

図1 光変換蛍光タンパク質 Phamret **MOVIE**

A) Phamretの構造と光変換の原理. B) 光変換前後のPhamretの蛍光スペクトル. 458nmで励起して測定. C) HeLa細胞にPhamretを発現させ、白矢頭の領域に405nmのレーザー光を連続照射してPhamretを光変換し、細胞内を拡散していく模様を捉えたもの(文献9より転載)

これは1波長励起2波長測光型の単量体型光変換蛍光タンパク質の開発に取り組んだ⁹⁾。われわれが取ったアプローチはFRETの利用である。PA-GFPをFRETアクセプターとして利用し、適当なFRETドナーと連結すれば、光刺激前はドナー蛍光が、刺激後はアクセプター蛍光が観察されるはずであると考えた(図1A)。そこで、シアン蛍光タンパク質の1つであるmSECFP(monomeric super enhanced cyan fluorescent protein)をFRETドナーとしてPA-GFPとタンデムに連結した。mSECFPを用いた理由は、その蛍光スペクトルが活性化型PA-GFPの吸収スペクトルと大きくオーバーラップするからである。また、光刺激によって大きく蛍光色が変わるようにするため、mSECFPから活性化型PA-GFPへのFRETが効率よく起こるように、mSECFPのC末端11アミノ酸とPA-GFPのN末端3アミノ酸を削って連結した。期待

通り、この融合タンパク質は光刺激前後で458nm励起による蛍光色がシアン色から緑色へと変化した(図1B)。光活性化に依存した共鳴エネルギー移動により蛍光色が変わる原理を用いているこの融合タンパク質をわれわれはPhamret(photoactivation-mediated resonance energy transfer)と命名した。

Phamretを哺乳類培養細胞に発現させると細胞質と核に凝集塊をつくることなく均一に分布し試験管内と同様405nmの光刺激によって蛍光色が変わった(図1C)。いくつかの光変換蛍光タンパク質で問題となっている多量体形成の可能性に関して調べるため、大腸菌で発現させた精製リコンビナントタンパク質や哺乳類培養細胞に発現させたタンパク質をゲル濾過カラムにかけて解析したところ、単量体相当の位置にシングルピークで溶出されることから、単量体として機能することが示された。確かに、さまざまなタンパク質

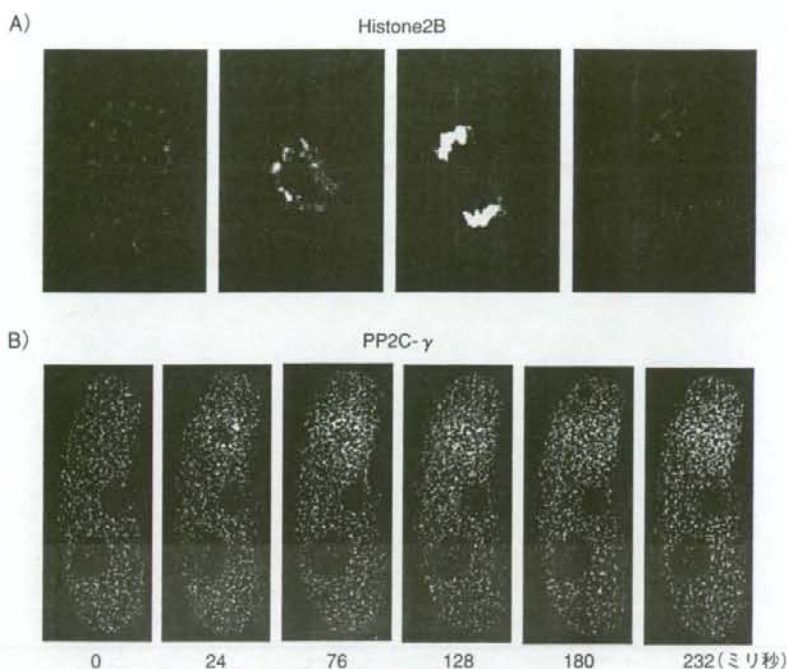


図2 Phamretの光変換によるタンパク質の動態解析 **MOVIE**

A) H2B-Phamretを細胞分裂前に核の下半球のみ光変換させてタイムラプスイメージングを行った例。シアン蛍光(水色)と緑色蛍光(赤色)を重ね合わせて表示。B) 核内に発現するPP2C γ -Phamretの一部を光変換させて42Hzで画像取得を行った。パネル下に示す時間におけるPA-GFP/CFPのレシオ画像を表示(文献9より転載)

と融合させて細胞に発現させると、融合したタンパク質と同じパターンで発現し、細胞に際立った異常がみられることもなかった。

PhamretのC末端側にクロマチン構成タンパク質の1つであるHistone2Bを融合(H2B-Phamret)させてHeLa細胞内で発現させた。核内に発現したH2B-Phamretを細胞分裂前に半円状に光変換させてタイムラプスイメージングを行ったところ、分裂後においても核の半分の領域に光変換したH2B-Phamretが分布しているパターンが保存される様子を観察することができた(図2A)。また、核内に存在するセリン/スレオニンホスファターゼPP2C γ をPhamretのC末端側に融合(PP2C γ -Phamret)してHeLa細胞内に発現させ、核内の一部を光変換させたところ、PP2C γ -Phamretが素早く拡散する模様を捉えることができた。同じ核内因子でも、さまざまな動態が存在することがわかる(図2B)。

3 FDAP法の開発

Phamretなどの光変換タンパク質はタンパク質動態の可視化のみならずタンパク質拡散係数を求める定量的解析にも用いることができる。この場合、FRAP法とは逆に光刺激によって増大した蛍光強度が拡散によってどの程度の時間で減衰していくのかを解析する。光変換の量子効率が光退色に比べて大きいため、弱い刺激光($<1 \text{ W/cm}^2$)を短時間照射することで光変換を達成することができる。したがって、細胞に優しい測定法であるだけでなく、FRAP法が苦手としていた速い分子拡散の定量測定が可能になる。しかしながら、これまで光変換後の蛍光強度減衰曲線から拡散定数を算出する方法は確立されていなかった。そこで、われわれは高い時間分解能で測定した蛍光減衰曲線を基に、FRAPの理論式を改変した式で非線形フィッティングすることでタンパク質拡散係数を求めるFDAP(fluorescent decay after photostimulation)法を開発

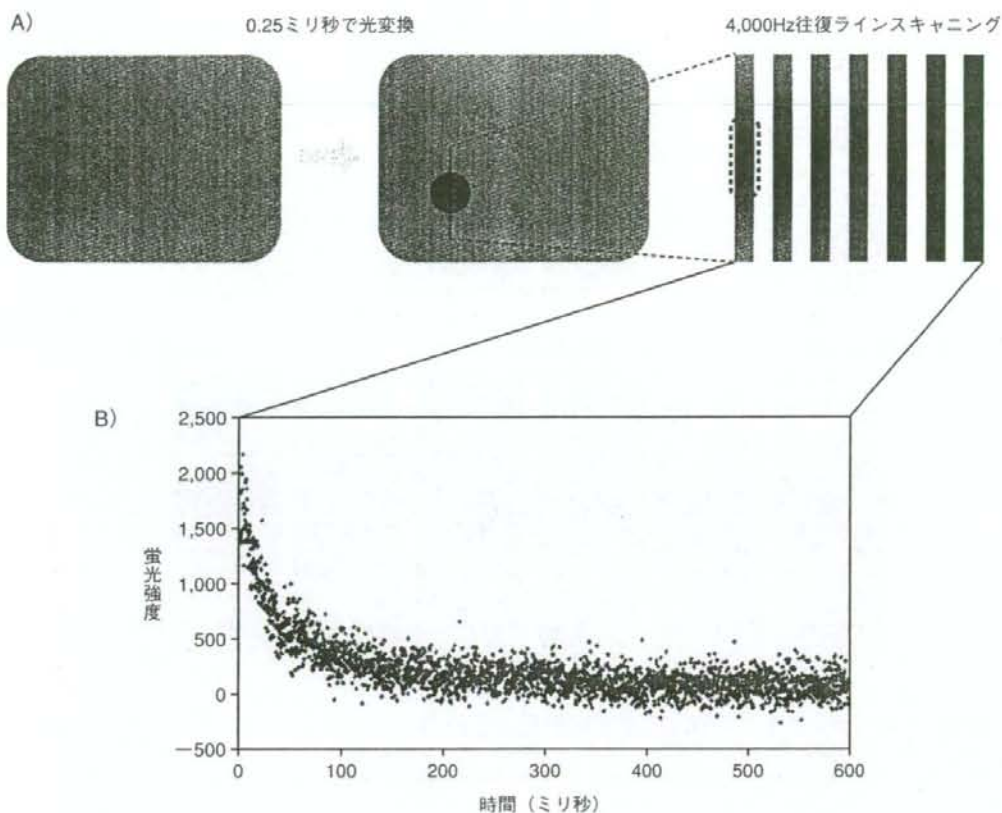


図3 FDAPの原理

A) 光変換蛍光タンパク質を発現させた細胞の局所に0.25ミリ秒の光刺激を行った後、4,000Hzの往復ラインスキャンニング走査により蛍光強度の変化を測定する。B) Aの右パネル内の点線で囲った領域の蛍光強度の時間変化をプロットすると蛍光減衰曲線が描ける

