

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つた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ふ。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に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。

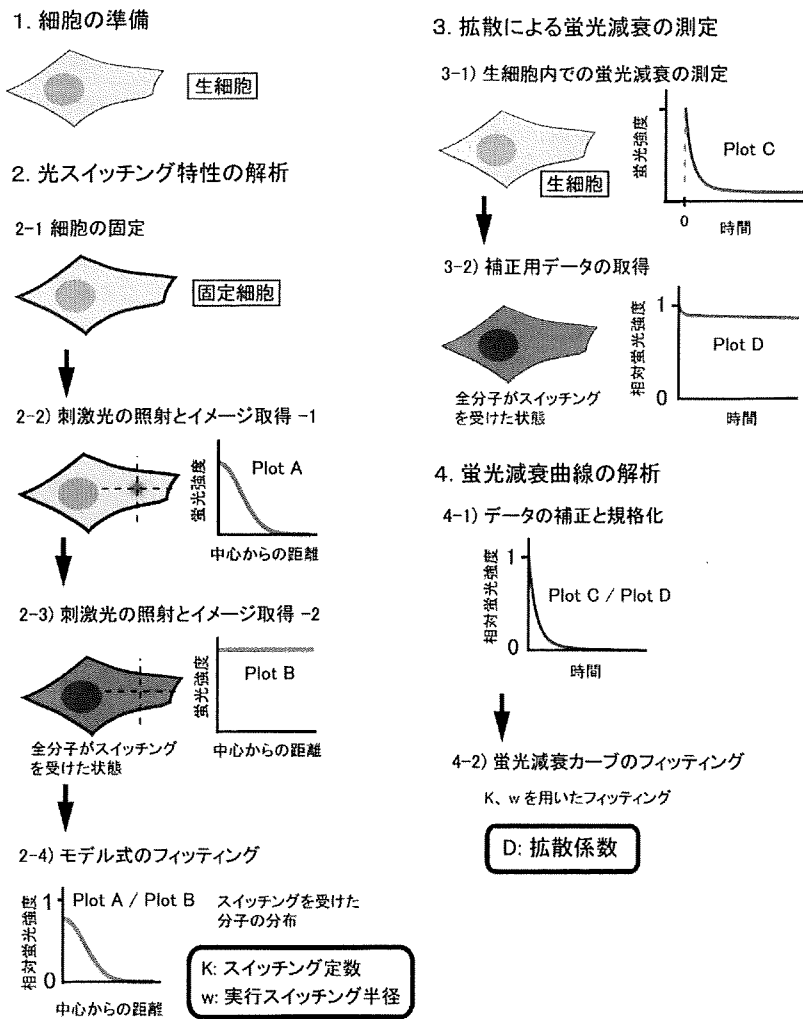


図3 FDAP測定の流れ

固定細胞で光スイッチング特性を解析した後、生細胞で拡散による蛍光減衰を測定・解析して拡散係数を得る。大まかな流れはFRAP法と同じであるが、データの規格化と補正に関する2-3, 3-2のステップがFDAPに特有である。

2. 光スイッチング特性の解析

2-1) 細胞の固定

光スイッチング特性の解析ステップでは、刺激光レーザーの照射によってタンパク質の拡散が起こらない固定細胞を用いて、光刺激により光スイッチングした蛍光タンパク質の空間分布を観測し、生細胞内での刺激直後(拡散の起こる前の状態)の光スイッチング特性を表す関数を求める。従って、細胞内のタンパク質が十分に固定されていることが重要である。通常、我々は4%パラホルムアルデヒドで15分処理することで培養細胞を固定しているが、2~3

時間の固定を行うとなお望ましい³⁾。

2-2) 刺激光の照射とイメージ取得-1

細胞内の蛍光標識した標的タンパク質が発現している領域に刺激光を照射して光スイッチングを起こし、2D画像を取得してスイッチングを受けた分子の分布の情報を得る。その際、ピンホールは推奨値よりも開いてより多くの蛍光を取得できるようにする³⁾。速い拡散を測定する場合は刺激光を照射する領域を回折限界まで絞り込むことで照射時間を最短にすることができる。筆者らの場合は、直径約500 nm程度の単点で0.25 msecの照射を行っている⁶⁾。

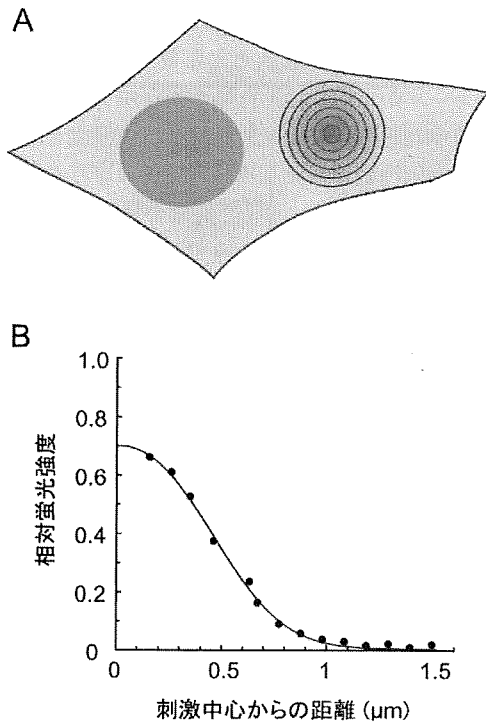


図4 固定細胞での光スイッチング特性の解析

(A) 光刺激を受けた固定細胞の2Dイメージの概念図。光刺激を受けて蛍光を発するようになった分子の分布を緑色で示している。光刺激の照射の中心を中心とする同心円を紫色の円で示した。各同心円に対して、一つ外側の円内の全蛍光強度から自身の円内の全蛍光強度を引いたものを二つの円の面積の差で割ったものを中心から二つの同心円の中点の位置まではなれた場所の平均蛍光強度とする。(B) 光スイッチング特性の解析のためのフィッティングの模式図。中心からの距離に応じた平均蛍光強度の測定データを青い点で示し、スイッチング定数 K と実効スイッチング半径 w を変化させてモデル式(1)をフィッティングして得られる曲線を赤線で示す。

刺激光の照射時間は後に行う生細胞内での拡散による蛍光減衰の測定の場合と同一でなければならぬ。万一、蛍光減衰を測定する際に光刺激の条件を変化させなければならぬ状況が生じた場合は再度、光スイッチング特性関数を求め直す必要がある。本稿では既に測定条件が決定されている場合を仮定した操作の流れを記述しているが、それらが決まっていなかった場合は生細胞での蛍光減衰カーブの測定を平行して行って条件を絞っていく必要がある。

2-3) 刺激光の照射とイメージ取得-2

光スイッチング特性の解析はFRAPの蛍光褪色特

性の解析で用いられるモデル式を改良したものをしている。FRAPのモデル式では細胞内の蛍光を発している分子がどれだけの割合で褪色を受けたかの分布を表しているので、FDAPの場合もその場所に存在する光スイッチング蛍光タンパク質のうちのどれだけの割合が光刺激により蛍光を発するようになったのかの分布を知る必要がある。そのために、2-2で光刺激を行った細胞において拡散による蛍光減衰を測定する場合よりも長い時間刺激光を照射してその領域に存在する光スイッチング蛍光タンパク質のすべてが光スイッチングした状態を作り出し、その蛍光強度を測定する。リアルタイムで蛍光強度がモニターできる場合には蛍光強度が十分に飽和するまで刺激光を照射した段階での値を観測する⁶⁾。

