

## 【第89回生涯教育講座】

緑色蛍光タンパク質を用いた細胞内  
タンパク質のダイナミクス解析か とう ひろ あき うら の たけし  
加 藤 太 陽 浦 野 健

キーワード：緑色蛍光タンパク質 (GFP), 生細胞内の分子動態, FRAP, FLIP

## 要 旨

1960年代にオワンクラゲから単離された緑色蛍光タンパク質 (GFP: Green Fluorescent Protein) は、現在の生命科学研究の様々な分野で欠かすことのできないツールとなっている。発見者の下村脩博士は GFP を発見した功績により2008年にノーベル化学賞を受賞した。本稿では、まず GFP を始めとした蛍光タンパク質について概説する。さらに、細胞内での生体分子の振る舞いを可視化することにより解析する FRAP 法 (Fluorescence Recovery After Photobleaching) および FLIP 法 (Fluorescence Loss In Photobleaching) について紹介する。

## は じ め に

我々の細胞は、細胞膜によって区画化された袋の中に数千種類を超える多様な分子が濃縮され、それらの分子が生体反応を営む場である。しかもそれは生体分子が無秩序に自由拡散している均一系ではなく、しかるべき時にしかるべき場でしかるべき生体反応 (生体分子の離合集散や化学反応など) を起こすことで、恒常性を維持し、ストレス応答や細胞分化を行うことができる、極めて高度に組織化された場である。「細胞内には高分子が高密度に存在するため、細胞内での分子の動き

は制限されており、自由に拡散できない」と生物学者たちは考えていた。この漠然とした思い込みを目に見える形で打ち壊したのが FRAP 法である。

500 kDa 程度の大きな分子でさえ核の端から端 (10  $\mu$  m 程度) まで1秒程度で移動することができ、比較的分子量のタンパク質にいたっては目にも留まらぬ速さで細胞内を拡散している。Verkman 博士らのグループは FRAP 法を開発し、かなり大きな分子でさえ予想以上に速いスピードで細胞内を移動していることを目に見える形で示した<sup>1)</sup>。DNA に結合する特定の化学薬品で染色した細胞を光学顕微鏡で観察すると、染色体の中にまわりよりずっと濃く見える領域が観察される。この濃く見える領域はヘテロクロマチン

Takeshi URANO et al.

島根大学医学部病態生化学講座

連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

と呼ばれ、非常に固くがっちりとした構造であるためそこでは遺伝子の転写は起きないと考えられていた。ところが Misteli 博士らは FRAP 法を用いて、ヘテロクロマチンを構成する HP1 タンパク質がヘテロクロマチンにおいて驚くほど頻繁に交換されることを示した<sup>2)</sup>。さらに我々の研究によって、ヘテロクロマチンを構築するためには転写装置そのものである RNA ポリメラーゼ II の働きが不可欠であることが判明し<sup>3)</sup>、FRAP 法による先行研究のおかげもあって、これまで静的と思われていたヘテロクロマチンでさえ実はダイナミックに活動しているという事実が、広く受け入れられるようになった。このような事例が示す通り、FRAP 法とその変法である FLIP 法は、細胞内の生体分子がどれだけ活発に躍動しているかを視覚的に教えてくれる。生命科学研究を遂行する上で必要不可欠な、きわめて重要な解析法である。

### G F P

FRAP 法と FLIP 法では、特定の生体分子を

蛍光色素によって可視化し、その一部を強制的に退色させ、その後の蛍光分子の振る舞いを解析することで細胞内における生体分子の動態を明らかにする方法である。かつては細胞外から注入された蛍光標識分子の振る舞いを解析していた。GFP などの蛍光タンパク質を目的のタンパク質との融合タンパク質として発現する手法が確立されてからは、実験操作が簡便になり、より生理的な条件下での解析が可能になった。このため、FRAP 法や FLIP 法を理解していただくためには、まず GFP などの蛍光タンパク質について説明しなければならない。