表 各測定法で求められた拡散定数の比較

蛍光タンパク質	FDAP D ($\mu\text{m}^2/\text{秒}$)	FRAP D ($\mu\text{m}^2/\text{秒}$)	FCS D ($\mu\text{m}^2/\text{秒}$)
単量体	22.9 \pm 3.7	34.0 \pm 8.5	23.4 \pm 2.5
タンデム二量体	14.1 \pm 2.4	18.3 \pm 6.4	16.4 \pm 0.8

した⁹⁾。FDAPはレーザー共焦点顕微鏡下で回折限界程度の大きさ(直径500 μm 程度)に集光した刺激光を短時間(0.25ミリ秒)照射して光変換を行った後、およそ4,000Hzの往復ラインスキャンニングで蛍光減衰の過程を測定することを基本とする(図3)。その他にFDAP特有の工程を必要とするが、紙面の都合上割愛する。詳細は文献7を参照されたい。

FDAP法によりPhamretの水溶液中での拡散係数測定を求めると49.5 \pm 0.6 $\mu\text{m}^2/\text{秒}$ であった。この値はPhamretと類似の立体構造をとっていると予想されるGFPタンデム二量体に関してFCSで得られた50.4 $\mu\text{m}^2/\text{秒}$ とよく一致した。さらに、HeLa細胞内に発現するPhamretについてもGFPのタンデム二量体に関するFCSでの測定結果とよく一致した(表)。一方、

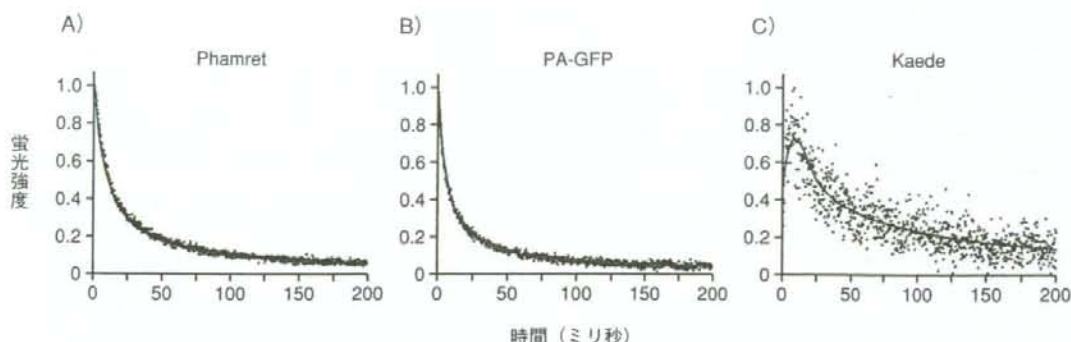


図4 FDAP 蛍光減衰カーブ (文献9より転載)

FRAP法によりPhamretやGFPタンデム二量体の拡散係数を測定すると、その値はFDAPやFCSで求めた値よりも、分散値も含め大きな値を示した(表)。この傾向はより大きな拡散係数をもつ分子を測定すると顕著になり、FRAP法では $10 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ 程度が測定限界であると考えられた(表)。

以上の結果は、これまでFCSでなければ測定できなかった $50 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ を超える速い拡散を、より簡便迅速なFDAP法でも測定できることを示す。しかも、FDAPの全測定は200ミリ秒で終了することから、10秒程度以上の測定時間を要するFCSよりも迅速な実験が可能であり、FCSでは解析が不可能な動かない分子の割合も解析できる利点もFDAP法は有している。したがって、FDAP法はそれ1つでFRAPの測定領域からFCSの測定領域までの幅広い測定領域をカバーできる汎用性の高い方法であるといえよう。ただし、FDAPを適用するにはある程度、光変換量子効率が高いプローブを使用しなければならない。例えば、KaedeはPhamretやPA-GFPと、同じパワー密度のレーザー光で光刺激をしても十分に光変換が起こらないため、ノイズの多いFDAPカーブになってしまい、とても拡散係数算出のために利用することはできない(図4)。これはKaedeの光変換量子効率の低さに起因する。さらに、PhamretやPA-GFPとは異なり、Kaedeは光刺激直後ではなく、10ミリ秒程度遅れて蛍光強度が最大になることから、光刺激と光変換に時間的ラグが存在することもわれわれは確認している(図4、未発表データ)。ここでは光変換中に分子拡散が起きてしまい、正確な拡散係数を算出することができなくな

る。われわれの経験では $10 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ よりも大きな拡散係数を有する分子を測定するには、1ミリ秒以下で光変換する必要があることがわかっている。

おわりに

Phamretなどの光変換蛍光タンパク質を用いることで、タンパク質(nm)から細胞(μm)や組織(mm)レベルまでのさまざまな空間スケールの対象物を高いコントラストでハイライトすることが可能となり、適当な時間間隔でハイライト画像を取得すれば、観察対象の動態や構造変化などを視覚情報として得ることができるようになった。従来の方法よりも、簡便にタンパク質の拡散に関する定量情報も得られる。今まで以上に、生きた試料を用いて動態解析を行う研究が増えることを期待したい。ただし、十分に解析技術を熟知していなければ、全くとんちんかんなデータが出てしまったり、誤った考察をしてしまう可能性が大いにありうる。そもそも、自分が調べたいタンパク質に光変換蛍光タンパク質を融合して測定した拡散係数が、融合していないタンパク質のそれとどれくらい異なる値になるのかについて、しっかり考察することは重要である。そのためにも、大学教養課程で習ったストークス・アインシュタインの式が意味するところを復習するのはきわめて有意義であろう。

文献

- 1) 金城政孝:『講義と実習 生細胞蛍光イメージング』, (原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰/編), pp101-109, 共立出版, 2007
- 2) 佐甲靖志:『講義と実習 生細胞蛍光イメージング』,

- (原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰/編), pp206-220, 共立出版, 2007
- 3) 木村 宏: 『講義と実習 生細胞蛍光イメージング』, (原口徳子, 木村 宏, 平岡 泰/編), pp85-100, 共立出版, 2007
- 4) Patterson, G. H. & Lippincott-Schwartz, J.: Science, 297 : 1873-1877, 2002
- 5) Ando, R. et al.: Science, 306 : 1370-1373, 2004
- 6) Wiedenmann, J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 15905-15910, 2004
- 7) Gurskaya, N. G. et al.: Nat. Biotechnol., 24 : 461-465, 2006
- 8) Lukyanov, K. A. et al.: Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6 : 885-891, 2005
- 9) Matsuda, T. et al.: Nat. Methods, 5 : 339-345, 2008

<筆頭著者プロフィール>

永井健治: 1992年筑波大学第二学群生物学類卒業, '98年東京大学大学院医学研究科修了, '98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等を経て'05年より北海道大学電子科学研究所教授. 専門は発生生物学, 多細胞生物の形態形成原理をバイオイメージングと光操作技術を用いて解き明かしたい.

PNE

PROTEIN,
NUCLEIC ACID
AND ENZYME

蛋白質核酸酵素

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

新規の光変換蛍光蛋白質プローブを用いた生体イメージングと動態解析

Bioimaging and analysis of protein dynamics with a novel photoswitchable fluorescent protein probe

松田知己・永井健治

生体内において、生命現象にともない引き起こされる細胞自体やオルガネラ、蛋白質の移動を単色の蛍光蛋白質を用いたイメージングでとらえることはむずかしいが、光変換蛍光蛋白質を用いて特定の位置の細胞や蛋白質を標識し、そのパターン変化を解析することで容易にその動態を知ることができる。さらに、筆者らの開発したFDAP法により、光変換蛍光蛋白質を用いて、比較的速い動きをする蛋白質の拡散係数を求めることも可能であり、蛋白質動態の変化を視覚的側面と定量的側面から簡便に解析することができるようになった。

Key words ● 蛍光顕微鏡 ● 光変換蛍光蛋白質 ● 拡散係数

はじめに

細胞のなかで起こるさまざまな現象を生きた状態でリアルタイムに可視化し理解するアプローチは、生命現象を解明する手法の主流となり、蛍光蛋白質を用いたバイオイメージングはそのためのキーテクノロジーとして広く用いられている。そして、この蛍光蛋白質によるイメージング技術は日々進歩をつづけている。さまざまな蛍光色を発する蛋白質が開発され、その用途も、従来からある蛋白質局在化マーカーや遺伝子発現レポーターとしての使い道から広がり、蛋白質の活性化など、機能イメージングのための指示薬の開発ツールとしても活用されるようになった¹⁾。さらに、光刺激によって蛍光特性が変化する蛍光蛋白質(光変換蛍光蛋白質)も開発され、それらを用いた分子動態解析が実現している²⁾。光変換蛍光蛋白質には、蛍光をもつ生物から単離されたものもあれば、遺伝子改変によって人為的に開発されたものもあるが、その特性の変化には、蛍光を発しない(蛍光が微弱な)状態から蛍光を発する(強い蛍光を発する)状態へ変化するものと、蛍光波長がシフトするもの

とがある。このような特徴を利用して、光変換蛍光蛋白質を発現する特定の領域を光刺激によって標識し、そのパターンが変化していくようすを動画イメージとして観察することによって、また、輝度変化を解析することによって、生体内の物質の移動がかかわるさまざまな現象を理解する手がかりが得られる。

本稿では、光変換蛍光蛋白質についてその用途と種類を概説し、さらに、筆者らが遺伝子工学的・蛋白質工学的手法により開発した、FRET現象を利用した新規の光変換蛍光蛋白質であるPhamretと、それを用いた細胞・分子動態イメージングについて、事例をまじえながら紹介する。

