi, A. *Biophys. J.* 2001, 80, 2667–77.
- 19 Kobayashi, T., Storrie, B., Simons, K., and Dotti, C.C. *Nature* 1992, 359, 647–50.
- 20 Kucik, D.F., Elson, E.L., and Sheetz, M.P. *Nature* 1989, 340, 315–7.
- 21 Kusumi, A., and Hyde, J.S. *Biochemistry* 1982, 21, 5978–83.
- 22 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.* 2005, 34, 351–78.
- 23 Kusumi, A., Sakaki, T., Yoshizawa, T., and Ohnishi, S. *J. Biochem. (Tokyo)* 1980, 88, 1103–11.
- 24 Kusumi, A., and Sako, Y. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996, 8, 566–74.
- 25 Kusumi, A., Sako, Y., and Yamamoto, M. *Biophys. J.* 1993, 65, 2021–40.
- 26 Kusumi, A., Subczynski, W.K., and Hyde, J.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982, 79, 1854–58.
- 27 Kusumi, A., Suzuki, K., and Koyasako, K. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999, 11, 582–90.
- 28 Lee, C.C., and Petersen, N.O. *Biophys. J.* 2003, 84, 1756–64.
- 29 Lee, G.M., Zhang, F., Ishihara, A., McNeil, C.L., and Jacobson, K.A. *J. Cell Biol.* 1993, 120, 25–35.
- 30 Lenné, P.F., Wawrezynieck, L., Conchonaud, F., Wurtz, O., Boned, A., Guo, X.J., Rigneault, H., He, H.T., and Marguet, D. *EMBO J.* 2006, 25, 3245–56.
- 31 Lindblom, G., Johansson, L.B., and Arvidsson, G. *Biochemistry* 1981, 20, 2204–7.
- 32 Lommerse, P.H., Vastenhouw, K., Pirinen, N.J., Magee, A.L., Spaink, H.P., and Schmidt, T. *Biophys. J.* 2006, 91, 1090–7.
- 33 Martin, D.S., Forstner, M. B., and Käs, J. A. *Biophys. J.* 2002, 83, 2109–17.
- 34 Mashanov, C.I., Tacon, D., Peckham, M., and Molloy, J.F. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 15274–80.
- 35 Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J., and Kusumi, A. *J. Cell Biol.* 2006, 174, 851–62.
- 36 Murakoshi, H., Iino, R., Kobayashi, T., Fujiwara, T., Ohshima, C., Yoshimura, A., and



- Kusumi, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101, 7317–22.
- 37 Murase, K., Fujiwara, T., Umemura, Y., Suzuki, K., Iino, R., Yamashita, H., Saito, M., Murakoshi, H., Ritchie, K., and Kusumi, A. *Biophys. J.* 2004, 86, 4075–93.
- 38 Nagle, J.F. *Biophys. J.* 1992, 63, 366–70.
- 39 Nakada, C., Ritchie, K., Oba, Y., Nakamura, M., Ito, Y., Iino, R., Kasai, R.S., Yamaguchi, K., Fujiwara, T., and Kusumi, A. *Nat. Cell Biol.* 2003, 5, 626–32.
- 40 Nelson, S., Horvat, R.D., Malvey, J., Roess, D.A., Barisas, B.G., and Clay, C.M. *Endocrinology* 1999, 140, 950–957.
- 41 Nishimura, S.Y., Vrljic, M., Klein, I.O., McConnell, H.M., and Moerner, W.E. *Biophys. J.* 2006, 90, 927–38.
- 42 Paller, M.S. *J. Membr. Biol.* 1994, 142, 127–35.
- 43 Peters, R., and Cherry, R.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982, 79, 4317–21.
- 44 Powles, G.J., Mallett, M.J.D., Rickayzen, G., and Evans, W.A.B. *Proc. R. Soc. Lond. A* 1992, 436, 391–403.
- 45 Qian, H., Sheetz, M.P., and Elson, F.L. *Biophys. J.* 1991, 60, 910–21.
- 46 Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.C. *Cell* 1992, 68, 673–82.
- 47 Saffman, P.G. and Delbrück, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975, 72, 3111–3.
- 48 Sako, Y., and Kusumi, A. *J. Cell Biol.* 1994, 125, 1251–64.
- 49 Sako, Y., and Kusumi, A. *J. Cell Biol.* 1995, 129, 1559–74.
- 50 Sako, Y., Minoghchi, S., and Yanagida, T. *Nat. Cell Biol.* 2000, 2, 168–72.
- 51 Sako, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Takeichi, M., and Kusumi, A. *J. Cell Biol.* 1998, 140, 1227–40.
- 52 Saxton, M.J. *Biophys. J.* 1989, 55, 21–8.
- 53 Saxton, M.J. *Biophys. J.* 1990, 57, 1167–77.
- 54 Saxton, M.J. *Biophys. J.* 1994, 67, 2110–9.
- 55 Saxton, M.J. *Biophys. J.* 1996, 70, 1250–62.
- 56 Saxton, M.J. *Biophys. J.* 1997, 72, 1744–53.
- 57 Saxton, M.J., and Jacobson, K. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1997, 26, 373–99.
- 58 Schmidt, K., and Nichols, B.J. *Curr. Biol.* 2004, 14, 1002–6.
- 59 Schmidt, T., Schutz, G.J., Baumgartner, W., Gruber, H.J., and Schindler, H. *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 17662–17668.
- 60 Schnapp, B.J., Gelles, J., and Sheetz, M.P. *Cell Motil. Cytoskelet.* 1988, 10, 47–53.
- 61 Schutz, G.J., Kada, G., Pastushenko, V.P., and Schindler, H. *EMBO J.* 2000, 19, 892–901.
- 62 Sheets, E.D., Lee, G.M., Simson, R., and Jacobson, K. *Biochemistry* 1997, 36, 12449–58.
- 63 Sheetz, M.P. *Semin. Hematol.* 1983, 20, 175–188.
- 64 Sheetz, M.P., Schindler, M., and Koppel, D.E. *Nature* 1980, 285, 510–1.
- 65 Sheetz, M.P., Turney, S., Qian, H., and Elson, E.L. *Nature* 1989, 340, 284–8.
- 66 Singer, S.J., and Nicolson, G.L. *Science* 1972, 175, 720–31.
- 67 Suzuki, K., Ritchie, K., Kajikawa, E., Fujiwara, T., and Kusumi, A. *Biophys. J.* 2005, 88, 3659–80.
- 68 Suzuki, K.G., Fujiwara, T.K., Edidin, M., and Kusumi, A. *J. Cell Biol.* 2007a, 177, 731–42.
- 69 Suzuki, K.G., Fujiwara, T.K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., and Kusumi, A. *J. Cell Biol.* 2007b, 177, 717–30.
- 70 Takeuchi, M., Miyamoto, H., Sako, Y., Komizu, H., and Kusumi, A. *Biophys. J.* 1998, 74, 2171–83.
- 71 Tank, D.W., Wu, E.S., and Webb, W.W. *J. Cell Biol.* 1982, 92, 207–12.
- 72 Tomishige, M., Sako, Y., and Kusumi, A. *J. Cell Biol.* 1998, 142, 989–1000.
- 73 Tsuji, A., Kawasaki, K., Ohnishi, S., Merkle, H., and Kusumi, A. *Biochemistry* 1988, 27, 7447–52.
- 74 Tsuji, A., and Ohnishi, S. *Biochemistry* 1986, 25, 6133–9.
- 75 Vaz, W.L., Criado, M., Madeira, V.M., Schoellmann, G., and Jovin, T.M. *Biochemistry* 1982, 21, 5608–12.
- 76 Vaz, W.L., Goodsaid-Zalduendo, F., and Jacobson, K. *FEBS Lett.* 1984, 174, 199–207.
- 77 Vrljic, M., Nishimura, S.Y., Brasselet, S., Moerner, W.E., and McConnell, H.M. *Biophys. J.* 2002, 83, 2681–92.
- 78 Wenger, J., Conchonaud, F., Dintinger, J., Wawrezinieck, L., Ebbesen, T.W., Rigneault,

