

- アポトーシスによって SCAT3.1 が切断され FRET が解除されたサンプルに対しても、同様のデータ取得と linear unmixing を行う。
- アポトーシスなし (FRET あり) とアポトーシスあり (FRET なし) の SECFP と Venus の蛍光強度の比から、FRET の有無を検討する (図 2)。

考察のポイント

- スペクトルイメージングによる観察が威力を発揮するのはどのような状況か？
- スペクトル顕微鏡はどのような仕組みで蛍光スペクトルを取得するのか？
- linear unmixing ではどうやって異なる蛍光物質から発せられる蛍光をスペクトル分解するのか？
- FRET とはどのような現象か？ (なぜ、アポトーシスありの細胞となしの細胞で蛍光が変化したのか？)

[原口徳子・永井健治・松田知己]

実習 6-2 アクセプターブリーチングによる FRET の検出

目的 アクセプターブリーチングによるドナーの蛍光回復から FRET の真偽判定を行う。測定データから FRET 効率を算出する方法を理解する。

実習内容

- 1) アクセプターの蛍光色素をブリーチする前後における、ドナーの蛍光強度を顕微鏡下で測定する。
- 2) 得られた蛍光強度データを基に FRET 効率を算出する。

関連の講義

第 13 章 FRET の基礎
第 14 章 FRET の測定法と評価

材料 SCAT3.1 を発現する HeLa-S3 細胞 (実習 6-1)
SECFP と Venus を共発現する HeLa-S3 細胞

機材 レーザー走査型共焦点顕微鏡

- Leica SP5, C-Apochromat 63×/NA 1.4, oil
- Nikon C1si PlanApochromat 60×/NA 1.4, oil
- Olympus FV1000, UPlanApo 60×/NA 1.35, oil

- Zeiss LSM510META, C-Apochromat 40×/NA 1.2, W, Corr
- SECFP 励起用レーザーとして, 半導体レーザー (405 nm, 430 nm, 440 nm 各種レーザー), ガスレーザー (413 nm Kr) が必要

手順

① 細胞の準備

実習 6-1 と同じ。

② 顕微鏡による蛍光観察とブリーチング

- 1) サンプルを顕微鏡にセットし, 透過光観察により対物レンズのピントを細胞に合わせる。
- 2) 水銀ランプ (あるいはキセノンランプ) を用い目視による蛍光観察を行い, SCAT3.1 が発現している細胞を選ぶ。
- 3) FRET 観察および Venus のブリーチングに必要なダイクロイックミラー, フィルター, レーザーを選択する (蛍光スペクトルを取る場合も, それに必要なダイクロイックミラー, フィルター, レーザーを選択する)。

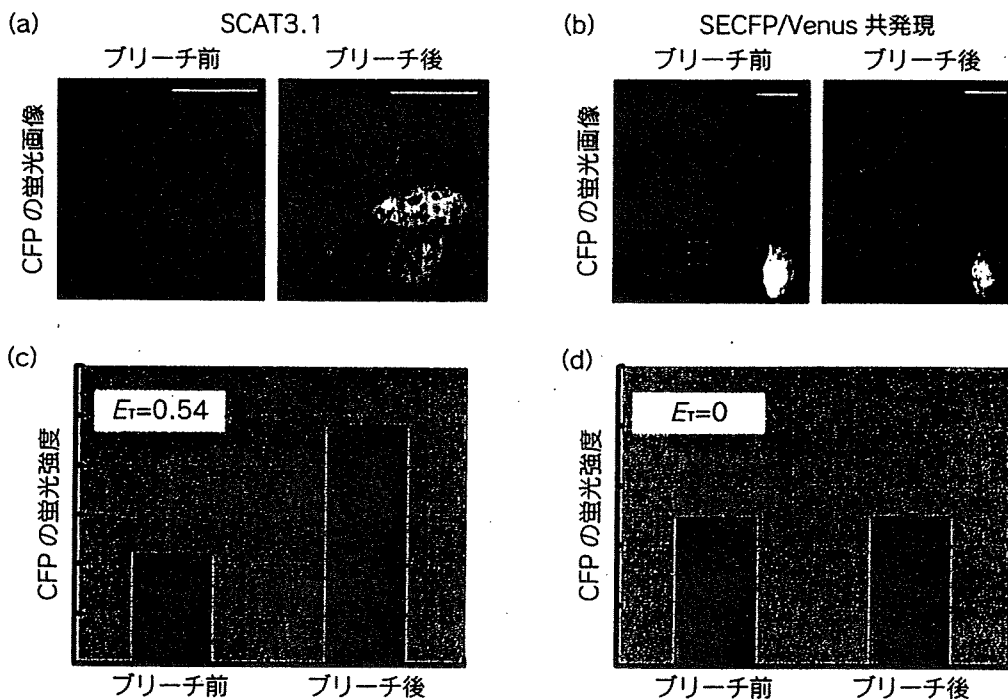


図3 アクセプターブリーチングによる FRET の検証

- アクセプターブリーチ前後の SCAT3.1 を発現する HeLa 細胞のドナー蛍光画像。
- アクセプターブリーチ前後の Venus と SECFP を発現する HeLa 細胞のドナー蛍光画像。
- (a) の細胞におけるアクセプターブリーチング前後でのドナーの蛍光強度変化。
- (b) の細胞におけるアクセプターブリーチング前後でのドナーの蛍光強度変化。

図 1 に示すように, アクセプターブリーチ後には SCAT3.1 内のドナーである SECFP の蛍光強度が増加しているのがわかる。一方, SECFP と Venus を共発現する細胞においては, SECFP の蛍光強度増加は見られなかった。また, ドナーの蛍光強度変化から, FRET 効率を求めたところ, SCAT3.1 では 0.54, SECFP と Venus では 0 という値が得られた。以上から, これらの細胞では, SCAT3.1 では効率よく FRET が起こっているのに対し, それを構成している蛍光タンパク質が共発現しただけでは FRET が起こらないことが示された。

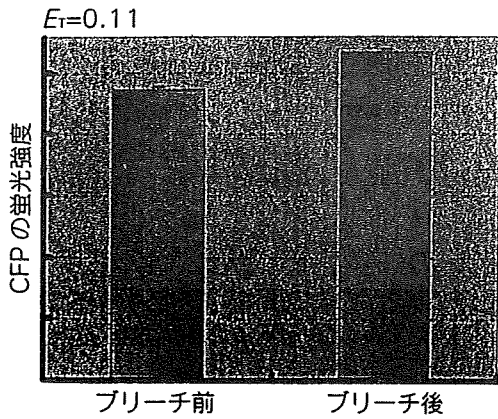


図4 蛍光再吸収による偽 FRET

SECFP と Venus を共発現する細胞の中でも、比較的明るい細胞をアクセプターブリーチするとドナーの蛍光強度が有意に増加する。また、その強度変化から FRET 効率を算出すると 0.11 であった。本結果は、アクセプターが大量に発現する細胞を測定していることから、再吸収機構 (図 5, および第 14 章「FRET の測定法と評価」参照) が起きているものと考えられた。

