

Supplementary References

12. Shimozono, A., et al. Concatenation of cyan and yellow fluorescent proteins for efficient resonance energy transfer. *Biochemistry*. **45**, 6267-6271 (2006).
13. Shaner, N.C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. **22**, 1567-1572 (2004).
14. Miyawaki, A., et al. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. **388**, 882-887 (1997).
15. Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C. & Tsien, R.Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*. **296**, 913-916 (2002).
16. Reid, B.G. & Flynn, G.C. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*. **36**, 6786-6791 (1997).
17. Theodossiou, T. and MacRobert A.J. Comparison of the photodynamic effect of exogenous photoporphyrin and protoporphyrin IX on PAM 212 murine keratinocytes. *Photochem Photobiol*. **76**, 530-537 (2002).
18. Miyawaki, A. & Tsien, R. Y. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol*. **327**, 472-500 (2000)

1 波長励起 Dual FRET による 生細胞内における複数現象の可視化

永井健治, 小林健太郎

はじめに

蛍光タンパク質間の Förster 共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer: FRET) を利用することで、特定のタンパク質の活性化やイオン・代謝産物の動態などを可視化するための機能指示薬が作製可能である¹⁾。蛍光タンパク質が遺伝子にコードされているため、遺伝子工学的な技術を有している生命科学者であれば至極簡単に機能指示薬を作製することが可能であり、多くの生命科学者が自ら蛍光機能指示薬を設計する時代へと突入したといっても過言ではない。これまでの FRET 法は原理上可視光の広い範囲の波長をその観察に必要としていたため、1つの細胞内現象に観察が限定されてしまうことが多かった。しかしながら、細胞内におけるシグナルネットワークを理解するには一度に観察する生理現象の数を増やし、現象間の連関についての知見を得ることが重要である。このような要求に応えるべく、励起波長が異なる2つの FRET ペアを用いた2波長励起4波長測定により2つの生理現象を可視化する方法が近年いくつか報告された^{2)~4)}。しかしながら、2つの励起波長を切り替

えながら照射することで細胞への光照射量が多くなり、細胞の光損傷の可能性が多くなることや、2つの現象を同時に観察することが原理上できないなどの問題点を含んでいた。

そこで本稿では最近われわれが考案した同一波長で励起可能な2つの FRET 指示薬を用いることで2つの現象を同時に観察することを可能にする dual FRET 法⁵⁾ について、特に取得画像の処理方法を中心に概説する。

原理

FRET とは、2つの分子間におけるエネルギー供与体 (ドナー) からエネルギー受容体 (アクセプター) へのエネルギー移動のことをいう⁶⁾。より具体的には、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルに重なりがあり、励起状態にあるドナーの近傍 (~10 nm 以下) に、ある相対的位置関係を保ってアクセプターが存在するとき、無輻射的にドナーの励起エネルギーがアクセプターに移動する結果、アクセプターが励起され、アクセプターが蛍光分子であれば、それ固有の蛍光が観察される現象が FRET である。この現象

Visualization of multiple cellular events by dual FRET-based indicators with a single excitation light
Takeharu Nagai^{1) 2)}/Kentarō Kobayashi²⁾: Laboratory for Nanosystems Physiology, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University¹⁾/Nikon Imaging Center, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University²⁾ (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¹⁾/北海道大学電子科学研究所ニコンイメージングセンター²⁾) E-mail: tnagai@es.hokudai.ac.jp/kobayasi@es.hokudai.ac.jp

はドナーとアクセプターが一般的なタンパク質分子のサイズと同程度である10 nm以内に存在するときを生じるため、タンパク質の修飾や特定分子の結合に伴うタンパク質の立体構造変化をFRETの変化として検出することを可能にする。この原理を応用することで、これまでにCa²⁺、cAMP、ATP、膜電位、タンパク質リン酸化、低分子量Gタンパク質の活性化状態など数多くの生理機能を可視化する指示薬が開発されてきた¹⁾。

1つのFRET指示薬を観察する場合はドナーを励起しドナーとアクセプターの蛍光変化を測定する1波長励起2波長測定が一般的に用いられるが、2つのFRET指示薬を観察する場合には工夫が必要である。従来は励起波長が異なるFRETペアを利用し、励起波長を切り替えて4波長を連続的に測定するのが一般的であった。しかしながら、2波長を交互に切り替えて観察する方法には、サブ秒で起こるすばやい生理現象や、すばやく動き回る細胞に追従できないなどの問題点があった。そこでこのようなdual FRETペア(短波長ペアと長波長ペア)を観察する時間分解能を上げるべく、2波長を同時照射して観察しようとする。今度は短波長ペアのFRETシグナルが長波長ペアのFRET検出チャンネルに紛れ込んでしまうため、厳密なFRETの評価はできないという問題が起きてしまう。

そこでわれわれは同一波長で2つのFRETペアを励起し4波長を観察後、蛍光分離法を組み合わせるという方法を考案した⁵⁾。FRETペアとしてSirius-ECFP、Sapphire-DsRedを利用する。このSiriusはわれわれが開発した蛍光タンパク質でpH非依存的な最短波長発光(2010年1月現在)を誇る。それぞれSiriusとSapphireをFRETのドナーとし、380 nmの紫外線あるいは700 nm前後のフェムト秒パルスレーザーで励起することで、蛍光極大が424 nm(群青色)と510 nm(緑

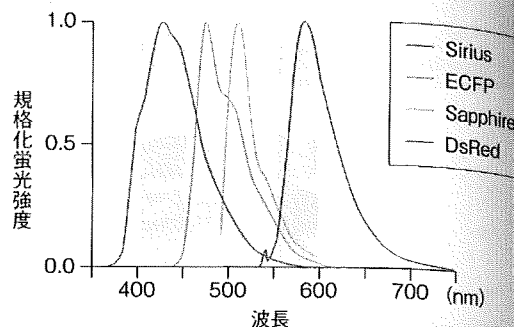


図1 Sirius, ECFP, Sapphire, DsRedの蛍光スペクトルと蛍光取得のためのバンドパスフィルター波長特性

曲線で各蛍光タンパク質の蛍光スペクトルを示し、塗りつぶしにより、各蛍光を取得するための干渉フィルター特性を示した(文献5より引用)

色)の蛍光を放つ。SiriusとSapphireの蛍光スペクトルはECFPとDsRedの吸収スペクトルと大きなオーバーラップを有するため、FRETペアとしての相性がよい。また、ECFPとDsRedはそれぞれ480 nm(水色)と580 nm(橙色)に蛍光極大があるため、Sirius, ECFP, Sapphire, DsRedの蛍光色は適当なバンドパスフィルター(干渉フィルター)を用いることで連続的あるいは同時に取得可能である(図1)。とはいえ、SiriusおよびECFPの蛍光スペクトルがあまりにもブロードであるため、無視できない量の蛍光シグナルがSapphireおよびDsRedの蛍光取得チャンネルに紛れ込んでしまう。このクロストークを取り除くために蛍光分離を行う。難しい計算は何もなく、ただ単にSirius, ECFP, Sapphire, DsRedそれぞれのスペクトルデータを参照し、連立方程式を解くだけである。以降、その方法を詳述する。

準備

1 観察試料

Sapphire-DsRedペアとSirius-ECFPペアのそれぞれを用いて機能指示薬を作製し、細胞に発現させる。機能指示薬の作製手順については他書を参照のこと⁷⁾。dual FRETの用途は同一

細胞内における異なるセカンドメッセンジャーの時空間動態の比較や、ある酵素の活性化とタンパク質相互作用の相関解析など多岐にわたるが、ここでは、Sapphire-DsRed ペアを用いた Ca^{2+} 指示薬 SapRC2 と、Sirius-ECFP ペアを用いたカスパーゼ3 活性化指示薬 SC-SCAT3 を発現する HeLa 細胞を使用する。また、Sirius, ECFP, Sapphire, DsRed それぞれの、細胞内における蛍光データを取得するために、各蛍光タンパク質を単独に発現する細胞も準備する。

2 顕微観察システム

● 顕微鏡

dual FRET 観察はかなり広い波長範囲を観察するため、対物レンズの色収差が問題になってくる。可能な限り4波長すべてにおいて色収差が補正されているものを選択することが、よいデータを取得するうえで重要になる。例えば、ニコン社のCFI Apo 40x WI λ Sのように405~850 nm まで、広い波長域での色収差補正を実現している対物レンズを利用するのが望ましい。

● 干渉フィルター

Sirius-ECFP, Sapphire-DsRed を利用した FRET 観察では励起光として 380 nm 前後の UV 光を用いることになる。われわれは全視野観察の場合は水銀光源を用い、セムロック社のFF01-370/36を通して励起光を得ている。ダイクロイックミラーはCFW-Di01-Clin (セムロック社) を、Sirius, ECFP, Sapphire, DsRed の蛍光を取得するためのバンドパスフィルターはそれぞれFF01-435/40, FF01-479/40, FF01-525/39, FF01-585/40 (いずれもセムロック社) をわれわれは用いている。これらのハードコートフィルターは、従来のソフトコート型干渉フィルターに比べると高価ではあるが透過率は抜群で、かなり明るく画像を取得することができる。4 蛍光色を観察する場合は1 蛍光色を取得するための波長幅が狭くならざるをえないため、少しでも透過率のよいフィルターを選ぶのが望ましい。共焦点や2光子励起法により観察する場合も同じ干渉フィルターを用いる。