- H., Marguet, D., and Lenne, P.F. *Biophys. J.* 2007, 92, 913–9.
- 79 Wieser, S., Moertelmaier, M., Fuertbauer, E., Stockinger, H., and Schutz, G.J. *Biophys. J.* 2007, 92, 3719–28.
- 80 Winckler, B., Forscher, P., and Mellman, I. *Nature* 1999, 397, 698–701.
- 81 Wu, E.S., Tank, D.W., and Webb, W.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 4962–6.

# 蛍光プローブ開発秘話：Pericam

## Anecdote of fluorescent probe development : Pericam

永井健治

### Ⅱ I. 研究事始め

#### 1. 卒業研究のころ

筆者が蛍光プローブの開発をはじめたきっかけを説明するには、1991年の筑波大学での卒業研究までさかのぼらなければならない。散逸構造論や反応拡散理論を(ちょっと)かじってプリゴジンやチューリングなどにすっかり傾倒していた筆者は、卒業研究をするならその生物学への展開がおもしろいだろうと考えた。そして、レニン-アンジオテンシン系の研究で有名な村上和雄博士(筑波大学名誉教授)の研究室にて講師をされていた上野直人博士(現 基礎生物学研究所 教授)の指導のもと、「アフリカツメガエルにおける中胚葉誘導の分子生物学的解析」を卒業研究に選んだ。分泌蛋白質アクチビンが濃度依存的に異なる中胚葉組織パターンを誘導する現象は、まさにうってつけの題材だったからである。

ところが、研究を開始して3カ月もしないうち、自分自身の研究に疑問をもつようになった。結局、筆者のやっていることは「遺伝子の過剰発現や欠損などの摂動をあてえて、表現型やほかの遺伝子発現がどうなるかを確認し、その遺伝子の役割を確定する」だけじゃないかと、もちろん重要な研究だけれども、それではある生理現象の原因と結果を調べているだけで、その途中でなにが起きているのか

はブラックボックスのまま、まさに、背に背中に手が届かない感じである。チューリングの反応拡散論的な観点でパターン形成を理解するには、静的な(死んだ)試料を解析してはだめで、アクチビンのような中胚葉誘導因子がどのように分泌されて濃度勾配を形成していくのかを、生きたアフリカツメガエル胚のなかでとらえていくことがなによりも肝要である。さらに、中胚葉誘導因子の濃度情報が細胞内でどのようにデコードされていくのかも、シグナル伝達にかかわる蛋白質がくりだすネットワークの機能を可視化することで理解する必要がある。

当時の解析技術ではできなかったことを、研究室の同級生や先輩に声を大にして語っていたのが、昨日のこのように思い出される。青い才が偉そうなことをぬかしていたので、研究室の助手が、毎日、肩間に皺を寄せていたのはいうまでもない。「永井、おまえは偉そうな口を叩くまえに言われたことをやれ」とか「おまえが考えることくらいすでに誰かが考えてやっているんだよ」と、よく説教されたものである。事実、すでにこのとき、近藤 滋博士(現 名古屋大学 教授)が、チューリングの反応拡散理論で熱帯魚の皮膚模様を説明する研究を展開しつつあった。

#### 2. X線顕微鏡法との出会い

そんな折、筑波大学物理工學系の青木貞雄博士がX線顕微鏡の開発を行なっていると、上野博士が紹介してくれた。可視光よりも波長がはるかに短いX線を用いれば、理論上は生きた個体のなかの現象を分子レベルの空間分解能で観測することができるのではないかと胸を躍らせ、上野博士に懇願して青木研への学内留学を許可してもらった。卒業研究から一転、修士課程では、青木研自作の撮人投影型X線マイクロ(干渉ウォルターミラー型X線顕微鏡などの機