下村博士がオワンクラゲから単離した GFP<sup>4)</sup> (図 1 a) は、クラゲの細胞内ではイクオリンとの複合体として機能する。イクオリン単体はカルシウム濃度を感知して青色の光を発する発光タンパク質であるが、近傍に GFP があればイクオリンから GFP へのエネルギー転移 (FRET: Förster Resonance Energy Transfer) が起き、GFP が励起されて緑色の蛍光を発する。単体としての GFP は青色の光によって励起され、緑色

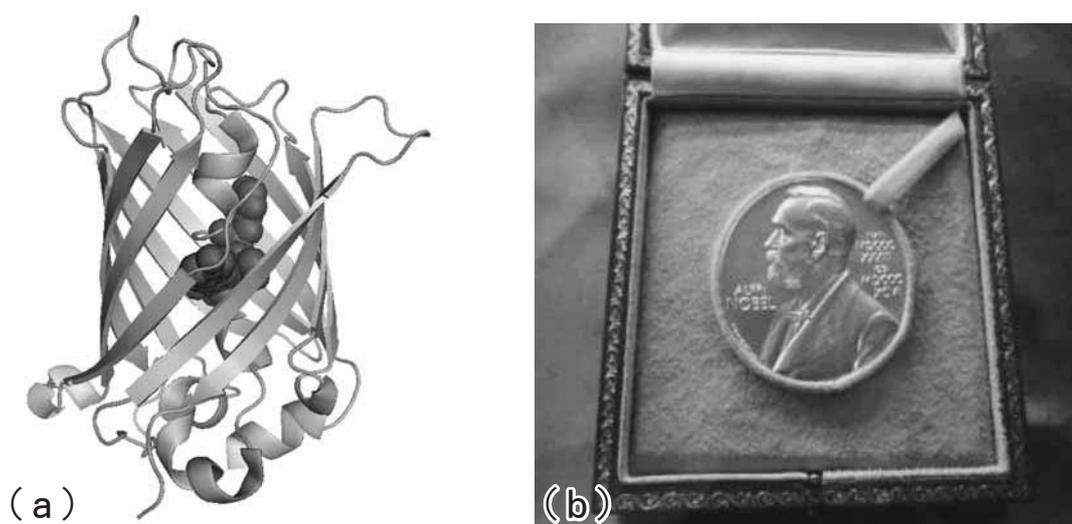


図1 発色団 (中央部分) を包む形で円筒構造を取る GFP の立体構造 (a) と下村博士のノーベル化学賞のメダル (b)

の蛍光を発する。このため緑色蛍光タンパク質と呼ばれる。

余談ながら本稿の筆者の一人浦野の同級生(小・中学校および大学時代)が下村博士の甥っ子で、その同級生は下村博士の影響で夏休みの宿題はかならず光りモノを題材にしていた。その同級生より下村博士のノーベル賞の写真を提供いただいた(図1b)。

GFPタンパク質発見の30余年後、GFPをコードする遺伝子がクローニングされ<sup>5)</sup>、さらにGFPの発現マーカーとしての利用や、GFPを融合させたタンパク質の局在解析が可能であることがChalfie博士らによって示された<sup>6)</sup>。加えて、Tsien博士らはGFPのアミノ酸置換によってGFPを改良できることを示した<sup>7)</sup>。Chalfie博士とTsien博士もまた、下村博士と同時にノーベル化学賞を受賞している。

それまでの発光系では発光基質や補因子が必要だった(例えばルシフェラーゼはルシフェリンやATPを必要とする)のに対し、GFPは発光基質や補因子を必要とせず、励起光のエネルギーだけで発光させることができる。その上、目立った細胞毒性もなく、しかも融合タンパク質として発現させればそのタンパク質自体が光るので、機能をもったタンパク質が生きた細胞内のどこに局在し、その機能をいつ発揮するのかを知ることができる。このように優れた性質があったため、世界中の生命科学研究者がこぞってGFPおよびその類縁体を利用するようになった。生化学や遺伝学によるタンパク質の機能解析から生命現象を理解しようという従来の研究方法に加えて、タンパク質の細胞内局在を手がかりとして生命現象を理解しようという流れが生まれた。

