

蛍光タンパク質—知っておきたい性質—

松田 知己

オワンクラゲの傘の縁から単離された緑色蛍光タンパク質 (GFP) は、遺伝子配列が決定され、また細胞内でタンパク質を構成するアミノ酸残基のみで自発的に発色団を形成して蛍光を発するようになることが発見された。これを契機としてGFPは、生細胞イメージングに欠かせないツールとして広く用いられるようになるまでに発展を遂げた。蛍光標識を施すことにより、形態を知るために透過光によって撮影される像では得ることができない「特定のタンパク質がどのように分布しているのか」「特定のプロモーターによる遺伝子発現がどのタイミングで起こっているのか」といった細胞の中で隠されていた情報を鮮やかな蛍光像として得ることができる。有機蛍光分子も細胞の蛍光イメージングでは用いられるが、GFPは遺伝子にコードさせて転写翻訳系によって継続的に生産させることができるため、染色した細胞から時間とともに蛍光分子が抜け出すような心配がなく長時間にわたるイメージングが可能である。そして、外部から蛍光分子を侵襲させることの難しい組織の深部の細胞にまで蛍光を持たせることもできる。また、シグナル配列を用いた細胞内小器官への局在化、さらには、細胞特異的プロモーターを用いた標的細胞のラベリングをすることも可能である。

GFPの緑色の蛍光からスタートした蛍光タンパク質は、生細胞イメージングでの有用性が認められると瞬く間に開発が進み、オワンクラゲ由来GFPの改変、他のクラゲ、サンゴ、イソギンチャクなどの蛍光生物からの単離により、紫外光付近から近赤外光付近までにわたる幅広い領域にわたってさまざまな波長の蛍光を発する蛍光タンパク質が開発され、生細胞イメージングに用いられている。さらにその開発の努力は波長領域の拡大に留まらず、金属イオンや基質の結合に由来するタンパク質の結合ドメインの構造変化を利用した蛍光センサー、光スイッチングを起こす蛍光タンパク質などにまでその応用の幅を広げている。選択の幅が広がることは喜ばしいことなのは確かではあるが、その反面、初めて蛍光タンパク質を使う場合にどれを選べばいいのか頭を悩ませることにつながり、「自分の使用目的以外の面で優れた性質を持ってはいるが、自分の目的のためには使用できるも

のの好ましくはない」蛍光タンパク質を実は使っていた、という残念な状況に陥ることは避けたいものである。本稿では、蛍光タンパク質を選択する際に思い出していただければ参考になるであろう基本的な性質を紹介する。

蛍光発色団

外から光の入らない部屋で明かりを消して蛍光ペンで書いた文字を見てみたとしても、光る文字が浮かび上がることがないことから分かるように、蛍光を観察するためには光の照射が必要となる。蛍光は、蛍光物質中の蛍光発色団が光を吸収してエネルギー準位の高い励起状態に遷移した後、元の基底状態に戻る際に発せられる吸収した光よりも長い波長の光のことを指す (図1)。蛍光タンパク質もちろん発色団を持ち、それはタンパク質を構成するβバレル構造のほぼ中心に位置している (図2a)¹⁾。蛍光タンパク質中の発色団はポリペプチド鎖中の連続した3残基の側鎖 (たとえば野生型オワンクラゲGFPでは65番目から67番目のセリン、チロシン、グリシン) が自発的に環状化、脱水、酸化を経て成熟化することにより形成される (図2b)²⁾。

励起・蛍光スペクトル

蛍光発色団がどの波長の光で励起され、どんな波長の蛍光が発せられるのかという情報は、イメージングの際に励起光と蛍光を分離するために欠かせない光学フィルターを選択するうえで必須となる。シンプルに励起、蛍光波長に関する情報をピーク波長として得ることもできるが、多色イメージングなどで複数の蛍光タンパク質を

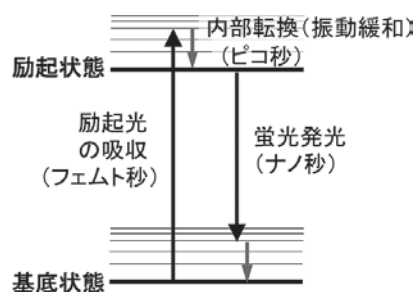


図1. 蛍光発光に関わるエネルギー状態図 (ヤブロンスキーダイアグラムと呼ばれる)

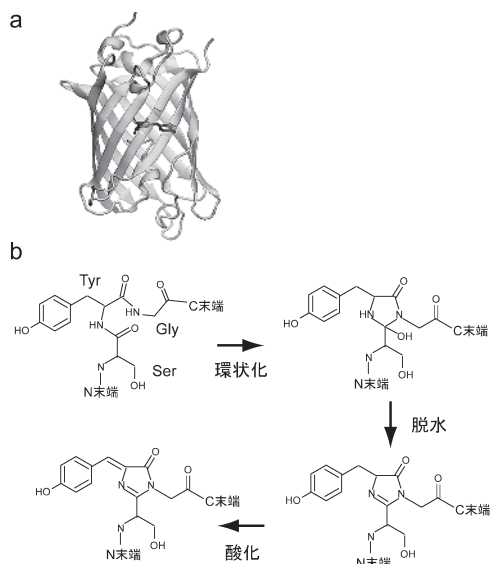


図2. (a) オワンクラゲ由来GFPの立体構造. 中心でスティック表示されているのが蛍光発色団. (b) セリン (Ser), チロシン (Tyr), グリシン (Gly) 残基からの蛍光発色団の成熟過程.