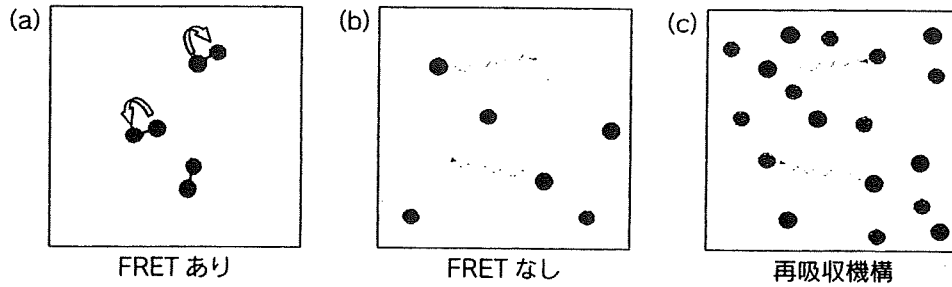


図5 再吸収機構

- (a) FRET が起きている場合、ドナー (濃いグレー) からアクセプター (薄いグレー) にエネルギーが移動し、アクセプターから蛍光が放出される。
- (b) FRET が起きているときは、ドナーから蛍光が放出される。
- (c) FRET が起きているときでも、アクセプターが過剰に存在すると、そのアクセプターがドナーから放射された蛍光を吸収してしまうため、アクセプターからの蛍光が観察される。

FRET 観察時の SECFP の励起には 405 nm 半導体レーザー (413 nm, 430 nm, 440 nm のレーザーでもよい) を使用する。Venus のブリーチングは Ar レーザーの 515 nm を使用する。

- 4) 励起光強度などの測定条件を適当な細胞を用いて検討する。アクセプターブリーチ後は、ドナーの蛍光強度が増加するので、それを考慮して励起光強度などを決める必要がある。測定には条件検討で使用した以外の細胞を用いる。
- 5) SCAT3.1 を発現する細胞に対して、SECFP と Venus それぞれの蛍光強度を測定する (蛍光スペクトルを取得してもよい)。
- 6) アクセプターである Venus に対して、515 nm のレーザーパワーを最大にし、細胞全体をスキャンして完全にブリーチする。
- 7) ブリーチング後、SCAT3.1 の SECFP と Venus それぞれの蛍光強度を、上と同じ条件で測定する (蛍光スペクトルでもよい) (図 3)。
- 8) SECFP と Venus を共発現する HeLa-S3 細胞に対しても、上と同様の測定を行う。発現量が違う細胞を選び、再吸収機構による“偽 FRET”の有無を検討する (図 3, 図 4, 図 5)。

④ データ解析と FRET 効率の計算

- 1) 細胞全体（または特定領域）について、ブリーチング前後での SECFP（ドナー）の蛍光強度を求める。
- 2) その値を、第 13 章「FRET の基礎」、式 (12) に代入し、FRET 効率を計算する。

考察のポイント

- SECFP と Venus の吸収・蛍光スペクトルと選択したフィルター・ダイクロイックミラーとの関係。
- アクセプターブリーチングによりドナーの蛍光強度の回復が起こっていれば「真」、ドナーの蛍光強度の回復が起こっていなければ「偽」と判定してよいか？
- アクセプターブリーチングで FRET の真偽が見分けられないのはどのような場合か？ また、その場合どのような方法を用いれば FRET の真偽を確かめられるか？
- アクセプターが完全にブリーチできていない場合、FRET 効率はどのように見積もられるのか？（小さく見積もられるか、大きく見積もられるか？）
- FRET 効率からいえること、推測できることは何か？

[斉藤健太・永井健治]

実習 6-3 レシオイメージングによる FRET の検出

目的 レシオイメージングによる FRET の検出についての原理と方法を理解する。

実習内容 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を分子内 FRET の変化として検出する。細胞培養液にヒスタミンを添加することで生じる Ca^{2+} 波を、Cameleon YC3.60 の蛍光変化として高速撮影で捉える。

関連の講義 第 13 章 FRET の基礎
第 14 章 FRET の測定法と評価

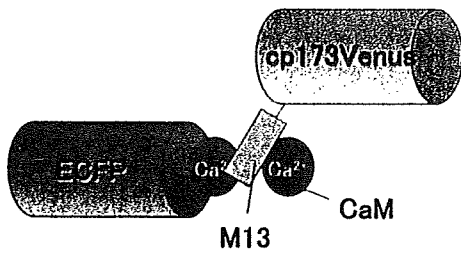


図6 カルシウム濃度指示薬としての Cameleon CY3.60 の分子構造の模式図

ECFPと円順列変異 cp173Venus の間にカルシウムと結合するサイトをもつ。カルシウムが結合しない状態では FRET が起こらないが、カルシウムが結合すると FRET を起こす。そのために、カルシウム濃度を測定する指示薬として使われている。

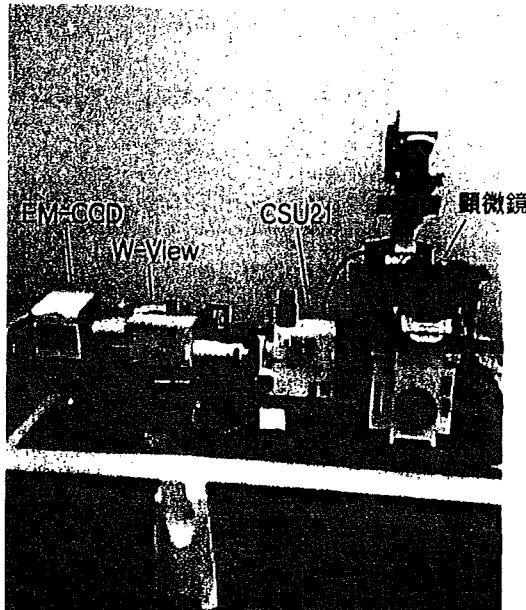


図7 高速 FRET 観察システム

背景

Cameleon YC3.60 [2] は Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルモジュリン (CaM) と Ca^{2+} -CaM 結合ペプチド M13 をタンデムに連結したペプチド鎖を CFP と YFP でサンドイッチした構造をもつ (図6)。 Ca^{2+} の濃度に応じて FRET 効率が変化するので、 Ca^{2+} 指示薬として使われる。

材料

Cameleon YC3.60 を発現する HeLa 細胞 (生細胞)
ヒスタミン 200 μM 溶液
ハンクス緩衝液カルシウム入り (HBSS+)