現在では、シアン、青、黄など様々な蛍光を発

する類縁体(CFP, BFP, YFPなど)が存在する。励起波長と蛍光波長は蛍光分子ごとに異なるため、CFPに対する励起光によってYFPが蛍光を発することはなく、逆もまた然りである。また、オワンクラゲ以外の生物から多様な蛍光タンパク質が同定・改変されており、蛍光強度に差はあるものの可視光帯域のほとんどすべてがカバーできるようになった。これらの蛍光タンパク質を利用すれば、興味ある複数のタンパク質を個別の色で標識することができるため、ある色で細胞内の構造体を蛍光標識しながら別の色で興味あるタンパク質の局在を解析することも可能である。

例えば微小管への局在が疑われるタンパク質があるならば、そのタンパク質とチューブリンをそれぞれ別の色の蛍光タンパク質で蛍光標識し、生きた細胞内で蛍光像が重なるかどうかを調査すればよい。また、細胞周期の時期の可視化も実現している<sup>8)</sup>。Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) と呼ばれるこのシステムは、細胞周期特異的に分解されるタンパク質の分解モチーフを蛍光タンパク質と融合させることで、S期には細胞がオレンジ色に光り、その他の時期には緑色に光るようにデザインされている。このため細胞増殖活性の評価や細胞周期の解析が容易にできる。このシステムを発現するマウスもすでに作られており、個体内での細胞周期の解析も可能になっている。この他に、異なる色で蛍光標識されたタンパク質間のFRETを利用してタンパク質分子内あるいは分子間の相互作用を解析することも可能である。細胞内で一見同じ場所に局在しているように見える二つのタンパク質は物理的に近接しているとは限らない。蛍光タンパク質同士の配向にもよるが両者の距離が1~10 nm程度であればFRETが起こり、両者の細胞

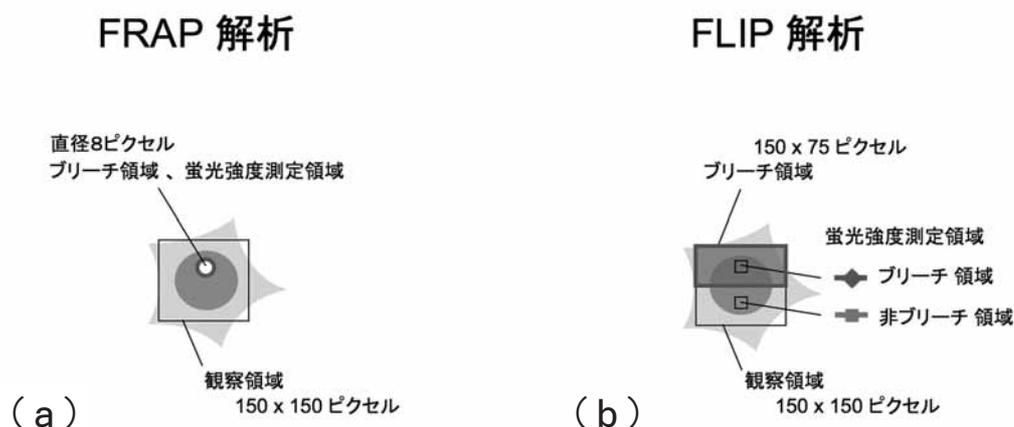


図2 FRAP法(a)とFLIP法(b)の原理

観察領域内の特定部位にてブリーチングを行い、ブリーチ領域と非ブリーチ領域の蛍光強度の経時変化から分子の動態を解析する。詳細は本文参照。

内での局所的な相互作用を証明することができる。よく利用される蛍光タンパク質はCFPとYFPの組み合わせであり、FRETが起こるならばCFPの励起光によってYFPの蛍光が検出される(エネルギー移動の関係で、その逆はおこらない)。蛍光タンパク質を利用したこれらの技術は、下村博士によるGFPの発見と、ChalfieとTsien両博士による分子生物学的利用法の確立に端を発したものであり、生命科学の発展に欠かせないものとなっている。彼らがノーベル賞を受賞したのは自明の理と言えよう。

