

蛍光の時代 蛋白尿をみる

信州大学医学部病理組織学講座

江原孝史

近年、生きたままの細胞の状態をみることが可能になった。ライブセルイメージングなどと呼ばれる。さらに分子の機能が可視化できるようになった。蛍光標識した癌細胞の転移や移動を生体で観察することができる。これにはノーベル化学賞を授与された下村先生が発見し分離生成したオワンクラゲからの GFP をはじめとするさまざまな蛍光蛋白質や蛍光プローブの発見と開発とともにレーザー顕微鏡の発展と関連するテクノロジーの進歩も大きく関わっている。蛍光を使った研究の隆盛をみると現代は蛍光の時代ともいえる。

I 蛍光物質の発展

蛍光プローブとしては、フルオレセイン系がよく用いられているが、それをさらに発展させた新しいフルオレセイン類 (TokyoGreens) によって、生体分子や活性酸素などを標識することができるようになった¹⁾。βガラクトシダーゼに対する蛍光プローブで癌細胞を標識して体内での移動が詳しくわかるようになった²⁾。GFP は緑色蛍光タンパクの略で、基質を必要とせずリアルタイムで他の蛋白質との融合蛋白としても検出が可能な特徴を活かして現在いろいろな用途に

使われている。くわしくは成書を参照されたい。また近年では GFP 以外にもさまざまな特徴を持った蛍光タンパクが新しくでてきている。いくつか例をあげると、コモンサンゴから得られたケイマという蛍光蛋白質は励起光と発せられる蛍光との波長差が大きく生体間相互作用を高感度、定量的に測定できる。これを発展させて1つの励起光で6色同時に蛍光を得る事が可能になった³⁾。またカエデという蛍光蛋白質はヒュサンゴから得られたもので、紫外線照射で蛍光が緑から赤に変わるといふ photoconversion という特性をもっている (図1)。この蛍光タンパクを発現させた細胞の一部にのみ紫外線をあてるだけで、細胞全体が緑から赤に変化し、任意の細胞を任意の時に標識が可能であることが明らかになった (図2, 3)⁴⁾。このため特定の神経細胞だけに紫外線をあて、複雑な突起の中から照射した細胞由来の突起を同定でき、複雑な神経回路の研究などに応用されている⁵⁾。ミトコンドリアの研究でこの蛍光タンパクを用いて調べた結果、高等植物のミトコンドリア同士が頻繁に融合分裂して内容を交換しあっていることが解明された⁶⁾。さらにこの蛍光タンパクを発現するトランスジェニックマウスを作

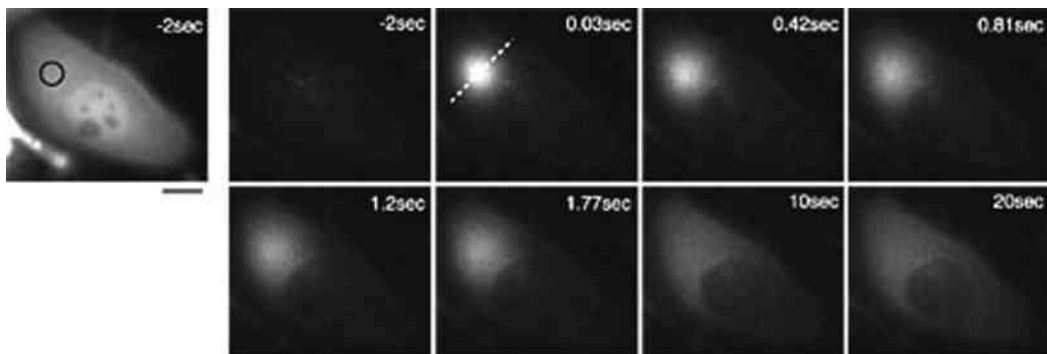


図1 緑から赤に変わる蛍光タンパク

蛍光蛋白質「カエデ」を発現する HeLa 細胞の細胞質の一部分 (左上, 丸の部分) に紫外線を1秒間照射すると, photoconversion により赤色に変換した「カエデ」タンパクが時間の経過とともに細胞質全体に広がるのが観察された。理化学研究所脳科学総合研究センターより許可引用

