分子デザインにより創生した光変換蛍光タンパク質を用いて
生きた細胞内の生体分子の動きを鮮明に可視化する技術を開発

北海道大学電子科学研究所と独立行政法人理化学研究所は、光刺激によって蛍光色を変化させせることができる新しい光変換蛍光タンパク質を開発し、生きた細胞内で特定の分子を光でマーキングし、その動きを高いコントラストで追跡する技術を開発しました。また、光変換蛍光タンパク質を用いて細胞内の生体分子の拡散係数※1を従来法よりも簡便に、精度良く測定するする方法も開発しました。

北大電子研ナノシステム生理学分野の永井健治教授、松田知己研究員と理化学研究所脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チームの宮脇敦史チームリーダーとの共同研究による成果です。

蛍光タンパク質を用いた生体分子の標識技術は発展を遂げ、今では紫外線などの光刺激によるスイッチングで蛍光色を変化させせることのできる光変換蛍光タンパク質が細胞や分子の「動き」を解析するために用いられるようになりました。従来の光変換蛍光タンパク質では蛍光波長の変化を観察するために、波長の違う２種類の励起光（蛍光タンパク質を光らせるために与える光）を用意する必要がありました。研究チームは、２つの蛍光タンパク質を繋げたキメラ蛍光タンパク質をデザインしてスイッチング前後の２色の蛍光（前：シアン色、後：緑色）を１種類の励起光で観察することのできる光変換蛍光タンパク質「**Phamret（ファムレット）**」を開発しました。１種類の励起光で観察できるため、特殊な光学系を使わずに、光変換によって生じた２種類の蛍光を同時に測定することが可能になり、動きの速い分子の映像化を可能にしました。また、光刺激によるダメージを受けやすい生物には観察のために与える光の量は１種類の励起光だけでよいため負担が少なくなります。さらに研究チームは、この Phamret の光変換を利用して、特定の領域で光変換を起こさせ、その領域の分子が領域の外に出て行くことによって生じる蛍光強度の減衰を数値解析することで分子拡散係数を求める方法「**FDAP（エフダップ）**」も開発しました。蛍光の褪色を利用して拡散係数を求める従来法などに比べ、動きの速い分子の拡散係数をより簡便かつ正確に求めることが可能となりました。

この技術を活用することにより、細胞内情報伝達メカニズム、細胞や個体の形態が形成される仕組み、がんの浸潤・転移メカニズムなどに関して新たな知見がもたらされることが期待されます。

今回の研究成果は、米国科学雑誌『Nature Methods』の電子版で 2008 年 3 月 16 日（米国東部時間）に公開されます。

１．背景

生細胞の中では分子は活発に動いており、細胞内の環境変化はその動きの変化とも密接な関係があると考えられており、細胞の分化・増殖や疾病での病態変化など生体内で大きな変化が起こるイベントでは物質の動きも大きく変化していると考えられます。そのような変化を蛍光タンパク質を用いて映像化するためには、蛍光ラベルした分子のうちの限られた細胞内領域の分子について蛍光色をさらに別の色に変換して、その変換した分子の蛍光色のパターンがどのように領域の外の変換前の分子の蛍光色と混じりあっていくか、あるいは細胞内の何処に蓄積していくのかを観察する方法が有効です。光変換蛍光タンパク質はそのような観察を行うことを目的として開発されました。

光変換蛍光タンパク質は光刺激によって刺激を受けた分子と受けていない分子の２色の蛍光を発する状態を作りだすことができますが、これまでの光変換蛍光タンパク質はそれぞれの蛍光を観察するために、別々の波長の光で励起する必要がありました。動きの速い分子のイメージングを行うためには、２色の蛍光を同時に観察する必要がありますが、２種類の励起光で同時に励起しながら２色の蛍光を同時に観察するためには特殊な光学系を用意しなければならない上に、２種類の励起光を全く同じ微小領域に集光させる技術的に困難な操作を含んでいます。この、従来の光変換蛍光タンパク質の欠点を補うものとして１種類の励起光で２色の蛍光を同時に観察することのできる光変換蛍光タンパク質が求められていました。