1 光変換蛍光蛋白質の使い道

光変換蛍光蛋白質は、光刺激により標識してそれを追跡することにより、生体内で起こるさまざまなレベルでの動態の観察に用いることができる²⁾。たとえば、発生や分化の研究では“生物個体・組織レベル”のイメージングデータがその理解の大きな助けになると考えられるが、特定の細胞を標識してその移動や増殖を観察する細胞トラッキングによってそれらのデータを得ることができる(図1a)。また、脳や神経の研究においては、複雑に絡みあった神経回路における細胞集団のなかの特定の細胞に注目して観察するのに有効である。最近では、ショウジョウバエやゼブラフィッシュについて、こうした個体・組織レベルでの観察例が

Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai
北海道大学電子科学研究所 ナノシステム生理学分野
E-mail : matsuda@es.hokudai.ac.jp
URL : http://nano.es.hokudai.ac.jp/

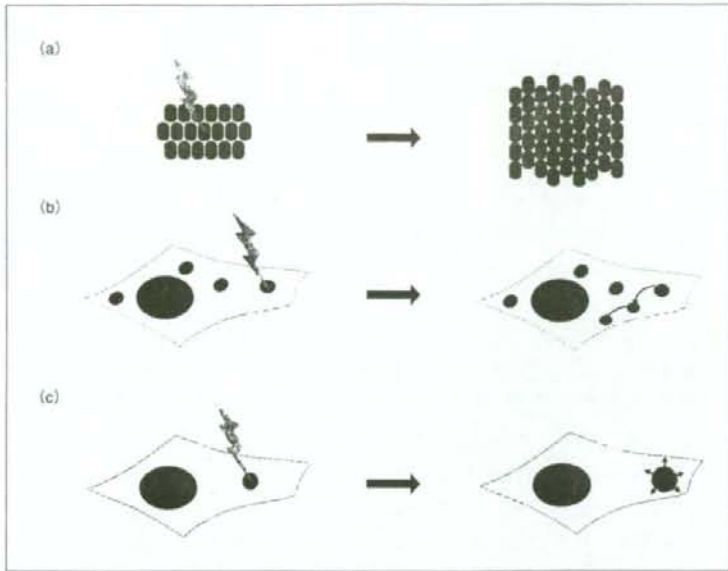


図1 光変換蛍光蛋白質を用いた生体内での分子動態解析

- (a) 細胞トラッキング。個体・組織のなかの特定の細胞を標識して、それを追跡する。
 (b) オルガネラトラッキング。細胞内の特定のオルガネラを標識して、その移動や融合を観察する。
 (c) 蛋白質トラッキング。細胞内で発現する蛋白質を限定された領域でのみ標識して、それを追跡する。いずれも、光刺激により標識された細胞・分子を赤色で示している。

増えはじめている^{3,4)}。また、“細胞レベル”においては、光変換蛍光蛋白質を発現するオルガネラのうち特定のものを標識することにより、その動く方向や速度、到達地点、さらには、融合や分裂を可視化するオルガネラトラッキングに用いることができる(図1b)。また、標的蛋白質を標識しその標識パターンの経時変化の観察から、蛋白質そのものの動態がわかる(図1c)。さらに、標識した領域内の蛍光強度の変化を数値解析すれば、蛋白質の動態を定量化した拡散係数を知ることも可能である。

光変換蛍光蛋白質が開発される以前から、こうした蛋白質の動態解析には蛍光蛋白質のブリーチング(光退色)を原理とするFRAP (fluorescence recovery after photobleaching, 光退色後蛍光回復)法⁵⁾が用いられてきたが(Column), FRAP法では領域外部からの蛍光分子の流入という間接的な効果のみをみているので、標識した分子が別の場所で蓄積するような現象を可視化することはできない。また、光変換に比べてブリーチングは大きな光エネルギーを必要とするため、細胞にダメージをあたえる心配がある。さらに、動きの速い分子の蛋白質拡散係数測定の際には、ブリーチングの過程で起こる拡散により正確な拡散係数を求めることができない⁶⁾。光変換蛍光蛋白質はこれらの問題点をクリアすることが可能であるため、分子動態を解析するツールとして、今後、不可欠なものになっていくのではないかと考えられる。

光変換蛍光蛋白質は分子動態解析への応用のほかに、超解像顕微鏡観察法であるPALM (photoactivated localization microscopy) 法やRESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transition) 法でも用いられている^{7,8)}。これらの方法は発展途上で、まだ一般のユーザーが簡単に導入できる段階ではなく、今後の発展が期待される。

II 光変換蛍光蛋白質の種類と性質

光変換蛍光蛋白質には、光刺激により暗い状態から明るい状態へと変化する光活性化蛍光蛋白質(photoactivatable fluorescent protein; PAFP)と、光刺激により蛍光特性が変化して異なる波長の蛍光を発するようになる色変換蛍光蛋白質(photoconvertible fluorescent protein; PCFP)とがある²⁾。さらに、光活性化蛍光蛋白質は2種類に分類できるため、大きく3つの種類に分類することができる(表1)。これらについて、それぞれ代表的なものを紹介する。

1. 不可逆的な光活性化蛍光蛋白質

光活性化が不可逆的に起こる蛍光蛋白質としては、細胞イメージングのため実用的な光変換蛍光蛋白質として最初に開発されたPA-GFP (photoactivatable green fluorescent protein)がその代表例である。PA-GFPは、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)に由来するGFPの203番目のチ

ロシン残基をヒスチジン残基に変換することによってGFPがもともともっていた光異性化能を増強させた変異体で、刺激光により光活性化されて吸収ピークの波長が400 nmから480 nmへとシフトする⁹⁾。活性化前は480 nmに吸収をもたないため、光活性化の前後で480 nmで励起したときの517 nmの緑色蛍光強度は100倍も増加する。

2. 可逆的な光活性化蛍光蛋白質

活性化と不活性化をくり返すことのできる蛍光蛋白質の代表例は、サンゴ由来のDronpaである¹⁰⁾。活性化に用いる紫(外)光とは波長の異なる強い青色の刺激光をあたえてやることにより積極的に不活性化させることができるため、蛍光のオンとオフを自由に制御することが可能である。細胞内では緑色の蛍光を発する活性化状態で発現する。Dronpaはオンとオフのスイッチングの操作性のよさから、PALM法やRESOLFT法といった超解像顕微鏡技術への応用が積極的に試みられている^{11,12)}。

3. 色変換蛍光蛋白質

色変換蛋白質は刺激光の照射により蛍光特性が変化し、照射前とは別の波長の蛍光を発するようになるものである。光活性化蛍光蛋白質では光を発しない不活性化状態があるのに対して、刺激前と刺激後の両方の状態で蛍光観察を行なうことができる。すなわち、いずれの状態でも分子の発現している場所を容易に知ることができ、全体の発現パターンのなかで標識した分子がどのように移動していくのかを可視化することができる。青色から緑色に変化するものとしては、*Aequorea victoria*とは別のオワンクラゲ(*Aequorea coerulea*)由来のPS-CFPがある。緑色から赤色に変化

するものとしては、サンゴ由来のEosFP、KikGR、Kaede、Dendraがある²⁾。

光変換蛍光蛋白質は、発色団が受け取った刺激光のエネルギーによって、脱炭酸(PA-GFPやPS-CFP)や蛋白質主鎖の切断(Kaede)、あるいは、光異性化(Dronpa)などの反応が引き起こされることで発色団の周囲の化学環境が変化し、その結果、蛍光特性が変化する²⁾。刺激光としてはおもに紫(外)光(波長400 nm付近)が用いられるため生体へのダメージが心配されるが、ほとんどの場合、1 W/cm²程度の刺激光を数秒間照射するだけで光変換を起こすことができるため、さほど問題とはならない。可視光領域での刺激光を用いることが可能であるものもあり、それらは紫外線によるダメージをうけやすい試料の観察に有効である。光変換蛍光蛋白質でも多くのものは単量体化された変異体が作製されているが、単量体の開発に成功していないものを使用する際には、標的蛋白質が機能を失ったり、局在化が変化したり、あるいは、凝集体を形成したりすることがあるため注意が必要である。

III 新規の色変換蛍光蛋白質 Phamret

これまでに開発された色変換蛍光蛋白質では、刺激光の照射により蛍光波長が変化すると同時に、励起光の波長の変化も引き起こされていた。したがって、色変換前と色変換後の両方の状態の蛍光観察をするためには、波長の異なる2種類の励起光を必要とした。細胞内での速い分子動態を観察する際には、2波長の蛍光像をフィルター交換しながら交互に取得すると、2色の蛍光画像のあいだの時間的ず

表1 代表的な光変換蛍光蛋白質とその特性

	蛍光の変化	複合体形成	刺激光の波長 (nm)
不可逆的な光活性化蛍光蛋白質			
PA-GFP	無蛍光→緑色	単量体	405
PA-mRFP1	無蛍光→赤色	単量体	365
可逆的な光活性化蛍光蛋白質			
KFP1	無蛍光→赤色	4量体	543
Dronpa	無蛍光→緑色	単量体	488/405 活性化/不活性化
不可逆的な色変換蛍光蛋白質			
PS-CFP	青色→緑色	単量体	405
mEosFP	緑色→赤色	単量体	405
KikGR	緑色→赤色	4量体	405
Kaede	緑色→赤色	4量体	365, 405
Dendra	緑色→赤色	単量体	488, 405