機材

- ニポーディスク共焦点顕微鏡 (下記を組み合わせたシステム) (図7)
- ・顕微鏡: Olympus IX81, PlanApo 60 \times /NA 1.4
 - ・共焦点システム: 多点走査型共焦点ユニット CSU21 (横河電機)
 - ・励起光源: 440 nm 半導体レーザー
 - ・観察光学系&カメラ: W-View+EM-CCD カメラ (または Ashura 3CCD) (浜松ホトニクス) (第14章「FRETの測定法と評価」参照)
 - ・画像取得および解析ソフト: AQUACOSMOS (浜松ホトニクス)

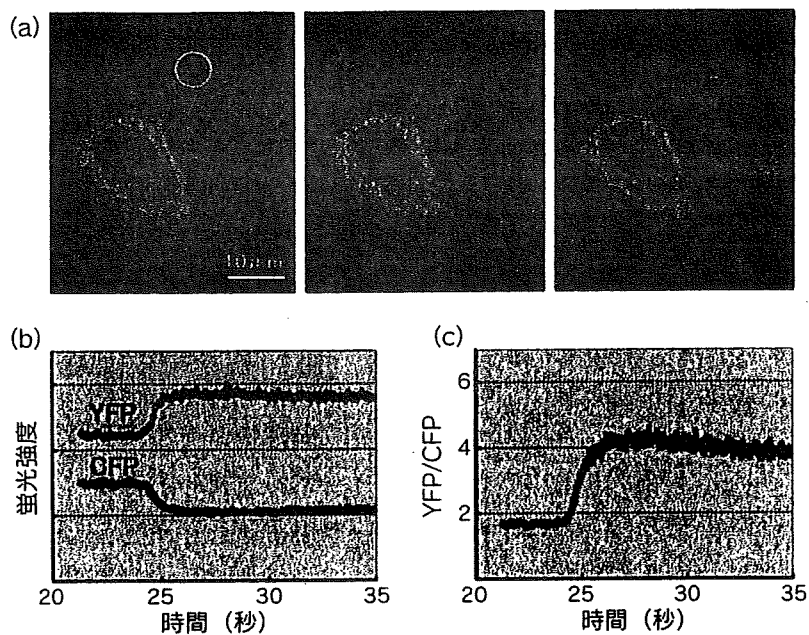


図8 HeLa細胞をヒスタミン刺激したときの Ca^{2+} 濃度変化

(a) 共焦点蛍光レシオ画像。

(b) YFPとCFPチャンネルの蛍光強度変化。

(c) YFP/CFPレシオ値の変化。

ヒスタミン刺激による小胞体からの Ca^{2+} 動員の様子をビデオレート共焦点観察した。画像取得後、バックグラウンドの画像を減算し、AQUA COSMOSのレシオ表示・ Ca^{2+} 濃度計算機能を用いて、“アクセプター画像とドナー画像の比”の表示と Ca^{2+} 濃度の計算を行った。

手順

① 細胞の準備

- ガラスボトムディッシュで培養したHeLa細胞に、観察の1日前にcameleon YC3.60遺伝子をコードするDNAプラスミドをトランスフェクションし、cameleon YC3.60を発現させる。

② 顕微鏡による蛍光観察

- トランスフェクション済み培養細胞ディッシュをインキュベータから取り出す。
- 観察前に、培地をHBSS+に換える。
- 顕微鏡ステージの上に培養細胞ディッシュを設置する。
- 水銀ランプを光源として用いて、蛍光性細胞を探す。
- 励起光を遮断する。
- カメラによる画像取得開始
- CSUのシャッターを開け、励起レーザーを照射する。
- 観察細胞の蛍光強度に合わせ、カメラの露光時間やビニングなどをセッティングする。
- カメラのセッティングが終了したら、すぐにCSUのシャッターを閉じる。
- 画像取り込み（バースト）開始

- 刺激薬剤（ヒスタミンなど）を培養液に加える。
- 画像取得続行
- 画像取得終了
- 画像解析（図 8）

考察のポイント

- フィルター交換方式，W-View 光学系，および 3CCD で FRET 観察するときの相違点は何か？
- 観察対象に応じて，適切に画像取得間隔を設定する必要がある．どのような観点で設定を行なうべきか？

文献

- [1] Nagai, T., Miyawaki, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 72-77, 2004
- [2] Nagai, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10554-10559, 2004

[永井健治]

実習 9

全反射顕微鏡

実習 9-1 全反射顕微鏡による 1 分子動態観察

目的 • 全反射顕微鏡の使い方と 1 分子計測法を学ぶ。

実習内容 受容体へ結合したローダミン標識 EGF の細胞膜上での拡散運動について、全反射顕微鏡を用いて 1 分子レベルでリアルタイム観察する。コンピュータにデータを取り込み、画像解析ソフトを用いて蛍光輝点の輝度重心の運動軌跡を求める。拡散速度の分布、拡散速度と輝点の蛍光強度との相関について解析する。

関連の講義 第 22 章 全反射顕微鏡と 1 分子計測

背景 上皮成長因子 (epidermal growth factor ; EGF) は、上皮細胞・線維芽細胞など種々の細胞に対して増殖作用を及ぼすペプチドホルモンである。増殖応答は細胞外からやってきた EGF 分子が細胞膜上の受容体に結合することによって開始されるが、細胞質内への情報伝達には、EGF-受容体複合体が 2 量体を形成し、受容体分子どうしが相手の細胞質ドメインのチロシン残基を相互にリン酸化することが必要である。

EGF 受容体は細胞膜を 1 回貫通した膜タンパク質であり、細胞膜には単量体として存在する他に、EGF の結合以前から 2 分子あるいは数分子の会合体を形成していることが明らかになってきた。細胞膜は脂質二重層を基本構造とする 2 次元の液体であり、EGF 受容体は、細胞膜内を熱拡散でランダムに運動している。受容体の一部は膜骨格への結合などにより、運動が抑制されている。EGF-受容体複合体の 2 量体形成は、受容体会合体に 2 分子の EGF が順に結合していく場合と、2 つの EGF-受容体複合体が熱運動しながら衝突し、結合して起こる場合がある。

ローダミン標識した EGF を細胞に結合させ、それを全反射顕微鏡で観察すると、個々の分子が蛍光輝点として検出される。輝点の運動は、EGF-受容体複合体の熱拡散運動を表す。輝点の蛍光強度はその場所に存在する分子数に関係

している。

材

- HeLa 細胞
- ローダミン標識 EGF

機 材

- YAG レーザー (532 nm) 全反射顕微鏡システム (オリンパス, ニコンなど)
- EM-CCD カメラ (アンドール, 浜松ホトニクス, ローパーサイエンティフィックなど)
- 1分子追跡ソフト (オリンパス, 浜松ホトニクスなどから販売されている)