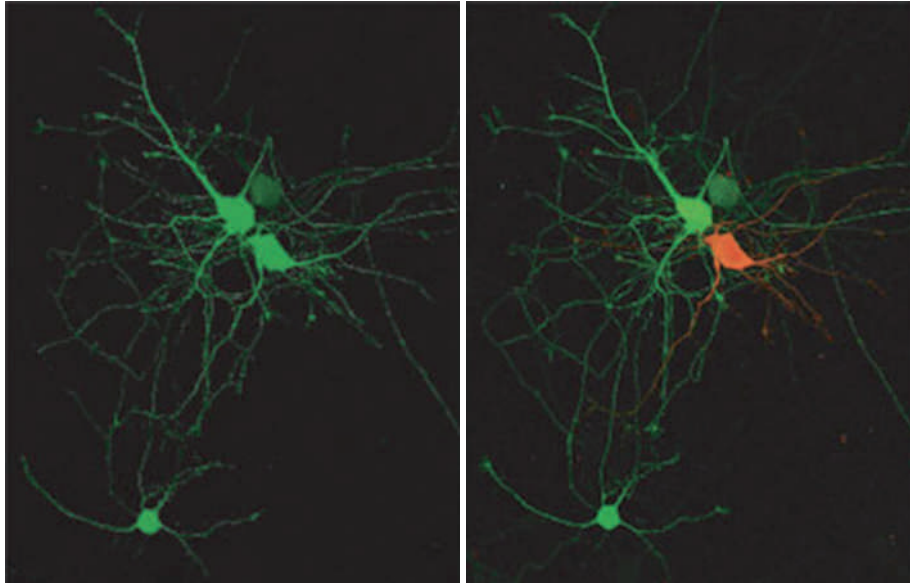


図2 特定の細胞のみを赤く蛍光標識する

「カエデ」を発現する海馬神経細胞の培養（左、すべての細胞が緑色）において、一つの神経細胞の細胞質の一部分に紫外線パルスを与えたところ、細胞質と突起全体が赤くなった（右、隣同士の神経細胞を色で区別できる）。理化学研究所脳科学総合研究センターより許可引用

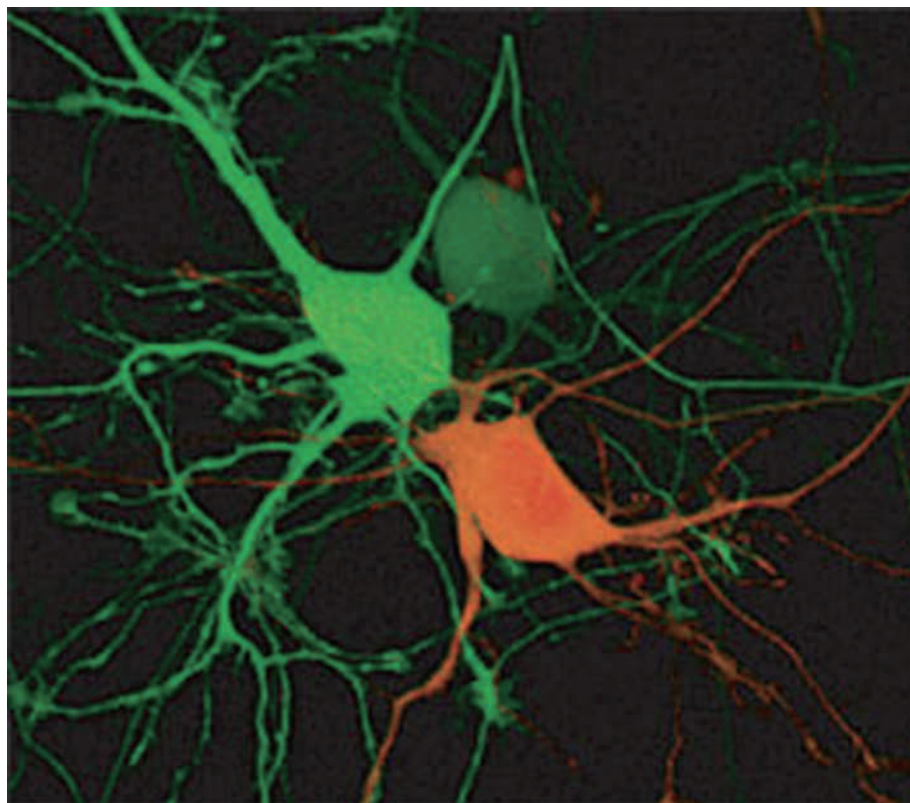


図3 図2右写真の拡大
神経細胞同士が複雑にからみあっている様子が明らかになる。

成することにも成功した。このマウスを使い鼠径リンパ節を紫外線照射してリンパ球を赤く標識することでリンパ球の動態を追跡することもできるようになった。この結果、リンパ球が鼠径リンパ節から同側の腋下リンパ節へ主に移動し、細胞の種類ではCD4陽性T細胞が中でも多く移動することがわかった⁷⁾。このマウスをモデルに応用して、接触皮膚炎を調べたところ、制御性T細胞が皮膚炎症の治癒に大きく関わっていることが明らかになった。さらに、末梢組織とリンパ節間の細胞の移動の過程が初めて明らかになった⁸⁾。これら以外にも最近では小動物用にプロテアーゼ活性や脈管や骨リモデリング観察のためのイメージング試薬が市販されている。