れが問題となる。共焦点レーザー顕微鏡を用いて同時に2波長励起・蛍光測定を行なったとしても、励起光レーザー間の共焦点領域のずれを完全に一致させるのは困難なため、蛍光画像間の空間的なずれはまぬがれない。さらに、2波長励起を基本とするため、照射する励起光の強度が1波長励起に比べて約2倍になることから、光照射に弱い細胞をイメージングする場合には光損傷を十分に考慮しなければならない。このような問題点に対応できる新たなプローブとして、筆者らは1波長励起で2波長の蛍光を観察することのできる新規の色変換蛍光蛋白質、Phamret (photoactivation-mediated resonance energy transfer) を開発した¹³⁾。

1. Phamret の色変換メカニズム

Phamret は、2つの蛍光蛋白質、mSECFP (monomeric super enhanced cyan fluorescent protein) と PA-GFP とを直列につないで作製されたキメラ蛋白質で、PA-GFP を活性化する前は458 nm の励起光をあたえると mSECFP が青色の蛍光を発する。405 nm の刺激光を照射して PA-GFP を活性化すると、mSECFP の励起エネルギーは FRET によって無放射的に PA-GFP に移動し、PA-GFP から緑色の蛍光が発せられる。したがって、色変換前の青色と変換後の緑色の蛍光画像を458 nm の1波長の励起光で取得することができる(図2)。Phamret 開発の際には、mSECFP と

PA-GFP を結ぶリンカーの長さを変化させ、最適な FRET 効率をもつものを選び出している。

2. Phamret を用いた動態解析の例

これまで、Phamret をさまざまな蛋白質、たとえば、ヒストン2B、 β アクチンや核小体、ゴルジ体、ミトコンドリア、ペルオキシソームへの局在化シグナルと融合し、HeLa 細胞内で発現させ観察を行なったところ、局在化と色変換のいずれもが確認された。ミトコンドリア局在化シグナル、あるいは、ヒストン2Bを融合させたものについては、さらに動態解析を行なった。

A. ミトコンドリア融合

Phamret のN末端側にCox IV蛋白質由来のミトコンドリア局在化シグナルを融合した mt-Phamret を HeLa 細胞内に発現させた。生細胞内に分布するミトコンドリアのうちの一部を光変換させ観察したところ、色変換前の mt-Phamret をもつミトコンドリアチューブと、色変換後の mt-Phamret をもつものが融合するようすが観察された(図3a)。さらに、融合したミトコンドリアのマトリックス内において色変換した mt-Phamret が拡散していくようすが可視化することができ、その結果、融合後にはマトリックス間の隔壁も取り払われていて物質が自由な移動をすることが示された(図3a)。

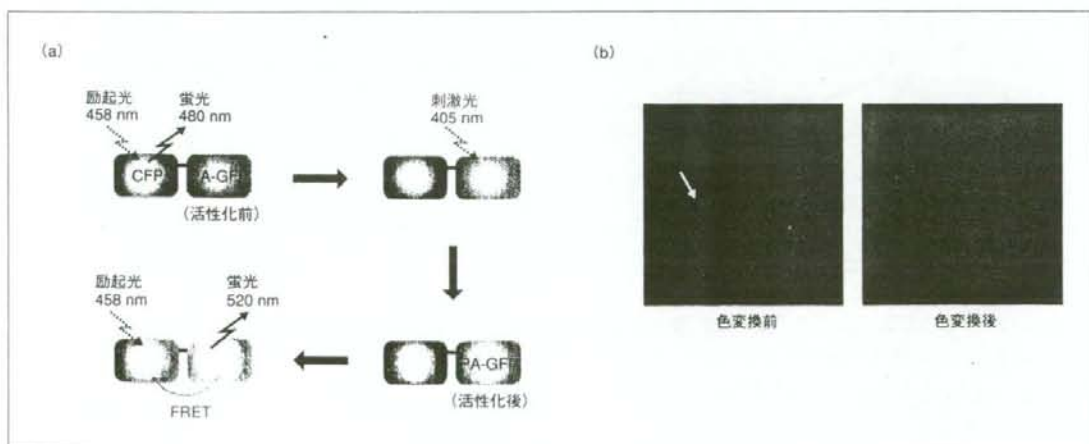


図2 Phamret の色変換

(a) Phamret の色変換メカニズム。Phamret は、CFP (mSECFP) と PA-GFP を直列に結合して作製された。PA-GFP を活性化させると、458 nm の光で励起された CFP のエネルギーが FRET より移動して、PA-GFP より緑色の蛍光が発せられる。したがって、色変換前の青色の蛍光と、色変換後の緑色の蛍光の、どちらも458 nm の励起光で観察することができる。

(b) Phamret を発現する HeLa 細胞における1細胞の色変換。矢印で示した細胞の細胞質に刺激光(405 nm)を照射して色変換させた。青色の蛍光には青色、緑色の蛍光には赤色の擬似カラーを割り当て、合成像として表示している。[文献13より転載、一部改変]

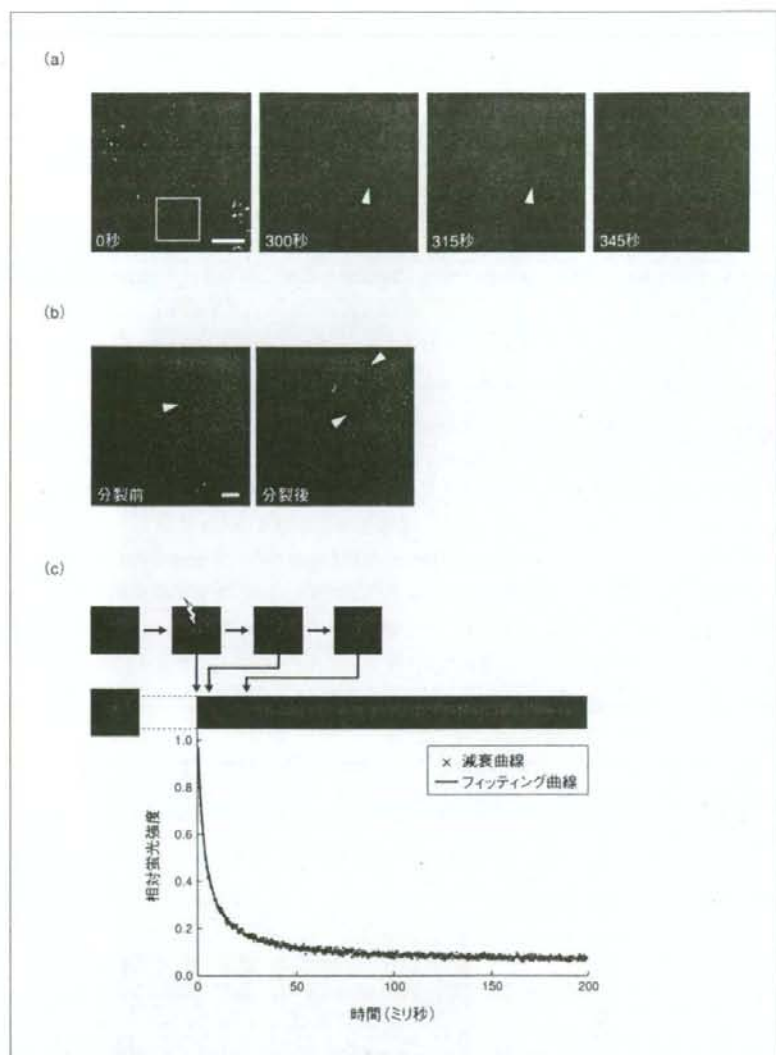


図3 Phamretを用いた動態解析

(a) ミトコンドリア融合の観察。HeLa細胞中においてmt-Phamretを発現するミトコンドリアの一部を色変換させ(0秒、以降は点線の内部の画像を拡大して表示)。その動態を観察した。300～315秒のあいだで色変換をうけたミトコンドリア(赤色)と受けていないミトコンドリア(白色)の融合がみられ、315～345秒のあいだで色変換をうけた分子のマトリックス内の移動を色の拡散としてみる事ができた。

(b) 分裂時のヒストン2Bの分配の観察。HeLa細胞中においてH2B-Phamretを発現する核の半分の領域を分裂前に色変換させ(白色の矢じり)。分裂後まで観察をつけると、娘細胞でも核の半分の領域に色変換させた分子が分布しており、パターンが保存されているのが観察された。

(c) Phamret蛋白質の溶液中でのFDAP法による拡散係数の測定。溶液中で0.25ミリ秒の刺激光により増大した緑色の蛍光について、その拡散による減少をプロットし(x)。それに対してモデル式をフィッティングさせて(黄緑色の線)、拡散係数 $49.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ を得た。

[文献13より転載、一部改変]

B. 細胞分裂時のヒストン2Bの分布

PhamretのC末端側にヒストン2Bを融合したH2B-PhamretをHeLa細胞内に発現させた。核内に発現したH2B-Phamretを細胞分裂前に半円状に色変換させてタイムラプスイメージングを行なったところ、分裂後においても、核の半分の領域に色変換したH2B-Phamretが分布しており、パターンが保存されるようすを観察することができた(図3b)。これまでのヒストン2Bの動態解析では、2つの異なる色の蛍光蛋白質を融合させたものを共発現させ片方をブリーチングしてパターン変化を解析していたが、Phamret

