

蛍光バイオイメージングで 細胞内現象を可視化する

脳科学総合研究センター
先端技術開発グループ 細胞機能探索技術開発チーム
チームリーダー 宮脇敦史

「生物学の分野では、いくつもの現象をめぐって論争が繰り広げられています。未解決の難題も多いのです。いろいろな実験や観察をしても決定的な答えが得られない。これは、生きた細胞の中で起きている現象を可視化する技術が不足しているために、もう一步踏み込めないからです。動かぬ証拠をダイレクトにつかみたい。しかし見えない。みんな、いら立たしさを感じています」と宮脇敦史チームリーダーは語る。細胞機能探索技術開発チームでは、蛍光タンパク質を道具として、1個1個の生きた細胞の中で起こるさまざまな現象を、生きたままリアルタイムで、時間的・空間的に可視化する技術を開発している。「論争や難題を包括的に解明できるようなアプローチをしていきたい」と宮脇チームリーダーは語る。生物学の難題に挑む蛍光バイオイメージングの最前線を紹介します。

“分子スパイ” GFP

「蛍光タンパク質は“分子スパイ”と呼べるかもしれません」と宮脇チームリーダーは言う。「私たちは、分子スパイを生きた細胞に潜入させ、送られてくる信号を読み取って画像化することで、細胞内で起きているさまざまな現象を探ろうとしています。相手は1個1個の生きた細胞です。細胞と語り合いながら、時間的・空間的な変化を見なければいけません」

蛍光タンパク質の代名詞ともなっているのが、GFP (Green Fluorescent Protein) である。1962年、下村脩博士らによって、オワンクラゲ *Aequorea victoria* の発光器官から発見された。蛍光とは、特定の波長の光を吸収して、より波長の長い光を発する現象である。GFPは、紫外線(波長395nm)を

吸収し、緑色の光(波長508nm)を発する。

「GFPの遺伝子配列が1992年に明らかにされ、GFPを用いた蛍光バイオイメージングが一気に普及したのです」

蛍光バイオイメージングとは、観察したい分子に蛍光標識を付けることによって、分子の分布や動きを可視化する技術である。以前は、蛍光標識として有機化合物が使われていた。有機化合物で標識するには、まず観察したいタンパク質を精製し、有機化合物の蛍光色素を付け、細胞に穴を開けてガラスピペットで注入しなければならない。細胞にダメージを与え、蛍光標識を導入できるのは組織の表面に限られてしまうのが問題だった。

現在は、観察したいタンパク質の遺伝子にGFPの遺伝子を導入することで、蛍光を発する融合タンパク質を自由自在に細胞内で作り出すことができる。しかし、宮脇チームリーダーは言う。「GFPは、今では誰もが使っていますが、タンパク質の分布や動きが見えるだけで満足してはいけません。その上を目指さなくては」

より早く明るく光るGFP

GFPは、238個のアミノ酸からなるタンパク質だ。GFPの結晶構造が明らかになったのは1996年である。 β -カンと呼ばれる樽のような構造の中に、らせん構造をした1本の α -ヘリックスがある。 α -ヘリックスの上に、短波長の光を吸収して長波長の光を発する、発色団が形成される(図①)。

「細胞の中でGFPが100個作られたら100個すべて光ると思うかもしれませんが、実は、光るのはわずか。発色団の形成効率はとても低いのです」と宮脇チームリーダーはGFPの問題点を指摘する。タンパク質は、