● 画像解析ソフト

ここではNIS-Elements (ニコン社) またはMetaMorph (モレキュラーデバイス社) を例に解説するが、Image-J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) などでも蛍光分離は可能である。

プロトコール

生細胞の蛍光画像取得については、これまでに多くの総説が出ているので割愛し、ここでは主に蛍光画像を取得したあとの画像処理について述べる。

1 蛍光画像取得

① Sirius, ECFP, Sapphire, DsRed の各蛍光タンパク質を単独に発現する細胞に、dual FRET 観察時と同じ波長の励起光を照射し、それぞれの蛍光タンパク質からの蛍光シグナルを4つのチャンネル

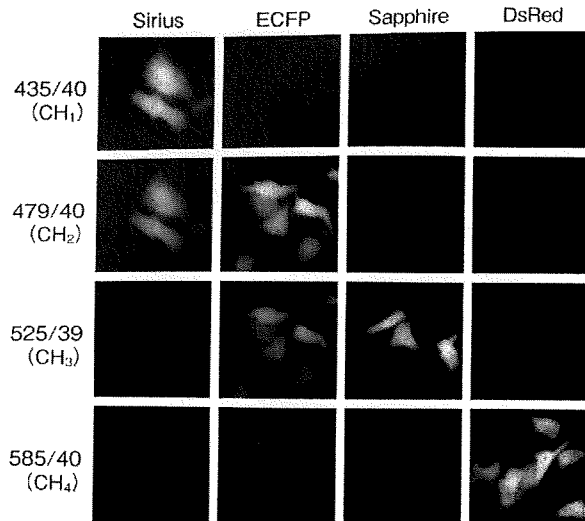


図2 各蛍光取得チャンネルにおける
蛍光タンパク質の蛍光画像

すべて (Sirius, ECFP, Sapphire, DsRed 蛍光取得用チャンネル, それぞれ CH₁, CH₂, CH₃, CH₄ とする) で検出する (図2)。

● SapRC2 と SC-SCAT3 を発現する細胞のタイムラプスイメージングを行う。

2 蛍光の分離

4色蛍光の分離は, それぞれの蛍光スペクトル情報から, 互いの混入割合を計算して真の蛍光量を算出する linear unmixing 法^{※1}により行っている⁸⁾。

なお, 基本的にわれわれは以下に示す式をもとに蛍光分離を行っている。その計算は大抵の PC にインストールされている Microsoft Excel に備わっている “MINVERSE” 関数^{※2}で行う。

$$\begin{bmatrix} 1 & Cf_1 & Sa_1 & Ds_1 \\ Si_2 & 1 & Sa_2 & Ds_2 \\ Si_3 & Cf_3 & 1 & Ds_3 \\ Si_4 & Cf_4 & Sa_4 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I_{s1} \\ I_{c1} \\ I_{s4} \\ I_{d4} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} CH_1 \\ CH_2 \\ CH_3 \\ CH_4 \end{bmatrix} \quad (\text{式1})$$

$$\begin{bmatrix} I_{s1} \\ I_{c1} \\ I_{s4} \\ I_{d4} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & Cf_1 & Sa_1 & Ds_1 \\ Si_2 & 1 & Sa_2 & Ds_2 \\ Si_3 & Cf_3 & 1 & Ds_3 \\ Si_4 & Cf_4 & Sa_4 & 1 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} CH_1 \\ CH_2 \\ CH_3 \\ CH_4 \end{bmatrix} \quad (\text{式2})$$

ここで, CH₁, CH₂, CH₃, CH₄ は Sirius, ECFP, Sapphire, DsRed の各蛍光取得用チャンネルで検出した蛍光強度を表す。Sirius, ECFP, Sapphire, DsRed の各チャンネルへの寄与を, 各蛍光シグナルを本来取得すべきチャンネル (例えば Sirius であれば CH₁) の輝度値で規格化した Si_n, Cf_n, Sa_n, Ds_n (下付の n はチャンネルの番号を表す) とする。いずれも図2の蛍光画像から得られる値である。最終的に求めたいのは, Sirius, ECFP, Sapphire, DsRed それぞれの CH_n,

※1 これはいわゆる蛍光スペクトルのみならず, 4チャンネルの蛍光輝度データにも応用可能である。前者をスペクトルアンミキシング, 後者をチャンネルアンミキシングというように使い分けられる場合があるが, 本質は同じである。しかしながら, 解析ソフトによってはわざわざ使い分けている場合があり, しかもいずれか一方しか計算できないようになっていたりするので, やっかいである。工夫次第でなんとかなるものなので, ここでは現状の解析ソフトを用いた例を紹介する。

※2 正方行列の逆行列を返す関数。

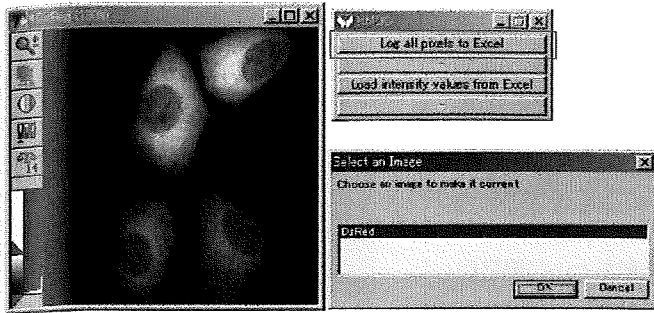


図3 画像データのExcelファイルへの変換

X	Y	Image	Plane	Date	Elapsed Time	Region No	Stage	Label	Wavelength	Z Position	Left
1	1	38237	00000								0
2	51	695	90	359	373	110	403	46	206		
3	257	249	289	121	159	327	129	0	87		
4	346	123	643	196	470	354	200	48	327		
5	281	205	86	431	260	367	0	280	327		
6	273	47	0	149	306	59	189	204	0		
7	110	139	187	58	92	100	76	110	132		
8	71	350	5	179	94	345	39	356	420		
9	359	139	237	490	322	230	281	390	139		
10	89	375	292	322	355	4	34	187	295		
11	134	321	23	256	207	180	203	96	0		
12	305	464	66	0	287	125	408	95	0		
13	533	366	383	108	311	100	117	420	248		
14	141	101	201	342	354	341	282	299	221		
15	285	295	470	196	105	64	97	347			
16	470	470	470	470	470	470	470	470	470	470	470

図4 Excelに読み込まれた画像の輝度データ

CH₂, CH₃, CH₁における正味の蛍光輝度値であり、それぞれを I_{CH₂}, I_{CH₃}, I_{CH₁}と表している。

以下にMetaMorphおよびNIS-elementsを使用した場合の蛍光分離法を記載する。後者はもともとニコンスペクトル共焦点顕微鏡AISIにオプション搭載の32チャンネルPMT^{※3}を用いて取得したスペクトルデータを分離する機能が備わっているので、Excelを使用する必要はないが、4チャンネルデータでも蛍光分離ができるように“擬似スペクトル”画像変換を行う必要がある。

1) MetaMorphによる蛍光分離

① 画像データをExcelファイルに変換

まずMetaMorphを起動して、dual FRETの各チャンネルにおける蛍光画像ファイルを開く。

[Journal] → [Load Taskbar] → “C:\MM\Taskbars\NMDC.jtb”を順次選択して実行すると、タスクバーが起動する^{※4}。

“Log all pixels to Excel”をクリックするとExcelが起動し、そして図3のように処理元の画像を問われる^{※5}。

画像を選択して“OK”をクリックすると、画像内の各ピクセルにおける輝度が読み込まれExcelシート上に数値が展開される。この処理は即座に完了する。図4のように3行目以降に各ピクセルの輝度データが記載される。

※3 photomultiplier tube. 微弱光を検出し電気信号に変換して増幅する高感度検出器。

※4 本Journal (機能を複数組合わせて連続的に動作させる機能)はデフォルトでインストールされていないので、必要な場合はモレキュラーデバイス社に問い合わせること。

※5 このとき、実際の処理Journalは、C:\UI\journalフォルダに保存されている。

● Excelでの逆行列演算処理

Excelによる逆行列演算は、以下のようにして行う。

Sirius, ECFP, Sapphire, DsRedの各蛍光タンパク質を単独に発現する細胞をdual FRET観察時と同じ波長で励起し、Sirius, ECFP, Sapphire, DsRed観察用の各チャンネルでの蛍光輝度を計測する。