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

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



械に囲まれ、青木研の学生らと格闘しながらアフリカツメガエルの胚やショウジョウバエの蛹、大腸菌などのイメージングを試みた。X線吸収端微細構造(X-ray absorption near edge structure; XANES)の差解析によるアフリカツメガエル胚内の元素分析や、金コロイド標識抗体を用いた特定蛋白質の画像化などに成功し、修士論文としてまとめることができた。しかし、2年の研究期間で到達できたのは、“固定した(死んだ)”アフリカツメガエル胚の断層撮影<sup>1)</sup>がやっつであり、分子レベルで生きた試料のなかの現象を観る夢は実現しなかった。とはいえ、そのあいだに学んだ光学の知識がいまごろ役に立っていると思うと、無駄な2年間ではなかったといえる。

### 3. 分子生物学的手法の修得

そのうち、土野博士からの“永井さー、おまえのやろうとしていることは15年早いんだよ。自分のラボをもってからはじめても遅くない。いまはもうちょっと現実をみつめた研究をしておいたほうがいいぞ”との言葉に、“なんで10年や100年やなくて15年やねん?”と思いつつも(心にもなく)改心し、博士課程では遅ればせながら分子生物学なるものをしっかり身につけようと、東京大学医科学研究所の御子柴克彦博士に師事した。御子柴博士は、当時、3カ所(白金、目黒、筑波)で研究室を構えていた。筆者は理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センターで神経発生にかかわる研究を行なうことになり、ジंकフィンガー型転写因子Zicの相同遺伝子クローニング<sup>2)</sup>、発現解析<sup>3)</sup>、ノックアウトマウスの作製と解析<sup>4)</sup>を行ない、分子生物学のイロハの習得に余念がなかった。

バイオイメージングとは無縁な研究生生活を送っていたところ、筆者の心を揺るがす衝撃的な論文があいついで発表された。1994年のGFP (green fluorescent protein, 緑色蛍光蛋白質)異所性発現<sup>5)</sup>、1995年の全反射顕微鏡による1分子蛍光イメージング<sup>6)</sup>、1997年の蛋白質性Ca<sup>2+</sup>指示薬の開発<sup>7)</sup>である。早速、GFP遺伝子をもらって大腸菌に発現させるもたいして光らず、“なんやこんなもんかいな?”と失望した記憶がある。蛋白質性Ca<sup>2+</sup>指示薬の論文は、同じ御子柴研究室の宮脇敦史博士(当時 東京大学医科学研究所、現 理化学研究所脳科学総合研究センター)が留学先の米国California大学San Diego校Tsien研究室で行なった研究で、*Nature*誌に発表されたため研究室内で大きな話題

になった[編集部注: Roger Y. Tsien博士は、GFPの発見と開発により、2008年ノーベル化学賞を受賞した。本誌今月号p.78、宮脇敦史、〈Laureate〉2008年ノーベル化学賞: GFP史話も参照されたい]。時代は確実に自らが卒業研究のときに考えていた方向にむかっていると、このとき確信した。

### 4. 宮脇博士との邂逅

1998年、博士号を無事に取得するのとときを同じくして、宮脇博士が米国から御子柴研究室に戻ってきた。これ幸いと、海外留学を考えていた筆者はバイオイメージング関連の研究室の情報を知りたく、“日本語の”電子メールで連絡をとったところ、“Why don't you come here on coming Saturday?”と、すべて英語で書かれた返事が返ってきた。“なんやこのおっさん? アメリカかぶれて日本語でへんようになったんか?”と訝しがりつつも、東京大学医科学研究所のオフィスを訪れた。会って話をはじめると、予想に反して日本語は(筆者より)達者で、すっかり疑念は晴れた。筆者が当時もっていた組織特異的な細胞破壊法のアイデアにはじまり、発生学、散逸構造論やX線顕微鏡の生物応用、バイオイメージング研究の動向、それに、今後有望な世界の研究室など、多岐にわたって話しあった。どの話題にも食いついてきて的確なコメントを返し、かつ、即興の実験アイデアをポンポン出すところから、並の頭脳ではないなと感心していると、“今度の春、理化学研究所で研究室を立ち上げるんだけど、いっしょに研究しない? 海外留学したってたいしたことできないけど、僕のところにすればおもしろい研究ができるよ”と予想だにしない言葉もらった。“海外の留学先で*Nature*だしとるくせに、なにぬかしとんねん!”と内心では突っ込みつつ、あくまでも海外留学が頭にあった筆者はおおいに迷った。こういうときこそボスに相談するものだろうと、筑波に帰ってから御子柴博士に電話した。しかし、“宮脇のところに行ったら研究室の立ち上げからはじまるし、FRETはトリッキーだから間違いないく4年は論文でないぞ!”と脅され、迷いは拭きされるどころか、ますます深まってしまった。そのあともあれこれ悩んだが、一向に埒があかない。考えるだけ時間の無駄と思い、数日後には“えーい、こうなったらいちかばちかだ!”と宮脇研究室への“留学”を決心した。それから3カ月後、筆者は住み慣れた茨城の地を離れ、板橋に居を移し、

1999年3月下旬に理化学研究所本所の脳科学総合研究センターでの研究をスタートした。以下は、それからはじまるブロープ開発ストーリーである。

## II. $Ca^{2+}$ 指示薬Pericamの開発秘話

### 1. 宮脇研究室事始め

いまは伐採されて一部を残すのみとなっていたが、当時の理化学研究所本所・研究本館の南側はさながら桜林となっており、気の早いグループが五分咲きの桜をまえに花見を楽しんだりしていた。その桜林の南側にひととき大きな建物が建設中であつた。その建物こそが、研究室が入ることになっている脳科学総合研究センター中央棟であつた。建物ができていないので、もちろん実験室はまだなく、東棟の地下1階の部屋の一角を間借りしていた。実験ができないし、何をテーマに研究するかも決まっていなかったの、とにかくGFP研究の現状を把握しようと思ひ、せっせと関係する論文、総説、教科書を読みまくった。また、週一度、ラボメンバー（ポストドク5人、テクニカルスタッフ3人）が集合して、宮脇博士の講義を聴講した。蛍光の理論、GFP、FRET、OCT、ビーコン、2光子励起、レシオイメージング、緩和法、ケージド化合物など、宮脇博士の気のおもむくままの講義であつたが、どれも非常におもしろかつた。このようにビバットマンを握らない生活が3カ月