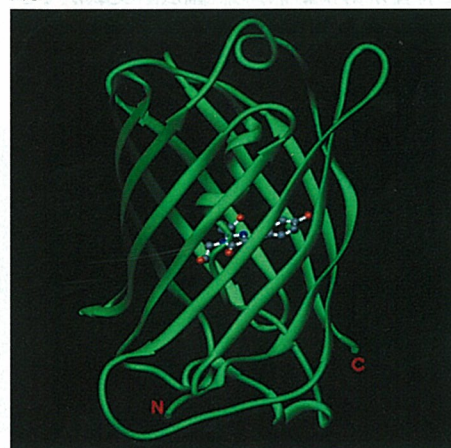
宮脇チームリーダー

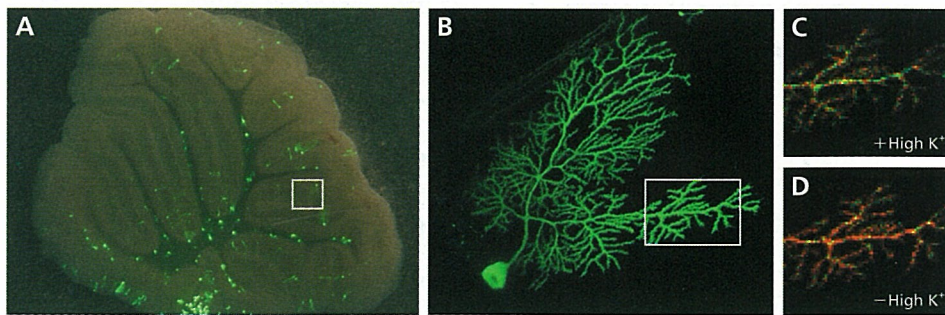
遺伝子の情報から作られたアミノ酸の鎖が3次的に折り畳まれることで、特定の機能を発揮する。GFPも例外ではなく、うまく折り畳まれることで発色団が形成される。ところが、GFPと観察したいタンパク質を融合させてあるため、ストレスがかかって折り畳みがうまく起こらないことが多いのだ。

「われわれのラボで、永井健治研究員が中心になってpericamというカルシウム濃度の変化を観測できる指示薬を作っていたとき、蛍光タンパク質にある変異が起きたのです。すると、飛躍的に折り畳みがうまく起きようになり、発光団の形成効率が高い蛍光タンパク質ができた。それをきっかけに、蛍光タンパク質の発色団形成効率の重要性を具体的に説くことができるようになりました」

宮脇チームリーダーらは、GFPを改変して世界で最も明るい蛍光タンパク質Venusを作製した。Venusは従来のGFPと比べて大腸菌内で30~100倍、ほ乳類の細胞内で3~100倍の明るさで光る。これまでは明るくするために大量のGFPを細胞に導入していた。しかし、大量のGFPは細胞にとっては毒となり、本来の現象が阻害されてしまう。明るいVenusを使えば少ない量でも観測が可能なので、本来の現象を観測で

図①





図①: GFPの結晶構造。

11本のβ鎖からなるβ-カン構造の中にあるα-ヘリックスの上に発色団が形成される。

図②: マウス小脳中のプルキンエ細胞における、Venusを導入したcameleonによるカルシウムイメージング。Aはマウス小脳スライス。蛍光像と暗視野像を重ね合わせた。Bはプルキンエ細胞の共焦点蛍光画像。高濃度カリウムに浸すと、膜電位の脱分極が起こり、カルシウムが細胞内に流入する。Cが脱分極前、Dは脱分極後。赤いほどカルシウム濃度が高くなったことを示す。Aの白四角の拡大がB、Bの白四角の拡大がC、Dである。

図③: カルシウム指示薬cameleonの仕組み。

cameleonはCFP (ドナー)、カルモデュリン (CaM)、M13、YFP (アクセプター) から構成される。カルシウム (Ca²⁺) が来るとCaMとM13が複合体を作ることにより、CFPとYFPが近くなってFRETの量が增大する (470nmの蛍光に対して535nmの蛍光の強度が増える)。

きる。しかも、ほ乳類の細胞を培養するのに最適な37℃で効果が高い。

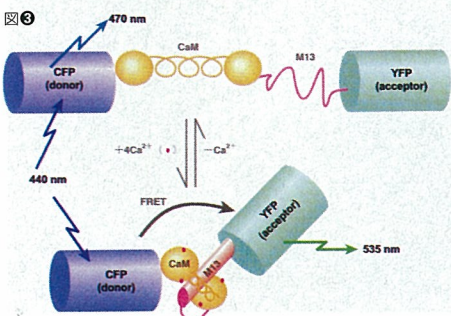
さらに、タンパク質が作られてから蛍光を発するまでの時間が、従来の半日ないし1日程度から、数時間に短縮された。これによって試料が新鮮なうちに観察することができるようになった(図②)。