これから紹介するFRAP法やFLIP法を行うには、GFPなどの蛍光タンパク質は最適である。適度に小さく、適度の励起エネルギーによって不可逆的に退色するという性質をもつからである。GFPは分子量が約27 kDaであり、細胞質と核を隔てる核膜に存在する微小な核膜孔を、輸送因子の力を借りずに自由に往来する(拡散する)ことができる。このため、細胞内に単体として発現させたGFPは特徴的な局在を示すことなく、核と細胞質にまんべんなく存在する(ただし、通常で

は核小体には局在しない)(図3aおよび図4a左上)。他方、特定の細胞内局在を示すタンパク質との融合タンパク質としてGFPを発現させた場合、GFPはそのタンパク質に特徴的な局在パターンを示す。たとえば、核内に存在するヒストンH3タンパク質をGFPとの融合タンパク質として発現させた細胞では、GFPは核小体を除く核内に認められる(図3aおよび図4a左下)。もし分子量が大きすぎる蛍光タンパク質を用いれば、融合相手のタンパク質の本来の局在や機能を損なう可能性が高まるだけでなく、分子が大きくなるほどに拡散速度が低下するので、比較的小さなタンパク質が融合相手の場合その動態解析が困難にする恐れがある。くり返しになるが、GFPなどの蛍光タンパク質は励起光を吸収して蛍光を発するが、強い励起エネルギーを受けると不可逆的に失活(退色)する。このようにして蛍光タンパク質を失活させる行為をフォトブリーチング、あるいは単にブリーチングという。FRAP法とFLIP法はブリーチングを行いながら蛍光物質の振る舞いを解析する手法であるため、瞬間的にブ

