

## 分子は細胞内でどう動く？

東 恒仁

分子は機能する場所に存在するので、その細胞内における局在やダイナミクスを知れば、分子や細胞の機能を知らずとも助けるだろう。

2008年の下村博士のノーベル化学賞受賞で一躍有名になったGFP (green fluorescent protein, 緑色蛍光タンパク質) は分子、特にタンパク質の細胞内や個体におけるダイナミクスを知る上で非常に有力なツールの一つである。GFPの利点は、遺伝子導入という比較的簡便な手法を用い、細胞が活着している状態で、かつ基質を加えることなくタンパク質の可視化が可能である点にある。その反面、約27 kDaという比較的大きなタグを付加することや用いるプロモーターの種類が結果そのものに影響を与える可能性などの問題点が指摘されているのも事実であり、利用の際には留意が必要である。

オワンクラゲ由来のGFPは1992年にその遺伝子がクローニングされた<sup>1)</sup>。また1999年にはイソギンチャクから赤色蛍光タンパク質 (RFP) が発見されている<sup>2)</sup>。それ以来、蛍光タンパク質は目的に合わせてさまざまな改変を受けてきた。現在では研究の目的と使用する測定機器によって群青色 (Sirius) から赤外領域 (IFP1.4) までさまざまな波長特性を持つ蛍光タンパク質を選択することができるし、特定の波長の光を当てることによって蛍光が変化するタンパク質 (Kaede) や光による活性化が可能なもの (paGFP) も開発され利用することができる。

近年、これらの蛍光タンパク質 (おもにGFP) を用いた生きた細胞内におけるタンパク質のダイナミクスについて数多くの報告がなされるようになった。その際に用いられる代表的な手法について紹介したい。

一般的なレーザー共焦点顕微鏡で可能な手法としては、蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching) がある。この手法は、蛍光タンパク質と融合させたターゲットタンパク質を発現した細胞の一部分に強力なレーザー光を照射し、その領域の蛍光の回復具合を観察することでターゲットタンパク質の動きを知る方法である。原理自体は1970年代から提唱されてきたが、2000年にMisteliらが本手法を用いてクロマチンの動態と転写との関係を解析して以来<sup>3)</sup>、幅広く使われるようになった。

より動きの速い分子に対しては、蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy) が適している。これは微小空間での蛍光強度の変化を測定することで分子のダイナミクスを知る手法である。解析に用いる装置がきわめて高価であることが問題であるが、溶液中の低分子の単純拡散の解析も可能なレベルであるマイクロ秒オーダーの時間分解能と高い再現性を持つ有力な手法で

ある。

直接分子を観察するためには、全反射顕微鏡法がよく使われる。本手法はエバネッセント光という、急激に減衰する性質の光 (光の強度が距離に対して指数関数的に弱まる。通常の光の強度は光源からの距離の二乗に反比例する) を使ってカバーガラス近傍に存在する蛍光分子を一分子レベルで観察する手法である。原理上、細胞表面の分子の観察にしか用いることができないとされてきたが、最近長屋らによって条件次第では細胞内部の分子のダイナミクスの解析も可能であるとする報告がなされた<sup>4)</sup>。分子を直接観察するだけに膨大なデータ処理を必要とするものの、ごく一部の異常なダイナミクスを示す分子を検出することが可能であり、画像解析やデータ処理法も併せた今後の発展が期待されている。

これらの手法を用いた解析により、生細胞においてはかなりの割合のタンパク質が単純拡散もしくは拡散ベースの動態 (effective diffusionと呼ばれる、拡散と結合・解離が同じタイミングで起こる分子動態) を示すと考えられるようになってきた。また分子によっては明らかに移動速度が異なる集団が存在するものも報告されている。これらの情報から分子の状態を探り出し、細胞内のプロセスの理解につなげるのが分子の動態解析の重要な目的の一つではないかと考えている。より正確な解析のためにタンパク質であれば発現量と時期のコントロール、シグナル伝達に関係する小分子であればラベル方法などが当面の課題ではないかと考える。それに加えて近年光学系の研究者が中心になって無染色状態でのオルガネラや分子の可視化についても研究されており<sup>5)</sup>、まだ実用化レベルではないものの細胞に手を加えずに解析ができるという点で期待が持てる。

本稿で紹介した手法を含むさまざまな生細胞イメージング・分子ダイナミクス解析に関する手法を実践的に解説した書籍<sup>6-8)</sup>が近年多数出版されているので、興味を持たれた方は一読されてはどうだろうか。

- 1) Prasher, D. C. *et al.*: *Gene*, **111**, 229 (1992).
- 2) Matz, M. V. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **17**, 969 (1999).
- 3) Misteli, T. *et al.*: *Nature*, **408**, 877 (2000).
- 4) Nagaya, H. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **180**, 129 (2008).
- 5) Fujita, K. and Smith, N. I.: *Mol. Cells*, **26**, 530 (2008).
- 6) 高松：バイオイメージングがわかる，羊土社 (2005).
- 7) 高田ら：染色・バイオイメージング実験ハンドブック，羊土社 (2006).
- 8) 原口ら：生細胞蛍光イメージング，共立出版 (2007).