光変換蛍光タンパク質は生体分子動態の映像化のみならずタンパク質拡散の定量的な解析にも用いることができます。生体内では分子は活発に動いており、分子と分子が出会うことによって様々な機能が発揮されています。その分子の動きを詳細に知るためには、拡散係数を求めて定量的に比較する必要がありますが、これまでは遅い動きは「FRAP（光褪色後の蛍光回復）」法[※2]で行い、速い動きに関しては「FCS（蛍光相関分光）」法[※3]で行うというように２つの方法が使い分けられてきました。FRAP 法では限定された領域の蛍光タンパク質の蛍光発色団[※4]を強力な励起光を与えて破壊し、領域の外からの褪色を受けていない分子の流入による蛍光の回復を測定して数値解析から拡散係数を求めます。しかし、褪色を起こすのに比較的長い時間がかかるため、遅い動きしか観察できないという欠点がありました。光変換は褪色に比べて短い時間で起こすことができることから、FRAP 法の得意としていた動きの遅い分子の測定はもちろんのこと、今まで FCS 法でしか測定できなかったような動きの早い分子の解析も可能になると考えられてきましたが、そのような方法論は未だ開発されていませんでした。

２．研究手法と成果

研究チームはシアン色の CFP（Cyan Fluorescent Protein）と光刺激により暗い状態から緑色の蛍光を発するようになる PA-GFP（Photoactivatable-Green Fluorescent Protein）の２つの蛍光タンパク質を蛍光共鳴エネルギー移動[※5]の効率が最大になるように融合したキメラ蛍光タンパク質 Phamret をデザインし作製しました。キメラタンパク質中の PA-GFP を光刺激により活性化させる前は 458 nm の CFP に対する励起光を与えると CFP から直接シアン色の蛍光が発せられます（図１）。405 nm の刺激光で PA-GFP 部分を活性化してやると CFP の励起エネルギーが蛍光共鳴エネルギー移動によって PA-GFP の発色団に移動し、PA-GFP から緑色の蛍光が発せられます。従って、458 nm の１波長の励起光で光変換前のシアン色の蛍光と色変換後の緑色の両方の蛍光を観察することができます。

Phamret を HeLa 細胞[※6]内で発現させ共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて 458nm の励起光

によりシアン色と緑色の２つのチャンネルを観察しました。細胞に 405nm の刺激光を与えてやると、細胞内の Phamret 分子が光変換を起こしてシアンの蛍光強度が低下し緑色の蛍光強度が増大しました（図２）。さらに Phamret に細胞内局在化タンパク質やシグナルペプチドを付加した融合タンパク質を HeLa 細胞内で発現させ、局在化や光変換を示すかどうかを調べました。その結果、局在化と光変換のいずれもが確認されました。さらに、細胞内でエネルギーを作り出す小器官ミトコンドリアで Phamret を発現する細胞についてはミトコンドリアの融合を観察し、光変換した Phamret（緑）を持つミトコンドリアと光変換前の Phamret（シアン）を持つミトコンドリアの融合を Phamret の色が交じりあっていく様子として映像化することに成功しました（図３）。さらに研究グループは、細胞の DNA 情報が詰まっている核内に Phamret を発現する細胞についても、細胞分裂の際に核の半分の領域を特異的に光変換させたパターンが分裂後にも保存されることを映像化によって見いだしました。

また、光変換蛍光タンパク質を用いた新たな解析法として開発した FDAP 法により生体分子の拡散係数測定を行いました。光変換の過程は非常に速く起こるためこれまでに用いられていた光褪色を利用した FRAP 法での刺激時間の 1/100 以下である 0.25 ミリ秒という短い時間で刺激を行うことができます。その結果、刺激中の分子の拡散による影響が少なく従来法で信頼できる範囲とされていた 10μm^2/秒を超える溶液中での速い分子拡散について正確に拡散係数を求めることができるようになりました。また、生細胞内で発現する Phamret の細胞内での拡散について細胞周期の各段階で拡散係数を求めることで、細胞周期に応じて分子拡散係数が変化することを発見しました。

３．今後の期待

研究グループが開発した Phamret は、発生・分化の研究で注目する細胞を光刺激によって蛍光色を変化させ、それがどのように移動、増殖していくのかを細胞レベルで可視化することに使うことができます。また、細胞小器官やタンパク質の動きや蓄積を可視化することもできます。さらに、FDAP 法を用いることにより細胞内で起こるイベントに伴う細胞内での分子の動きの変化を拡散係数の変化として観測し、シグナル伝達のプロセスや疾病時の病態変化を新たな切り口から解析することができます。今後、両技術はタンパク質から細胞、個体までの様々な階層において様々な時間スケールで起こる生理現象の解明に貢献することが期待されます。