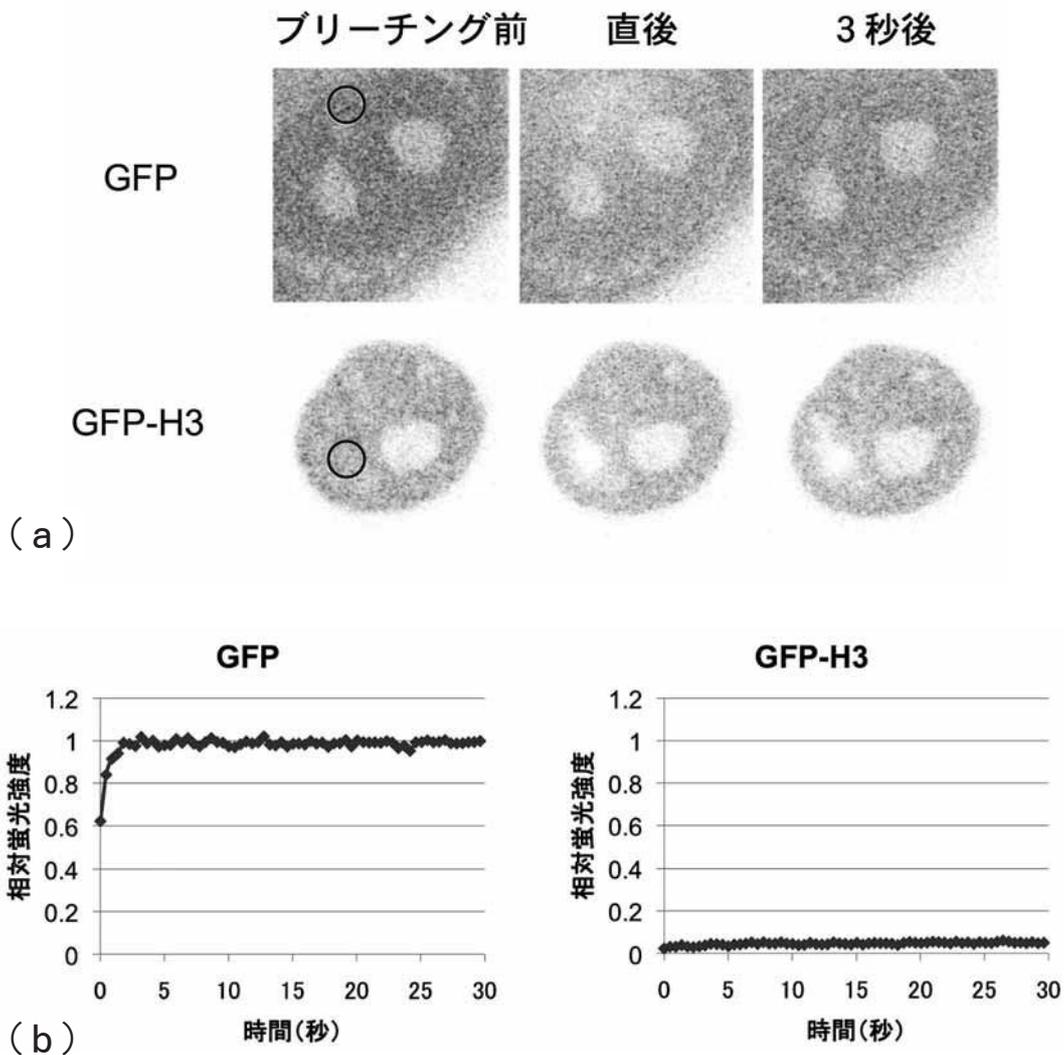


図3 FRAP法(黒色で表示した円形領域の短時間ブリーチング)による、GFPとGFP融合ヒストンH3の動態解析の結果

蛍光画像(a)とブリーチ領域における相対蛍光強度の経時変化(b)を示す。GFP(a上段、b左側)の場合、ブリーチ直後に局所的な退色が認められたが、3秒以内に蛍光が回復した。GFP融合ヒストンH3(a下段、b右側)の場合、30秒経過後もブリーチ領域の蛍光回復がまったく認められなかった。蛍光画像(a)は白黒反転させている。

ブリーチングできるGFPなどの蛍光タンパク質は、これらの手法に最適であると言える。

#### FRAP法とFLIP法

FRAP法(図2a)は「光退色蛍光回復法」と和訳される。細胞質内でGFP融合タンパク質が拡散しているとき、その一部分に強い励起光を短時間照射してブリーチングを行う。本稿ではその

場所をブリーチ領域と呼び、その他の細胞質内の領域を非ブリーチ領域と呼ぶ。ブリーチング直後、ブリーチ領域にはGFPが失活した(退色し蛍光を発する能力をもたない)融合タンパク質ばかりが存在し、それ以外の場所にはGFPが活性を保った(蛍光を発する能力を保った)融合タンパク質のみが存在する。次の瞬間にはブリーチ領域と非ブリーチ領域との間で融合タンパク質の入れ替わ

りが始まる。これは融合タンパク質が GFP の活性に関わらず拡散するためである。厳密に言えばブリーチングの最中にも融合タンパク質の交換が起っている。そのため、ブリーチング効率が高く拡散が速すぎない分子が解析に適している。重要な点なので繰り返すが、GFP が活性を保った融合タンパク質の濃度は、ブリーチング直後には不均一である。しかし最終的には均一になるため、2つの領域での蛍光強度は同程度になる。よって、ブリーチ領域での相対蛍光強度の回復の程度を記録すれば、GFP 融合タンパク質の動態を拡散の程度として求めることができる。すなわち、回復が早い因子は細胞内でより速く移動しており、回復が遅い因子はより遅く移動している。このように細胞内での分子の動態をグラフ化および数値化できる点が FRAP 法の魅力である。当然ながら細胞質内だけでなく核内の解析も可能であり、核と細胞質間での分子の往来を解析することもできる。