組み合わせて用いる際には、それだけでは不十分である。各蛍光タンパク質のスペクトル分布の詳細を知り、それぞれがどのようにオーバーラップしているのかを考慮して、光学フィルターを選択を行うことが重要となる。スペクトル情報はグラフやデータの表として論文や提供元のウェブサイトなどで公開されているので、使用する前には一度はどのようなスペクトル形状をしているのかを調べてみることをお勧めする(図3)³⁾。

In vivo 観察で厚みのあるサンプルをイメージングする際に用いられる2光子顕微鏡による観察では、生体透過性の良い近赤外光(波長700 nm~1000 nm)を超短パルスレーザーを用いて照射することになる。照射光のエネルギー的には2光子励起光の波長は1光子観察の場合の2倍となるはずである。しかし、実際の励起スペクトルは単純に1光子のスペクトルの波長を2倍にして描き直したのから変化していて、短波長へのシフトが起こっていたり、広がった形状になっている場合があるため、多波長のイメージングの際は注意が必要である⁴⁾。また、Förster共鳴エネルギー移動(FRET)や光スイッチングといった蛍光を介さない現象を取り入れたイメージングを行う場合には、蛍光をとまなわない光の吸収が関わるケースもあるため、吸収スペクトルについても知っておく必要がある。励起光波長の選択に吸収スペクトルが用いられていることもあるが、励起スペクトルと形状が異なる場合があることを覚えておく必要がある。

蛍光スペクトルにオーバーラップがあるような蛍光物質が混じり合った試料に対しても、試料に含まれている

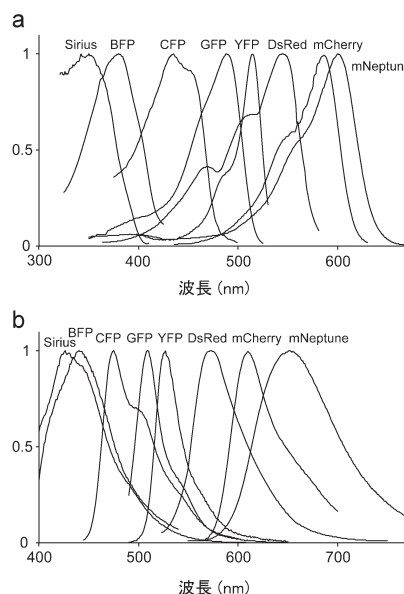


図3. おもな蛍光タンパク質の(a) 励起スペクトル, (b) 蛍光スペクトル

個々の蛍光物質の蛍光スペクトルの情報が分かっているならば、それらを参照して試料の蛍光スペクトルを成分分離してやることにより、各蛍光物質の蛍光成分がどれだけ含まれているのかを知ることができる。スペクトル共焦点顕微鏡観察では、異なる局在を示す多波長の蛍光タンパク質を含む試料に対して、蛍光スペクトルのイメージを撮影し、各蛍光タンパク質成分に分離してそれぞれの局在のイメージを取得するスペクトルアンミキシングが行われている⁵⁾。励起スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長間の差(ストークスシフト)の長い蛍光タンパク質を用いると1波長の励起光で観察できる蛍光タンパク質の幅を広げることができ、長ストークスシフトの蛍光タンパク質mKeimaを用いて異なる局在を示す6色の蛍光タンパク質の同時観察が報告されている⁶⁾。

蛍光強度

蛍光タンパク質からどの程度の強さの蛍光が発せられるのかは、どの程度の感度を持っている検出器を用いるべきなのかを検討する際に重要な情報であり、当然強い蛍光を発することのできるものが好ましい。この蛍光強度を考えるうえでは、蛍光タンパク質が励起光を吸収する能力と吸収した光のエネルギーを蛍光に変換する効率の二つの要因が関わっている。前者は光が1 Mの蛍光物質溶液を1 cmの光路で通過した際の吸光度であるモル吸光係数(ϵ : 単位 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)として評価される。後者は放出された光子数を吸収された光子数で割った、0(無蛍光)から1(効率100%)の間の値をとる蛍光量子