2-4) モデル式のフィッティング

FDAPの蛍光減衰曲線はFRAPの蛍光回復曲線と時間軸方向に対象なので(1-[FRAPの蛍光褪色特性のモデル関数])でFDAPの光スイッチング特性のモデル関数を得ることができる。2-2で得られた画像に刺激光照射の重心位置を中心とする半径の異なる同心円を作製し、二つの同心円間の領域の平均強度を計算し、中心からの半径とその平均強度の関係をプロットする³⁾。その際、2-3で測定した光スイッチング蛍光タンパク質のすべてが光スイッチングされた状態での測定値で規格化を行う必要がある。実際にはモデル式

$$C(r) = 1 - \exp\left(-K \exp\left(-\frac{2r^2}{w^2}\right)\right) \quad (1)$$

を得られた蛍光強度分布にフィッティングさせる。 r は中心からの距離、 $C(r)$ はその距離で光スイッチングされた分子の割合を表す。光スイッチングの効率を表す光スイッチング定数 K と実効スイッチング半径 w の二つの変数を変化させてフィッティングする。我々はこのフィッティングにOriginやIGOR等のデータ解析ソフトウェアを用いている。算出された K や w は拡散による蛍光減衰の解析の際に用いられる⁶⁾。

3. 拡散による蛍光減衰の測定

3-1) 生細胞内での蛍光減衰の測定

蛍光標識した標的タンパク質が発現している細胞

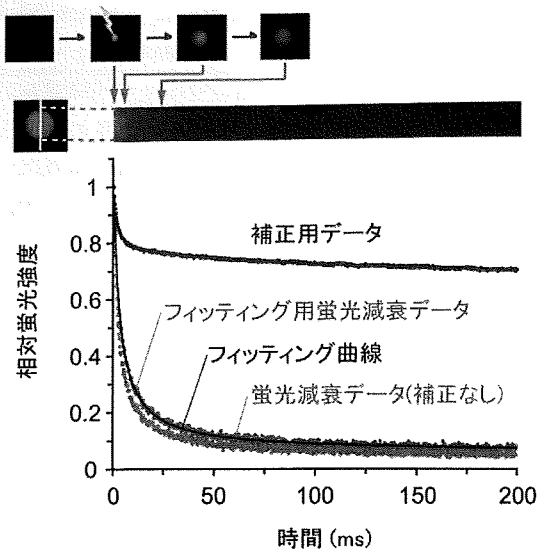


図5 生細胞内での拡散による蛍光減衰の測定
(上段) 蛍光減衰の模式図。0 msecで光スイッチング蛍光タンパク質分子を光変換して蛍光強度を増加させた。(下段) 蛍光減衰曲線のグラフ。測定した蛍光減衰曲線(補正なし)をあらかじめ測定を行っていた拡散以外の要因による蛍光減衰の補正用のデータで補正して得られたフィッティング用蛍光減衰データに関してモデル式へフィッティングを行って拡散係数を求めた。

の特定の領域に刺激光を照射し、光スイッチングにより増大した蛍光強度が減少する過程を測定する。拡散を観察する場合には、解像度を下げスキャンをする領域を限定(クロッピング)することでさらに測定時間を速くすることができる。筆者らの場合は蛍光の取り込みに往復ラインスキャン(4000 Hz以上)を用いて時間分解能を高めている。

3-2) 補正用データの取得

FRAP測定では観察用励起光の照射による蛍光タンパク質の光異性化や蛍光褪色の影響を排除することが、信頼性の高い拡散係数を得る上で重要になる場合がある。このような場合には画像取得を開始した後、観察領域の蛍光強度が安定するのを待って、強い励起光に切り替えて褪色を行い、蛍光回復曲線を取得する¹¹⁾。FDAP測定においても蛍光減衰曲線を取得中に蛍光タンパク質の光異性化や蛍光褪色が起こる可能性がある。この場合、拡散による蛍光強度の減少に、蛍光褪色等による蛍光強度の減少が上

乗せられるため、見かけの蛍光減衰が速く起こることになる。そこで、これらの影響を3-1で得られた減衰カーブから取り除くための補正用データを取得する。すなわち、細胞全体に対して刺激光を照射して一旦細胞内の光スイッチング蛍光タンパク質を全て光スイッチングし、3-1と同様のスキャン条件で蛍光強度減衰を測定することで、蛍光褪色等により生じる蛍光強度減衰のデータを得る。

4. 蛍光減衰曲線の解析

4-1) データの補正と規格化

3-1で得られた蛍光減衰の各時間のデータは3-2の各時間の補正用データの値(測定開始直後のデータポイントの蛍光強度で規格化したもの)で割って補正を行ってフィッティング用の蛍光減衰データとする。

4-2) 蛍光減衰カーブのフィッティング

4-1で得られた補正済みのデータに対してモデル式を非線形カーブフィッティングして拡散係数を得る。2-4のスイッチング特性のモデル関数と同様に(1-[FRAPの蛍光回復のモデル関数])からFDAPの蛍光減衰のモデル関数とすることができる。用いるFRAPのモデル式は単純な自由拡散を仮定している場合や細胞内の成分への結合を仮定する場合など幾つかあり、細胞内での標的タンパク質の挙動を元を選ぶ必要がある¹⁾。特に、自由拡散を仮定したモデル式で得られた拡散係数が、分子量から予想される拡散係数に比べて著しく小さくなった場合には、他の分子との結合などが関与するモデルの適用を考慮しなければならない^{12,13)}。筆者らはAxelrodらのモデル式をFDAP用に改変し、自由拡散と他の分子との結合の双方を考慮した以下の式を考案した。

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

$$\tau_D = w^2 / 4D \quad (3)$$

I_{rel_image} はフィッティング用の蛍光減衰データ I_{rel_calc} は拡散のモデル式を示し、 a はそれらの $t=0$ での値を

一致させるための変数である。βがかかるとは領域内の拡散しない成分（イモービルフラクション）を(1-β)がかかるとは拡散する成分をそれぞれ表す。Dとτ₀はそれぞれ拡散係数と拡散時間を示す。スイッチング定数Kと実行スイッチング半径wは2-4で求めた既知の値である。α、β及びτ₀の3変数による(2)式のフィッティングを行うと(3)式から拡散係数Dが求まる。Σの∞までの足し算は40項付近で十分収束することが分かっているため40項までの和とした。

IV. 利点と問題点

FDAP法により測定法の元となるFRAP法では測定できなかった速い拡散に関しても比較的精度よく解析することができるようになった。また、FCS法では測定が不可能なイモービルフラクションに関する情報も得られるという点でFDAP法は汎用性が高いと言えよう。但し、FRAP法やFCS法では、これまで多くの研究者が構築してきたGFPやYFP、RFPなどの融合タンパク質が利用できるのに対し、FDAP法の場合にはそれらを光スイッチング蛍光タンパク質に置換しないといけない煩わしさがある。

おわりに

以上、FDAP法による分子拡散定量法を述べた訳だが、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。また、今回は細胞内タンパク質が自由拡散することを仮定してモデル式を構築しているが、細胞内構造物が障壁となって「拡散の異方性」が観察される場合もある。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画像化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様子を知り、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ストラテジー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法が、従来の細胞生物学的研究においてあまり真剣に解析されてこなかった定量的分子動態という視点から生命現象へアプローチするきっかけになれば幸いである。