次に、各タンパク質での蛍光強度を、最大強度を1に規格化した行列 (S_{in} , Cf_n , Sa_n , Ds_n) を作成する。以下は図2の実測値から得られた行列である。

$$\begin{pmatrix} S_{i1} & Cf_1 & Sa_1 & Ds_1 \\ S_{i2} & Cf_2 & Sa_2 & Ds_2 \\ S_{i3} & Cf_3 & Sa_3 & Ds_3 \\ S_{i4} & Cf_4 & Sa_4 & Ds_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1.0000 & 0.0675 & 0.0424 & 0.0621 \\ 0.7189 & 1.0000 & 0.1695 & 0.0927 \\ 0.2217 & 0.6581 & 1.0000 & 0.0804 \\ 0.1132 & 0.2831 & 0.2720 & 1.0000 \end{pmatrix}$$

この右辺にExcelのMINVERSE関数を適応すると、以下の逆行列が得られる。

$$\begin{pmatrix} S_{i1} & Cf_1 & Sa_1 & Ds_1 \\ S_{i2} & Cf_2 & Sa_2 & Ds_2 \\ S_{i3} & Cf_3 & Sa_3 & Ds_3 \\ S_{i4} & Cf_4 & Sa_4 & Ds_4 \end{pmatrix}^{-1} = \begin{pmatrix} 1.0398 & -0.0394 & -0.0213 & -0.0592 \\ -0.7999 & 1.1667 & -0.1513 & -0.0463 \\ 0.2936 & -0.7492 & 1.1253 & -0.0393 \\ 0.0289 & -0.1220 & -0.2608 & 1.0305 \end{pmatrix}$$

したがって(式2)より、Siriusのピクセル(0,0) (図4ではA3セルに相当)の正味の蛍光量 I_{s1} は、

$$I_{s1} = [CH_2:A3] \times 1.0398 + [CH_2:A3] \times (-0.0394) + [CH_3:A3] \times (-0.0213) + [CH_4:A3] \times (-0.0592)$$

となる。逆行列要素を絶対参照としておけば、●で得られたExcelシート中に記述されている他のピクセルの演算は、連続データの作成で一度に計算できる(範囲内で、右下四角のドラッグ)。他のシートでも、例えばECFPでは行列要素を-0.7999, 1.1667, -0.1513, -0.0463とし、同様の処理を行えばよい*6。

● 数値データを画像ファイルに変換

MetaMorphとExcelを起動し、Excelでは●で得られた計算後のデータファイルを展開しておく*7。

"CYMMYTaskbars\NMDc.jtb"のタスクバーで、"Load intensity values from Excel"を選択し、画像サイズを入力する(図5A)*8。

"OK"をクリックすると計算が実行される。左上から1ピクセルずつデータが入力され、新しい画像が作成されてゆく。すべて描き終わるまで、若干の時間がかかる(図5B)。

● ratio画像作成

前記の計算で得られたSirius, ECFP, Sapphire, DsRedの各蛍光

*6 ただし、逆行列要素に負の値が入っているため、ピクセルによっては演算結果が負の値となることもある。われわれはExcelのIF関数を利用し、計算結果が負の場合は0とし、正の場合は四捨五入した整数とする処理を施している。

*7 このファイルのデータがそのまま変換されるため、ラベルなどがある行は削除してデータ値のみのものとし、変換するシート名は"Sheet1"としておく必要がある。

*8 縦横が512ピクセルまで。

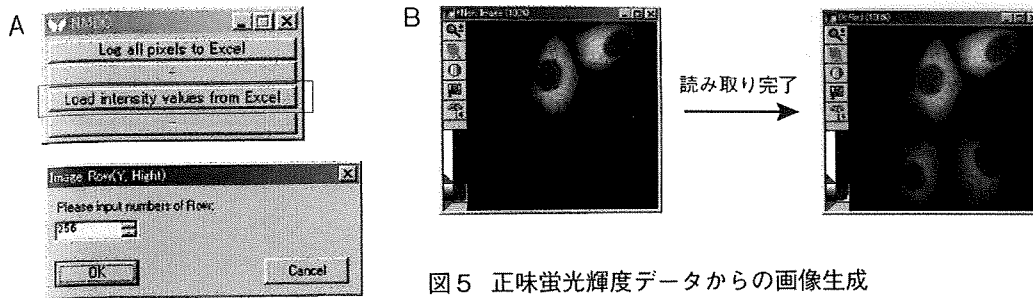


図5 正味蛍光輝度データからの画像生成

wl	ex	wl	em
324	0	424	1.000000
374	0	474	0.718856
411	0	511	0.221662
483	0	583	0.113186

図6 NIS-Elements登録用のスペクトルデータ例

画像を用いて、Sirius/ECFP、Sapphire/DsRedの擬似カラーレシオ画像を作成することで、FRET変化が一目でわかる画像を作成することができる。そのためにはMetaMorphの“ratio”を選択し、適当なRmaxとRmin^{※9}、どの画像を輝度情報として反映させるかを選択して、計算を実行する。

※9 それぞれratioの最大値と最小値を規定する。

2) NIS-Elementsによる蛍光分離^{※10}

① スペクトルデータの登録

新規の蛍光タンパク質・蛍光プローブのスペクトルデータを登録してアンミキシングやチャンネル設定に使用するには、以下のような形式のテキストファイルでスペクトルデータを用意する。ここでは、Siriusのスペクトルデータ(Si₁, Si₂, Si₃, Si₄)登録を例として示す(図6)。

1行目: “wl, ex, wl, em”, 2行目以降: “励起波長, 励起強度, 蛍光波長, 蛍光強度”としてデータを配置する。前の2項への入力で励起データの登録も可能だが、今回は赤字部分で示す蛍光データのみを登録する。

このファイルを以下のフォルダに入れてNIS-Elementsを再起動する。

C:\Documents and Settings\All Users\Application Data\
Laboratory Imaging\Platform\Fluorescent Probes

以上で試薬一覧(図中のSpectra・Sirius)に登録されるため、NIS-Elements上で擬似スペクトル表示も可能となる(図7)。

② TIF形式の画像データから(擬似)スペクトル画像への変換

最初に、他の顕微鏡で取得した複数チャンネルのTIF画像ファイル

※10 図7~11は実際にNIS-Elementsを用いて取得した画像である。

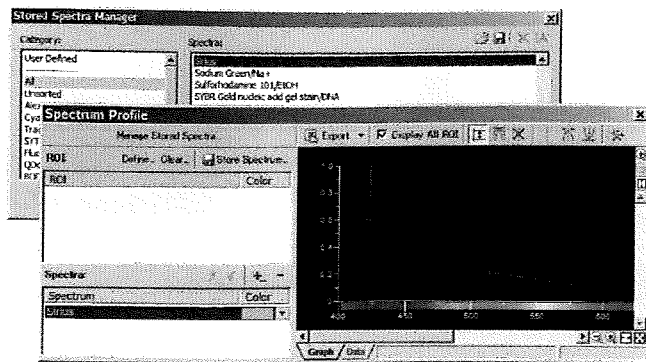


図7 登録スペクトルの擬似表示

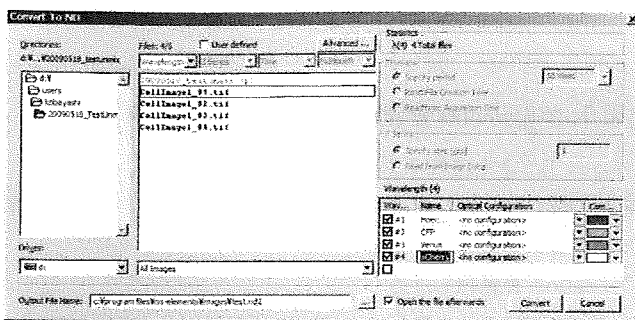


図8 NIS-Elementsでの画像展開

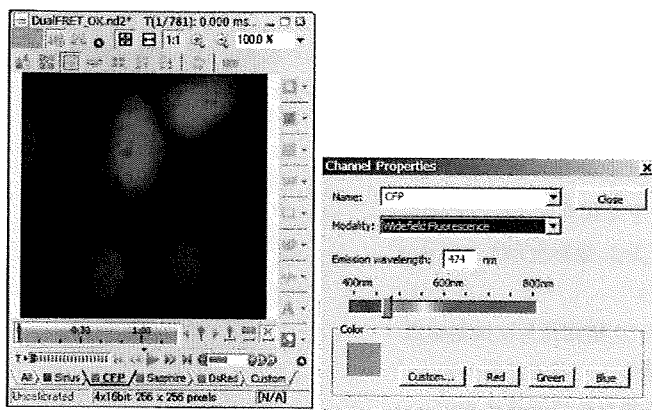


図9 登録した画像のECFPチャンネルの擬似カラー表示

から NIS-Elements の標準形式の ND2 形式ファイルを作成する (図 8)。
[File:ND:Creat ND Files] を実行する。ファイル名と各次元 (t, Z, l, 多点)^{※11} を対応させる。ここではチャンネル名は任意の名前でよい。

ND2 形式ファイルが作成されると、左下のチャンネルタブの右クリックメニューより [Property] を実行し、観察手法や蛍光色素・蛍光タンパク質の種類を指定することができる。●で未登録の蛍光色素でも蛍光波長を数値で入力することができ、波長に応じた擬似