II レーザー顕微鏡の発展

レーザー顕微鏡はレーザー光を試料にあてて出てきた蛍光を検出する一種の蛍光顕微鏡で従来から通常の蛍光顕微鏡よりもすぐれた蛍光画像が得られることが知られていた。しかし、これらは1光子によって励起される蛍光で、励起光が深部まで届かずまた試料の焦点面以外でも励起光が照射されるため、生きた状態の臓器の観察には制限が大きかった。つまり、深部の組織は観察できないのである。この弱点を多光子レーザー顕微鏡は克服した。多光子レーザー顕微鏡では長波長のレーザーを高密度かつ短時間、フェムト秒(1,000兆分の1秒, $1/10^{-15}$)程度のごく短時間で照射することによって、1個の細胞ないし分子が同時に2個の光子で励起される状態を作り出すことが可能になる。多光子励起で励起される蛍光は、焦点からの距離の2乗に反比例するため、焦点面でのみ蛍光が発生する。そのため、従来のレーザー顕微鏡に必要であったピンホールがいなくなった。また長波長のレーザー光はエネルギーも低くかつ組織透過性がすぐれているため、組織や臓器のより深部の観察が生きたまま可能になった。脳では表面から200ミクロン程度の深部まで観察が可能で、腎臓の糸球体は以前から皮質のごく表面の糸球体を観察できたが、多光子レーザー顕微鏡によってより深部の糸球体や尿細管の観察が可能となった。多光子レーザーを用いた最近の研究ではテキ

サスレッドで蛍光標識した低分子デキストランが静注された後に糸球体からボウマン腔に原尿として出る様子があざやかに捉えられた。さらにストレプトゾトシンによってラ氏島が破壊され糖尿病をおこしたラットの糸球体に入出入りする輸出入動脈の形の変化も捉えられた⁹⁾。他にレーザーを応用した顕微鏡としては全反射蛍光顕微鏡がある。これはレーザー光が全反射された場合に生じるエバネッセント光を励起光として利用した蛍光顕微鏡で、エバネッセント光は数100 nm程度しかとどかないのでバックグラウンドのない蛍光像が得られる。

III レーザー光を応用した技術

FRET (Fluorescence resonance energy transfer, 蛍光共鳴エネルギー移動) とは蛍光分子の励起エネルギーが別の分子に移動する現象で、生体分子間の相互作用、構造変化を研究するのに使われる。これを使用してアポトーシスをおこした細胞が貪食される過程における低分子量G蛋白 Rac1と Rab5の活性化と制御機構が明らかになった¹⁰⁾。FCS (Fluorescence correlation spectroscopy, 蛍光相関分光法) ではレーザー光を絞って、焦点に微小領域をつくりこの領域から発せられる蛍光のシグナルをゆらぎとして観測、ゆらぎのパターンから蛍光色素でラベルされた生体分子の大きさや拡散に関する情報を得る。FCCS (Fluorescent cross correlation spectroscopy, 蛍光相互相関分光法) は注目する2つの分子に異なる蛍光を発する色素をラベルする。蛍光色素を同時に励起し2色の蛍光シグナルのゆらぎを比較(相互相関を定量)し、FCSが苦手とする同じような分子サイズの相互作用の解析が可能である。すでに述べた蛍光蛋白ケイマは一種類の励起光でケイマとそれ以外の蛍光蛋白を同時に励起しうるため、同時に波長の異なる蛍光を得られるためにFRETやFCCSにとって欠かせない物質となっている。

これらの蛍光蛋白、レーザー顕微鏡の進歩によってこれからますますライブセルイメージの研究が発展することが期待される。

文 献

- 1) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T: Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70: 2446-2453, 1998

- 2) Kamiya M, Kobayashi H, Hama Y, Koyama Y, Bernardo M, Nagano T, Choyke PL, Urano Y : Highly activatable and rapidly releasable caged fluorescein derivatives. *J Am Chem Soc* 129 : 3918-3929, 2007
 - 3) Kogure T, Karasawa S, Araki T, Kinjo M, Miyawaki A : A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single laser fluorescence spectroscopy. *Nat Biotechnol* 24 : 577-581, 2006
 - 4) Ando R, Hama H, Hino MY, Mizuno H, Miyawaki A : An optical marker based on the UV-induced green- to-red photoconversion of a fluorescent protein. *PNAS* 99 : 12651-12656, 2002
 - 5) Sato T, Takahoko M, Okamoto H : *HuC : Kaede*, a useful tool to label neural morphologies in networks in vivo. *Genesis* 44 : 136-142, 2006
 - 6) Arimura S, Yamamoto J, Aida GP, Nakazono M, Tsutsumi N : Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleotide distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 7805-7808, 2004
 - 7) Tomura M, Yoshida N, Tanaka J, Karasawa S, Miwa Y, Miyawaki A, Kanagawa O : Monitoring cellular movements in vivo with photoconversion fluorescence protein “Kaede” transgenic mice. *PNAS* 105 : 10870- 10875, 2008
 - 8) Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldman H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K : Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* 120 : 883-893, 2010
 - 9) Satoh M, Kobayashi S, Kuwabara A, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N : In vivo visualization of glomerular microcirculation and hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Microcirculation* 17 : 103-112, 2010
 - 10) Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, Nagata S, Matsuda M : Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453 : 241-246, 2008
-