文 献

- 1) 和田郁夫, 長屋寿雄, 田村 拓: バイオイメージングが分かる(高松哲郎編), 羊土社, 東京, pp. 62-75, 2005.
- 2) Jaiswal J, Simon SM: Imaging single events at the cell membrane. *Nat. Chem. Biol.* 3: 92-98, 2007.
- 3) 木村 宏: フォトブリーチング法による蛍光標識タンパク質の細胞内動態解析(1). *実験医学* 22: 1739-1745, 2004.
- 4) 木村 宏: フォトブリーチング法による蛍光標識タンパク質の細胞内動態解析(2). *実験医学* 22: 1851-1856, 2004.
- 5) 金城政孝: 蛍光相関分光法による一分子検出. *蛋白質核酸酵素* 44: 1431-1438, 1999.
- 6) Matsuda T, Miyawaki A, Nagai T: Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. *Nat. Methods* 5: 339-345, 2008.
- 7) Lukyanov KA, Chudakov DM, Lukyanov S, et al.: Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 885-891, 2005.
- 8) 松田知己, 永井健治: 新規の光変換蛍光タンパク質プロトタイプを用いた生体イメージングと動態解析. *蛋白質核酸酵素* 53: 1858-1864, 2008.
- 9) Meyvis TK, De Smedt SC, Van Oostveldt P, et al.: Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. *Pharm. Res.* 16: 1153-1162, 1999.
- 10) 永井健治, 松田知己: 光変換蛍光タンパク質を用いた生体分子の動態解析法. *実験医学* 26: 2830-2836, 2008.
- 11) 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), 共立出版, 東京, pp. 255-267, 2007.
- 12) Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA, et al.: Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* 86: 3473-3495, 2004.
- 13) Sprague BL, McNally JG: FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol.* 15: 84-91, 2005.

特集にあたって

Bioimaging towards the study of trans-hierarchical interplay in biological systems

野地博行・永井健治

はじめに

生命システムを構成する生体分子の種類とその配列がほぼ完全に明らかとなり、生命科学は物質科学としての生体分子科学に立脚しながらも、その集合体をシステムとしてとらえた“超階層システム生命科学”へと急激に変貌しつつある。この新しい展開を実験的にささえているのが、トランスクリプトームやメタボロームなどに代表される網羅的計測技術にくわえて、システムの状態の時空間情報をあたえるイメージング技術である。限られた誌面で、非常に速いペースで発展しているイメージング技術の全貌をとらえることはできないが、本特集では、システムとしての生命現象を解明するのに適した新しいイメージング技術の開発やその利用方法に関して、注目すべき成果をあげている若手研究者の研究を紹介する。ここから、イメージング技術の今後の発展や、その先にある将来像を探りたい。

I 生命システムにおける階層構造

生命システムの構造には、2つの明確な階層構造がある(図1)。ひとつは、生命システムの構成単位である生体分子である。もうひとつは、“生きているシステム”の基本単位である細胞である。生体分子をより詳細にみれば、サブユニット、ドメイン、反応部位、アミノ酸、そして、原子・電子にいたる階層構造をもつ。また、生体分子と細胞のあいだには、生体分子の相互作用にもとづいたさまざまな細胞反応システムが存在する。たとえば、転写システム、

蛋白質合成システム、代謝ネットワーク、情報伝達システムなどである。細胞の階層の上位には、細胞集団からなる機能単位・器官・個体・個体集団・生態系という高次の階層が形成されている。本特集で紹介するのは細胞集団からなる機能単位までであるが、生態系の研究でもリモートセンシングにもとづくイメージングが強力な手法となっていることを強調したい。

II 生命システムの特徴

生命システムの特徴のひとつは、各階層のシステムを構成する要素が、その機能発現によって上位階層システムをささえるだけでなく、システムの状態に応じて自分の状態も柔軟に変化させるという点である。また、生命システムの基本的要素である生体分子は、つねに熱ゆらぎにさらされており、その構造、そして、反応もゆらいでいる。そのため、その上位階層のシステムにおいても、状態が自発的にゆらいで状態間をゆっくりと遷移する現象もみられる。

このようなダイナミックな生命システムのメカニズムを解明するためには、注目するシステムの状態の時間に関する情報が不可欠である。また、生命システムは、生体分子・細胞・組織にみられるように、本質的に非対称・不均一な構造をもつ。そのため、それらをすりつぶして解析すると、システムがもつ空間情報が失われてしまう。したがって、生命科学においてバイオイメージング技術は不可欠な実験手法といえる。とくに、システムの状態と構成要素の状態を同時に可視化することができれば、階層間における相互作用のダイナミクスを明らかにすることができ、その基本原理を理解することができる。

各階層を特徴づける時間スケールは、上位になるにつれて大きくなる。生体分子の反応とそれにとまなう構造変化は、おおよそミリ秒から秒の時間スケールで起こる(図1)。そのため、分子レベルでは必然的に高い空間分解能だけでなく高い時間分解能計測が求められる。一方で、細胞の状態遷移は数秒からそれ以上、細胞集団の相互作用はさらに

Hiroyuki Noji¹, Takeharu Nagai²

¹大阪大学産業科学研究所 生体分子エナジェティクス研究分野

²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: hnoji@sanken.osaka-u.ac.jp