（問い合わせ先）
国立大学法人北海道大学
電子科学研究所　ナノシステム生理学研究分野
教授　永井　健治　（ながい　たけはる）
Tel : 011-706-3833 / Fax : 011-706-4968

電子科学研究所 事務室　藤井　幹彦　（ふじい　みきひこ）
Tel : 011-706-3195 / Fax : 011-706-4977

独立行政法人理化学研究所
脳科学総合研究センター　細胞機能探索技術開発チーム
チームリーダー　宮脇　敦史　（みやわき　あつし）

脳科学研究推進部　企画課
Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

補足説明

※１　拡散係数

1855 年フィックが提唱したフィックの第一法則と第二法則から得られる、物質の動きやすさを表す物理量で、「拡散方程式」の係数として表されるので、この呼び名になる。

※２　FRAP

特定の領域にある蛍光分子を、強力な光を照射することによって褪色させた後、領域外から拡散によって流入する蛍光分子によってもたらされる、同領域の蛍光強度回復を測定する方法。蛍光強度の回復速度から蛍光分子の拡散係数を算出することができる。

※３　FCS

フェムトリットル程度に絞り込んだ励起光の中を出入りする蛍光分子によって観測される蛍光の揺らぎから，蛍光分子あるいは蛍光ラベルされた物質の運動状態とその数を測定できる実験方法。分子の運動に伴って生じる蛍光強度の揺らぎ情報を元に拡散係数を算出するため、動きが緩慢な、或いは動かない蛍光分子は解析できない。

※４　発色団

分子内に存在し、紫外・可視領域の光を吸収する構造単位。一般に有機化合物中で不飽和結合を持つ原子団が発色団を形成する。蛍光タンパク質は自己触媒的にペプチド鎖を修飾し、分子内に発色団を形成することが知られている。

※５　蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）

FRET とは、エネルギー供与体である蛍光蛋白質の励起エネルギーがエネルギー受容体である別の蛍光蛋白質へ移動する現象のこと。この現象をうまく利用することによって、生体分子間相互作用や生体分子構造変化を生きた細胞内でリアルタイムに観察することができる。