新規蛍光タンパク質を探す

細胞が外界からの刺激を受けると、いくつもの分子を経由して情報が細胞内部に伝達され、分化や移動、分裂などが起きる。「細胞内のさまざまな現象を包括的に理解するためには、1つの分子だけを見てはだめです」と宮脇チームリーダーは指摘する。情報伝達経路は一方通行ではなく、下流から上流へのフィードバックもある。別な情報伝達経路と相互作用していることもある。しかし、複数の分子を同時に観測するためには、分子を標識する蛍光タンパク質のバリエーションも必要だ。

「蛍光タンパク質を持っているのは、オワンクラゲだけではありません。他のいろいろな刺胞動物も蛍光タンパク質を持っています。それぞれの蛍光タンパク質は、違った特性がありますから、幅広い実験ができます。私たちもサンゴなどで新規の蛍光タンパク質を探しています」

すでにオワンクラゲ以外に、ウミシイタケ



やイソギンチャク、スナギンチャク、ハナヅタ由来の蛍光タンパク質が使われている。特に、赤色の蛍光を発する蛍光タンパク質が注目されている。オワンクラゲ由来のGFPのアミノ酸を置換することで、青色のBFP、シアン色のCFP、黄色のYFPが作られてきたが、赤色の蛍光を発するものができていなかったからだ。色つまり波長の違う蛍光タンパク質を複数使うことで、多角的な観察が可能になる。

FRETでタンパク質の相互作用を見る

「ゲノムの全容が明らかになり、多くの研究者がタンパク質とタンパク質の相互作用に興味を持ちつつあります。そうしたタンパク質の動態をリアルタイムで見るために活躍するのがFRETです」

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) とは、異なる色の2種類の蛍光タンパク質の間で励起エネルギーが移動する現象である。まず、短波長で励起するドナー (エネルギー供与体) と長波長で励起するアクセプター (エネルギー受容体) のペアを作る。ドナーの蛍光分子を特定の波長の光で励起させると、ドナーは蛍光を発する。ところが、近くにアクセプターがあると、ドナーの励起エネルギーがアクセプターに奪われてしまい、ドナーは光ることができない。代わりにアクセプターが光る。このエネルギー移動の量は、ドナーとアクセプターの距離や向きによる。

宮脇チームリーダーらは、FRETを使ったカルシウム指示薬cameleonを開発した。cameleonは、シアン色蛍光タンパク質 (CFP) を付けたカルモデュリンというタンパク質と、黄色色蛍光タンパク質 (YFP) を付けた

M13ペプチドをつなげてある。カルシウムイオンが近づくと、カルモデュリンがM13をくわえ込むように構造が変化する。すると、ドナーであるCFPとアクセプターであるYFPの距離が近づき、FRETが起きてYFPの蛍光が増大するという仕組みだ(図③)。cameleonを使えば、カルシウムの濃度変化を生きた細胞で時間的・空間的に可視化することができる(図④、図⑤)。

「FRETによる蛍光強度の変化を観測することで、分子間の距離、相対的な向きが分かります。距離は10nmのレベルで分かる。タンパク質とタンパク質の相互作用や、タンパク質の構造変化を生きた細胞でリアルタイムに見ることができるのです」