tnagai@es.hokudai.ac.jp

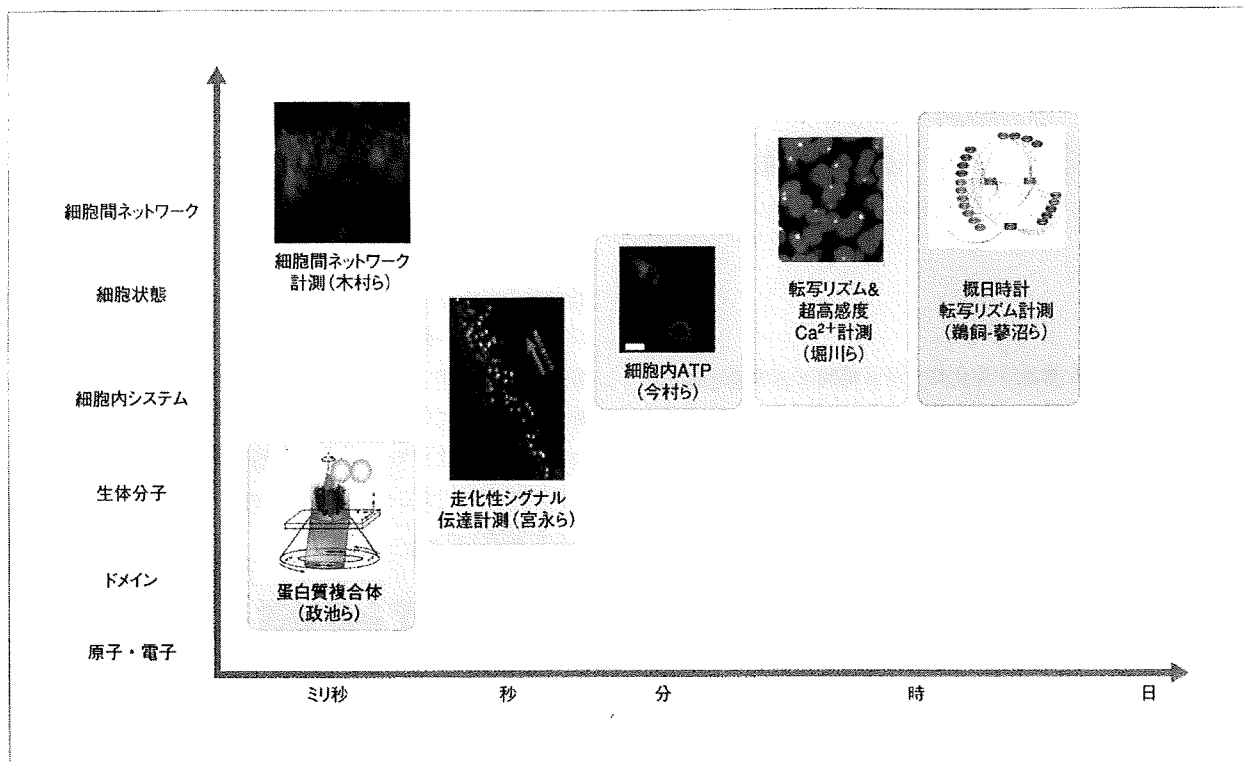


図1 各総説が取り扱う生命システムの階層マップ
縦軸は階層，横軸はその階層の時間スケールを表わす。

遅い時間スケールであることが多い(もちろん，神経細胞などの例外はある)。したがって，本特集が掲げる“階層をまたいだ”イメージングを行なうためには，各階層の空間スケールだけではなく，時間スケールをもまたいだ計測を行なう必要がある。

III 本特集の構成

政池らの項では，回転分子モーターのサブユニット回転をひき起こす触媒サブユニットの局所的構造変化のイメージング技術が紹介されている。これまで，回転分子モーターであるF₁-ATPaseのメカニズムは，回転子であるγサブユニットの回転運動に関する詳細な解析によって行なわれてきた。しかし，そのトルク発生サブユニットであるβサブユニットの構造変化を1分子レベルでリアルタイム計測した例はなかった。政池らは，独自に開発した偏光変調全反射型顕微鏡[→今月のKey Words (p.1918)]を用いて，βサブユニットに固定した蛍光色素の励起モーメントの向きから

βサブユニットの局所的構造変化を検出することに成功した。この計測は，F₁のグローバルな構造変化，すなわち，γサブユニットの回転運動と同時計測されたため，βサブユニットの構造変化と回転運動の相関に関する重要な発見につながった。この手法をほかの生体分子に適用することで，さまざまな蛋白質の局所的構造変化をリアルタイムにイメージングすることが可能となり，生体分子の反応と構造変化の相関が明らかになると期待される。

宮永らの項では，細胞性粘菌におけるcAMP受容体と3量体G蛋白質からなる情報処理システムが，細胞の走化性という高次の細胞応答をどのようにささえているのかについて，1分子イメージングと理論的な考察もふまえて解説している。彼らが注目したのは，細胞前後のcAMPの濃度差という値として非常に小さく，しかも，本質的にゆらぎの大きなシグナルを，細胞膜の情報処理システムがどのようにして検出するのかという問題である。細胞性粘菌の細胞前後におけるcAMPの濃度差は，cAMP結合型受容体の数の差に変換されたのち，活性化した3量体G蛋白質の数の

差(シグナル)に変換される。このとき、cAMP結合型受容体の数のゆらぎも、活性化した3量体G蛋白質の数のゆらぎ(ノイズ)として伝播する。驚いたことに、粘菌細胞の走化性効率はシグナルの大きさそのものではなく、ノイズとの比(S/N比)に一致するらしい。また、彼らは受容体がcAMPに対して親和性の高い状態と低い状態のあいだを遷移していることを見だし、これが広い濃度範囲における走化性応答の基礎となっていることも発見している。

今村らの項では、細胞のエネルギー状態(ATP濃度)を計測するための新しいプローブ開発が紹介されている。ATP合成酵素には、 ϵ サブユニットとよばれる活性調節サブユニットがある。この蛋白質は、ATP結合にもなって大きく構造を変化させる。そこで、彼らは ϵ サブユニットのN末端、C末端それぞれに水色蛍光蛋白質、黄色蛍光蛋白質を接続することで、FRET^{*1}効率の変化からATP濃度を測定できる蛋白質性のプローブを作製した。このプローブを培養細胞に発現させたところ、ミトコンドリア内部のATP濃度が細胞質や核のATP濃度より低いという予想外の発見がなされた。ATPは非常に多くの細胞内システムをささえるエネルギー通貨であり、しかも、一部のシステムでは情報伝達物質として使われている。そのため、細胞のATPレベルを細胞活性や細胞システムと同時に計測することで、まったく新しい発見がなされるだろう。

鵜飼・蓼沼らの項では、哺乳類の概日時計をつかさどる基本時刻のうち、“昼”と“夜”がどのようにつくられるのかを理解する方法として、“再構成実験”と“物理的シミュレーション”[→今月のKey Words(p.1918)]の組合せによるアプローチを紹介している。彼らは概日時計の転写制御ネットワークシステムが時計遺伝子と制御DNA配列を含む標的遺伝子プロモーターが織りなす2つの要素から構成されていると考え、これを検証するために、哺乳類培養細胞中に人工的な概日時計を再構成し、化学発光蛋白質の発光量としてモニターした。さらに、この再構成実験系の真偽を検証するために、物理的シミュレーションとして人工概日時計に対していくつかの摂動をくわえ、そのアウトプットとしての化学発光シグナル量がどのように変化するかを調べた。その結果、人工的に構成したシステムにおいても実際の概日時計と同様の転写出力を創出することに成功している。このような研究戦略は概日時計にとどまらず、ほぼす

べての生命システムの解析に今後ますます有用になるに違いない。

堀川らの項では、結合振動子システムの構成単位である細胞が数百~10万個ほど集まった大規模ネットワークにおいて、ナノメートルからミリメートルまでの空間階層を同時に可視化計測する2つの技術について解説している。1つ目は、高価なイメージング技術や生細胞試料を使わずとも、発生過程の分節時計の動的システムに迫る最先端のデータを出すことができる例を紹介しており興味深い。2つ目は、細胞内のCa²⁺濃度を超高感度に計測するための新しいプローブ開発を紹介している。彼らは多細胞集団における細胞の自発活動にともなう微弱なCa²⁺変化を検出するために、Ca²⁺キレーターとしてよく知られたEGTAよりもCa²⁺に対する親和性がはるかに高いCa²⁺指示薬を作製した。細胞内の生理環境を攪乱すると考えられるため、これまで誰も開発してこなかった高親和性Ca²⁺指示薬を用いることで、さまざまなCa²⁺の動的時空間パターン¹の発見に成功している点がきわめて興味深い。

木村らの項では、億単位のニューロンが協調的に作動することによって高次機能を創発する脳の動作原理に迫るためのイメージング技術“機能的多ニューロンCa²⁺画像法”(functional multineuronal calcium imaging; fMCI)について解説している。fMCIは多数のニューロンの活動記録を大規模に記録する方法であり、これまでにさまざまなfMCIが開発されている。しかしながら、そのどれもが時間分解能・空間分解能の面で満足のいくものではなかった。そこで、彼らはニューロンの活動を毎秒2000枚という超高速で共焦点観察する方法を開発した。これにより多数のニューロン活動の相関を解析することが実現し、海馬が2種類の情報を並列的に処理することが可能であることや、2種類の入力²のタイミングを変化させることによって情報処理の演算様式が変化する可能性をみいだしている。