を用いることにより、細胞の生育や核内構造への悪影響をあたえる強いエネルギー(10 W/cm²以上)であるブリーチング光の照射を行なうことなく、圧倒的に弱いエネルギーの刺激光で同様の解析結果が示された。

Ⅳ 光変換蛍光蛋白質を用いた拡散係数測定法:FDAP法

細胞内で自由な状態で存在する蛋白質は、それぞれが固有の速度をもって動いている。それらが完全に自由な状態

Column 蛍光蛋白質を用いた従来の拡散係数測定法

10 μm^2 /秒以上の速い動きの測定法としては、微小領域で少数の分子の出入りによってひき起こされる蛍光強度のゆらぎから自己相関関数を用いた解析を行なって分子の拡散係数を解析するFCS法がある¹⁴⁾。この方法では、自己相関関数を用いる性質上、まったく動かない分子がある場合にはそれを解析することは不可能であり、また、遅い動きを解析することも困難である。10 μm^2 /秒よりも遅い動きの測定に関しては、小さな領域の蛍光蛋白質をブリーチングさせたのちに、その領域に流入する蛍光分子によってひき起こされる蛍光強度の回復を測定・解析するFRAP法が用いられてきた^{15,16)}。この方法では、ブリーチング中(100ミリ秒程度)に起こる分子の拡散の影響で、速い拡散に関しては正しい拡散係数を求めることがむずかしい。したがって、FRAP法とFCS法は相補的に用いられている。1 μm^2 /秒よりも遅い拡散の解析については、蛍光蛋白質1分子の移動をイメージングで追跡するSMT(single molecule tracking, 1分子解析)法を用いることもできる。

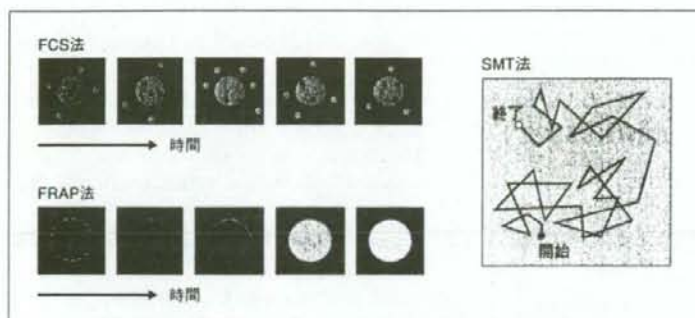


図 3 拡散係数測定法のイメージ

ならば、単純拡散をしている状態の移動速度と等しいと考えられるが、細胞内の動かない構造物やほかの自由な蛋白質との特異的あるいは非特異的な相互作用があると、単純拡散の速度から変化をうける。したがって、蛋白質の拡散を定量的に示す拡散係数を測定することにより、蛋白質のおかれている環境の変化をとらえることができる。また、シグナル伝達などにかかわる蛋白質の拡散係数の観測から、情報伝達速度の変化を議論することもできる。

先述したとおり、光変換蛋白質はイメージングのみならず、このような蛋白質拡散係数の定量的な解析にも用いることができる。従来法であるFRAP法を応用して、光変換蛍光蛋白質でも光刺激により増大した蛍光強度が拡散により減衰するさまをプロットした減衰曲線から、カーブフィッティングにより同様に拡散係数の解析を行なうことが可能である。さらに、光変換の過程はFRAP法のブリーチングに比べて小さなエネルギーで達成され、光変換の刺激光の照射はごく短時間で行なうことのできるため、刺激中の拡散による影響が小さく、速い拡散にも適用できる可能性が考えられていた⁶⁾。しかし、これまでに行なわれてきた光変換蛍光蛋白質を用いた拡散係数解析では、厳密な定量的

FRAP法が適用されていたわけではなく、理論的な裏づけに乏しいものであったため、速い拡散に関してFCS (fluorescence correlation spectroscopy, 蛍光相関分光) 法の結果と比較できるような結果は得られていなかった (Column)。そこで筆者らは、光変換蛍光蛋白質を用いてFRAP法の理論式を応用して蛋白質拡散係数を求める方法、FDAP (fluorescent decay after photostimulation) 法を開発した。解析にはいくつかの特有の行程を必要とするが、その詳細は原著論文を参照されたい¹³⁾。

筆者らは、Phamret精製蛋白質の溶液中での拡散係数測定を、レーザー共焦点顕微鏡を用いて試みた。速い拡散に対応するため刺激光の照射時間を0.25ミリ秒と短くし、およそ4000 Hzの高速ラインスキャンで200ミリ秒間の観測を行なった。得られた減衰曲線を理論式にフィッティングして拡散係数を求めると、 $49.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ と、Phamretと類似の立体構造をとっていると予想されるGFPタンデム2量体に関してFCS法により得られた値 ($50.4 \mu\text{m}^2/\text{秒}$) とよく一致した (図3c)。さらに、HeLa生細胞内でPhamretに関して測定を行なったところ、やはりGFPタンデム2量体に関するFCS法での測定結果とよく一致した。一方、

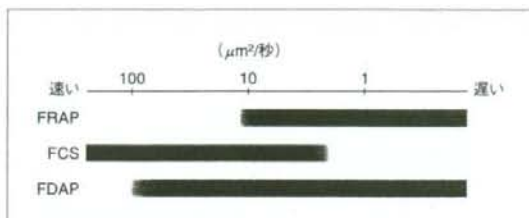


図4 FDAP法の測定可能な領域

FDAP法では、FRAP法の得意とする拡散係数 $10\mu\text{m}^2/\text{秒}$ 以下の遅い拡散から、FCS法の得意とする $10\mu\text{m}^2/\text{秒}$ 以上の速い拡散にいたるまで、幅広いレンジの拡散係数を測定することができる。

GFP単量体の拡散係数については、FRAP法で得た測定値はFCS法のそれと大きく異なっていることが知られていたが、分子量がほぼ同じPA-GFPのFDAP法で測定した拡散係数は、FCS法で測定したGFPのそれとよく一致していた(表2)。

以上の結果は、FDAP法がこれまでFCS法でなければ達成できなかった $50\mu\text{m}^2/\text{秒}$ をこえる分子拡散について、これと同じレベルの正確性で解析できることを示している。FDAP法は刺激光の照射を行なうことができれば専用の測定ユニットをつけることなく細胞観察に用いられている通常の共焦点顕微鏡システムで測定を行なうことができるため、より簡便に、FRAP法の世界領域からFCS法の世界領域までの幅広い測定領域をカバーできる汎用性の高い方法であるといえる(図4)。

おわりに

光変換蛍光蛋白質を用いたイメージングにより、細胞、オルガネラ、蛋白質のさまざまな時間スケールでのダイナミックな動きを、標識したパターンの変化として、直感的にわかりやすく説得力のある情報として得ることができる。また、拡散係数の定量的な解析から蛋白質の動きの微妙な差を議論することも可能である。この技術を、細胞や個体の形態形成、複雑に絡みあう神経細胞どうしの回路のしくみや、細胞内シグナル伝達などで起こる動きを解析するツールとして用いて、通常の蛍光蛋白質を用いた解析ではみ

表2 各測定法で求められた拡散係数の比較¹³⁾

蛍光蛋白質	測定法		
	FDAP法	FRAP法	FCS法
単量体	22.9 ± 3.7	34.0 ± 8.5	23.4 ± 2.5
タンデム2量体	14.1 ± 2.4	18.3 ± 6.4	16.4 ± 0.8

単位： $\mu\text{m}^2/\text{秒}$

えてこなかった隠された動きから新たな知見がもたらされることを期待したい。

文 献

- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y.: *Science*, **312**, 217-224 (2006)
- Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M., Lukyanov, S., Verkhusha, V. V.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 885-891 (2005)
- Datta, S. R. et al: *Nature*, **452**, 473-477 (2008)
- Aizawa, H., Goto, M., Sato, T., Okamoto, H.: *Dev. Cell*, **12**, 87-98 (2007)
- Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N., Patterson, G. H.: *Nature Cell Biol. Suppl.*, S7-14 (2003)
- Kimura, H.: *DNA Repair*, **4**, 939-950 (2005)
- Betzig, E. et al: *Science*, **313**, 1642-1645 (2006)
- Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S., Hell, S. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17565-17569 (2005)
- Patterson, G. H., Lippincott-Schwartz, J.: *Science*, **297**, 1873-1877 (2002)
- Ando, R., Mizuno, H., Miyawaki, A.: *Science*, **306**, 1370-1373 (2004)
- Flors, C. et al: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13970-13977 (2007)
- Dedecker, P. et al: *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 16132-16141 (2007)
- Matsuda, T., Miyawaki, A., Nagai, T.: *Nature Methods*, **5**, 339-345 (2008)
- 金城政孝: 蛋白質 核酸 酵素, **44**, 1431-1438 (1999)
- 木村 宏: 実験医学, **22**, 1739-1745 (2004)
- 木村 宏: 実験医学, **22**, 1851-1856 (2004)

松田知己

略歴：2003年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 修了，2004年 理化学研究所 リサーチアソシエイト，2005年 北海道大学電子科学研究所 非常勤研究員などを経て，2008年より同 助教。
研究テーマ：蛍光蛋白質プローブの開発。