も続いた。実験をしないから、なにもデータはでない。溜まるのは知識だけ。しかし、ここで蓄積した知識はそのうち多に役立つことになつた。

### 2. 研究テーマの決定

6月に入って中央棟の1期工事が完成し、ようやく研究室のセットアップが開始された。什器が入り、実験台が入り、測定機器が入り、じわじわと研究室らしくなつていく。そのころには、筆者の最初の研究テーマが決まりつつあつた。“GFPの円順列変異体を利用した $Ca^{2+}$ 指示薬の開発”と“活性化型カスパーゼ3による組織特異的な細胞破壊法の開発”の2つである。それぞれ、宮脇博士と筆者とが提案したものであつた。本稿は蛍光ブロープ開発に関するものなので、後者は割愛し前者にしばって話を進める。

円順列変異とは、蛋白質の内部の適当な位置で切断し、N末端とC末端とをひっくり返してつなげる変異のことである(図1a)。すでに宮脇博士の留学先だつたTsien研究室では、GFP円順列変異体の作製に関してプロジェクトが進行しているとのことだつたので、同じことを行なうことへの不安がないわけではなかつた。しかしながら、今回のプロジェクトではそのGFP円順列変異体をさらに改変して $Ca^{2+}$ 感受性をもたせようというもので、Tsienからは了承を得ているらしい。FRETを応用した $Ca^{2+}$ 指示薬Cameleonとは異なる方法で指示薬を作製するという目論見である。 $Ca^{2+}$

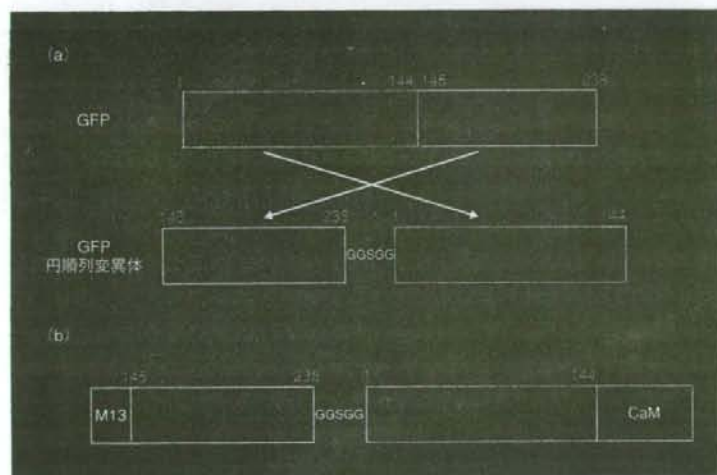


図1 GFPの円順列変異体とPericamの構造

(a) PericamのもととなつたGFP円順列変異体  
(b) Pericamの構造。カルモジュリン(CaM)ペプチドとM13ペプチドをGFP円順列変異体のN末端とC末端とに連結することで $Ca^{2+}$ 感受性が生じる



センサーとしては、Cameleonと同様、カルモジュリン (calmodulin; CaM) ペプチドとM13ペプチドを利用し、それぞれをGFP円順列変異体のN末端とC末端とに連結することでCa<sup>2+</sup>感受性が生まれる“だろう”というアイデアであった(図1b)。GFP初心者筆者にはその理論背景がまったくわからなかった。宮脇博士に質問してみた。返答は“円順列変異でGFPのβバレル構造に口を設ける。上唇と下唇の部分にカルモジュリンとM13をつなげるとCa<sup>2+</sup>依存的な相互作用でその口が塞がれてしまう。そうすると蛍光特性が変わるんだ”というものであった(図2)。文字どおり“煙に巻く”ような、よくわからない説明であった。でも、やってみるとわからんし、やっているうちに頭がついてくるようになる、というのが筆者の信条なので、理解が不完全なまま遺伝子の構築にとりかかった。

### 3. 研究開始

6月24日、研究開始。まずは、Cameleon (YC2.1) を鋳型にカルモジュリンとM13をPCRで増やして、大腸菌発現ベクターに挿入した。並行して、同じ研究室の沢野朝子さんが、GFPの各波長変異体6種類を用いて145番目のアミノ酸残基を新たなN末端とする円順列変異体(コードネーム:p54A1, p54B1, p54C1, p54D1, p54E1, p54G1)を作製した。それらをもって、カルモジュリンとM13のあいだに挿入し、コードネームCM2-p54X (X=A, B, C, D, E, G)と名づけた遺伝子を構築した。それら大腸菌に形質転換して、数日後、コロニーがたくさんでいる寒天プレートに紫外線イルミネーターのうえに置くと、3種類のコンストラクトがうっすら光っていた。しかも、それぞれ違う色を発していた。博士課程のときに野生型GFPを発現させて失望したときは異なり、ある種の感動を覚え、“うわー、めっちゃすんげー”と唸っていたのはいうまでもない。気をよくして、蛍光性コロニーをピックアップして大量培養したのち、蛋白質を精製した。やはり、波長変異体ごとに溶液の色づきが異なり、CM2-p54C > CM2-p54B > CM2-p54Dの順番で溶液の色は濃かった。それぞれECFP (enhanced cyan fluorescent protein), EGFP (enhanced green fluorescence protein), EYFP (enhanced yellow fluorescent protein)の由来である。残りは色がついていない。早速、蛍光分光光度計で、Ca<sup>2+</sup>があるときとないときの蛍光スペクトルを測定した。ところが…まったく変化がない。

一気に落胆である。“どだいそんな簡単にアイデアが実現できるわけないわな。このプロジェクトは中止か? いや待てよ。一応ちゃんと蛋白質ができているかSDS-PAGEで調べておこう”と気を取り直し、調べてみると…カルモジュリンがちぎれた蛋白質ができてることがわかった。Ca<sup>2+</sup>に反応しないのは当たり前である。