手 順

① 細胞の準備

- 超音波洗浄したカバーガラス上に培養した HeLa 細胞を観察用チャンバーにセットする。
- 背景光の上昇を防ぐため, フェノールレッド, 血清を含まない培地を用いる。高分子浸透圧を保つため, 1% の BSA を加える。また, 通常の培地は CO₂ インキュベータ外では pH を保てないため, 5 mM PIPES (pH 7.2~7.4) を加える。

② 全反射顕微鏡によるローダミン標識 EGF の蛍光 1 分子観察

- コンピュータに搭載されているイメージングツールを起動し, CCD カメラによる観察像をディスプレイに表示させる。
- チャンバーを顕微鏡にセットし, 透過光観察により対物レンズのピントを細胞底面に合わせる。
- YAG レーザー光励起による全反射顕微鏡に切り替える。
- 最終濃度が 1~10 nM になるようにローダミン EGF を加える。
- 光路調整つまみを操作して, 対物レンズからの YAG レーザー射出角度を全反射励起になるように調節し, 細胞基底膜に結合したローダミン EGF

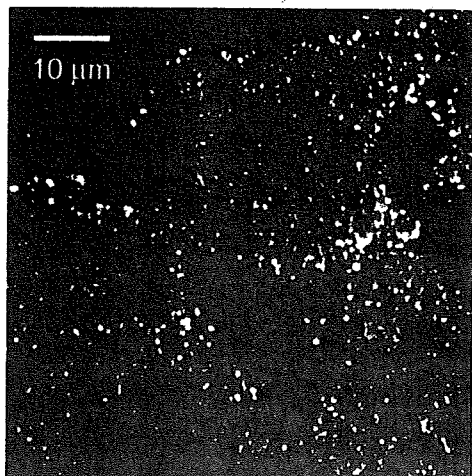


図1 ローダミン標識 EGF の全反射蛍光顕微鏡像

を1分子レベルで検出できるようにする(図1)。レーザー射出角度をレンズの中央部から周辺部に移動させていくと、全反射角に達したところで、背景光が急激に減少し、ローダミンEGF1分子が高コントラストで観察できるようになる。

- 焦点を上下して、全反射になったときに、細胞内や細胞上面からの蛍光信号が観察されなくなることを確認する。また、入射角の違いによる見え方の違いを見る。

③ コンピュータへのデータ取り込みの準備

- ディスプレイを見ながら S/N 比と蛍光退色の度合いのバランスが適切になるように、入射角、レーザーパワーとカメラの感度のパラメータを調節する。(運動を時間分解能よく観察するため、1秒あたり10~30枚程度の積算時間にする。)

④ データ取得

- 上記パラメータが決まったら、データ取得用に新たな細胞を準備する。(時間がたつと EGF は細胞内に取り込まれる。)
- ローダミン標識 EGF を投与し、リアルタイム観察像を1つの視野で数十秒間取得する。
- 各人がそれぞれ2ないし3の視野の動画を撮る。

⑤ データ解析

- 取得した連続画像を、1粒子追跡ソフトウェアで読み込み、S/N比の良さそうな輝点を選んで、動態追跡を行う(図2)。グループ全体で1秒間以上の輝点追跡データを数百個集める。
- 解析結果のデータを出力し、平均2乗変位から拡散係数を求める(図3)。
- 同時に、各輝点の蛍光強度を求める。

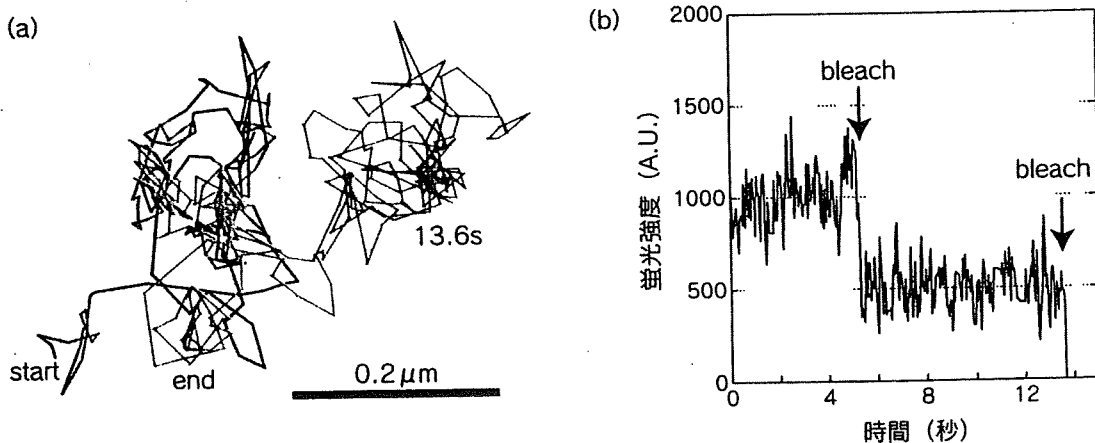


図2 運動軌跡(a)と蛍光強度変化(b)の例

1段階目の退色の前後の軌跡をそれぞれグレー、青で示している。A.U.:任意の単位。

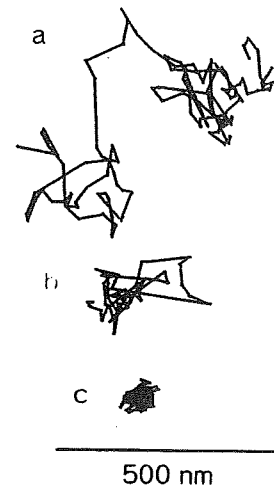
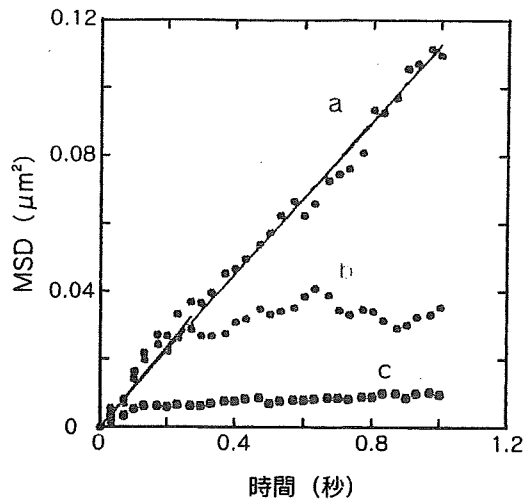


図3 平均2乗変位の時間発展(左)と運動軌跡(右)