光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像観察法

永井健治

分光研究 第58巻 第1号 (2009年) 別刷

トピックス

光スイッチング蛍光タンパク質を用いた
超解像観察法

北海道大学電子科学研究所 永井健治

電子顕微鏡や原子間力顕微鏡でなければ不可能と考えられてきたナノメートルオーダーの空間観察が、光学顕微鏡と蛍光タンパク質を巧みに用いることで可能になりつつある。しかも固定試料ではなく、生きた細胞を用いてである。このような常識外れの技がどのようにして可能になるのか、その原理と応用例について紹介する。

蛍光タンパク質が2008年度のノーベル化学賞の受賞対象になったことは記憶にあたらしい。Shimomuraらによって1962年に発見され、Prasherが1992年に遺伝子クローニングを行い、Chalfieが1994年に異所性発現に成功し、そしてTsienによって実用的に明るいものや波長変異体が開発された¹⁾。今や生物学に留まらず、医学、薬学、農学などおよそ生物を扱う研究分野において至極当然のツールとなっている。近年ではPA-GFPやKaede、Dronpa等々の刺激光を照射することで蛍光特性が変化する光スイッチング蛍光タンパク質も開発され(図1)²⁾、細胞内の任意の領域にのみ存在するタンパク質を例えば緑から赤に色を変えて、その動きを追跡することなどが頻繁に行われるようになった。また、全反射顕微鏡と高感度カメラを併用すれば1分子の動きも可視化でき、多光子励起顕微鏡を利用すれば比較的厚い試料の奥深くに潜む細胞の

形態や、その中に存在するタンパク質も鮮明に捉えることができる。このように蛍光タンパク質と蛍光顕微鏡の組み合わせによって、十数年前は不可能であった観察が可能となり、多くの科学的発見へと結びついた。しかしながら、光学顕微鏡による観察を余儀なくされるため、タンパク質の位置や動きを検出はできても、そのものの形を可視化することは今もって不可能である。何故なら、光学顕微鏡のようにレンズを使用して物体を拡大結像するファーフィールド顕微鏡は「回折限界の壁」により、200 nm程度以下に接近した2点を分解することができないからである。ところがごく最近になってこの壁を破り、まさにタンパク質の大きさ程度の空間分解能に迫る観察が可能なる「超解像顕微鏡観察法」が実用化され始めた。実はこの超解像観察に大きく貢献しているのが光スイッチング蛍光タンパク質である。

回折限界の壁を如何にして破ることができたかという点、端的に言えば「蛍光分子の2つの状態間、例えば明状態と暗状態の遷移を空間的・時間的に制御すること」によってである。大まかに分類すると2種類の超解像顕微鏡観察法が開発されており、1つは「蛍光の励起に工夫」を凝らしたもので、もう一つは「蛍光の観察に工夫」を凝らしたものである。前者、後者の代表的なものがそれぞれSTED (stimulated emission depletion) とPALM (photoactivated localization microscopy) である³⁾。

STEDは試料面の蛍光分子が励起されうる範囲を極力小さくすることで空間分解能の向上を達成している。回折限界の壁によって、励起レーザーを200 nm以下のスポットに絞り込むことは出来ないが、Hellらは励起レーザーを取り囲むような、ドーナツ状のレーザーを照射することを考案した(図2A)。このドーナツ状の光(STEDビーム)は、誘導放出のための光であり、励起状態にある蛍光分子を強制的に基底状態へと戻す。使用する蛍光分子の発光スペクトルの最も長波長側の光をSTEDビームの波長に設定し、それより短波長側の光を観察する。これによって、見かけの発光領域がより局所に絞り込まれ、空間分解能が50 nm以下にまで向上した。この方法の利点はSTEDビームのためのレーザーが一本増えただけで原理的には通常の共焦点顕微鏡と変わらないことである。しかしながら、誘導放出させるためにGW/cm²というとても高いパワー密度のSTEDビームを照射する必要がある。蛍光分子のみならず、試料そのものへの光損傷を回避することが不可能であった。そこでHellらは照射エネルギーを大幅に減少させることができるRESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transitions) という方法を考案した。RESOLFTは莫大なエネルギーを必要とする誘導放出の代わりに、少ない光エネルギーで蛍光のOn/Offを制御できる光スイッチング蛍光タンパク質を利用することがポイントで、実に1/10⁸に照射エネルギーを減

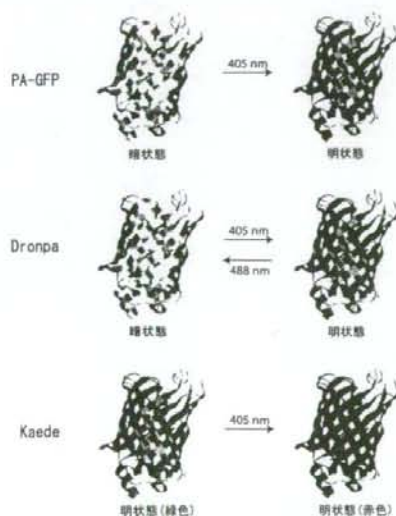


図1 光スイッチング蛍光タンパク質の特性。PA-GFPは不可逆的、Dronpaは可逆的に明暗状態間を変化する。Kaedeは不可逆的に蛍光色に変化する

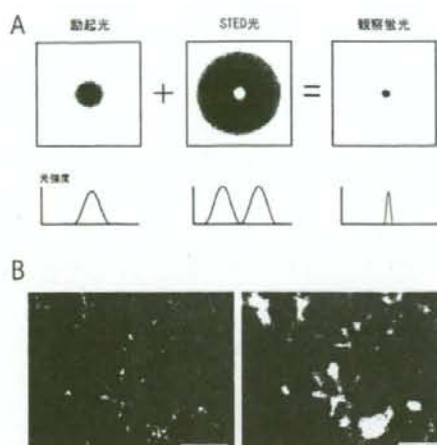


図2 STED法(A) STEDの原理。回折限界まで絞り込んだ励起レーザー光(紫)とドーナツ形に成形されたSTEDビーム(赤)が蛍光分子に照射されると、STEDビームが照射されている部分の蛍光分子は誘導放出によって強制的に基底状態へと遷移させられ、ドーナツの中心部分のみ蛍光が観察される(緑)。この領域は回折限界よりも小さく、数十nmの半値全幅をもつ鋭いピーク形状の蛍光スポットとなる。(B) STED法による黄色蛍光タンパク質 Citrineで標識した小胞体の超解像観察。右パネルは同視野の共焦点顕微鏡観察像を示す。文献4cよりそれぞれPNASの許可を得て掲載。スケールバーは5 μm (A)。

少させることに成功した。光スイッチング蛍光タンパク質としては Lukyanov らが開発した asFP595 を利用し、黄色光と青色でそれぞれ蛍光の On と Off を制御している。近年は生細胞観察が実現しただけでなく(図2B)、Dronpa を遺伝子工学的に改変することで特徴的な吸収特性やスイッチング特性を有する bsDronpa と Padron が開発されマルチカラー観察も行われ始めた⁴⁾。

一方の PALM は光スイッチング蛍光タンパク質を発見した試料を全反射顕微鏡で1分子観察することを基本とする。従って、撮像素子は EM-CCD などの高感度カメラの使用が必須である。この方法ではまず刺激光の光量を調節して、回折限界の領域内に存在する光スイッチング蛍光タンパク質を1つだけ活性化する。もし2つ以上が活性化された場合は観察対象から外す。次に、輝点の信号を十分な S/N 比が得られる程度の露光時間で取得し、最後に蛍光タンパク質を褪色させる。これら3つのステップを、試料中のすべての蛍光分子が褪色するまで繰り返す(図3A)。画像取得後は一つ一つの輝点の強度分布からその重心位置を計算する。このような計算によって輝度重心が1nm程度程度の“位置精度”で決定でき、幅が数百nmの輝度分布を数nmに変換することで、超解像が達成される。実際にはノイズ等の影響により、数nmの空間分解能は達成されていないが、それでも透過型電子顕微鏡

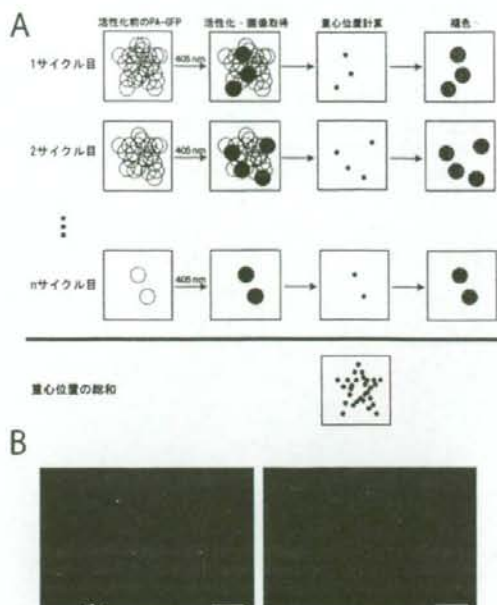


図3 PALM法(A) PALMの原理。PALMは光活性化→画像取得→重心位置計算→褪色の過程を1サイクルとして、視野中の蛍光分子が全て褪色されるまで繰り返し、得られた全ての輝度重心輝点を重ね合わせることで最終画像を得る。(B) PALMによるdEosFPで標識したミトコンドリアの超解像観察。右パネルは同視野の全反射顕微鏡像を示す。文献5aより Science の許可を得て掲載。スケールバーは1 μm 。