そこで、培養温度を変えたり、フラスコの回転数を変えたり、IPTGの濃度を変えたりと、蛋白質を発現させる条件をいろいろ検討してみたが、やはり結果は同じ。“ほんだからカルモジュリンとM13をひっくり返したらどうやろう?”と、早速コンストラクト(MC2-p54X)を作製して蛋白質を精製し、蛍光測定した。すると、Ca<sup>2+</sup>の有無でちゃんと蛍光強度が変化するではないか! とくに、MC2-p54CとMC2-p54Dが大きな変化(それぞれ、1.6倍と2.8倍)を示した。

ときは7月21日。研究開始からわずか1カ月でプレリミナリーなデータをとることができた。嬉しさのあまり宮脇博士に報告すると、たいして嬉しくなさそうに“生きた細胞のなかで変化がみられないとだめだね”と労いの言葉もなし。“おっしゃー、もっとええデータとったるでえー”と自らを励まし、MC2-p54CとMC2-p54Dを哺乳類の培養細胞に発現させるべく、遺伝子のサブクローニングを開始した。遺伝子構築が終了し、いよいよイメージング実験である。顕微鏡は研究室に入ったばかりのオリンパス社IX-70で、Roper Scientific社のMicroMaxカメラがついていた。また、画像取得やデバイス制御用にMolecular Devices社のMetaFluorがインストールされていた。どれもはじめて使用するの、要領を得るまではたいへんだった。しかし、何度かの試行錯誤ののち、8月23日にポジティブデータを得ることに成功した。MC2-p54CまたはMC2-p54Dを発現するHeLa細胞にヒスタミン刺激をすると、いずれも蛍光強度が明らかに上昇した。MC2-p54Dにいたっては、蛍光強度の明滅っぽいものまでみられた。もしかしたらCa<sup>2+</sup>振動がみえているのではと、もう喜びを通り越して感動を覚えていた。当然、宮脇博士にすぐさま報告。すると、“これじゃーまだまだ、10倍くらいシグナルが変化しないと駄目だね。fluo-3なんて100倍以上も変化するよ”だってさ…。確かに、蛍光強度の変化はわずかだったけど、もうちょっと喜んでくれてもええんちゃうん…。

そのときは憤りを感じたが、頭が単純なのだろうか、翌



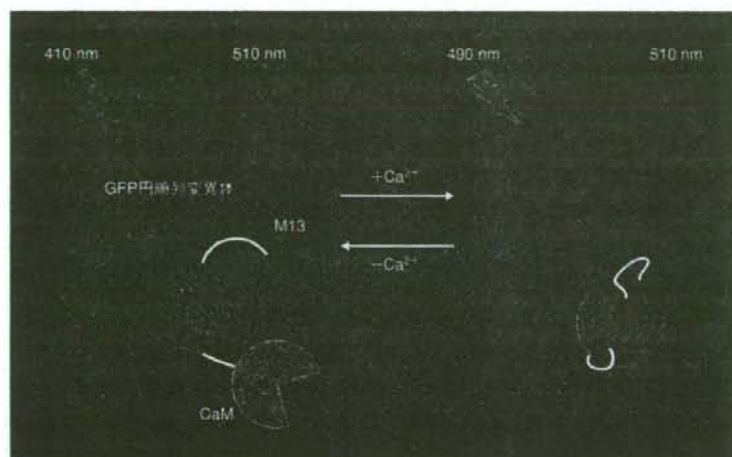


図2 Pericamの動作機構

円順列変異でGFPのβバレル構造に口を設け、上唇と下唇の部分にカルモジュリン(CaM)ペプチドとM13ペプチドをつなげる。Ca<sup>2+</sup>依存的な相互作用でその口が塞がれると、蛍光特性が変わる。

日にはそのことをすっかり忘れてつぎの作戦開始。YFP円順列変異体内のリンカー配列を変えたり、より明るく光るようにするためにフォールディング変異を導入したり、YFP円順列変異体の発色団と静電相互作用するアミノ酸残基に変異を導入したりと、当時で考えられるあらゆることを試した。そのあいだに、Tsienの研究室からGFPの円順列変異体に関する論文がでた<sup>8</sup>。そこには、GFP内への受容体挿入によるCa<sup>2+</sup>指示薬CaMgalooの開発も記載されており、筆者らの研究と内容が重複する部分も多かったが、明らかに筆者らの開発しているものとは設計思想が異なっているので安堵した。しかし、Tsien研究室でも同じことをしているのではないかと不安は払拭できなかった。そんな不安を取り除くには、かむしゃらに酒を飲むか実験を行なうしかなかった。もちろん後者を選び、かむしゃらにたくさんの遺伝子構築を行なった。その甲斐あって、とうとう10月16日、Ca<sup>2+</sup>結合により蛍光強度が8倍変化するMC2-p54DH1を作製することに成功した。これは、MC2-p54DH1にイフのアミノ酸変異H148D、V163A、S175G、Y203Hを導入したものであった。細胞内での応答も十分に大きく、Ca<sup>2+</sup>振動もしっかりとらえることができた。fluo-3ほどではないが、十分、実用に耐えうる性能をもっているといっ

てよかった。  
今度こそは！と意気込んで報告すると、「よっしゃ！」とようやくポジティブな反応が得られ、名前をつけようということになった。研究室のメンバー全員にアイデアを募集