※11 t:時間, Z:光軸方向の画像スキャン, l:チャンネル, 多点

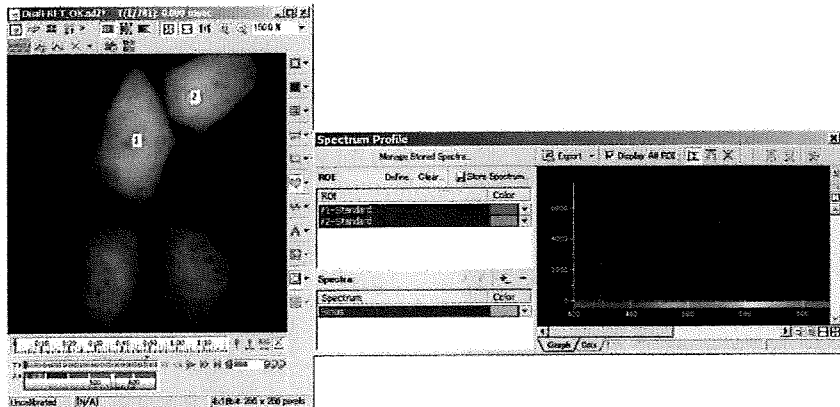


図10 多チャンネル画像の擬似スペクトル形式表示
1, 2はROIを示す

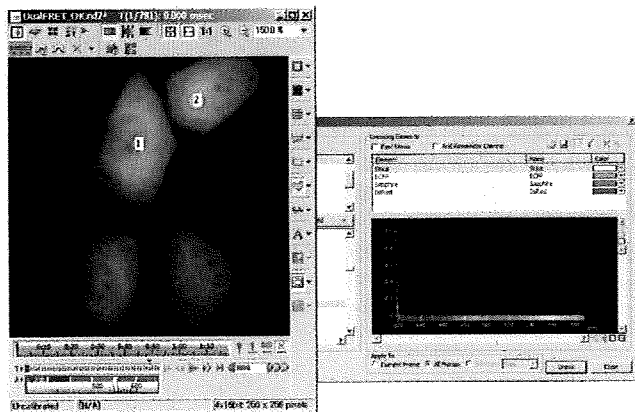


図11 蛍光分離後のスペクトル表示例

カラー表示がなされる。この場合、各チャンネル画像は“単一の蛍光波長”による蛍光画像とみなされる。図9はECFPの例を示す。

[Image:Treat As Spectral] の実行により、多チャンネルの画像は(擬似)スペクトル形式の画像となる(画像左下のチャンネルタブが、スペクトル表示形式へと変わる)。そのため、例えばROI^{※12}のスペクトルの表示も可能となる(図10)。

④ 蛍光分離

最後に [Image:Spectral Unmixing Setting] で蛍光試薬・タンパク質を選択して、蛍光分離を実行する。タイムラプス画像の場合でも、全画像を一度に処理することが可能である(図11)。

※12 region of interest. ソフトウェア上で定義する解析したい領域。

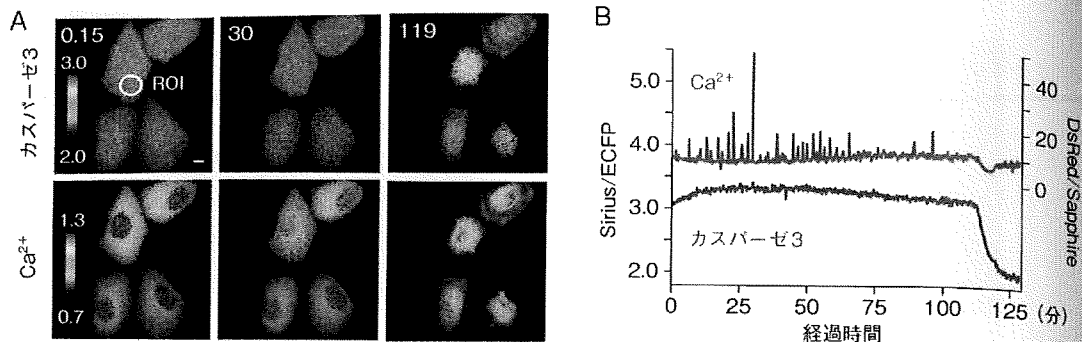


図12 TNF- α によってアポトーシスを誘導したHeLa細胞内でのCa²⁺の濃度変動とカスパーゼ3の活性化状態の可視化解析
スケールバー=10 μ m. 文献5から転載

実験例

HeLa細胞にSapRC2とSC-SCAT3を発現させ、TNF- α によるアポトーシスを誘導し、Ca²⁺の濃度変動とカスパーゼ3の活性化状態を同一細胞内で観察した。TNF- α 処理直後から1時間半程度にわたってCa²⁺オシレーションが続いてCa²⁺は静止期レベルに戻り、その30分程度後にカスパーゼ3の活性化がみられた(図12)。この結果から少なくともTNF- α によるHeLa細胞のアポトーシス過程においてはCa²⁺とカスパーゼ3の活性化に相関はないと結論付けられた⁶⁾。

おわりに

dual FRET法はまだまだなじみのないイメージング法かもしれないが、近い将来普通に用いられるようになると思われる。今回紹介した解析手順からもおわかりいただける通り、特別難しいところは何もなくハードルは低い。ぜひ、多くの研究者に試してもらいたいと思う。また、今回紹介した蛍光分離法はdual FRETのみならず、single FRETにおけるドナーとアクセプター蛍光の分離や多重染色での蛍光分離にも応用可能な汎用的テクニックである。行列式をさらに拡張することでより多くの蛍光色を扱うことが可能になるので、triple FRETや8重染色などに挑戦してみるのはいかがであろうか？

文献

- 1) Frommer, W. B. et al. : Chem. Soc. Rev., 38 : 2833-2841, 2009
- 2) Piljic, A. & Schultz, C. : ACS Chem. Biol., 3 : 156-160, 2008
- 3) Ai, H. W. et al. : Nature Methods, 5 : 401-403, 2008
- 4) Grant, D. M. : Biophys. J., 95 : L69-71, 2008
- 5) Tomosugi, W. et al. : Nature Methods, 6 : 351-353, 2009
- 6) 永井健治: 蛋白質核酸酵素, 51 : 1989-1997, 2006
- 7) 永井健治, 宮脇敦史: 『図・写真で観るタンパク質構造・機能解析実験実践ガイド』(月原富武, 新延道夫/編), メディカルドゥ, 173-182, 2006
- 8) Zimmermann, T. et al. : FEBS Lett., 546 : 87-92, 2003

● 筆頭著者プロフィール ●

永井健治: 北海道大学電子科学研究所教授。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。博士(医学)。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研究者などを経て'05年より現職。'08年より科学技術振興機構さきがけ研究者研究者兼任。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とき明かしたい。

連絡先: 〒001-0020 北海道札幌市北区北20条西10丁目
E-mail: tnagai@es.hokudai.ac.jp
URL: <http://nano.es.hokudai.ac.jp/>

解説

生細胞内でのタンパク質動態測定とその意義

永井健治, 松田知己 北海道大学 電子科学研究所

It is quite important to understand behavior of biomolecules in terms of the diffusion coefficient inside live cells since the diffusion speed of biomolecules sometimes affects the result of chemical reactions with downstream target molecules. Here, we introduce several technologies to measure diffusion coefficient of biomolecules in living cells, and discuss about biological meaning of diffusion measurement analysis.

FDAP / FRAP / FCS / SMT / diffusion coefficient

1. 生体内でのタンパク質動態とシグナル伝達

細胞はホルモンやサイトカインなどのシグナルを受容し、その情報を細胞内に伝達することで、外界の環境変化に応答する。このシグナル伝達には多くのタンパク質が関与し、それらが拡散したり、細胞骨格上を移動することがシグナルを細胞の内部へ伝えていく本質である。したがって、外界環境に対する細胞の応答を理解するためには、細胞内を伝わるシグナルの空間パターンや伝達の速さを知ることがきわめて重要となる。そのためには特定のタンパク質だけを観察しやすくする必要があるが、近年の蛍光タンパク質技術の発展により、遺伝子組み換え技術さえ身につけていれば、誰でも簡便にそれが行えるようになった。つまり、蛍光タンパク質の遺伝子を標識したい特定のタンパク質の遺伝子と連結して細胞に発現させ、蛍光顕微鏡下で観察するだけで、そのタンパク質が細胞内のどこに局在するかが簡単にわかるようになったのである。しかし、その動態を定量的に解析しようとするとき、若干の工夫が必要であり、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法や FCS (fluorescence correlation spectroscopy) 法などさまざまな顕微鏡観察手法が開発されてきた。一方で、蛍光タンパク質の開発・改変もめざましく、紫外光などの刺激光を照射することで蛍光性を獲得するものや蛍光色に変化する光スイッチ