IV 生命システムイメージング研究の今後の方向性

以上のとおり、生命システムを定量的に解析するためのイメージング技術は、急激な速度で進歩している。本特集で取り上げられなかったすぐれた計測技術もぞくぞくと開

*1 FRET: IUPAC(国際純正・応用化学連合)命名法では、共鳴エネルギー移動は無輻射的に起こり蛍光が発せられるわけではないため、発見者であるフェルスター(Förster)にちなんで、Förster resonance energy transferに統一されている。

発されている。とくに、“複数要素”“高空間分解”“深部”の3つを標榜する技術は今後のイメージング研究の方向性を考えるうえではずせないキーワードである。なぜなら、複数の要素が絡み合ったネットワークとして構成される生命システムを理解するためには、これまでのようにひとつの要素だけをとらえているだけでは不十分で、同時にとらえる要素の数を増やさなければ、それらの動的関係を正確に理解できるようにはならないからである。また、1分子レベルの現象は蛍光輝点の動きや強度変化をとらえることで、分子の構造変化を“推測”するという方法論がとられていた。従来の光学顕微鏡では300 nm程度の空間分解能しかないので、ナノメートルサイズの分子を解像することができなかったのだから仕方がない。しかしながら、近年では、STED (stimulated emission depletion) やPALM (photoactivated localization microscopy) など可視光を用いながらも分子レベルの空間分解能で観察することができる顕微鏡が現われてきており¹⁾、分子間相互作用や蛋白質の構造変化をまさに“目の当たり”にできるようになりつつある。さらに、“深部”については、最近、708 nmの赤外蛍光を発する蛍光蛋白質がはじめて開発され、マウスの個体深部の組織を鮮明に観察することができるようになった²⁾。今後の階層的イメージングになくてはならない大きな技術的進歩である。個人的(永井)にはGFPのような蛍光蛋白質が超音波で励起できないものかと夢想しているが、このような技術は報告がなく相当むずかしいらしい。

一方、イメージングにくわえて、つぎに必要とされるのは“操作技術”である。たとえば、生体分子機械の研究では、計測対象の分子機械のはたらくようすがイメージングする実験系が確立すると、つぎは計測対象に対して摂動、すなわち、力学操作をあたえて、その反応メカニズムを探ってきた。また、木村らの項にあるように、神経細胞回路の研究では、外からの電氣的な刺激に応答してどのように細胞や細胞間の相互作用が変化するかをみることで、そのシグナル伝達・処理のメカニズムが研究されている。最近では、光によって開閉するイオンチャネル(チャンネルロドプシン)や光によって駆動するイオントランスポーター(ハロロドプシン)を神経細胞に発現する遺伝子導入動物が作製され、特異的な神経のみを活性化・不活性化させることで、個体の動きを人為的に制御できるようになってきた³⁾。個体の動きを制御しているときにどのような神経ネットワークが活動しているかをとらえることができれば、まさに異なる階層システムの相互作用にアプローチできるすぐれた解

析系になるであろう。同様に、ほかの階層システムを研究するうえでも、イメージングの最中にさまざまな摂動をあたえる技術の開発が必要である。化学的な摂動をあたえるツールとしては、ケージド化合物をはじめとするさまざまな試薬がすでに開発されており、細胞内転写・翻訳の制御にも用いられている。光照射により蛋白質を任意の時空間で不活性化できるCALI (chromophore-assisted light inactivation) 法は20年前に開発された方法であるが、ようやく活躍の舞台があたえられつつある⁴⁾。今後、イメージング技術の発展にともない、これらの操作技術をさらに洗練化させるとともに、本質的に異なる操作技術の開発が不可欠である。個人的(野地)にはGFPのように遺伝子でコードできる磁性体を用いた、細胞内における分子特異的な操作技術ができないものかと夢想している。

また、システムの作動原理モデルの検証のためには、再構成が不可欠である。鶴飼-蓼沼らは、概日時計システムの研究におけるすぐれた実例を紹介しているが、彼らが行う細胞を用いた物理シミュレーションは合成生物学として注目をあびており^{5,6)}、多くの読者もご存知だろう。この方向の重要度は今後もより増すものと思われる。また、精製された試料を用いた*in vitro*における再構成実験の重要性は、ひき続き非常に重要であると思われる。ただし、この手法が飛躍的な発展をするには、技術革新が不可欠である。そのときにキーとなるのは、再構成する空間やそのタイミングなどを厳密に制御するためのデバイス開発であろう。

また、イメージングによって得られたデータの解析や、モデルの構築において、理論的なアプローチはこれまでとは比較にならないほど重要度を増している。膨大なイメージングデータを扱うこの学問領域では、データマイニングなどの手法がこれからますます必要不可欠になるだろう。とかく研究者は得られたデータから自分に都合のよい部分を無意識的に取捨選択している場合が多いが、そのために見落とされてしまったデータにこそ、新たな発見があるかもしれないからである。すでにアラフォーとなってしまった筆者たちも含めて、生物学を専攻する学生や研究者には伝統的に数理的な解析を苦手とするものが多い。しかし、生命システムを理解するうえで理論的アプローチはもはや不可避である。今後は、理論家と実験家の共同作業によるすぐれた研究が増えるだろう。

この特集は、2008年12月のBMB2008(日本分子生物学会年会・日本生化学会大会の合同大会)における企画シンポジウムに基づくものである。

文 献

- 1) Fernandez-Suarez, M., Ting, A. Y.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 929-943 (2008)
- 2) Shu, X. *et al.*: *Science*, 324, 804-807 (2009)
- 3) Zhang, F. *et al.*: *Nature Rev. Neurosci.*, 8, 577-581 (2007)
- 4) Jacobson, K., Rajfur, Z., Vitriol, E., Hahn, K.: *Trends Cell Biol.*, 18, 443-450 (2008)
- 5) Endy, D.: *Nature*, 438, 449-453 (2005)
- 6) Sprinzak, D., Elowitz, M. B.: *Nature*, 438, 443-448 (2005)

野地博行

略歴：1997年 東京工業大学大学院総合理工学研究科 修了、1998年 科学技術振興機構CREST 研究員、2000年同 さきがけ 専任研究員、2001年 東京大学生産技術研究所 助教授を経て、2005年より大阪大学産業科学研究所 教授。

研究テーマ：ATP合成酵素の1分子生物物理、バイオMEMS。
関心事・抱負：解析的な研究にくわえて、創る生物学にも取り組みたい(人工もしくは生体分子から細胞システムまで)。

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、1998年 理化学研究所 基礎科学特別研究員、2001年 科学技術振興機構さきがけ 研究員を経て、2005年より北海道大学電子科学研究所教授、2008年よりさきがけ研究員 兼任。

研究テーマ：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。

関心事：趣味は飲酒しながらの科学談義、読書、スキー。好きな言葉は“自我作古”。

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“超解像顕微観察法”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/cm^2 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り、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 $1/10^8$ に照射エネルギーを減