し、ホワイトボードに名前を案をどんどん記入していった。もらった。「がまぐち」「入れ歯」「食虫植物」「ディオネア」「ペリカン」など、さまざまな案が出た。実は、筆者が出した案は「ディオネア」で、これは食虫植物の学名である。MC2-p54DH1がCa<sup>2+</sup>と結合して光るようすが、葉を閉じてハエを捕らえて元気になるディオネアの姿を彷彿させたからである。2週間ほどの募集期間ののち、宮脇博士がどれにするかをラボミーティングで決定した。20以上の案のなかから選ばれたのは「ペリカン」であった。正確には、Pericam(ペリカム)である、permutation(順列変異)のperとカルモジュリンの略称CaMをあわせた造語で、蛋白質の特徴をよく体現した名称であること、かつ、ペリカンがくちばしを開閉するようすが指示薬のCa<sup>2+</sup>結合にともなう立体構造変化を連想させるという点が評価されたい。このPericamもまんざら悪くはないと思った。しかし、MC2-p54DH1の生みの親としては、自分の考えた名前を採用してもらいたかった。この経験が、これ以降に開発するVenus<sup>9</sup>やYC3.60<sup>10</sup>、Phamret<sup>11</sup>などの命名を大きく左右していく。それらの開発および命名秘話はまた別の機会に。

#### 4. 生みの苦しみ

さて、名前もついたので論文もそろそろではないかと思ひ宮脇博士に尋ねると、「レシオイメージングが可能な指示薬ができあがるまでは論文になてまとめられないよ。だって、1波長励起1波長測光型の指示薬だと信頼のおけるイ

メージングはできないからね、動いたり形が変わったりする試料を観察する場合は、とくにそうだよ”とのこと。確かにそのとおりだと思い、すぐさまつぎのステップに突入した。ここまでが順調だったこともあり、またバリバリやればすぐにレシオメトリックな指示薬は開発できるだろうと楽観していた。しかし、この期待は見事に外れた。10カ月にわたる生みの苦しみがはじまった。

EYFPがもつ波長400 nmあたりの無蛍光性吸収を蛍光性吸収にすればよいのではと思い、203番目のアミノ酸残基をスレオニンに変えてみたがだめだった。それでは、円順列変異の銚型を変えてみよう、EYFPではなく ratiometric phluorin<sup>12)</sup>を用いてみたが今度はまったく光らない。蛋白質がちゃんとフォールディングされていないのではないかと考え、F99SやM153Tなどのフォールディング変異を挿入したり、円順列変異内のリンカー配列の最適化を行ったり、円順列変異体とカルモジュリンやM13とのあいだのリンカー配列の最適化を行ったり、気がつくにつれて構築した遺伝子の総数はすでに100個をこえていた。さまざまな文献を読んで得た知識をもとにあらゆる試行を行なったが、うまくいかなかった。過去のデータや理論から結果を予測して行なう実験なんて、うまくいくことのほうが少ない、と考えるようになったのはこのころである。

頭でっかち実験はやめてつぎにとった戦略は、“スペクトルに変化をあたえそうなアミノ酸残基にあらゆる変異を導入して、目的のものをスクリーニングする”だった。148番目と203番目のアミノ酸残基をターゲットとして選んだ。部位特異的ランダム変異導入を行ない、蛋白質を大腸菌に発現させて精製し、ひとつひとつ蛍光・励起スペクトルを測定していった。その結果、148番目と203番目のアミノ酸残基がそれぞれアスパラギン酸とフェニルアラニンになると励起スペクトルが二峰性になり、しかも、Ca<sup>2+</sup>の濃度によってその強度比がレシプロカルに変化することがわかった。しかし、YP32DF0-17と名づけられたこのコンストラクトは、残念なことに、37℃ではあまり明るく光らなかった。そこで、エラー誘発PCRによってYP32DF0-17の全長にランダム変異を導入して大腸菌に発現させ、37℃の培養条件下で明るく光るコロニーをピックアップした。遺伝子を抽出して配列を調べると46番目のフェニルアラニン残基がロイシン残基に変異していることがわかった。このYP32DF0-17-F46LをHeLa細胞に発現させると十分に明るく光り、しか

も、念願のレシオイメージングを行なうことにも成功した。さらに、YP32DF0-17-F46Lの148番目のアミノ酸残基をスレオニンに置換したもの(YP32TF0-17-F46L)はCa<sup>2+</sup>に結合すると蛍光強度が減少するという特性をもつことや、初代Pericamの円順列変異体内のリンカー部分で切り離したもの(M13-pericam-Nとpericam-C-CaM)を同時に発現させるとしっかりCa<sup>2+</sup>応答がみられることなども、同時期にぞくぞくと明らかになった。さまざまな特性をもつコンストラクトができたので、初代Pericamをflash-pericam、YP32DF0-17-F46Lをratiometric-pericam、YP32TF0-17-F46Lをinverse-pericam、M13-pericam-Nとpericam-C-CaMをsplit pericamと命名した。

ここまでくれば宮脇博士も納得し、いよいよ論文化である。細胞やミトコンドリアなどの細胞内小器官におけるCa<sup>2+</sup>イメージングのデータなどをくわえて、11月6日に*Nature Biotechnology*誌に投稿した。ところが、11月13日にリジェクトの通知が届いた。理由は以下のとおりであった。“I am concerned that genetically encoded fluorescent indicators for calcium based on GFP have been previously described, so that this paper lacks sufficient conceptual novelty for our readership...” Cameleonと発想が違わないと判断されたらしい(とこのときは考えた。そうでないことはすぐに判明する)。そこで、つぎこそはと*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*誌に投稿した。幸い、今度はレビューにまわり、2名のレビューアーからマイナーコメントがついた。それに答えて年末の12月26日に郵送し、12月30日にアクセプトされた。ようやく苦勞が報われ、筆者の20世紀は幕を閉じた。

## 5. 衝撃

年が明けるとともに21世紀のはじまりである。初詣をすませ、恒例のおみくじを引いた。幸運にも大吉が出た。21世紀は筆者にとってよい世紀になることを予感させ胸をおどらせていた。しかし、2月に衝撃が走った。Pericamと同じ発想に基づくCa<sup>2+</sup>指示薬の開発にかかわる論文が、*Nature Biotechnology*誌に掲載されたのである<sup>13)</sup>。指示薬名はG-CaMP。著者は宮脇博士のよく知っている人とのことで、以前に2回ほど研究会で会ってPericamのことについて議論したことがあったらしい。その論文のアクセプトされた日は11月20日。Pericamの論文が*Nature Biotechnology*誌に