像に肉迫する、10nm程度の空間分解能が得られている(図3B)⁵⁾。開発当初は2~12時間かかっていた画像取得が、最近では25~60秒に短縮され、生細胞における細胞接着複合体の観察に成功している。しかしながら、ビデオレート観察からはほど遠く、依然として動きの速い現象を観察するのは難しい。時間分解能を向上させるためには単位時間・単位面積当たりを取得可能な光子数をさらに増やす必要があり、その為にはより明るい光スイッチングタンパク質の開発が待たれる。Manley らに依れば、現時点で PALM に最適な光スイッチング蛍光タンパク質は EosFP とのことで、この蛍光タンパク質を改良することで、高い時間分解 PALM が可能になるかも知れない。

現在も超解像観察に関する技術開発は日進月歩の勢いで進められており、そう遠くない将来に生きた試料を10nm程度の空間分解能でビデオレート観察できるようになるかもしれない。顕微鏡開発と蛍光タンパク質開発のバランスが益々重要になるであろう。光学屋と生物屋のコラボレーションによってのみなし得るまさに境界領域科学である。今後のさらなる発展を多に期待したい。

参考文献

- 1) R. Y. Tsien: *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509 (1998).
- 2) K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov, and V. V. Verkhusha: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 885 (2005).
- 3) M. Fernandez-Suarez and A. Y. Ting: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 929 (2008).
- 4) a) S. W. Hell and J. Wichmann: *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994), b) M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, and S. W. Hell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17565 (2005), c) B. Hein, K. I. Willig, and S. W. Hell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 14271 (2008), d) M. Andresen, A. C. Stiel, J. Folling, D. Wenzel, A. Schonle, A. Egner, C. Eggeling, S. W. Hell, and S. Jakobs: *Nature Biotechnol.* **26**, 1035 (2008).
- 5) a) E. Betzig et al: *Science* **313**, 1642 (2006), b) H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, and E. Betzig: *Nature Methods* **5**, 417 (2008).

Engineering a Novel Multifunctional Green Fluorescent Protein Tag for a Wide Variety of Protein Research

Takuya Kobayashi¹, Nobuhiro Morone², Taku Kashiyama¹, Hideto Oyamada³, Nagomi Kurebayashi¹, Takashi Murayama^{1*}

1 Department of Pharmacology, Juntendo University School of Medicine, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, **2** Department of Ultrastructural Research, National Institute of Neuroscience, National Center for Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan, **3** Department of Pharmacology, School of Medicine, Showa University, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan

Abstract

Background: Genetically encoded tag is a powerful tool for protein research. Various kinds of tags have been developed: fluorescent proteins for live-cell imaging, affinity tags for protein isolation, and epitope tags for immunological detections. One of the major problems concerning the protein tagging is that many constructs with different tags have to be made for different applications, which is time- and resource-consuming.

Methodology/Principal Findings: Here we report a novel multifunctional green fluorescent protein (mfGFP) tag which was engineered by inserting multiple peptide tags, i.e., octa-histidine (8×His), streptavidin-binding peptide (SBP), and c-Myc tag, in tandem into a loop of GFP. When fused to various proteins, mfGFP monitored their localization in living cells. Streptavidin agarose column chromatography with the SBP tag successfully isolated the protein complexes in a native form with a high purity. Tandem affinity purification (TAP) with 8×His and SBP tags in mfGFP further purified the protein complexes. mfGFP was clearly detected by c-Myc-specific antibody both in immunofluorescence and immuno-electron microscopy (EM). These findings indicate that mfGFP works well as a multifunctional tag in mammalian cells. The tag insertion was also successful in other fluorescent protein, mCherry.

Conclusions and Significance: The multifunctional fluorescent protein tag is a useful tool for a wide variety of protein research, and may have the advantage over other multiple tag systems in its higher expandability and compatibility with existing and future tag technologies.

Citation: Kobayashi T, Morone N, Kashiyama T, Oyamada H, Kurebayashi N, et al. (2008) Engineering a Novel Multifunctional Green Fluorescent Protein Tag for a Wide Variety of Protein Research. PLoS ONE 3(12): e3822. doi:10.1371/journal.pone.0003822

Editor: Axel Imhof, University of Munich and Center of Integrated Protein Science, Germany

Received: July 14, 2008; **Accepted:** November 7, 2008; **Published:** December 2, 2008

Copyright: © 2008 Kobayashi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by grants from the Japan Science and Technology Agency (SENTAN), Grants-in-Aid for Scientific Research, Japan Society for Promotion of Science, and a Health Labor Sciences Research Grant (NANO-001).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: takashim@juntendo.ac.jp

Introduction

Protein complexes mediate the majority of cellular processes. Information on localization, structure, and interaction of such protein complexes provides key insights into their functions. Genetically encoded protein tags are a useful tool for characterization of protein complexes. There are a variety of tags for localizing proteins in living cells. Among them, the most widely used are *Aequorea victoria* green fluorescent protein (GFP) and the related fluorescent proteins, which are easily fused to proteins of interest [1,2]. Because the N- and C-termini of GFP are closely located to each other, this protein can be inserted in the middle of the fusion partner, as well as fusion at its N- and C-termini [3]. This is great advantage in case that the protein has intolerant of tag fusion at both N- and C-termini.

Structural and interaction analysis of the protein complexes requires isolation of the complex. A variety of affinity tags have been developed, which strongly bind to a specified ligand [4,5]. The use of multiple tags, such as tandem affinity purification (TAP) strategy, has recently become popular for purification of the

protein complexes with a high purity [6]. Epitope tags, small peptides to which commercially available highly specific antibody bind, are used for a wide variety of immunological detections [7]. Epitope tags are also useful for affinity isolation of the protein complexes by immunoprecipitation.

In general, cellular localization and isolation of protein complexes are determined using fusion proteins with different tags; GFP-tagged protein for localization and affinity tagged-protein for structural and protein composition analysis. However, making of different constructs is time- and resource-consuming, especially in case of analyzing a large number of proteins, e.g., genome-wide analysis. In addition, it is better to correlate the two determinations using the same fusion protein. Development of a single tag with multifunction is therefore highly desirable.

GFP forms a rigid and stable 11-stranded β -barrel structures [1,2] (see Fig. 1A). It has been shown that GFP is tolerant to insertion of foreign peptides within certain loops between the β -strands [8] and thus can be a scaffold for short peptides [9,10]. In this study, we engineered "multifunctional GFP" (mfGFP), in which the multiple peptide tags (affinity tags and epitope tags) were

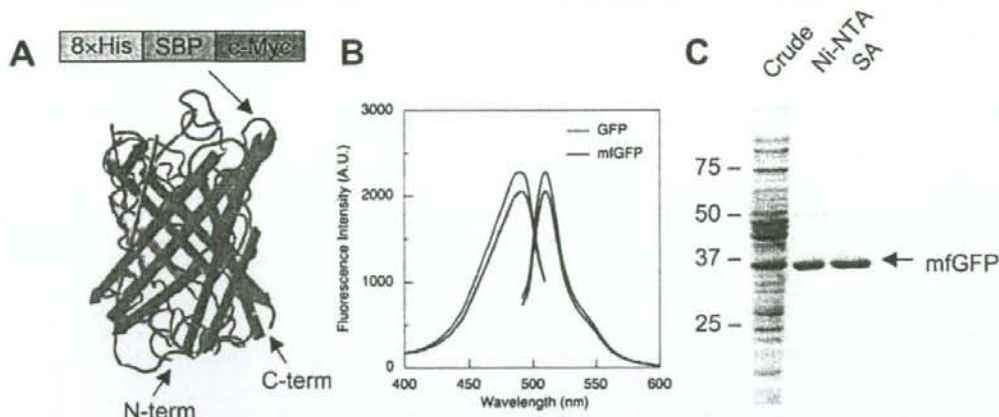


Figure 1. Design and characterization of multifunctional GFP (mfGFP). (A) Schematic representation of mfGFP. Octa-histidine (8xHis), streptavidin-binding peptide (SBP), and c-Myc tag were inserted in tandem after Asp173 within a loop between the β -strands (blue) that is located on the opposite side of N- and C-termini. (B) Excitation and emission spectra of wild type GFP (with N-terminal His-tag) and mfGFP that were expressed in *E. coli* and purified by nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) beads. (C) Purification of mfGFP. mfGFP was purified by either Ni-NTA beads or streptavidin beads, processed on an SDS-polyacrylamide gel, and stained with CBB.
doi:10.1371/journal.pone.0003822.g001

inserted in tandem into a loop of GFP. The mfGFP successfully monitored localization of the fusion protein in living cells, isolated the protein complex in native form with a high purity, and detected the protein in immunofluorescence and immuno-electron microscopy (EM). mfGFP is a useful tool for a wide variety of protein research including live-cell imaging, affinity isolation, and immunological detection.

Results and Discussion

The mfGFP was engineered by inserting three tags (a total of 67 residues including linkers) into GFP in tandem: octa-histidine (8xHis) and streptavidin-binding peptide (SBP) for affinity isolation, and c-Myc for immunological detection (see Supplementary Figure S1). The Asp173-Gly174 was chosen as an insertion site, because it is located at the opposite side of N- and C-termini that would allow tags to work effectively by minimizing steric hindrance provided by the fusion partner (Fig. 1A).