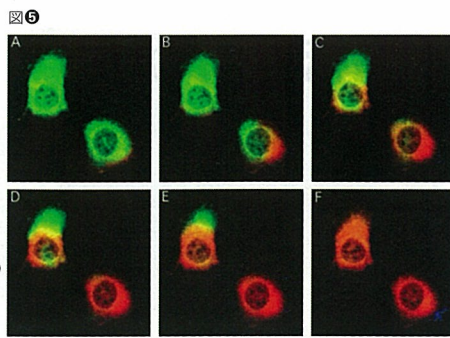
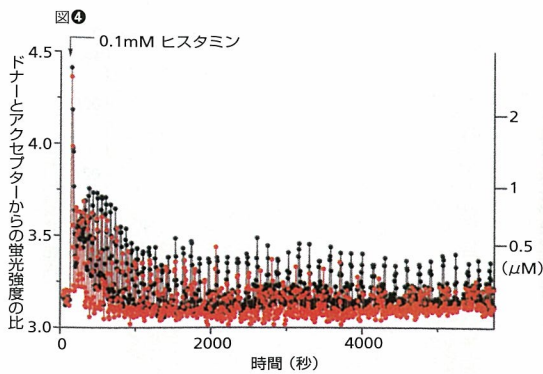
物理現象としてFRETの理論が出たのは19世紀中ごろである。「私は大学3年生のとき、FRETに興味を持ち始めました。しかし当時、生物の研究者でFRETに興味を持っている人はほとんどいませんでした。今では多くの研究者がFRETに興味を持つようになってきました。しかし、FRETにはいろいろな落とし穴があって難しい。まだ誰もが使えない段階ではありません」

2光子励起で脳をより深く見る

「脳の中で起きていることを知りたい。そのためには、“より深く”というのが今後のキーワードです。今までは脳の表面しか見えなかったのです」

有機化合物の蛍光色素では組織の表面しか標識できなかったが、蛍光タンパク質を遺伝子工学的に導入することで脳の奥深くでも蛍光標識ができるようになった。しかし、励起させる光が奥まで届かない。そこで期待されるのが、2光子励起である。

普通は、蛍光分子に1つの光子が飛び込



図④: cameleonを用いて観察された、HeLa細胞の細胞質におけるカルシウムイオン濃度の時間的変化。ヒスタミンの刺激によってカルシウム振動が起きている。
 図⑤: cameleonを用いて観察された、HeLa細胞の細胞質におけるカルシウムイオン濃度の空間的変化。
 図⑥: COS細胞において見られたRasタンパク質活性化の局在化。左図における細胞の右側(紫色で網をかけた部分)にEGFを投与すると、その部分に限局してRasの活性化が起きた(右図の赤色の部分)。COS細胞はサルの腎臓由来の上皮系細胞。
 図⑦: EGF受容体を過剰に発現させたCOS細胞において見られたRasタンパク質活性化の伝播。左図における細胞の右側(紫色で網をかけた部分)にEGFを投与すると、速やかにRasの活性化が細胞全体に広がった(右図の赤色の部分)。

監修: 脳科学総合研究センター
 先端技術開発グループ 細胞機能探索技術開発チーム
 チームリーダー 宮脇敦史

むことで励起される。例えば400nmの波長の光で励起される蛍光分子は、800nmの波長の光では励起されない。波長と光のエネルギーは反比例し、波長が長くなるほど光のエネルギーは低くなるからだ。ところが、800nmの波長の光子が2つほとんど同時に飛び込めば、その蛍光分子は励起される。これが2光子励起だ。波長の長い光は、散乱が少ないため奥深くまで届く。2光子励起を使うことによって、脳のより深い場所での活動を可視化できるのである。

「1光子励起は日常的に起きていますが、2光子励起は強い日差しの下にある蛍光分子にとって1000万年に1度起きるかどうか。2光子励起が可能になったのは、レーザー技術の進歩によります」。レーザーで光子の密度を上げて、蛍光分子に当てるのだが、普通のレーザーでは細胞が死んでしまう。「一瞬だけ光を当てるパルスレーザーが登場したおかげで、2光子励起が生物学的な研究に使えるようになりました」

● 局所刺激による情報伝達メカニズム

「生物学にはいくつかの論争や難題があります。外界からの刺激が細胞の中でどのように伝わるのか。これも生物学における難題の1つです」

細胞内の情報伝達経路については、上皮増殖因子(EGF)でよく調べられている。EGFが細胞表面のEGF受容体に結合すると、チロシンのリン酸化が起こり、その情報がRasタンパク質などさまざまな分子を介して核に伝えられ、細胞増殖を促す。しかし、情報伝達が細胞の刺激部位にとどまるのか、細胞全体に広がるのか。それが分かっていない。