FRAP 法や FLIP 法は共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて解析を行うため、ここで少しこの顕微鏡について解説を加える。この顕微鏡は特定波長のレーザー光 (励起光) を標本に照射するため、ある励起波長の蛍光分子のみを励起することができる。標本が発する蛍光のうちピンホール (極小の穴) で限定された特定焦点面の光のみを CCD 素子によって検出することにより、標本を輪切りにした二次元の画像 (XY) を得ることができる。焦点を少しずつずらして前後の像を得た上で三次元画像 (XYZ) を合成することや、さらに時間軸を加えて三次元動画 (XYZT) を得ることも可能である。

FRAP 法や FLIP 法では同焦点の二次元画像を一定時間毎に取得して得た画像データの集合

(XYT) を解析対象とする。各時間単位 (T) で得られる画像データには各座標 (X,Y) における蛍光強度 (I) が記載されている。よって、特定の座標における蛍光強度の経時的な変化を解析することで、標本の特定部位における蛍光分子の動態を調査することができる。すなわち、X, Y, T, I の四つの次元からなるデータを扱う。個々の標本のデータは顕微鏡に付属のソフトで解析し、母集団を増やして統計的な解析を行う場合には自作プログラムなどで自動化するのが一般的である。素早い分子の動態を捉えるためにはスキャン領域を狭めるなどして一枚あたりの画像取得の所要時間を減らす必要がある。顕微鏡の画像取得速度を超えるほど素早い分子の動態調査には FRAP 法や FLIP 法は不向きであり、そのような場合には蛍光相関分光法 (FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy) などが用いられる。

GFP がタンパク質の蛍光標識として実用化される以前から、FRAP 法による分子動態の解析は行われていた。例えば、分子の拡散を FRAP 法で解析するためのモデル式が 1976 年に Axelrod らにより発表されている<sup>9)</sup>。GFP 融合タンパク質を用いて得られるデータをこの式に適用してモデルフィッティングを行えば、細胞内における蛍光分子の拡散係数を求めることが可能である。ただし、細胞内の分子は必ずしも単一分子種として自由拡散しているとは限らないため、蛍光分子の単一性を前提としたモデル式にフィットしないことも多い。そのようなデータは、解析対象の分子の一部が他の分子や細胞内構造体と相互作用することを示唆する。GFP 単体などの比較的小さな分子を解析した場合、速やかな蛍光の回復が認められる (図 3 a 上段, 図 3 b 左)。GFP は核膜孔を自由に通過できるため、核内をブリーチ