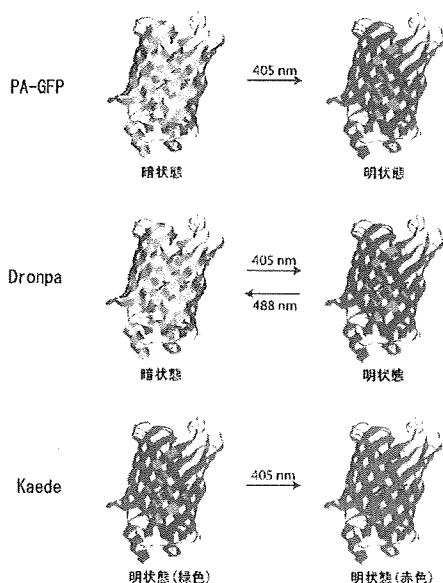


図1 光スイッチング蛍光タンパク質の特性。PA-GFP は不可逆的、Dronpa は可逆的に明暗状態間を変化する。Kaede は不可逆的に蛍光色を変化する

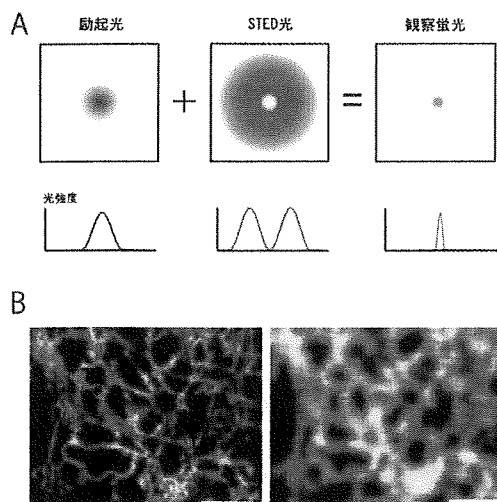


図2 STED法(A) STEDの原理。回折限界まで絞り込んだ励起レーザー光(紫)とドーナツ形に成形されたSTEDビーム(赤)が蛍光分子に照射されると、STEDビームが照射されている部分の蛍光分子は誘導放出によって強制的に基底状態へと遷移させられ、ドーナツの中心部分のみ蛍光が観察される(緑)。この領域は回折限界よりも小さく、数十nmの半値全幅をもつ鋭いピーク形状の蛍光スポットとなる。(B) STED法による黄色蛍光タンパク質Citrineで標識した小胞体の超解像観察。右パネルは同視野の共焦点顕微鏡観察像を示す。文献4cよりそれぞれPNASの許可を得て掲載。スケールバーは5 μ m(A)。

小さくすることに成功した。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現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つだけ活性化させる。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、輝点のシグナルを十分な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

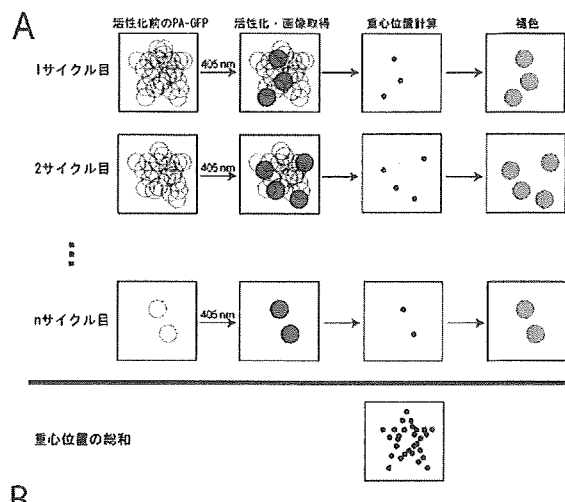


図3 PALM法(A) PALMの原理。PALMは光活性化→画像取得→重心位置計算→褪色の過程を1サイクルとして、視野中の蛍光分子が全て褪色されるまで繰り返し、得られた全ての輝度重心輝点を重ね合わせることで最終画像を得る。(B) PALMによるdEosFPで標識したミトコンドリアの超解像観察。右パネルは同視野の全反射顕微鏡像を示す。文献5aよりScienceの許可を得て掲載。スケールバーは1 μ m。

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いに期待したい。

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).

ワンステップ全自動プラスミド構築方法

Versatile Technique for High-throughput Multi-fragment DNA Recombination by a Spontaneous Reaction in a Single Tube

小寺一平, 永井健治

Ippei Kotera, Takeharu Nagai

生物学領域の多くの研究者にとってプラスミドの構築は、時間的にも精神的にも実験の大きな部分を占める作業である。DNA組換え技術は1970年代に確立されたが、現在でも当時のプロトコルが広く使われており、作業効率の改善に大きな余地がある。そこで我々は、IIS型制限酵素とDNAポリメラーゼ阻害剤を利用することでPCR産物を全自動かつ超迅速に組換える方法を開発した。

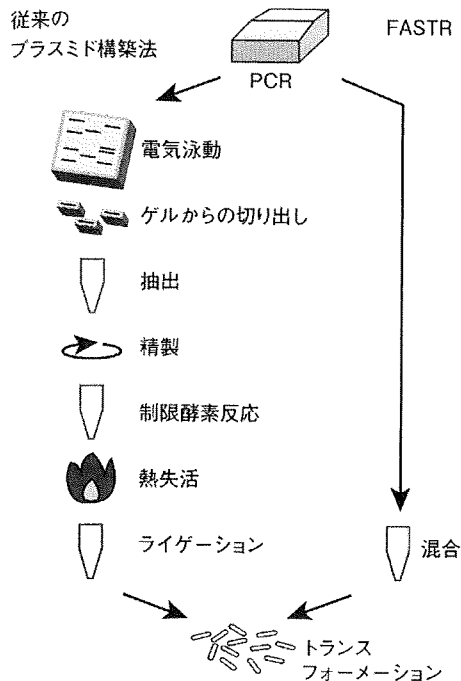
key words | DNA組換え, プラスミド構築, IIS型制限酵素

●はじめに

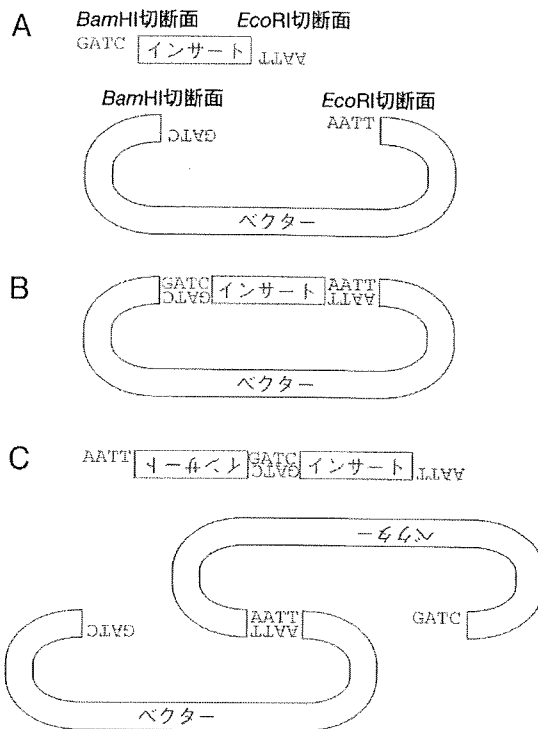
生物学とその関連領域における多くの研究者にとって、プラスミド構築をはじめとするDNAの組換えは避けて通れない作業である。ノックアウト個体の作成や遺伝子の強制発現、iPS細胞の作成、酵素エンジニアリング、RNAiなどの分子生物学的な領域に加え、医学、生態学、系統分類学、生物情報学、細胞生物学、生物物理学など広義の生物学分野においてもプラスミド構築は必要不可欠な作業である。こうして本稿を読んでいる読者の中にも、たくさんのプラスミド構築を抱えている方がいるのではないだろうか？ プラスミド構築の作業を効率化するために、Gateway™のようなDNA組換え酵素によるプラスミドの構築を検討した研究者も多いと思われる。DNA組換え酵素を応用した技術は、特にハイスループットな実験系では強力な技術である反面、比較的長めの組換え配列がインサートの両端に残ってしまうため、複数のDNA断片を自由に切り貼りすることが難しい。こうした理由から、制限酵素とDNAリガーゼを用いた第一世代DNA組換え技術は現在でも世界中の研究室で使われている。我々が開発した組換え技術はこのような背景を踏まえ、従来の技術と同等の組換え柔軟性を確保しつつも、作業時間と効率を大幅に改善することに主眼をおいた¹⁾。この技術をやや大げさに表現すると「全自動DNA組換え」であり、FASTR (fully automated single-tube recombination) と名付けている。FASTRを用いると、PCRで増幅したインサートとベクターDNAを混ぜ、15分静置するだけで目的のプラスミドを構築することができる(図1)。また組換え効率も高く、4断片の同時組換えも実証済みである。本稿では、この技術の特徴と、実際の実験に則したプロトコルを紹介する。