ング蛍光タンパク質が現れ、細胞内に存在する特定タンパク質の一部をハイライトして、それらがどのような挙動を示すのかを観察・解析することでタンパク質動態を“拡散係数”という物理量で定量化することが可能になった^{1),2)}。本稿では、蛍光タンパク質を用いた生細胞内での動態解析のうち特にこの拡散係数の測定法に関して解説する。

2. 拡散係数とは？

19世紀にロバート・ブラウンが顕微鏡下で水上に浮かぶ花粉から出た微粒子が活発に動くようすを観察したように、水溶液中では粒子径数 nm ~ μm 程度の微細粒子は熱運動によってランダムなブラウン運動をする。このブラウン運動は溶液の温度が高くなるほど大きくなり、粒子径が大きくなると小さくなる。粒子の並進拡散の大きさと温度・粒子径との関係はストークス-アインシュタイン (Stokes-Einstein) の式によって以下のように表される。

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

k_B はボルツマン係数、 T は絶対温度、 r は球形分子の半径、 η は溶媒の粘性を示し、拡散の大きさは拡散係

数 D として [m^2s^{-1}] の次元の値として表される。実際の分子は完全な球形をとっているわけではないのでこの式では不十分だが、大まかに溶液中での拡散係数の値を見積もることができる。細胞内部は水溶液中に比べて粘性が高く、タンパク質分子の拡散係数は小さくなる。注目するタンパク質が細胞内でまったく自由に動いているならば拡散係数は水溶液中と同様に分子半径と温度と粘性に依存する量となるはずであるが、実際には他のタンパク質と複合体を形成したり、細胞内の構造物や動きの遅い巨大な複合体と相互作用するため、見かけの拡散係数が水溶液中のものと大きく異なる場合が多い。しかし、逆にそのずれがそのタンパク質自身の性質や置かれている環境を反映していると考えられることもできる。

3. 一般的な細胞内拡散係数測定法^{3),4)}

試験管内の溶液に存在する分子の拡散係数を測定する場合には動的散乱法や NMR のパルス磁場勾配 (PGF) 法などの方法があるが、細胞内での拡散係数を測定する際は試験管に入れて測定するわけにはいかない。またさまざまなタンパク質が混在した中で目的のタンパク質の拡散を測定しなければならない。そのような背景のもと、目的とするタンパク質を蛍光標識して細胞に発現させ、その動態を蛍光顕微鏡で観察するという方法がいくつか開発されてきた。

3.1 SMT 法

蛍光標識したタンパク質の最も直接的でシンプルな拡散の計測法として、蛍光標識タンパク質の 1 分子動態を追跡する Single-Molecule Tracking (SMT) 法がある (図 1a)。蛍光輝点の平均自乗変位から拡散係数を求めることができる。ただし、この方法では、観察視野内に少数の蛍光標識された分子のみが存在するような状態を作り出す必要があり、また蛍光分子は 1 分子観測に耐えうる蛍光強度と褪色に対する強さをもっていなければならない。さらに、蛍光観測に用いる CCD カメラのフレームレートなども考慮すると今のところおよそ $1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 以下の遅い拡散の観察に限られる (図 1b)。全反射顕微鏡を用いて細胞膜にアンカーされたタンパク質や小胞体に存在するタンパク質の動態が解析されている^{4),6)}。

3.2 FRAP 法

SMT が 1 分子の動きを直接観察して、その拡散係数を解析するのに対し、FRAP 法 (図 1a) は、多分子

の平均的挙動を観察することで拡散係数を算出する方法である^{4),7),8)}。FRAP 法では、蛍光標識したタンパク質を発現する細胞内の限定された領域に強い励起光を照射することで、その領域内の蛍光分子をすべて褪色させた後、褪色領域外からインタクトな (褪色していない) 蛍光分子が流入することによって生じる蛍光強度の増加を観察し、蛍光回復曲線を得る。次に、モデル式をこの蛍光回復曲線に対してパラメーターを変化させながら非線形フィッティングして拡散係数を得る。当然、単純拡散する場合と細胞内の構造物などと相互作用する場合には、フィッティングに用いるモデル式は異なるものを選択しなければならない。実際、さまざまな拡散モデル式とその選択基準がこれまでに提案されている⁹⁾。たとえば、測定された蛍光回復曲線を単純拡散のモデルでフィッティングして求めた見かけの拡散係数が、理論的に推定される拡散係数よりも顕著に小さい場合には、細胞内構造物などとの相互

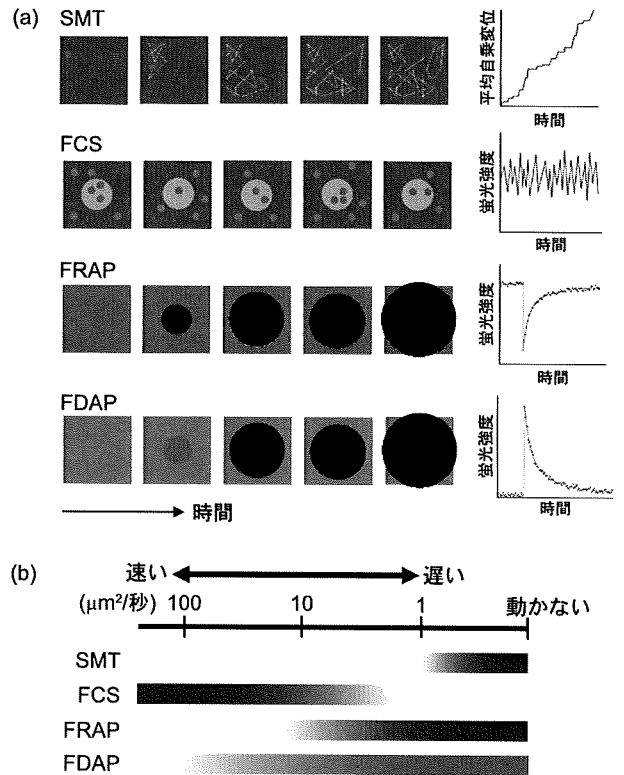


図 1 蛍光タンパク質プローブを用いた拡散係数測定法。(a) (左) それぞれの測定法の概念図。SMT, FCS の緑色の円が蛍光タンパク質 1 分子からの蛍光を示す。FRAP の黒色の領域は褪色して蛍光を失った分子のパターンを示す。FDAP の緑色の領域は光刺激により蛍光を発するようになった分子のパターンを示す。(右) 測定で得られるデータのグラフ。(b) それぞれの方法で測定することのできる拡散係数の領域。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/> ではカラーで掲載)

作用を考慮したモデルを選択するという指標がそれである⁹⁾。FRAPはSMT法に比べて速い拡散の解析が可能であり、拡散係数の測定上限は $10\ \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 程度が目安である(図1b)。この上限が存在する理由は褪色の過程に比較的大きなパワー密度($>10\ \text{W}/\text{cm}^2$)の強光を照射したとしても、褪色に時間がかかる(10~100 msec)からである。速く拡散する分子は、褪色過程でインタクトな蛍光分子が褪色領域に拡散流入するため、得られる回復曲線とモデル式にずれが生じて正確な解析を行うことができないのである⁴⁾。

3.3 FCS法

FRAPよりも速い拡散を測定する方法としては、FCSが用いられている^{4), 10)}(図1a)。この方法では、励起のためのレーザー光をサブフェムトリットル程度の領域に集光して蛍光測定する。測定領域内の蛍光強度を観測し続けると、蛍光分子の励起領域への出入りに起因する蛍光強度のゆらぎが観測される。そのゆらぎの変化が起こる速さは分子の拡散に依存し、小さな分子すなわち拡散係数の大きい分子では変化は速く起こり、大きな分子すなわち拡散係数の小さな分子ではその変化は遅い。また、ゆらぎの大きさは分子の密度にも依存し、密度が高いほど平均蛍光強度に対するゆらぎの影響は小さくなる。測定データのゆらぎから拡散の速さの情報を抽出するために時間軸に対する自己相関を解析する。すなわち、各時間での蛍光強度とそれから一定の時間が経過した後の蛍光強度の積の平均を求め、それを時間に対してプロットしたものにモデル式をフィッティングして拡散係数を得る。この方法では、ゆらぎという変化情報を用いる性質上、まったく動かない分子がある場合にはゆらぎが観察されないためそれを解析することは不可能である。また、自己相関解析を行うことから、極端に遅い動きの分子(ゆらぎが少ない)を解析することにも難がある。したがって、実際の研究に用いられる際には遅い拡散の計測はFRAPで行い、速い拡散の測定はFCSで行うことが多く、その境界はおおよそ $10\ \mu\text{m}^2/\text{sec}$ である(図1b)。速い成分と遅い成分が混在するような場合にはこれらの測定を組み合わせる必要もある。