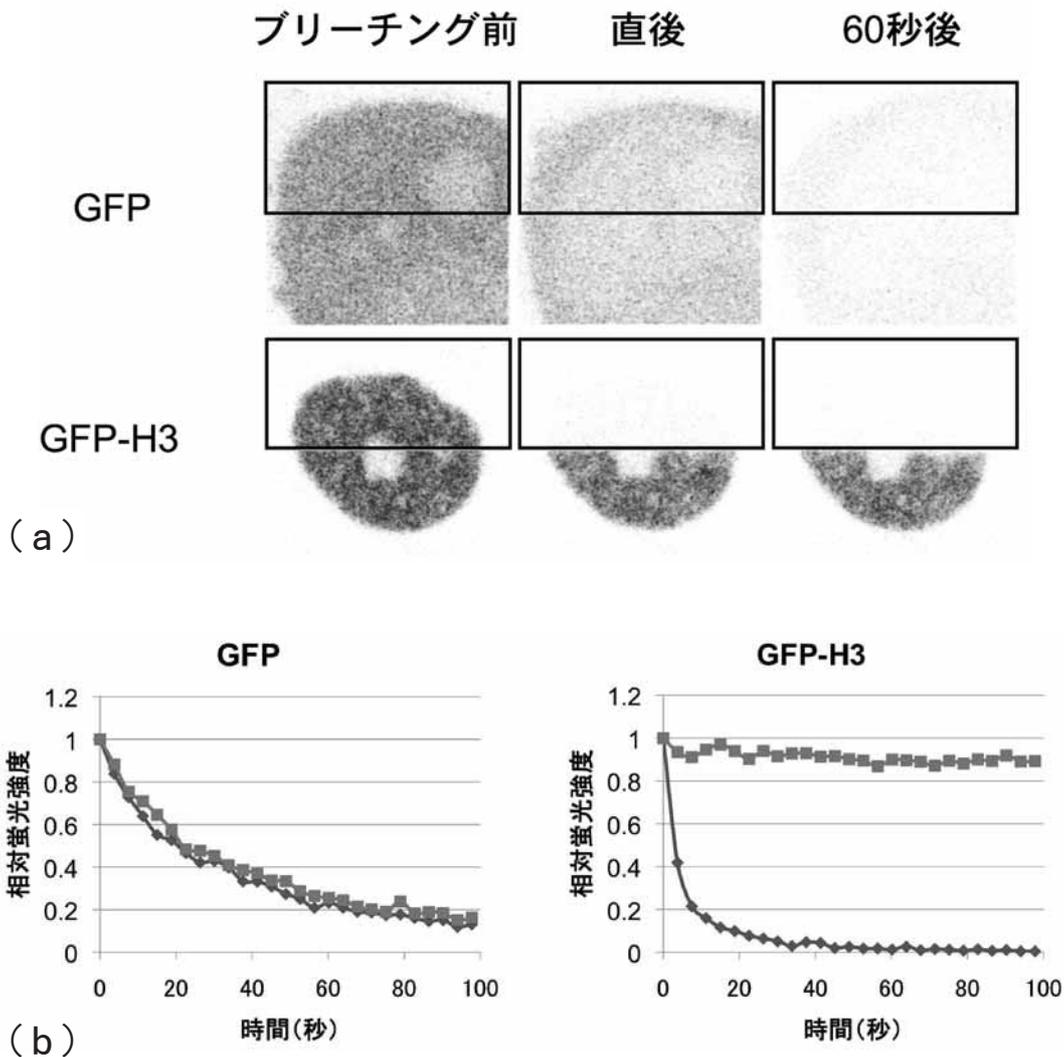


図4 FLIP法(グレイ色で表示した長方形領域の持続的ブリーチング)による、GFPとGFP融合ヒストンH3の動態解析の結果

蛍光画像(a)とブリーチ領域(ダイヤモンド)および非ブリーチ領域(正方形)における相対蛍光強度の経時変化(b)を示す。GFP(a上段,b左側)の場合、ブリーチ領域と非ブリーチ領域においてほぼ同時に蛍光の退色が認められた。GFP融合ヒストンH3(a下段,b右側)の場合、ブリーチ領域では速やかな退色が起こり、非ブリーチ領域ではほとんど退色が起きなかった。蛍光画像(a)は白黒反転させている。

ングすれば細胞質の非ブリーチ領域においてさえ蛍光強度が速やかに低下する。一方、解析対象となるタンパク質によっては、GFP融合タンパク質の分子量から計算される予測値に比べて回復の遅さが目立つ場合があり、その場合は観察している分子が大きな複合体の一部として存在しているか、何らかの構造との結合と解離を繰り返している可能性が考えられる。

極端な例では、巨大な細胞内構造体に結合している蛍光タンパク質を局所的にブリーチングすると、いつまで経ってもブリーチ領域の蛍光が回復しなかったり、特定の方向へブリーチ領域がまるごと移動していく現象が観察されることがある。例えば、GFP融合ヒストンH3は非常に安定に染色体と結合しており交換反応がほとんど起こらないため、数時間経過したとしてもブリーチ領域