※６　HeLa 細胞

子宮頸ガン由来の上皮様細胞株で、ヒト由来細胞株として最初のものである。

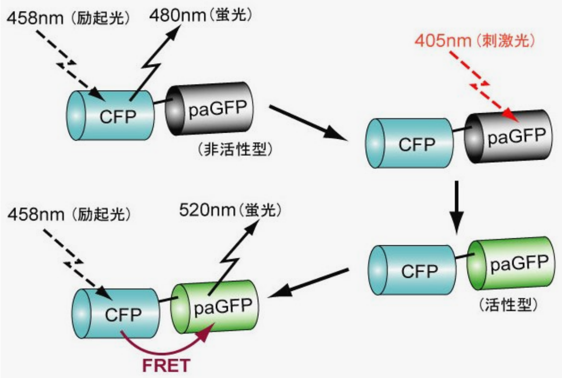

図１ 光刺激によるファムレットの蛍光波長変化

光刺激によりファムレットはシアン色の蛍光から緑色に変化する。励起波長はいずれの蛍光色も 458nm のままで観察することができる。

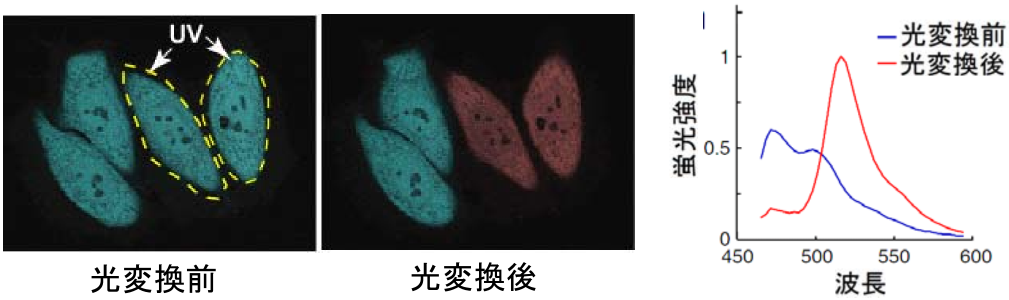

図２ HeLa 細胞内での光変換

黄色の点線で囲った HeLa 細胞に紫外線（UV）による光刺激を与えると蛍光色が変化する。図では緑色蛍光は赤色の疑似カラーで表示

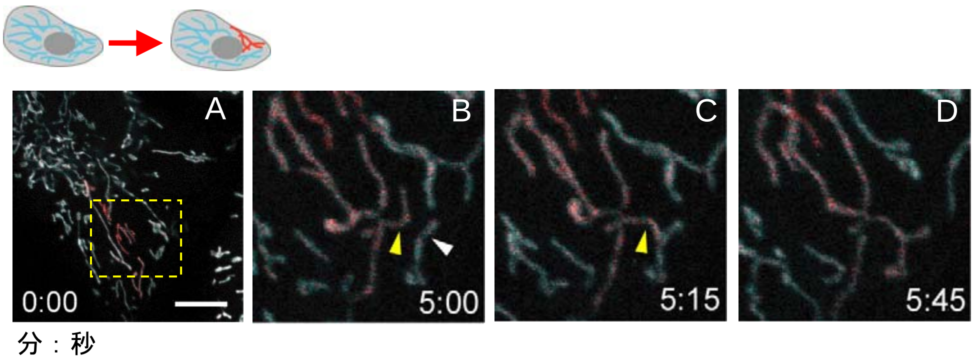

図３．ファムレットによるミトコンドリア動態の観察

(A)ファムレットをミトコンドリアに発現させ、一部分に紫外線を照射して、光変換を行った。黄色の波線枠を拡大したのが B-D である。(B) 黄と白の矢頭は、今まさに融合しつつあるミトコンドリアであり、一方が赤色、他方が水色で標識されている。(C) ミトコンドリアが融合した直後。ミトコンドリアマトリクス内部にある光変換前後のファムレットは混合していない。(D) 融合３０秒後には光変換前後のファムレットが混合している、つまりミトコンドリアの外膜のみならず内膜も融合していることが分かる。

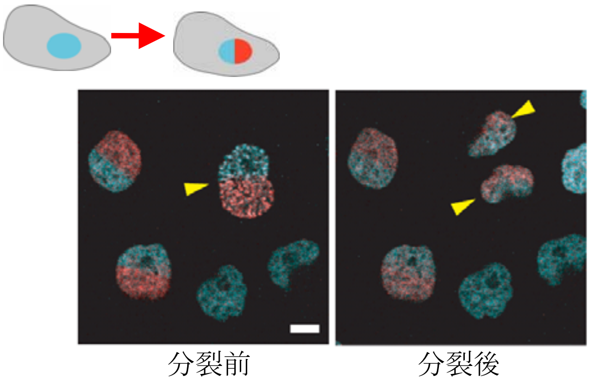

図 4. ファムレットによる染色体動態の観察

(A)ファムレットをヒストンタンパク質と融合して、染色体に発現させ、細胞分裂直前に半分の核を紫外線照射によって光変換させた（黄矢頭）。(B)細胞分裂してできた、2つの娘核においても、赤色と水色が明瞭な境界を作って染色体が分布していることから、細胞分裂前後において染色体の核内配置は変化しないことが示唆された。

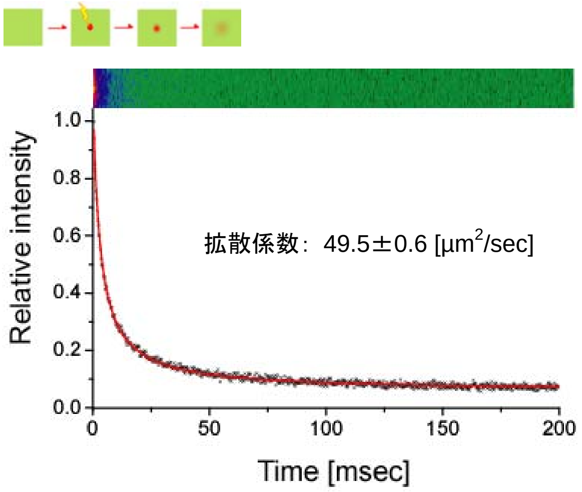

図５． エフダップ法による溶液中での Phamret の拡散係数の解析

ファムレット溶液の微小領域（直径 1 ミクロン程度の円）に紫外光を照射してファムレットを素早く(0.25 ミリ秒)光変換し、光変換したファムレットが拡散していく様子を高速（4000 枚/秒）観察した。光変換した領域におけるファムレットの拡散による蛍光減衰の情報から、ファムレットは 50μm^2/秒の拡散係数を有することが精度良く算出された。本方法により動かない分子から、非常に速く拡散する分子(<～100μm^2/秒)まで、非常に広い範囲に渡る分子動態特性を定量的に解析することが可能となった。