4. 光スイッチング蛍光タンパク質を用いた細胞内拡散係数測定法 FDAP

FRAPとは逆に、光スイッチング蛍光タンパク質を用いると、パルス刺激によって増加させた蛍光強度が、蛍光分子の拡散によって減衰するようすを解析

することにより、拡散係数を算出することができる。FRAPによる解析では前述のとおり褪色に比較的時間を要し(10-100 msec)、速い拡散をする分子については褪色の途中に分子の拡散が起き、正しく拡散係数を求めることができなかった。それに対して、光スイッチング蛍光タンパク質の光スイッチングは msec 以下の短時間で行うことができるため、速い拡散にも適用できる可能性が示唆されていた¹¹⁾。しかし、これまでに行われてきた光スイッチング蛍光タンパク質を用いた拡散係数解析は、単一の指数関数によるフィッティングから半減期を求めたり、光スイッチング後の各時間の蛍光強度プロファイルをガウス分布フィッティングしたものから拡散計数を見積もったりしたもので、FCSの結果と比較できるほどの信頼性のある結果が得られていなかった。そこで、筆者らは光スイッチング蛍光タンパク質を用いて定量的FRAPのモデル式を応用し、タンパク質の拡散係数を求める方法FDAP(fluorescence decay after photostimulation)を開発した¹²⁾(図1a)。

4.1 光スイッチング蛍光タンパク質

光スイッチング蛍光タンパク質には紫外光などの光刺激の前後で蛍光を発しない状態から蛍光を発する状態へ変化するもの(光活性化蛍光タンパク質)と蛍光波長が変化するもの(光変換蛍光タンパク質)が開発されている(図2a)。前者についてはその変化を可逆的に起こすことのできるものと不可逆的なものの双方が存在する。後者に関しては可逆的なものはまだ開発されていないが、昨今の活発な蛍光タンパク質開発の状況から考えると可逆的な光変換蛍光タンパク質も近い将来に出現することが期待される。代表的な光活性化蛍光タンパク質であるLippincott-Schwartzのグループが開発したphotoactivatable green fluorescent protein(PA-GFP)は不可逆的な光活性化蛍光タンパク質で、紫(外)光の照射により活性化されて緑色の蛍光を発するようになる¹³⁾。可逆的な光活性化蛍光タンパク質としては、細胞内で蛍光を発する状態で発現し、強い緑色光の照射により蛍光を発さない状態に、さらに紫(外)光の照射により蛍光を発する状態にといった光のオン・オフを繰り返すことができるDronpaが代表的である¹⁴⁾。光変換蛍光タンパク質としては紫(外)光の照射により緑色から赤色に蛍光波長が変化するKaedeやEosFP、Dendraなどがある¹⁵⁾。以下で解析例を示す、筆者らがFDAP開発の際に蛍光タンパク質タンデム2量体の例として用いたPhamretも光変換蛍光タンパク質に属する¹²⁾(図2b)。

4.2 FDAPの測定と解析

測定にはレーザー共焦点顕微鏡を用いる。速い拡散運動を行っている場合でも刺激光の照射中の拡散が無視できるように照射時間を十分に短くする必要がある。われわれの方法では、刺激光は回折限界程度の大きさ（直径約 500 nm 程度）に集光し、0.25 msec 間照射している。また、可能な限りスキャンする領域を小さく設定し、4200 Hz の高速往復ラインスキャンで蛍光減衰の測定を行うことにより、サンプリングの頻度を上げている¹²⁾。

FRAP の回復カーブと FDAP の減衰カーブは時間軸に対して対称な関係にある。したがって、FDAP データ解析のためのモデル関数は FRAP の回復カーブのモデル関数をもとに、相対蛍光強度に関して (1-[FRAP モデル関数]) という形で得ることができる。われわれの解析では単純拡散を仮定した Axelrod らのモデル式を FDAP 用に改変した以下の式を用いている^{16), 17)}。

$$I_{rel_image}(t) = \alpha \cdot I_{rel_calc}(t) = \alpha \left(1 - \left((1-\beta) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-K)^n}{n!} \left(1 + n \left(1 + \frac{2t}{\tau_D} \right)^{-1} + \beta \frac{1-e^{-K}}{K} \right) \right) \right)$$

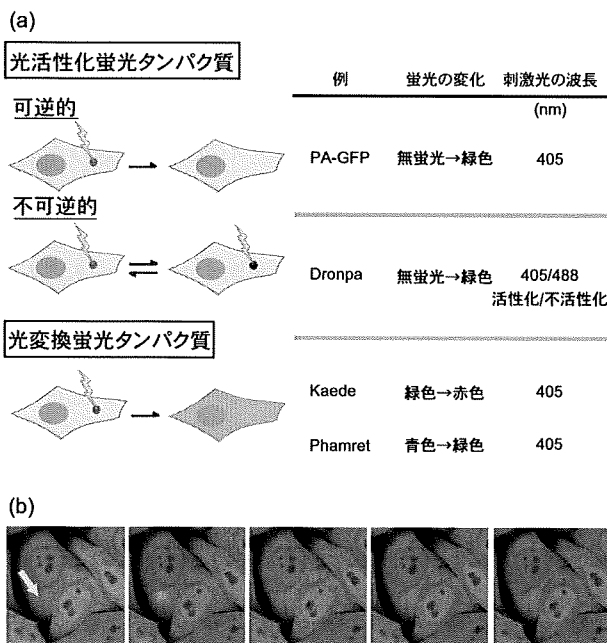


図2 光スイッチング蛍光タンパク質。(a) 光スイッチング蛍光タンパク質の種類。(b) 光変換タンパク質の細胞内での拡散のイメージングの例。Phamret を発現している HeLa 細胞の矢印で示す領域に 405 nm のレーザー光を照射して光変換した Phamret が拡散していくようすを撮影した。光変換前を水色に、光変換後を赤色の擬似カラーを割り当てて合成画像として示している。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/> ではカラーで掲載)

ここで、 I_{rel_image} は刺激光照射直後の蛍光強度で規格化したフィッティングのための測定データ、 I_{rel_calc} は拡散のモデル式を示し、 α はそれらの $t=0$ での値を一致させるためのパラメーターである。右辺の $(1-\beta)$ にかかる項は自由に動く分子による寄与を表し、 β にかかる項は動かない分子による寄与を示す。したがって β は 0 と 1 の間の値をとる。拡散時間 τ_D と実効半径 w (e^{-2} の光スイッチング強度になる半径) と拡散係数 D は $\tau_D = w^2/4D$ で関係付けられる。 Σ の ∞ までの足し算は 40 項付近で十分収束することがわかっているため 40 項までの和とした。FDAP の解析の際には上式に対するカーブフィッティングの前に、FDAP 特有の測定とデータ処理を行う必要がある。たとえば、刺激光レーザーの光変換効率の分布や拡散測定中の褪色などの補正処理である。これらの詳細については文献 12 を読んでいただきたい (図 3)。

水溶液中に分散している蛍光タンパク質のタンデム 2 量体からなる光変換蛍光タンパク質 Phamret について、褪色などによる蛍光強度の減少を考慮した補正を行わずに上式へのカーブフィッティングから拡散係数を求めると $70.4 \pm 0.8 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ となり FCS で蛍光タンパク質タンデム 2 量体に関して求められた $50.4 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ と比べて大きな値となった。一方、補正を行った

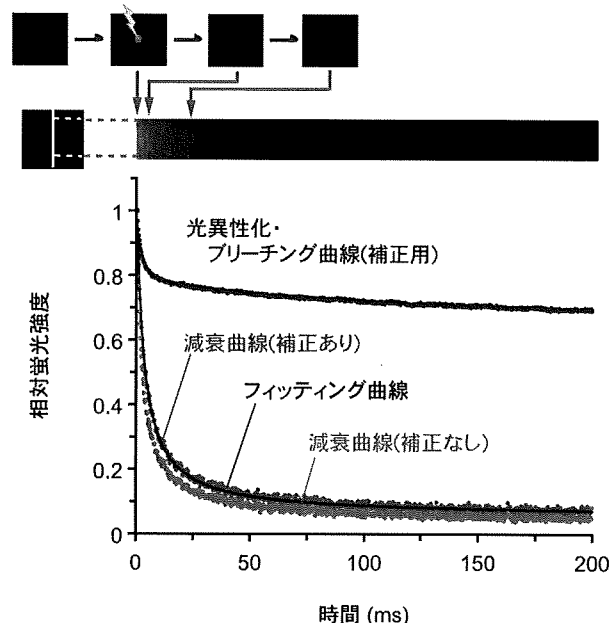


図3 Phamret の水溶液中での FDAP 測定。(上段) FDAP の蛍光減衰の模式図。0 msec で Phamret 分子を光変換して蛍光強度を増加させた。(下段) FDAP 蛍光減衰曲線のグラフ。測定した蛍光減衰曲線 (補正なし) をあらかじめ測定を行っていた拡散以外の要因による蛍光減衰曲線のデータで補正して得られた減衰曲線 (補正あり) に関してモデル式のフィッティングを行って拡散係数を求めた。

場合には $49.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ となり FCS での値と同様の値を示した。

さらに、HeLa 細胞内で蛍光タンパク質単量体とタンデム 2 量体の拡散係数を FDAP, FRAP, FCS の 3 つの方法で測定して比較を行ったところ、単量体に比べて拡散の遅い蛍光タンパク質 2 量体に関する FRAP, FDAP の測定結果は FCS の測定結果と比較的よく一致した。しかし、より速く拡散する蛍光タンパク質単量体に関する測定値では速い拡散に対応した FRAP 測定法とされている Braga らの方法¹⁹⁾で解析したにもかかわらず FCS の値と大きく異なり分散も大きい値を示したが、FDAP での測定値は分散も小さく FCS の値とよい一致を示した¹²⁾ (表 1)。

以上の結果は FDAP 法を用いれば 1 つの方法で動きの遅い分子から素早く拡散する分子まで解析できることを示している (図 1b)。これまでのように、遅い拡散の計測は FRAP で行い、速い拡散の測定は FCS で行うとうような使い分けを必要としない。したがって、FDAP は非常に便利な方法であるといえよう。但し、FRAP や FCS がこれまで多くの研究者が構築してきた GFP や YFP 融合タンパク質が利用できるのに対し、FDAP の場合にはそれらを光活性化型や光変換型の蛍光タンパク質に置換しないとイケない煩わしさがある。

5.