GFPを融合したEGF受容体の例。EGFは結合していない。短時間領域(30~170ミリ秒)と長時間領域(170~670ミリ秒)の見かけの1分子拡散係数から、個々の粒子の運動をa~cの3つに分類し、各々40~50粒子の平均2乗変位(MSD:この場合は多数粒子平均)をプロットしたのが左図。右図はa~cに分類された粒子の運動軌跡の例。

考察のポイント

- 全反射画像と、レーザー光が光軸上にあるときの落射蛍光画像、その中間にある斜光照明画像を比較する。
- どこが全反射の臨界角かわかるか。
- 1分子運動軌跡には、どのような特徴があるか。運動軌跡をいくつかのパターンに分類することができるか。各々のパターンで平均2乗変位の時間発展はどのようになっているか。
- 蛍光強度変化から、光退色の様子を観察せよ。退色から会合体数を求めることができるか。退色するまでの時間分布はどうなっているか。(EGFと受容体の解離は 10^4 秒程度と遅いので、輝点の消失がEGFの解離で起こる可能性はほとんどない。しかし、受容体のエンドサイトーシスは分のオーダーで起こるので、細胞内への取り込みによる焦点面からの輝点の消失は見える可能性がある。退色と取り込みを区別できるだろうか。)
- 輝点の蛍光強度は、ローダミンEGFの数に比例し、EGF受容体の会合数に関係しているが、1分子蛍光強度のゆらぎは大きいので、個々の輝点の会合数を求めるのはむずかしい。しかし、多数粒子の蛍光強度分布として、EGF数の分布を求めることはできる。蛍光強度と拡散係数や運動パターンとの間に相関があるか。

[日比野佳代・佐甲靖志]

実習9-2 分光光度計でのスペクトル測定と1分子 FRET

目的

分光光度計によるスペクトル測定を用いた FRET 観察法と1分子 FRET 観察法を学ぶ。

実習内容

蛍光色素間のフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) により色素間の微細な距離変化を可視化することができる。一方の蛍光色素 (ドナー) を励起したときに、もう一方の蛍光色素 (アクセプター) が近傍に存在すると、無輻射的にエネルギーがドナーからアクセプターに移動し、アクセプターから蛍光が發せられる。このときのエネルギー移動効率は、ドナー-アクセプター間の距離の6乗に反比例し、かつ蛍光色素の双極子モーメントの配向に依存するため、色素間のわずかな距離の変化を検出することができる。しかし通常の計測では、非常に多くの色素の蛍光を十把一からげに観測するため、個々にふるまう分子の集合体としての平均値しか測定できない。FRET を1分子観察することにより、分子の複雑なふるまいを動的にかつ詳細に可視化するのが本手法のねらいである。

関連の講義

- 第13章 FRETの基礎
- 第14章 FRETの測定法と評価
- 第22章 全反射顕微鏡と1分子計測

背景

本実習では、両端にドナーとアクセプターを共有結合させたテロメア DNA を用いる。テロメア DNA は TTAGGG のくり返し配列であるが、陽イオン存在下で G-quadruplex とよばれる4本鎖構造をとる。陽イオンの添加によるテロメア DNA の高次構造変化を DNA 両端につないだ蛍光色素間の FRET 効率の変化として捉え、分子動態の観察を行う。

材料

Potassium Sensing Oligonucleotide
(Alexa 488-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-TAMRA)

機材

蛍光分光光度計：日立 F-2500
顕微鏡：TE2000E + パーフェクトフォーカスシステム + 全反射照明系 (いずれも Nikon)
分光光学系：W-VIEW システム (浜松ホトニクス)
カメラ：Cascade II EM-CCD (日本ローパー)
画像取得・解析ソフト：MetaMorph (日本モレキュラーデバイス)



① バルクでの FRET 計測

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に終濃度が 0~100 mM の NaCl と 0.1 μ M の Alexa 488-PSO-TAMRA が溶解したサンプルを用意する。
- サンプルを石英キュベットに移し、蛍光分光光度計にセットする。
- 励起光を 470 nm に設定し、500~650 nm の蛍光スペクトルをそれぞれのサンプルについて計測する (図 4)。
- 得られたスペクトルから FRET 効率を求め、重なり積分とフェルスター距離から蛍光色素間の距離を求める。
- <オプション>それぞれのサンプルに UV を照射し、FRET 効率の変化を肉眼で観察する (図 4)。

② 1 分子 FRET 計測

- アルカリ洗剤とメタノールで洗浄したカバーガラスを全反射顕微鏡にセットする。
- ガラス表面の蛍光性のゴミを手がかりに、ガラス表面にピントを合わせる。
- 励起光源 (488 nm) の ND フィルターをすべて外し、ガラス表面に付着している蛍光性のゴミを退色させる。
- Nikon パーフェクトフォーカスを作動させ、バーストモードによる取り込みを開始する。
- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解させた Alexa 488-PSO-TAMRA (ピコモル程度) 10 μ l をカバーガラス表面に静かにのせる。
- 観察を開始し、5 秒ほど経過してから 600 mM の NaCl を 2 μ l 添加する。
- W-View システムで、ドナーとアクセプターの蛍光量を同時に取得し、FRET の起こっている輝点を抽出する。
- 画像解析を行い、蛍光強度の変化を測定する (図 5)。



- 1 分子 FRET 観察とバルク FRET 観察で得られたデータのそれぞれの本質を考察する。
- データから計算される蛍光色素間の距離にはどれほどの妥当性があるか考察する。
- 蛍光スペクトルの等発光点とは何か? カチオン濃度を変化させたときに生じた等発光点は何を意味するのか?
- ガラス表面上で 1 分子 FRET 観察を行う際の問題点を考察する。

[小寺一平・谷 知己・永井健治]

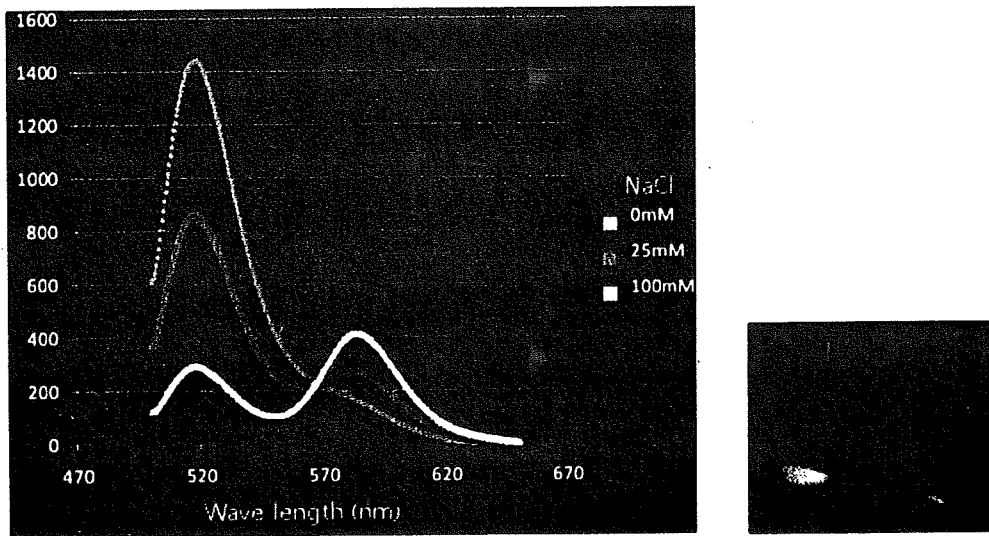


図4 バルク FRET 計測の結果

(左) バルク FRET 計測による蛍光スペクトル. カチオン濃度の上昇に伴い FRET 効率が上昇する様子がわかる. また 570 nm 付近に等発光点が存在する.