細胞機能探索技術開発チームではまず、細胞の局所だけをEGFで刺激するために、流体力学を応用した新しい技術を開発した。細胞内の情報伝達の観察には、チロシンのリン酸化と、情報伝達にかかわるRasタンパク質の活性化を可視化する2種類の蛍光指示薬を使った。

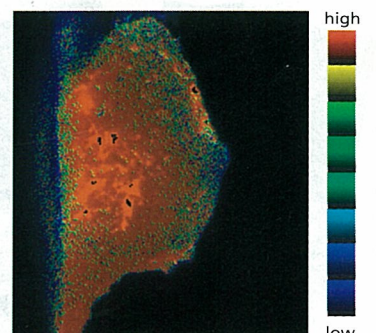
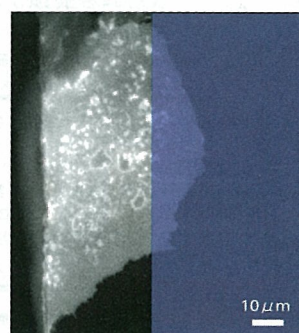
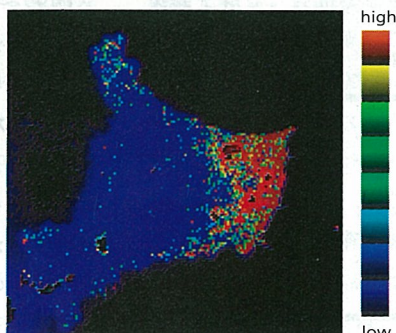
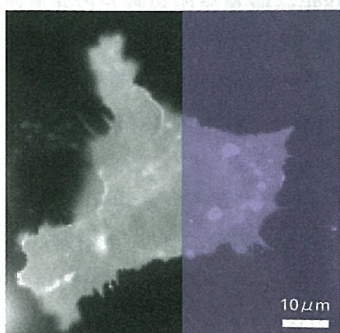
実験の結果、普通の細胞では局所刺激による情報伝達は、刺激された部分にとどまる(図⑥)。一方、EGF受容体を過剰に発現させると、情報伝達は細胞全体に広がることが分かった(図⑦)。

「情報伝達が局所にとどまるのは、非常に重要なことかもしれません。発生における形態形成では、情報伝達が局所にとどまるからこそ、方向感覚を保ったまま分化、増殖できるのです。この問題は細胞のがん化とも密接にかかわっています。悪性のがん細胞では、刺激を加えると情報伝達が局所にとどまらずに一気に広がってしまう。細胞膜にあ

るEGF受容体の数を調整することで、情報伝達を局所にとどめ、がん細胞の増殖を抑えることが可能になるかもしれません」と宮脇チームリーダーは解説する。「細胞の情報伝達の時空間パターンについては、絶対突っ込んでみたいという欲望がありました。そこで局所刺激の技術の開発を真剣に考えました。この研究は、whatをhowに優先させた例です。逆に技術開発をしたらこんなものができて、それを使ったらこんなことが分かってしまった、というケースもあります。それも面白い展開です。真理の探求と技術開発の両方が必要なのです」

「蛍光バイオイメージングの研究の流れを見たとき、「時代の潮流」をととても感じます。GFPの登場は一つの革命でした。私自身も次の革命を企てています」。宮脇チームリーダーは「自説ですが」と続ける。「例えば、2光子励起の理論が出たのが1931年。レーザーによってその現象が実証されたのが1961年。パルスレーザーの登場によって2光子励起が生物学的に使われるようになったのが1991年。もうお気付きですね。30年周期なんです。この周期をもっと短くしなければ、と思います。とても2021年まで待てませんからね」

21世紀初頭。細胞機能探索技術開発チームがどのような革命を起こすのか楽しみである。



図⑥

図⑦