まとめ

以上、細胞内における従来の分子拡散定量法と FDAP 法の比較を述べたのだが、いずれの手法においても得られる情報は細胞内における「見掛け」の拡散定数であることを銘記されたい。また、FRAP や FDAP を用いると、FCS では難しい動かない分子の割合や結合・解離定数も算出できる場合もある。それぞれの手法の利点欠点を把握するのはもちろんのことであるが、これらの方法によって得られる情報から何を読み取るかが最も重要であろう。たとえば、拡散定数が分子量から期待される値よりもはるかに小さな値になる場合には他の分子との複合体形成やあるいは分子の形が球形から大きくずれて棒状だったりすることが

表 1
各測定法で求めた拡散係数の比較 (単位: $\mu\text{m}^2/\text{秒}$)

	拡散係数測定法		
	FDAP	FRAP	FCS
モノマー	22.9 ± 3.7	34.0 ± 8.5	23.4 ± 2.5
タンデムダイマー	14.1 ± 2.4	18.3 ± 6.4	16.4 ± 0.8

想定される。また、試験管の中のような均一系内で起こる「正常拡散」とは異なり、生きた細胞の中には小胞体などのオルガネラやアクチン繊維や微小管などの細胞骨格系がさまざまな空間スケールで網目構造を形成しているため、測定の空間スケールによって拡散係数が変化する「異常拡散」が起こる。この異常拡散の概念は外界のシグナルを受け取った細胞がその情報を核にどのように伝えていくかを理解する上で常に念頭に入れておかねばならない。なぜなら、シグナル伝達分子は細胞膜から核内へと“数 μm ”にわたっておもに拡散によって移動していかなければならないが、その拡散係数は“サブ μm ”の領域の観測によって得られる拡散係数と異なる値を通常は示すからである。これまでに細胞外マトリクスを構成するヒアルロン酸水溶液や細胞膜上に存在するタンパク質の異常拡散が FCS 法や FRAP 法、超高速 1 分子観察によって見いだされており^{19), 20)}、シグナル伝達との関連が示唆されているが、細胞質内に存在する生体分子の異常拡散についての報告は依然少なく、今後の解析が待たれる。この他、細胞内構造物が障壁となって「拡散の異方性」が見られる場合もある。この情報は FRAP, FCS, FDAP の解析からは見いだすのは困難であり、イメージングによって初めて得ることができる。特に、光スイッチング蛍光タンパク質を用いたイメージングは拡散異方性の解析に力を発揮することから、光スイッチング蛍光タンパク質による分子ハイライトで拡散の大まかなようすを知り、次いで同じ細胞に対して FDAP を行い、詳細な拡散係数を求めるという戦略が包括的に分子動態を知る方法として優れていると考えられる。この FDAP 法をきっかけに、従来の細胞生物学的研究においてあまり真剣に定量解析されてこなかった分子拡散という切り口に簡便にアプローチすることが可能になった。今後、本技術をより多くの生物研究者が用い、新たな発見がなされることを期待したい。

文献

- 1) Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N. and Patterson G. H. (2003) *Nat. Cell Biol. Suppl.* S7-14.
- 2) Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M., Lukyanov, S. and Verkhusha, V. V. (2005) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 885-891.
- 3) Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. and Kenworthy, A. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 444-456.
- 4) 和田郁夫, 長屋寿雄, 田村 拓 (2005) バイオイメージングが分かる (高松哲郎 編), pp. 62-75, 羊土社.
- 5) Jaiswal, J. and Simon, S. M. (2007) *Nat. Chem. Biol.* 3, 92-98.
- 6) Saxton, M. J. (1997) *Biophys. J.* 72, 1744-1753.
- 7) 木村 宏 (2004) 実験医学 22, 1739-1745.

- 8) 木村 宏 (2004) 実験医学 22, 1851-1856.
- 9) Sprague, B. L. and McNally, J. G. (2005) *Trends Cell Biol.* 15, 84-91.
- 10) 金城政孝 (1999) 蛋白質 核酸 酵素 44, 1431-1438.
- 11) Kimura, H. (2005) *DNA Repair* 4, 939-950.
- 12) Matsuda, T., Miyawaki, A. and Nagai, T. (2008) *Nature Methods* 5, 339-345.
- 13) Patterson, G. H. and Lippincott-Schwartz, J. A. (2003) *Science* 13, 1873-1877.
- 14) Ando, R. *et al.* (2004) *Science* 306, 1370-1373.
- 15) Ando, R. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12651-12656.
- 16) Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W. W. (1976) *Biophys. J.* 16, 1055-1069.
- 17) Calapez, A. *et al.* (2002) *J. Cell Biol.* 59, 795-805.
- 18) Braga, J., Desterro, J. M. P. and Carmo-Fonseca, M. (2004) *Mol. Biol. Cell* 15, 4749-4760.
- 19) Masuda, A., Ushida, K. and Okamoto, T. (2005) *Biophys. J.* 88, 3584-3591.
- 20) Kusumi, A., Sako, Y. and Yamamoto, M. (1993) *Biophys. J.* 65, 2021-2040.



永井健治

永井健治 (ながい たけはる)

北海道大学電子科学研究所教授

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, 博士(医学). 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研究者等を経て05年より現職, 08年より科学技術振興機構さきがけ研究者兼任.

研究内容: 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とき明かしたい.

連絡先: 〒001-0020 北海道札幌市北区北20条西10丁目

E-mail: tnagai@es.hokudai.ac.jp

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

松田知己 (まつだ ともぎ)

北海道大学電子科学研究所助教

2003年大阪大学大学院理学研究科化学専攻修了, 理学博士. 理化学研究所リサーチアソシエイト, 北海道大学電子科学研究所非常勤研究員, 財団法人医療機器センター非常勤職員を経て08年より現職.

研究内容: タンパク質工学, バイオイメージング
連絡先: 同上

E-mail: matsuda@es.hokudai.ac.jp

C. 蛋白質, 核酸, カルシウムのイメージング

光スイッチング蛍光タンパク質を用いた生細胞内でのタンパク質動態定量法

永井 健治, 松田 知己

Key words: 蛍光顕微鏡 (fluorescence microscopy), 生細胞イメージング (live cell imaging), 拡散係数 (diffusion coefficient), 光変換蛍光タンパク質 (photoswitchable fluorescent protein), FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), FCS (fluorescence correlation spectroscopy), FDAP (fluorescence decay after photostimulation)

はじめに

細胞は外界の環境変化に応答するためにサイトカインなどのシグナルを受容し, その情報を様々なタンパク質を介して細胞内部に伝達する. このシグナル伝達には多種多様なタンパク質が関与し, それらが拡散や定方向運動によって移動することでシグナルを細胞の内部に伝えていく. 従って, 外界の環境変化に対する細胞の応答を理解するためには, シグナル伝達の空間パターンや速さを知ることが極めて重要となる. 特定のタンパク質を蛍光タンパク質に融合して細胞に発現させ, FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法やFCS (fluorescence correlation spectroscopy) 法などの顕微測定法を用いる事で, 特定タンパク質の動態を, 例えば“拡散係数”という物理量で定量的に解析することができる. しかしながら, これらの方法には一長一短があり汎用性に欠けていた. 本稿では近年筆者らが開発した“光スイッチング蛍光タンパク質”を用いた特定タンパク質の細胞内における動態を定量解析する方法を解説する.