(右) 0 mM と 100 mM の NaCl が含まれたサンプルに UV を照射すると FRET 効率の変化が肉眼で観察できた.

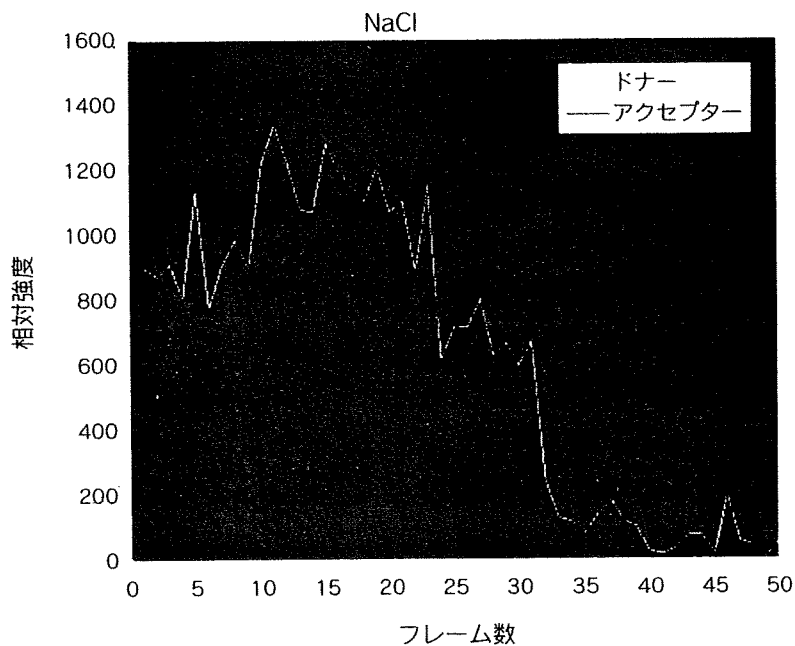


図5 1分子 FRET 観察の結果

NaCl 添加後にドナーの蛍光は減少し, アクセプターの蛍光は増加している. その後, 同時刻にドナーとアクセプターの蛍光が消失する. 1分子 FRET の観察から, ドナーとアクセプターの強度が同時期に対照的に変化する輝点が得られた.

実験がうまくいく

蛍光・ 発光試薬の 選び方と使い方

編集：三輪佳宏

成功の秘訣は
試薬選びにあり!

羊土社

4章 細胞・酵素活性測定のためのプローブ

② アポトーシスの検出

—生きた細胞・個体におけるカスパーゼ活性の
ライブ検出

竹本 研, 永井健治, 宮脇敦史, 三浦正幸

Kiwamu Takemoto, Takeharu Nagai, Atsushi Miyawaki, Masayuki Miura

はじめに

細胞死は生体を構成する細胞の数の調節, あるいは組織の形態形成において非常に重要なイベントの1つである。線虫の遺伝学的解析から細胞死実行因子ced-3, ced-4の発見により, 細胞死は実行遺伝子により巧妙に計画されていることが明らかになった(プログラム細胞死)。これまでに, ced-3とヒトインターロイキン1 β 変換酵素(ICE: IL-1 β converting enzyme)とのホモロジーをもとに, 哺乳類から14種類, ショウジョウバエでは7種類のカスパーゼファミリープロテアーゼが報告されている。

カスパーゼは細胞死が実行される際に活性化されるシステインプロテアーゼであり, 基質内の特定のアスパラギン酸残基のC末端側で切断するユニークな活性をもつ。カスパーゼが細胞内のさまざまな基質を切断することにより, 細胞死を実行するものと

考えられている。一般的に“アポトーシス”と呼ばれる細胞死形態をとる場合は, このカスパーゼに依存する細胞死実行経路が関与しているとされ, 実際にカスパーゼの特異的阻害剤で多様な細胞死が効率よく抑制される。本項では, 培養細胞あるいは個体レベルでのアポトーシス細胞の検出法・カスパーゼ活性の検出法に関して解説したい。

アポトーシスに伴う形態的变化を検出する手法

1. 核・染色体DNAの断片化検出

アポトーシス細胞で認められる典型的な形態的变化として, 核の断片化・染色体DNAの断片化・細胞膜の構造変化があげられる。こうした細胞の形態変化を検出することで, 培養細胞から個体レベルで起こる細胞死の検出が可能である(表)。ヘキスト

表◆細胞死誘導時の細胞・染色体の形態変化を検出する主な手法

染色手法	細胞死検出の原理	発売元メーカー(販売元)
Hoechst染色	染色体DNAに結合し, 各構造の断片化・凝集を観察する	Molecular Probes社など
TUNEL染色	DNAの断片化により生じたDNA3'-OH末端に, TdTを用いて, 標識dUTPをニックエンドラベルする	CHEMICON(フナコシ)社など
Annexin V染色	細胞死誘導時に起こるPSの細胞表面への露出を標識済みのPS結合タンパク質Annexin Vで検出する	バックマン・コールター社など

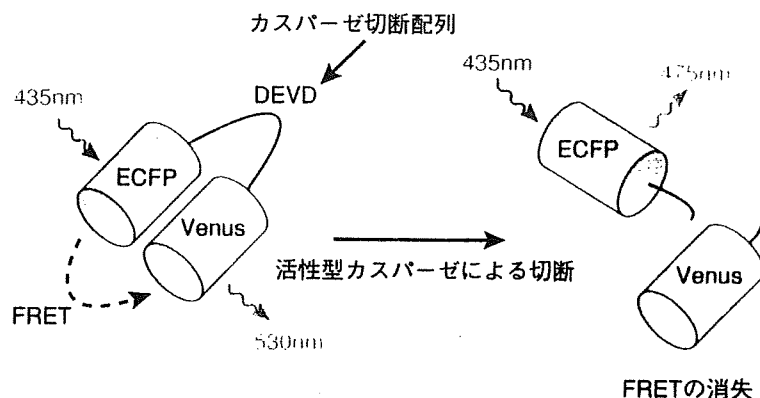


図1 ◆遺伝子にコードされたカスパーゼ3指示薬“SCAT3”