I. IIS型制限酵素を用いたDNAの組換え

*Bam*HIや*Eco*RIなどのお馴染みの制限酵素は、IIP型と呼ばれる制限酵素のサブタイプに属し、1968年にハミルトン・スミス、ダニエル・ネーサンズ、ヴェルナー・アーバーらによって発見された。その後の分子生物学の興隆は言わずもがなである。こうした歴史的背景もあって、現在DNA組換えに使われている制限酵素は、大部分がパリンドローム配列



■図1 FASTRの概略
従来の半日掛かりの方法とは異なり、FASTRではPCR後の全工程が15分程度で終了する。



■図2 IIP型制限酵素切断面による非特異的なライゲーション
A: ベクターとインサート配列の両末端をそれぞれ*Bam*HIと*Eco*RIで切断した例。
B: 設計通りにライゲーションが行われた場合。
C: それ以外のライゲーションのパターン。
これ以外にも無数のライゲーションの組合せが生じる。青字がインサートDNA配列、赤字がベクターDNA配列をそれぞれ示す。

を認識するIIP型制限酵素である。実は、DNA組換えにとって制限酵素の切断配列がパリンδροームである必要はなく、むしろパリンδροームは有害であるとさえいえる。図2に示すように、*Bam*HIと*Eco*RIで末端を処理したインサートとベクターのライゲーションについて考えると、IIP型制限酵素が作成する突出末端はパリンδροームであるため方向性がない(図2A)。突出末端が同配列であればライゲーションが起こるため、目的のプラスミド(図2B)以外にも無数のライゲーションの組合せが生じてしまう(図2C)。このため一般的なDNA組換え工程においては、目的プラスミドの収量を上げるためにライゲーション反応やスクリーニングに工夫が必要である。

一方で、IIS型制限酵素²⁾は、DNA認識配列と切断配列が異なる部位に存在するため切断配列を自由にデザインすることが可能である(図3)。これは、DNA組換えにおいて非常に有用な性質である。切断部位を非パリンδροームにすることにより、目的のライゲーションのみが起こる条件が達成可能である。IIP型制限酵素を用いた場合のような、インサートやベクターどうしのライゲーションは原理上起こらない。さらに、1種類の制限酵素で複数種類の切断配列を作成することが可能であり、複数の制限酵素の組み合わせに頭を悩ませる必要がない。IIS型制限酵素のこうした性質を考慮すると、DNA組換え作業においてIIP型を選択する必要性は感じられない。一般的なプラスミド構築においても、*Bam*HIなどのIIP型制限酵素は破棄し、ぜひIIS型制限酵素へ移行することをお勧めする。

II P 型制限酵素 (BamHI)

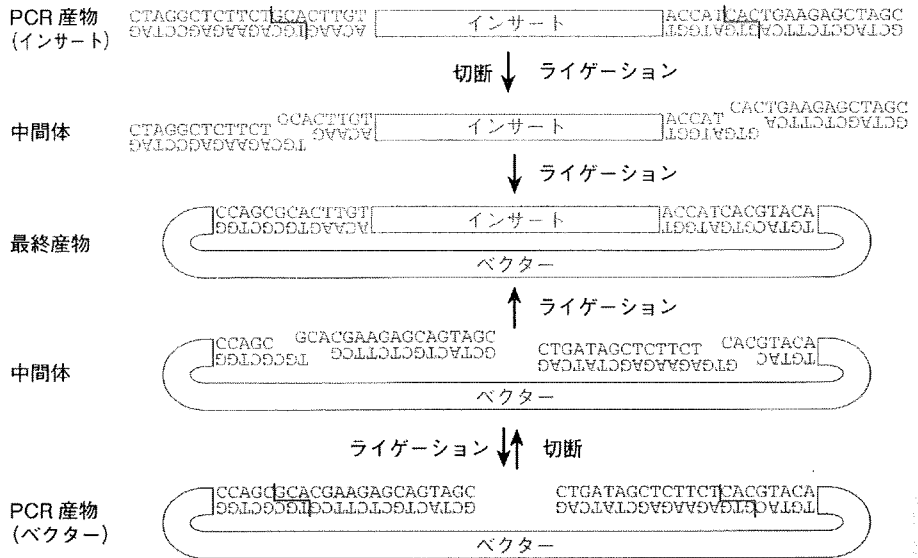
NNNGGATCCNNN
NNNCCLVGGNNN

IIS 型制限酵素 (BbsI)

GAAGACNNNNNN
DLICLVGGNNNNN

■図3 IIP型とIIS型制限酵素の比較

黄色のボックスは制限酵素の認識配列、緑線は制限酵素の切断部位をそれぞれ示す。



■図4 FASTRの概要図

PCR産物から中間体に至る反応は平衡反応であるが、最終産物ではIIS型制限酵素の認識配列(黄色ボックス)が失われているため、これ以上の反応は起こらない。

緑は制限酵素の切断面、青字がインサートDNA配列、赤字はベクターDNA配列をそれぞれ示す。

ただし、IIS型制限酵素の唯一考えられる欠点として、通常使われるベクターの多くはIIP型制限酵素に合わせて内部サイトに変異を施されているが、IIS型への最適化は行われていない点が挙げられる。したがって、IIS型への移行に際し、よく使うベクターを改変してしまうのが得策である。2009年2月現在、REBASE (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>)には363種類のIIS型制限酵素が登録されているため、配列や目的に応じた酵素を選択することも可能である。

II. IIS型制限酵素とDNAリガーゼを組み合わせた指向性の高い組換え反応

前述のIIS型制限酵素を用いることで、目的のプラスミド産物のみを選択的にライゲーションできることがわかる。ここでさらに、IIS型制限酵素とDNAリガーゼを同時に反応させることで、自立的な組換え反応が可能であることを説明する。IIS型制限酵素の認識部位を付加したプライマーで増幅したPCR産物を考えると、制限酵素とDNAリガーゼを同時に反応させることで、PCR産物の両端のアダプター配列が切断と再結合を繰り返す平衡反応が予想される。アダプター配列を切断されたPCR産物がターゲットのDNA断片と結合すると、そこにはIIS型制限酵素の認識部位がもはや存在しないため再切断が起こらない。つまり、アダプター配列を切断・再結合する平衡反応から目的の最終産物に向かって一方向へ反応が進むことになる。FASTRでは、この原理に基づいてPCR増幅したインサートとベクター断片を混ぜ合わせ、IIS型制限酵素とDNA組換えリガーゼを同時に反応させることが可能である。アダプター配列の切断と再結合は平衡反応であるが、ターゲット断片が存在する場合は、目的の最終産物を作成する反応が一方向に起こる。こうして、「混ぜるだけ」でDNA組換えを起こすことが可能になるのである(図4)。