I. 細胞内タンパク質拡散係数測定法

1. 従来からある測定法

現在一般的に用いられている細胞内でのタンパク質の拡散係数を求める方法としては, Single-Molecule Tracking (SMT) 法やFRAP法, FCS法などが挙げられる¹⁾. これらはいずれも蛍光の情報を利用する測定であるため, 測定対象のタンパク質は蛍光化合物や蛍光タンパク質で標識されていなければならない. SMT法は蛍光標識されたタンパク質の1分子動態を追跡して得られる平均自乗変位から拡散係数を解析する最も直接的でシンプルな方法である²⁾. FRAP法では蛍光標識したタンパク質を発現する細胞内の限定された領域に強い励起光を照射することで, その領域内の蛍光分子を全て褪色させた後, 褪色領域外からインタクトな(褪色していない)蛍光分子が流入することによって生じる蛍光強度の増加の速さをもとに拡散係数を得る^{3,4)}. 一方, FCS法はサブフェムトリットル程度の領域内への蛍光分子の出入りに起因する蛍光強度の揺らぎから拡散係数を得る方法である⁵⁾.

それぞれの方法で解析できる拡散係数の範囲は, SMT法がおおよそ $1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 以下, FRAP法がおおよそ $10 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 以下, そしてFCS法がおおよそサブ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ 以上である. 観察に用いられる顕微鏡も異なり, SMT

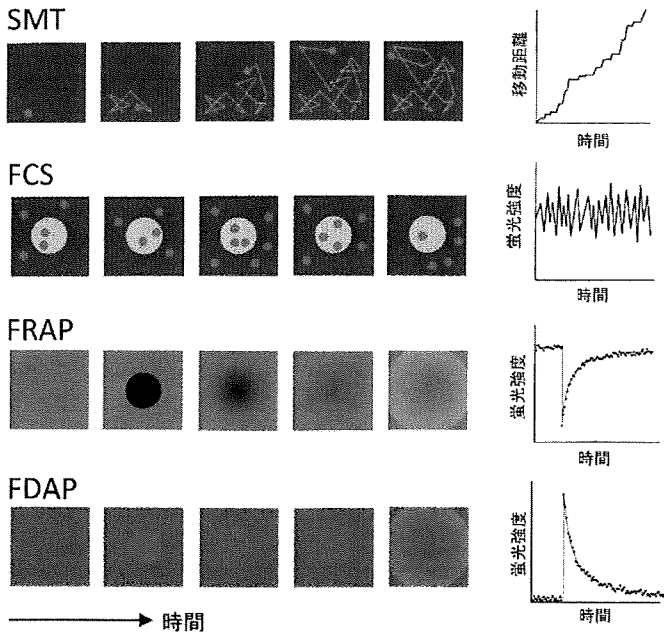


図1 蛍光タンパク質プローブを用いた拡散係数測定法
(左) 各測定法の概念図. SMT, FCSの緑色の円が蛍光タンパク質1分子を示す. FRAPの黒色の領域は褪色を受けた分子のパターンを示す. FDAPの緑色の領域は光刺激により蛍光を発するようになった分子のパターンを示す. (右) 各測定で得られるデータの時間軸に対するグラフ.

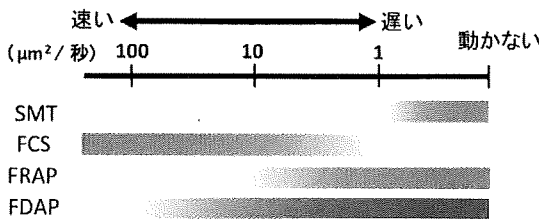


図2 それぞれの蛍光タンパク質プローブを用いた拡散係数測定法で測定することのできる拡散係数の領域

法では全反射顕微鏡が, FRAP法やFCS法では共焦点顕微鏡が用いられる. 従って, SMT法では細胞膜内や細胞膜近傍に存在するタンパク質が主な観察対象になるのに対し, FRAP法とFCS法では細胞膜のみならず, 細胞内部に存在するタンパク質の測定も可能である¹²⁾. 従来FRAPとFCSの2つの方法は, それぞれ比較的遅い拡散と早い拡散の測定に用いるという使い分けがなされており, その境界はおおよそ $10 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ である.

2. 定量的FDAP法

FRAP法による解析では, 褪色に比較的長い時間を要し (10~100 msec), 速い拡散をする分子につい

ては褪色作業の最中に分子の拡散が起きてしまう結果, 正確な拡散係数を算出することが出来なかった. そこで, 筆者らは褪色に比べて短時間で進行することができる光スイッチング蛍光タンパク質の光変換を利用した測定法を開発した⁶⁾. 定量的Fluorescence decay after photostimulation (FDAP; エフダップ) と命名したこの方法ではFRAPとは逆に, 光刺激によって増加した蛍光強度が拡散によって減少していく過程を測定する. 解析可能な拡散係数の範囲はFRAP法よりも拡大し $100 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ に迫るまでになった.

II. FDAP法に要求される条件や留意点

1. 光スイッチング蛍光タンパク質

光スイッチング蛍光タンパク質には光刺激により暗い状態から蛍光を発する状態へ変化するものと蛍光波長が変化するものがあるが, いずれを用いても刺激による蛍光強度増大と拡散による減衰を観測することができる⁷⁸⁾. FDAP法で速い拡散の測定を行う場合は光スイッチングの過程にかかる時間を十分短くする必要があるため, 標識に用いる光スイッチング蛍光タンパク質の光スイッチングに要する時間が適切であるかどうかを検討する必要がある. FRAP測定文献によると褪色にかかる時間は拡散

にかかる時間の1/15以下とされておりFDAPにおける刺激光の照射時間もそれに準ずる必要がある⁹⁾。筆者らのこれまでの経験では、photoactivatable green fluorescent protein (PA-GFP) とそれを用いて作製されたPhamretについては、サブミリ秒の刺激光照射で瞬時に光スイッチングを行うことができ、細胞内での速い自由拡散を問題なく測定することができた。一方、Kaedeを用いた場合には光刺激と光スイッチングに時間的ラグが生じてしまい速い拡散を正しく測定することができなかった¹⁰⁾。

2. 蛍光標識されるタンパク質の特性変化

蛍光標識されたタンパク質の測定では標識に用いた蛍光タンパク質の大きさの影響によって、求まる拡散係数が小さくなってしまい、従って、標識する蛍光タンパク質に比べて標識されるタンパク質が非常に小さい場合はその影響を大きく受けることに注意しなければならない。また、蛍光タンパク質の融合により解析対象となるタンパク質の特性が変化していないかどうかを確かめることも重要である。局在の変化等、なんらかの影響が見られる場合には蛍光タンパク質を融合する位置を解析対象となるタンパク質の逆の末端にしたり、リンカーの長さを調節したりといった試行錯誤を行うことが要求される。

3. 拡散の自由度について

FDAP法による解析は、刺激光の照射直後に光スイッチングしたタンパク質分子の分布する領域に比べてそれらが拡散して広がっていく領域が十分広く、しかも等方的に拡散が起こる場合を仮定している。従って、解析対象となるタンパク質がミトコンドリアや小胞体などの狭いスペースに局在化しているような場合や、細胞内に存在する構造物の分布に偏りがあるような場合には、求められる拡散係数の絶対的な精度は悪くなる。また、2次元拡散を元に作られたモデル式を解析に用いる場合にはディッシュに張り付いている“扁平な”細胞では問題にはならないが、細胞の厚みが大きな細胞や浮遊細胞を解析に用いると厚み方向への拡散による影響から誤差が大きくなってしまふことに留意しなければならない。

4. 顕微鏡システム

FDAPを用いて速い拡散を解析する場合には、短時間（サブミリ秒）で光刺激を行った直後に蛍光強度の減衰を測定する。そのためには励起光と刺激光の照明光学系が独立しており、蛍光観察を行いながら刺激光による光スイッチングが可能な光学システムが必須である。また、光刺激直後の蛍光減衰を十分な時間分解能で測定できるスキャンスピードが必要である。筆者らは4000 Hz以上の高速往復ラインスキャンで励起光をスキャンして蛍光減衰の測定を行うことで、時間分解能を上げている。

III. 測定と解析

FDAP法はFRAP法をベースにしているため大まかな流れはFRAP法と大差なく、4つのステップからなる。まず、固定細胞を用いて回折限界まで絞り込んだ刺激光を与え、光スイッチングされたタンパク質の空間的な蛍光強度分布(光スイッチング特性)を測定し、それにモデル関数をフィッティングして分布関数を得る。次に、生細胞を用いて回折限界まで絞り込んだ刺激光を与え、蛍光強度の経時変化(蛍光強度減衰曲線)を測定する。最後に、蛍光強度減衰曲線を先の分布関数を考慮した拡散モデル式へフィッティングし、拡散係数を得る。これ以外に測定中に蛍光タンパク質が褪色する場合は、褪色に伴う蛍光強度の減衰分を補正するためのデータ取得が必要になる⁶⁾。

1. 細胞の準備

細胞をガラスボトムディッシュ上に培養する。筆者らは通常35 mmディッシュを用いる。光スイッチング蛍光タンパク質を融合した標的タンパク質の遺伝子をリポフェクション法などによって細胞に導入する。培地は、蛍光強度が大きい細胞の場合は励起光強度を小さくすることにより通常の培地でもバックグラウンドの蛍光を気にせず観測を行うことができるが、フェノールレッドを添加していない培地を用いることによりさらにバックグラウンドを抑えることができる。