(Hoechst33342) 染色は細胞に容易に透過するDNA結合性の試薬であり、可視化した核構造を観察し、断片化や凝集しているものを死細胞と判定する。それに対して、TUNEL [terminal deoxynucleotidil transferase (TdT) -mediated dUTP nick end labeling] 染色はアポトーシス細胞で認められる染色体DNAの断片化を標識することで、死細胞を検出する。断片化したもののみ染色されるため、死細胞のカウントやパターンを検出するのに適していると考えられる。

2. ホスファチジルセリンの検出

また、細胞死の初期段階においては、細胞膜の内側に局在する陰性荷電リン脂質のホスファチジルセリン (PS: phosphatidyl serine) が細胞表面に露出する。Ca²⁺依存性のリン脂質結合タンパク質であるAnnexin VはPSに選択的に結合するため、蛍光ラベルしたAnnexin Vを用いて細胞死の検出が可能である。Annexin染色は操作が比較的簡便であり、フローサイトメトリーを用いた解析でも広く用いられている。以上の試薬は簡便ですでに広く使われており、細胞死研究になくてはならない手法として確立されている。

それでは個体レベルの細胞死のすべてを上記の方法で検出できるかといえば、それは困難と言わざるを得ない。個体内では、死細胞はマクロファージなどの貪食細胞ですみやかに除去されることが知られているからである。したがって個体における細胞死

のパターンを知るためには、生きたままリアルタイムに検出する方法が求められる。しかしながら、従来の方法では、生きたまま長時間死細胞を検出することは非常に困難であった。

□ FRET を利用した観察

1. cDNAにコードされたカスパーゼ指示薬

生体内で生きたまま分子の機能を解析するための強力な手段として蛍光タンパク質を用いたFRET (フェルスター共鳴エネルギー移動) を利用する方法が注目されている。FRETを利用することで時間的分子の解析ができ、これまでさまざまな分子に対する指示薬が開発されてきた。FRETの原理に関しては第II部4章-⑤を参照していただきたい。活性型カスパーゼ3に対する指示薬 (SCAT3) はFRETのドナーにECFPを、アクセプターにVenusを用い、両分子間にカスパーゼ3の至適切断配列 (DEVD) を含むリンカー配列が挿入されている (図1)。カスパーゼ3により切断される前 (左側) はドナー (ECFP) からアクセプター (Venus) へFRETが起こる (図1左) が、切断後 (図1右) にはFRETが消失する。本指示薬はcDNAにコードされているため、適当な方法を用いて個体内の特異的な細胞や組織に発現させ、リアルタイムにカスパーゼ活性や細胞死を検出することが可能になった^{1)~4)}。

2. YFPを用いる際の注意点

ところで、生きた細胞内でのカスパーゼ活性化の

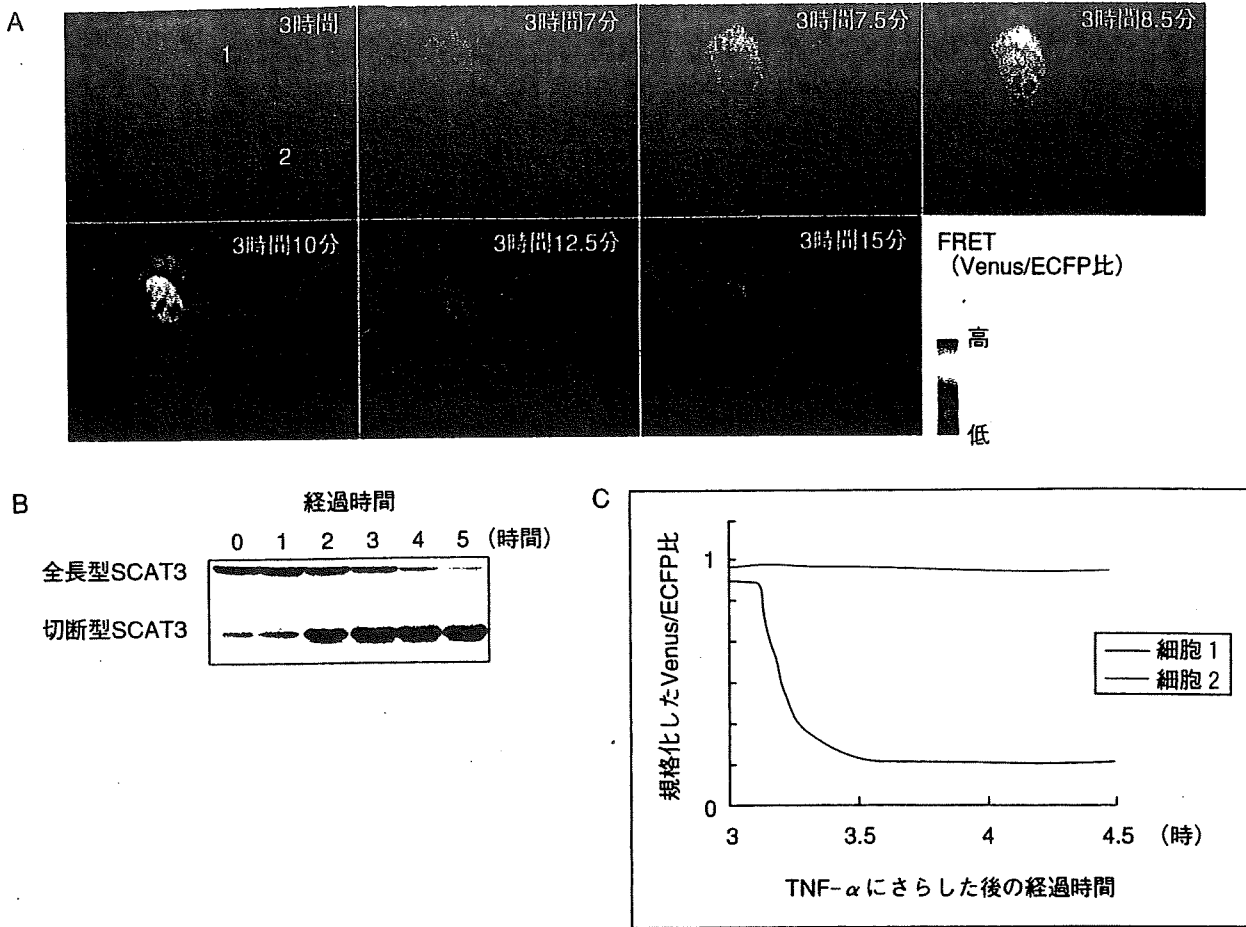


図2◆SCAT3を用いた生細胞でのライブイメージング

定量的検出を行うには、従来用いられてきた ECFP-EYFP ペアでは不十分であると考えられる。というのも、アクセプター EYFP のモル吸光度はプロトンやクロライドイオンに対し、感受性が非常に高いためである。アクセプターのモル吸光度は FRET の重要な因子であり、こうした因子の変動に由来する、つまりカスパーゼ以外の偽シグナルを受ける可能性が示唆される。アポトーシス実行過程では、細胞質やミトコンドリアにおける pH の変動が報告されている。また神経系の細胞では活動依存的にプロトン濃度の変動が報告されている。さらには EYFP 発現マウスを用いて、こうした因子の変動が観察されることも報告されている。以上のことから、特に生きた細胞内で FRET 観察をする際、YFP をアクセプターに用いるのは慎重を期すべきであろう。生理的な濃度の変動範囲内では Venus の蛍光強度は両イオンにほとんど影響を受けなため、FRET アク