1) プライマーの設計

プライマーの基本構造として、5'末端に数塩基程度の予備配列と IIS 型制限酵素の認識配列とを並べ、さらに切断配列を挟んで3'側にテンプレート配列へのハイブリダイゼーション配列を設ける(図5)。インサートとベクターに対してそれぞれプライマーを設計し、IIS型制限酵素による切り口どうしが、うまく結合するように設計する。複数断片の同時ライゲーションを行う場合には、切断部位を複数種類用意し、それぞれがクロストークしないように留意する。

2) FASTR 反応

- ① Aの条件でPCRを行う。
- ② PCR産物をBの条件で混ぜ合わせ、室温で15~60分静置する。
- ③ FASTR反応産物5 μ lで50 μ lのコンピテント大腸菌をトランスフォームする。

A. FASTRプロトコルで用いるPCRの条件

フォワードプライマー (5pmol/ μ l)	3	μ l
リバースプライマー (5pmol/ μ l)	3	μ l
テンプレートDNA (100ng/ μ l)	0.2	μ l
10 \times KOD plus バッファー	2	μ l
dNTPs (2mM)	2	μ l
MgSO ₄ (25mM)	0.8	μ l
KOD plus (Toyobo)	0.4	μ l
超純水	8.6	μ l
合計	20	μ l

94 $^{\circ}$ C	2分	1サイクル
	↓	
94 $^{\circ}$ C	15秒	30~35サイクル
65 $^{\circ}$ C	30秒	
68 $^{\circ}$ C	1分/1000bp	
	↓	
68 $^{\circ}$ C	5分	1サイクル

B. FASTR反応溶液の組成

Tangoバッファ (Fermentas)	0.5 μ l
T4 DNA Ligaseバッファ (NEB)	0.5 μ l
PCR産物(インサート)	1 μ l
PCR産物(ベクター)	1 μ l
アフィニティコリン (10mM, 和光017-09813)	0.2 μ l
ATP (10mM)	1 μ l
LgaI (Fermentas)	0.2 μ l
DpnI (NEB)	0.2 μ l
T4 DNA ligase (NEB)	0.2 μ l
超純水	5.2 μ l
合計	10 μ l

●おわりに

FASTR技術は、今までできなかったことをできるようにする技術ではないが、多くの研究者が多大な労力を注ぐプラスミド構築を迅速・簡便化し、研究全体の効率を改善するものである。プラスミド構築が避けて通れないものである以上、最先端の技術を駆使してできるだけ短時間で通り過ぎるしかない。FASTRにより労力や時間を節約し、それを新たな発見やイノベーションのために使うことができたとすれば、この技術の開発者にとって何よりの喜びである。

PROFILE 小寺一平

■北海道大学 電子科学研究所 ナノシステム生理学分野

PROFILE 永井健治

■北海道大学 電子科学研究所 ナノシステム生理学分野 教授

■E-mail: tnagai@es.hokudai.ac.jp

■専門: 発生生物学

■趣味: 飲酒, 読書, キャンプ, スキーなど

1998年東京大学大学院医学研究科修了。1998年 理化学研究所 基礎科学特別研究員。2001年科学技術振興機構さきがけ研究者等を経て2005年より北海道大学電子科学研究所, 教授。

文献

- 1) Kotera I, et al: J Biotechnol (2008) 137: 1-7
- 2) Szybalski W, et al: Gene (1991) 100: 13-26

- 3) Ikegami S, et al: Nature (1978) 275: 458-460
- 4) Cann IK; et al: Genetics (1999) 152: 1249-1267

for beginners

- ・福井泰久, 岩松明彦著: 「手抜き実験のすすめ バイオ研究五輪書」羊土社 (2003)
- ・Sambrook and Russel: "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" 3rd ed. CSHL PRESS (2001)

細胞結合振動子システムを対象にした 超高感度大規模イメージング

Ultra-sensitive and large-scale imaging of cellular coupled oscillator systems

堀川一樹・永井健治

脳や遺伝子プログラムは細胞や遺伝子などの機能単位から構成される複雑なネットワークである。その動作原理を理解したいという野心的な挑戦のためには、要素レベルの空間解像度を備えた大規模イメージングが必須である。本稿では、細胞結合振動子システムを材料に、構成単位である細胞の動的な活動を超高感度かつ大規模にイメージングする2つの方法を紹介する。

Key words

●生物リズム ●分節時計 ●Ca²⁺イメージング

はじめに

細胞結合振動子システムとは、なんらかのリズムを発振する多数の細胞が機能的に相互作用した多細胞ネットワークのことで、動的ネットワークの動作原理を研究する際のすぐれたモデル系である。脳や心臓はその典型例で、そのリズムとは膜電位や細胞内イオン濃度の周期的な変動である。本稿では、単位振動子が数百個から最大10万個ほど集まった大規模ネットワークを材料に、システムの動作原理にせまることをめざしたイメージング技術を紹介する。

たくさんの細胞結合振動子が協調的につくり出すリズム現象の研究は容易ではない。それぞれの細胞は細胞間相互作用を介して相手の時計を進めたり遅らせたりするが、その結果、自らにもリズムを変化させるような相互作用シグナルが入力される。こうなると、振動子集団全体のリズムを要素の足しあわせとして単純に記述することはできないので、これまで慣れ親しんだ還元型手法とはまったく異なるアプローチが必要になる。研究を進めるうえで確立された方法があるわけではないが、もっとも有効とされる最初の一歩としては、相互作用が維持された複雑なシステムをばらすことなくたくさんの構成単位のダイナミクスを同時に計測することがあげられる。つまり、細胞結合振動子な

ら、システム全体を細胞1個の分解能で大規模にイメージングすることが必要になる。本稿では、2つの具体例を材料に、階層間をまたぐイメージングの重要性を解説する。

I 分節時計

1. 分節時計の可視化と集団振動

脊椎動物の体は背骨やあばらのような節を単位として構成されるが、このくり返し構造は“時間の周期性を空間の周期性に変換する”ことで生み出される^{1,2)} [図1, 体節形成とclock & wavefront メカニズム, →今月のKey Words (p.1918)]。本稿で議論する分節時計とは時間の周期性をつかさどる振動体のことで、その実体は分節形成に参加するすべての細胞(未分節中胚葉)内でくり返される複数の遺伝子の周期的な発現である。分節形成は動物種ごとに固有の周期、つまり、マウスでは120分周期、ニワトリでは90分周期、そして、筆者らの研究材料であるゼブラフィッシュでは30分周期で進行するが、分節形成に必要な遺伝子群もこの周期で振動的に発現している。規則正しい分節パターンの構築にはそれぞれの細胞内で遺伝子発現が振動するだけでは不十分で、全体として調和がとれている必要がある。以下では、個々の細胞での振動と全体としての振動とにどのような関係があるのかについて、イメージングをとおしてせまる。

リズムの実体のひとつは、細胞内で自らの転写を抑制する転写因子のON/OFFであるので、リズムを可視化するには時計遺伝子の発現を生細胞イメージングするのが最適である³⁾。ただし、生細胞イメージングで動物の個体を対象

Kazuki Horikawa, 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: kazu@es.hokudai.ac.jp