リジェクトされてから1週間後である。EditorはCameleonではなく、このG-CaMPとコンセプトが変わらないとっていたのだ。まさか競争相手はいないだろうと思っていたので、2人でびっくりしていた。“灯台もと暗し”とはまさにこのことである。その翌月、Pericamの論文がようやく掲載された<sup>14)</sup>。驚いたことに、すぐさまScience誌のSenior Editorからメールがあり、“Editors Choice”で紹介したいとのこと。それ用の図を作成して送った。しばらくすると今度は、Trends in Cell Biology誌のDeputy Editorからメールがあり、“short news”として掲載させてほしいとのこと。またまたそれ用のデータをとって送付。そのあと、多くの遺伝子リクエストが殺到した。Pericamの反響の大きさに、正直、驚いた。こんなに注目されるのであれば、最初からScience誌などに投稿すればよかったと後悔した。が、あとの祭りである。

## おわりに

幸いにも御子柴博士の予想はずれ、宮脇研究室での研究開始後1年半で1報目の論文をだすことができた。“鈍才は頭ではなく、身体を使うこと”の信条が筆者のなかに生まれたのはこの研究によってである。ただし、鈍才は鈍才なりにおもしろいアイデアを発想することは重要で、そのためには広範な知識が必要である。学部、修士、博士、ポストドクと研究室を変え、そのたびに研究テーマもがらりと変えてきたが、そのことで得られた知識はいまの筆者の宝である。豊富な知識と頑健な身体で“考えるアリ”になりきることが漠進的に研究を進める秘訣である。ただし、実験ばかりやってもよい研究ができるわけではなく、アフター7はいろんな人と飲みながらディスカッションすることで、“アホ”な発想力も養わないといけない。

実は、Pericamの論文が出版されたころ2匹目のドジョウがすでに釣れていた。高効率に発光構造をとる黄色蛍光蛋白質Venusである。PericamとVenusの開発で培った

ノウハウを用いて“光らない”蛍光蛋白質を開発し、生物研究へ応用していくアイデアも生まれていた。まさに、いまに続くアイデアの“インフレスパイラル”がはじまろうとしていた。修士課程のときに上野博士に言われた“15年後”は今年である。そろそろX線顕微鏡関係の研究を再開しようか。

- 1) Aoki, S. et al: *Jpn. J. Appl. Phys.* 33, 556-558 (1994)
- 2) Aruga, J. et al: *J. Biol. Chem.* 271, 1043-1047 (1996)
- 3) Nagai, T. et al: *Dev. Biol.* 182, 299-313 (1997)
- 4) Nagai, T. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1618-1623 (2000)
- 5) Chalfe, M. et al: *Science*, 263, 802-805 (1994)
- 6) Funatsu, T. et al: *Nature*, 374, 555-559 (1995)
- 7) Miyawaki, A. et al: *Nature*, 388, 882-887 (1997)
- 8) Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11241-11246 (1999)
- 9) Nagai, T. et al: *Nature Biotechnol.* 20, 87-90 (2002)
- 10) Nagai, T. et al: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554-10559 (2004)
- 11) Matsuda, T., Miyawaki, A., Nagai, T.: *Nature Methods*, 5, 339-345 (2008)
- 12) Miesenböck, G., De Angelis, D. A., Rothman, J. E.: *Nature*, 394, 192-195 (1998)
- 13) Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K.: *Nature Biotechnol.* 19, 137-141 (2001)
- 14) Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S., Miyawaki, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 3197-3202 (2001)

## 永井健治

略歴：1998年 東京大学大学院医学系研究科博士課程 修了、同年 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21研究員、2005年より北海道大学電子科学研究所 教授。

研究テーマ：バイオイメーjing技術開発。

関心事：健康的なダイエット。



EXPERIMENTAL MEDICINE

実験医学 増刊

別 刷

 羊土社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1

TEL 03(5282)1211 FAX 03(5282)1212

E-mail: [eigy@yodosha.co.jp](mailto:eigy@yodosha.co.jp)

URL: <http://www.yodosha.co.jp/>

## 2. 光変換蛍光タンパク質を用いた 生体分子の動態解析法

永井健治, 松田知己

紫外線などの刺激光を照射することで蛍光特性が変化する光変換蛍光タンパク質は特定の細胞や細胞内小器官, あるいはタンパク質を高いコントラストで観察するためのツールとして需要が高まりつつある。本稿では最近われわれが開発した共鳴エネルギー移動を光変換原理とする新しい光変換蛍光タンパク質 Phamret および光変換蛍光タンパク質を利用したタンパク質拡散定量法 FDAP について解説し, 従来の光変換蛍光タンパク質との違いや特徴を議論する。

### はじめに

多数の生体分子間相互作用によって形成されるネットワークを記述し, 生命現象を生体分子システムの機能創発として理解しようとするシステム生物学が注目されつつある。システム生物学の中でも特にインタラクトームとよばれるものはいわばそれぞれの生体分子を電子回路の各構成要素 (トランジスタや抵抗な

ど) として捉え, その電子回路“的”なものがどのように機能するのかを計算機シミュレーションによって理解しようとする学問である。このシミュレーションに必要なパラメーターは生体分子の濃度と反応速度定数の2つであることが多い。このことは, 生体分子システムの動作律速が“反応”にあるという前提の上で成り立つ。ところが, 電子回路の各構成要素と異なり, 生体分子は基板上に固定されておらず, ほとんどの分子が細胞内を単純拡散などによって動き回っている。上流のシグナルを受け取った分子が細胞内のかなり離れた場所に移動して下流の分子と反応をする場合には, 必ずしも“反応”が律速になるわけではなく, “分子の移動時間”が律速になることもありうる。したがって, より正確かつ厳密に生体システムの機能を予測するためには, 分子の移動時間に関する例えば分子拡散係数などのパラメーターを数理モデルに組込んで計算機シミュレーションしなければならない。しかしながら, 現状のはぼすすべてのシステム生物学的分子ネットワークシミュレーションは生化学実験で得られた反応速度定数のみを利用しており, 分子拡散係数まで考慮に入れたものはほとんど見かけない。なぜ