の蛍光が完全に回復しない (図 3 a 下段, 図 3 b 右)。微小管の構成因子であるチューブリンを GFP 融合タンパク質として発現させて微小管の一部をブリーチングすると, ブリーチ領域が一方の極に移動していく様子を観察することができる。また, 大方の予想に反して驚くほど速い蛍光の回復が観察されることもある。その良い例が, 前述したヘテロクロマチンの特徴づける HP1 タンパク質の動的な振る舞いである。細胞内で見られる局所的な分子動態を試験管内で再構成することは多くの場合困難であるが, GFP などの蛍光タンパク質が発見されたおかげで, 我々は「生きた細胞」の中での事象について随分と多くのことを学ぶことができるようになった。「百聞は一見にしかず」と言われるが, 視覚的な情報は時として, 圧倒的な現実として我々のそれまでの常識を覆すのである。

FLIP 法 (図 2 b) は FRAP 法と同じ顕微鏡装置を用いる。FRAP 法が短時間ブリーチング後のブリーチ領域における蛍光強度の回復を観察するのに対し, FLIP 法では, ブリーチ領域においてブリーチングを持続的に行いながら, 非ブリーチ領域における蛍光強度の低下を観察する。拡散速度の早い GFP 単独分子を FLIP 法で解析すると, ブリーチ領域と非ブリーチ領域ではほぼ同程度に蛍光の退色が見られる (図 4 a 上段, 図 4 b 左)。これは, GFP 分子があまりにも速く拡散しているためである。それに比べ, GFP 融合ヒス

トン H3 を解析すると, ブリーチ領域での退色は GFP 単独よりも速やかに起こるのに対し, 非ブリーチ領域ではほとんど退色しない (図 4 a 下段, 図 4 b 右)。この事から, FRAP 法で示されたとおりヒストン H3 は非常に安定に染色体に結合しており, そのほとんどは核内を自由に移動していないことがわかる。このように FLIP 法は FRAP 法と表裏一体の関係にある解析法で, タンパク質の細胞内での動態を知る上で重要な解析法であると言える。

### おわりに

より詳しく学びたいという方々には, 国内での第一人者である木村宏博士による解説<sup>10,11,12</sup>をお勧めする。本稿は FRAP 法と FLIP 法の基礎を中心に紹介したが, 当然ながら様々な応用が考えられる。例えば, あるタンパク質の細胞内での機能ドメインを明らかにする事も可能であるし, 外部環境の変化に応じて同一因子の細胞内動態が変化する様子を解析することもできる。同様に, 細胞の分化状態と分子の動態の関係を解析することも可能である。また, 細胞を試験管として分子の動態変化を指標とした薬剤スクリーニングを行うことも可能であろう。細胞内部における局所的な分子動態を調査することのできる FRAP 法と FLIP 法は, 今後もその重要性を増していくに違いない。

### 文 献

- 1) Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. Seksek O, Bowers J and Verkman AS. *J Cell Biol.*, 138: 131-142, 1997
- 2) Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB and Misteli T.

- Science, 299: 721-725, 2003
- 3) RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. Kato H, Goto DB, Martienssen RA, Urano T, Furukawa K and Murakami Y. Science, 309: 467-469, 2005
- 4) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y. J Cell Comp Physiol., 59: 223-239, 1962
- 5) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG and Cormier MJ. Gene, 111: 229-233, 1992
- 6) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC. Science, 263: 802-805, 1994
- 7) Improved green fluorescence. Heim R, Cubitt AB and Tsien RY. Nature, 373: 663-664, 1995
- 8) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H and Miyawaki A. Cell, 132: 487-498, 2008
- 9) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E and Webb WW. Biophys J., 16: 1055-1069, 1976
- 10) 細胞核構造と機能のストカスティックな制御 木村 宏 生物物理 43 : 234-239, 2003
- 11) 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) —固定細胞を用いた条件設定— 木村 宏 実験医学 22 : 1739-1745, 2004
- 12) 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) —生細胞における測定と定量的解析のためのアプローチ— 木村 宏 実験医学 22 : 1851-1856, 2004