セプターとしては EYFP よりも Venus の方が優れている。

SCAT3 を用いた生きた細胞におけるカスパーゼ活性化のライブイメージングの実験例

SCAT3 は遺伝子にコードされた機能指示薬であることから、化学合成プローブでは困難なオルガネラなどの細胞の局所に発現させることが容易であり、細胞の局所的なカスパーゼ活性を詳細に解析できる。また、組織特異的プロモーターを用いてプローブを見たい細胞のみに発現させることが可能であり、個体レベルでのイメージングに適していると言える。図 2-A はヒト HeLa 細胞に SCAT3 を発現させ、細胞死誘導因子 TNF- α を添加した際の、カスパーゼ活性化のライブイメージングを示している。一般的には FRET (ここでは Venus/ECFP 蛍光強度比で換



- ライブイメージングでなくとも、固定標本でもSCAT3を用いたカスパーゼ活性化検出は可能である。通常カバーガラス上に培養した細胞を4%ホルマリン/PBSで固定し、市販のマウント剤を用いてスライドガラス上に固定標本を作製することで観察できる。ところがこうしたマウント剤で長時間（おおよそ1日以上）保存すると、標本作製直後と比較してVenus/ECFP 蛍光強度比が低下してしまうことがある。つまり本来カスパーゼ活性化が起こっていない細胞で、あたかもカスパーゼ活性が高いように観察されうる。
- すべての市販のマウント剤を試したわけではないが、少なくともマウント剤をPBSに変えると、この問題はほとんど起こらなくなる。おそらくマウント剤の成分のうち、CFPと比較してYFPの蛍光特性にいくらかのダメージを与える物質があると予想される。いずれにせよプローブを観察する環境は、アクセプターもドナーもその蛍光特性に変化がないことが定量的観察の前提である。これは前述のYFPのイオン感受性の問題にも通ずるところがある。同じ蛍光タンパク質といえども発色団構造の違いからその特性は全く異なるものになるため、2種類の蛍光タンパク質を使うFRETにおいては、その特性を十分に理解して使用することが特に必要である。

算)の変動を示す際、図のような擬似カラー表示をし、空間的な情報の解析を行う。

このように、SCAT3を用いることで細胞や核が形態変化を見せる前に、カスパーゼ活性化を検出することができる。すなわち「プレ死細胞」を検出できるといえる。カスパーゼの活性化は細胞質で起こり、核へと伝播することが明らかになった。また、カスパーゼの活性化は多くの細胞をすり潰すことにより行う生化学的な解析（例えば、抗活性型カスパーゼ抗体によるウエスタンブロット）からは、徐々に活性化が進行していくと考えられていた（図2-B）が、1細胞レベルのイメージングによる解析からは、活性化がはじまる時刻が個々の細胞ごとに異なり、かつ“all or none”のパターンで活性化することが明らかになった（図2-C）。このように、ライブイメージングでは従来の手法でわからなかった個々の細胞の個性・ダイナミクスを解析することができる。

おわりに

本項ではアポトーシスを検出する主な手法を解説した。いずれの手法にも利点と欠点があり、それぞれの原理と利点をよく理解して使用することが大切である。顕微鏡下におけるFRETの検出・ライブイメージングの実際のプロトコールは他書⁵⁾を参照していただきたい。

参考文献

- 1) Takemoto, K. et al.: J. Cell Biol., 160: 235-243, 2004
- 2) Kanuka, H. et al.: EMBO J., 24: 3793-3806, 2005
- 3) Kuranaga, E. et al.: Cell, 126: 583-596, 2006
- 4) Takemoto, K. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 104: 13367-13372, 2007
- 5) 永井健治, 宮脇敦史: 『分子生物学実験シリーズ 図・写真で観るタンパク構造機能解析実験実践ガイド』(月原富武, 新延道夫/編), pp. 173-182, メディカルドゥ, 2005

スパイはひとりで充分 蛍光タンパク質を用いた蛍光1分子イメージング

生きた細胞内におけるタンパク質の所在やその振る舞い、機能に伴う分子同士の会合を観察するために、蛍光タンパク質は広く用いられている。タンパク質の挙動のみならず、細胞内におけるイオン濃度などをモニターする目的においても、蛍光タンパク質の活躍はめざましい。このような細胞内イメージングのために、われわれは本来生体内には存在しないタンパク質を発現させている。正常な細胞機能を観察するためには、その発現量は少ないほどよい。スパイはふつうごく少人数で敵国に潜入し、得られた情報を本国に報告するものだ。そこで、生体内に送り込んだ少数のスパイ蛍光タンパク質を観察する。蛍光1分子イメージング技術の必要性が生まれてくる。明るさや光安定性の点から、これまで蛍光1分子イメージングにはCy3やロータミンなどが好まれて用いられてきた。しかしながら近年の光学顕微鏡およびその周辺機器の進歩、特に撮像素子の感度やシグナル/ノイズ比の向上により、蛍光タンパク質を用いた蛍光1分子イメージングは標準的な実験技術になろうとしている。

1分子イメージングで観察可能な分子の濃度の上限はせいぜい数nMである。いわゆる“漏れ”の少ないInducible promoter (例えばNEB (New England Biolabs社)のRheoSwitch®システムなど)を用いることにより、発現量を十分に抑えることが必要であろう。比較的弱い蛍光シグナルを検出するために、カバーガラスの洗浄、蛍光の少ない油浸オイルや培養液の選択、細胞がもつ自家蛍光の波長帯域からはずれた蛍光タンパク質の選択なども考慮する必要がある。われわれの経験では、蛍光1分子観察に十分な光安定性をもつ蛍光タンパク質(モノマー)として、EGFPやmCherryがあげられるが、今後これらを凌ぐ光安定性を持ち、明るい蛍光タンパク質が出現することは間違いないだろう(谷 知己, 永井健治)