#### 【キーワード&略語】

蛍光顕微鏡, 光変換蛍光タンパク質, 拡散係数

FCS : fluorescence correlation spectroscopy  
(蛍光相関分光)

FDAP : fluorescent decay after  
photostimulation (タンパク質拡散定量法)

FRAP : fluorescence recovery after  
photobleaching (光退色後蛍光回復)

FRET : fluorescence resonance energy transfer  
(蛍光共鳴エネルギー移動)

mSECFP : monomeric super enhanced cyan  
fluorescent protein

PA-GFP : photoactivatable green fluorescent  
protein

SMT : single molecule tracking (1分子追跡)

A novel method to determine diffusion coefficient of biomolecules with fluorescence decay after photostimulation of photoconvertible fluorescent protein

Takeharu Nagai/Tomoki Matsuda : Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University (北海道大学電子科学研究所)

か？ 答えは簡単である。細胞内において各生体分子がどのように動き回っているのかに関する定性的・定量的な情報がまだまだ足りないからである。

## 1 従来の分子動態解析技術

とはいえ、これまでに分子動態を解析する方法がなかった訳ではない。例えばFCS法<sup>\*1</sup>やSMT法<sup>\*2</sup>などの方法を用いれば分子動態の解析は可能である。にもかかわらず、これらの技術を利用して分子動態を定量的に解析した論文の数は依然少ない。いずれの技術も数式や光学系に不慣れなことが多い生物系研究者にとってはとっつきにくいというのが大きな理由であろう。一方、FRAP（光退色後蛍光回復）法<sup>\*3</sup>はその簡便さから、比較的多くの生物研究者に抵抗感なく利用されている。昨今のレーザー共焦点顕微鏡にFRAP実験を行うためのシステムがすでにインストールされているということも一因かも知れない。しかし、ボタンを押せばFRAP解析が完了してしまうという簡便さゆえに、多くの研究者はFRAPの原理、理論、特性を十分理解することなく使用しているように見受けられる。例えば、“蛍光分子を光退色している時間に分子が動かない”ことを前提にFRAPの計算式は構築されているが、拡散係数が $10 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ もある分子であれば、その前提が崩れることは簡単な計算から明らかで

ある。また、蛍光分子を速やかに光退色させるのに要するレーザーのパワー密度は $10\text{W}/\text{cm}^2$ 以上もあり、どんなに光耐性を有する細胞に対しても、光損傷を無視することはできない。さらに、FRAP法は光退色した領域への蛍光分子の流入を測定するため、ある領域にある分子が細胞内のどこまで拡散することが可能かどうかを調べることができないという問題点や、そもそも光退色した分子の動態を直接解析できないなどの欠点もあった。

これらのさまざまな問題点はPA-GFP<sup>4)</sup>の登場によってある程度解決されたかにみえる。PA-GFPは $1\text{W}/\text{cm}^2$ 以下の紫（外）光を短時間（ミリ秒以下）照射するだけで活性化し、蛍光を発するようになる。したがって、光毒性の軽減のみならず、FRAPでは困難な速い拡散の解析が可能となり、しかも光刺激した領域に存在していたタンパク質が細胞内のどこに移動していくのかを観察することもできるようになった。唯一の難点と言えば、光活性化前のPA-GFPは無蛍光性であるため、PA-GFPを発現している細胞を探すのが少々大変であるという点であろう。そこで、光刺激前から蛍光性があり、光刺激によって蛍光波長が変化するKaede<sup>5)</sup>やEosFP<sup>6)</sup>、Dendra<sup>7)</sup>などの光変換蛍光タンパク質<sup>8)</sup>が俄然注目されるわけだが、これらも多量体形成、 $37^\circ\text{C}$ での成熟効率が悪い、光変換に10ミリ秒程度の時間がかかるなど問題点が多かった。さらに、従来のいずれの光変換蛍光タンパク質も光変換に伴い、蛍光スペクトルのみならず、吸収スペクトルも変化するため、その観察には2波長励起・2波長測光を必要とする。細胞内での速い分子動態を観察する際に2波長の蛍光像をフィルターを交換しながら交互に取得すると2色の蛍光画像の間の時間的ずれが問題となり、たとえレーザー共焦点顕微鏡により2波長同時励起・同時蛍光測定を行ったとしても、完全には補正できない色収差が原因で励起の空間一致性は達成できない。そもそも2波長で励起するため、1波長励起に比べ励起光の強度が必然的に高くなってしまい、プロンプの光退色や細胞の光損傷の度合いが増加してしまう等々、解決されなければならない技術的課題が山積みであった。

## 2 Phamretの開発

このような数多くの問題点を解決するべく、われわれ

### \*1 FCS (蛍光相関分光) 法

微小領域内への分子の出入りによって引き起こされる蛍光強度揺らぎの自己相関から分子の拡散係数を解析する方法である。FCS法では、 $10 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ 以上の速い分子動態の解析が可能であるが、 $0.1 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ 程度以下の遅い動きを解析することは困難である。

### \*2 SMT (1分子追跡) 法

蛍光1分子の動きをビデオレート(30fps)程度で追跡し、一定時間後の原点からの距離の2乗を各時間にわたって平均した“平均2乗変位”を求めることで拡散定数を解析する方法である。微弱な1分子蛍光信号をコントラスト良く捉えるには30fps程度が限界であり、したがって $1 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ よりも速く拡散する分子は追跡ができず解析が難しい。

### \*3 FRAP (光退色後蛍光回復) 法

微小空間内の蛍光タンパク質を強い光を照射して光退色させた後に、その領域に流入する蛍光分子によって引き起こされる蛍光強度の回復を測定・解析する方法である<sup>(5)(10)</sup>。この方法では、 $10 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ よりも遅い動きの測定については信頼性が高く、かつ動かない分子の割合を求めることもできるが、光退色に要する程度の時間(10~100ミリ秒)の間を素早く拡散してしまう分子の測定は難しい。