We initially tested the properties of mfGFP which was expressed in bacterial system. mfGFP was expressed in *E. coli* as a soluble protein with bright green fluorescence. Excitation and emission spectra of the mfGFP were almost identical with those of wild type GFP with only a slight reduction of peak fluorescent intensity (Fig. 1B). Thus, insertion of the tags did not substantially affect the fluorescence properties of GFP. mfGFP was isolated as a single band in SDS-PAGE by nickel-nitrilotriacetic (Ni-NTA) acid and streptavidin (SA) chromatography (Fig. 1C). These findings indicate that 8xHis and SBP work well in the loop of mfGFP.

Next, we tested the ability of mfGFP in mammalian cells. HeLa cells expressing mfGFP alone demonstrated a homogeneous fluorescence throughout the cells, being consistent with the distribution of wild type GFP (Fig. 2A). This suggests that mfGFP is not associated with any specific organelle or cellular structures. mfGFP was fused to several membrane proteins to evaluate its fusion properties: clathrin light chain A (CLCA), a 30 kDa component of clathrin coated pits [11] (Fig. 2B), calnexin, a 90 kDa endoplasmic reticulum (ER) chaperon protein [12] (Fig. 2C), and ryanodine receptor type 1 (RyR1), a large

homotetrameric Ca^{2+} release channel protein in the ER [13] (Fig. 2D). The mfGFP was fused at C-terminus for CLCA and calnexin or in the middle of the coding sequence for RyR1 [13]. All the fusion proteins demonstrated appropriate cellular localization, indicating that mfGFP can monitor localization of the fusion partner as is the case with wild type GFP.

The mfGFP-tagged protein complexes were isolated by SA column using SBP-tag (see Materials and Methods). SBP-tag is superior than His-tag in purity of the isolated proteins in higher organisms including mammalian cells [14]. The isolated CLCA fraction contained two polypeptide bands (~160 and ~60 kDa) which correspond to clathrin heavy chain (CHC) and CLCA-mfGFP, respectively (Fig. 2E). CLCA interacts with CHC to form "triskelion" which is an assemble unit of clathrin cage [11]. Negative staining EM of the isolated CLCA fraction exhibited characteristic three-armed pinwheel morphology of triskelion (Fig. 2F). Calnexin fraction exhibited a major 120 kDa polypeptide of calnexin-mfGFP (Fig. 2E). RyR1 was successfully isolated as a single high molecular weight band in SDS-PAGE (Fig. 2E). A quarterfoil appearance in negative staining EM (Fig. 2G) together with a specific [3H]ryanodine binding (data not shown) confirmed that the isolated RyR1 forms functional Ca^{2+} release channel [13]. Thus, mfGFP can isolate protein complexes in a native form, at both terminal and internal fusion.

Tandem affinity purification (TAP) is a powerful strategy for protein interaction analysis, which isolates the protein complex with a high purity using two distinct affinity tags [6]. We tested 8xHis tag and SBP-tag inserted into mfGFP as TAP tags using 74-kDa dynein intermediate chain (DIC). DIC interacts with ~500 kDa dynein heavy chain (DHC) to form the cytoplasmic dynein complex. mfGFP was fused to C-terminus of DIC. When expressed in HeLa cells, DIC-mfGFP exhibited as dots in the cytoplasm which move along with microtubules (Fig. 3A). SA column chromatography isolated two major bands; >250 kDa for DHC and ~110 kDa for DIC-mfGFP (Fig. 3B). Some contaminants were also detected in 50–75 kDa range. Ni-NTA chromatography with 8xHis tag isolated the two bands but many

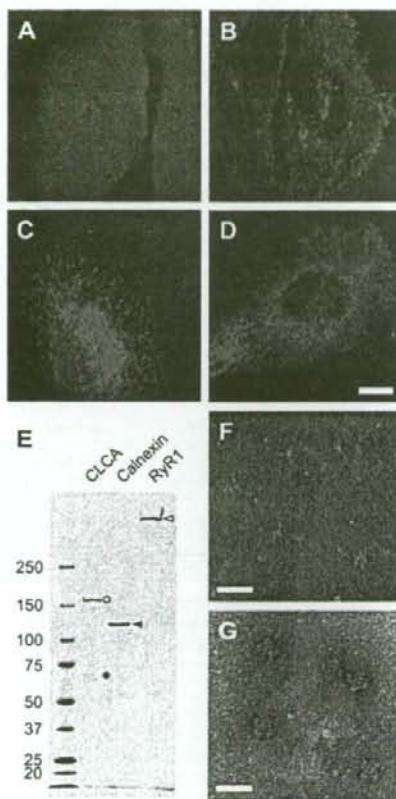


Figure 2. Localization of mGFP fusion proteins in living cells and isolation of mGFP-fusion protein complexes. (A–D) HeLa cells were transfected with expression vectors of either mGFP alone (A) or mGFP fused with clathrin light chain A (CLCA) (B), calnexin (C), and type 1 ryanodine receptor (RyR1) (D). Whereas mGFP alone distributed throughout the cells, fusion proteins were localized at the expected site. Scale bars, 10 μm. (E) mGFP-fusion protein complexes were isolated by streptavidin column chromatography using SBP-tag. The isolated fractions were processed on an SDS-polyacrylamide gel, and stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB). CLCA (black circle) co-purified clathrin heavy chain (CHC) (white circle). Calnexin and RyR1 were isolated as a single band. (F and G) Negative staining EM observation of isolated CLCA and RyR1 fractions. CLCA exhibited three-armed pinwheel morphology of triskellion (F), whereas RyR1 exhibited characteristic quarterfoil appearance (G). Scale bar, 50 nm.
doi:10.1371/journal.pone.0003822.g002

contaminants were also detected. This indicates that 8×His tag alone is insufficient to isolate the protein complexes from the mammalian cells. The SA chromatography of the eluted fraction from Ni-NTA, however, significantly reduced contaminants in 50–75 kDa range relative to the SA chromatography alone. These findings suggest that 8×His tag and SBP-tag work well as TAP tags. Several peptide affinity tags for TAP strategy have been proposed, which include calmodulin-binding peptide, StrepTagII, and FLAG tag [6,15]. These tags would also be good candidates for TAP strategy with mGFP.

Properties of the epitope tag in immunological detections were tested with CLCA. GFP fluorescence of HeLa cells stably expressing CLCA-mGFP distributed in a punctate pattern within the cell (Fig. 4A). AlexaFluor594 staining with c-Myc-specific antibody co-localized with GFP fluorescence (Fig. 4B). In frozen-replica immuno-EM [16], clathrin coated pits and vesicles were observed in the cytoplasmic surface of the plasma membrane together with caveolae and membrane cytoskeletons formed by actin filaments (Fig. 4C). c-Myc tag was detected by c-Myc-specific antibody and 10 nm colloidal gold-conjugated secondary antibody. Gold label was specifically detected on clathrin coated pits and vesicles (Fig. 4D,E), but not on caveolae or actin cytoskeletons (Fig. 4C,F). These findings demonstrated that c-Myc tag in mGFP works well both in immunofluorescence and immuno-EM studies.

A pair of fluorescent proteins (e.g., CFP and YFP) is widely used for fluorescence resonance energy transfer (FRET), a strategy for interaction analysis of two proteins [17]. A detailed cellular localization by immuno-EM and direct interaction by immunoprecipitation of the two proteins may further support the FRET results. However, no antibodies are so far available, which can distinguish fluorescent proteins from the same origins (e.g., CFP, GFP, and YFP). Fluorescent proteins with different epitope tags can be easily distinguished by commercially available tag-specific antibodies. Insertion of epitope tags into fluorescent proteins is highly useful for immunological detections of multiple fluorescent proteins.

The fluorescent proteins so far discovered share typical 11-stranded β-barrel structures [1,2]. The tag insertion will be applicable to the other fluorescent proteins. We successfully inserted several tags into the corresponding loop of mCherry, a red fluorescent protein derived from the *Dicostoma* sp. [18] (supplementary Figure S2). In addition, because the loop of GFP is enough tolerant to insertion of the large foreign peptides [8], the tags can also be varied depending on applications. Suitable combinations of fluorescent proteins and inserted tags will be adjusted for individual proteins and/or research applications.

Linking GFP and affinity tag in tandem is used as a simple approach for live-cell imaging and protein isolation [19]. When the tag is inserted into the coding sequence of the protein of interest, it would be expected that affinity tag sometimes does not work due to steric hindrance produced by GFP and the protein of interest that surround the affinity tag. In contrast, the affinity tag in mGFP work well irrespective of the insertion site, because the affinity tag is located at the opposite side of N- and C-termini of GFP that are linked to the protein of interest (see Fig. 1A). Transposon-based random insertion of GFP is an interesting approach to study structure-function relationship of the relatively large protein [3]. mGFP will also be useful for the strategy.

The engineered tag systems for both live-cell imaging and protein isolation have recently been available (HaloTag and SNAP-tag) [20,21]. These tags are derived from some enzymes and covalently attach the specific ligand to themselves. By choosing the ligand, they can be used for live-cell imaging (with fluorescent ligands) or protein isolation (with affinity ligands such as biotin). As compared with these tags, the main advantage of mGFP is its high expandability and compatibility with existing and future tag technologies. Whereas HaloTag and SNAP-tag systems are limited by its ligand design, all the peptide tags are a potential candidate for mGFP. In addition, easy-to-use format is of great advantage of mGFP. GFP and the related fluorescent proteins are widely used in the world and the system works just by replacing the original GFP by mGFP. Thus, mGFP is superior to the other tag systems. mGFP will be a powerful tool for a wide variety of protein research, especially in analyzing a number of target proteins, such as genome-wide analysis of unknown proteins.