収率 (ϕ) で評価される。蛍光量子収率は、蛍光物質から放出される蛍光を積分球ですべて集めて測定する絶対法、もしくは蛍光量子収率が既知の標準試料と対象とする蛍光物質の蛍光強度を比較する相対法で測定される。蛍光物質の蛍光強度は基本的には、これらのモル吸光係数と蛍光量子収率を掛け合わせたものと比例関係にあるため、蛍光タンパク質間で蛍光強度を比較検討する際の目安となり得る。しかし、これらの値は精製したタンパク質を用いて *in vitro* で測定された値であるため、細胞に発現させた蛍光タンパク質の蛍光強度を完全に反映したものではない。細胞内では、蛍光タンパク質の発現量が蛍光強度に影響を与えるうえに、後に述べるさまざまな理由によって蛍光強度は変動を受けるため、(提供されている蛍光タンパク質の ϵ と ϕ が大きい) = (発現させた蛍光タンパク質が細胞内で明るく光っている) となるとは一概にはいえない。

蛍光発色団の安定性

蛍光タンパク質中の蛍光発色団は、 β バレル構造に囲まれ外部から比較的守られた環境下にあるものの、外部環境から完全に遮蔽されているわけではないため、細胞内の環境の変化による影響を受けてしまう。ほとんどすべての蛍光タンパク質はpHに対する感受性を持ち、低pHになるにつれて蛍光強度は小さくなっていく⁷⁾。pHに対する耐性は pK_a (K_a : 酸解離定数) で評価することができる。現在では蛍光タンパク質の改良が進んでいて、一般的に用いられている蛍光タンパク質のほとんどについて pK_a は生理的なpHよりも低い6以下になっているため細胞質中での観察においては特に問題はない。しかし、酸性オルガネラなどの低pH環境下でイメージングを行おうとすると、蛍光タンパク質が存在するのにもかかわらず pK_a に応じて得られる蛍光強度が小さくなったり、まったく蛍光が観察されないといったことが起こりうる。また、蛍光タンパク質で標識した観察目的のタンパク質が低pH環境へ移動していくような場合には、蛍光の減衰がタンパク質分解によるものなのかpH変化に伴う蛍光の減衰によるものなのかの判断が難しくなる。pH3以下の酸性下でも蛍光強度がまったく変化しない唯一の蛍光タンパク質としては、群青色蛍光タンパク質Siriusがある。Siriusを発現する大腸菌が細胞性粘菌の食作用により食胞の中で完全に消化されるまでの一連の過程の観察にも成功しているが、励起波長ピークが紫外領域にあり、生体試料に対して光毒性の影響が大きいことに注意しなければならない⁸⁾。pH以外にもEYFPなどのオワンクラゲ由来のYFPはハロゲン化物の影響で蛍光強度が減衰することが知られている。こういった

外部環境から受ける影響は、安定な蛍光を得るためには不利に働くが、発想を転換すれば、環境センサーとしての目的に用いることができることを意味する。実際に蛍光タンパク質を用いたpHセンサーやCl⁻センサー、そしてその両方を同時に計測することのできるセンサー(ClopHensor)が開発されてライブセルイメージングに成功している^{9,10)}。

溶液環境以外で蛍光タンパク質に影響を与える大きな要因は、観察のための励起光である。強力なパワーの光照射を行うと、光毒性により生物試料が死に至る危険性が高まるとともに、蛍光タンパク質にも影響を生じる。すなわち、蛍光発色団が不可逆的に破壊されて蛍光を発さなくなる光退色が起こる。したがって、基本的には蛍光タンパク質の選択の際には光退色の起きにくいものを選ぶことが望ましい。やむを得ず退色の速い蛍光タンパク質を用いなければならない場合には、退色を抑えるためにできる限り弱い強度の励起光を照射してしのぐことになる。この光退色についても、逆手に取って利用するイメージング手法が存在する。光退色後蛍光回復(FRAP)法では、細胞内の限定された領域内の蛍光タンパク質分子を光退色させ、その後に領域外部からの退色を受けていない分子の流入に伴う蛍光回復をタイムラプス観測することにより蛍光標識した分子の拡散の速さや相互作用を解析する¹¹⁾。また、光退色の主要な原因であると考えられている光照射による活性酸素の産生の能力を高めた蛍光タンパク質が開発され、光照射により標識した分子を破壊する発色団補助光不活性化(CALI)に用いられている¹²⁾。

光退色では光照射により不可逆的に蛍光を失ってしまうが、蛍光タンパク質によっては一度暗くなった蛍光が照射を止めるとまた元の明るさに戻る可逆的な変化である光異性化という現象が起こる。インターバルの短いタイムラプスイメージングの際に、初期に非常に速く蛍光強度が減衰し、その後光退色によるゆっくりした減衰が現れるような場合には光異性化が疑われるため、蛍光強度が安定した後の測定データを解析する必要がある。この光異性化やその他の光化学反応を増強することにより、光刺激によって蛍光強度や波長を変化させることができる光スイッチング蛍光タンパク質が開発されており、細胞・タンパク質のハイライトや最近発展が目覚ましい回折限界を超える超解像イメージングに用いられている^{13,14)}。

細胞内での発現

モル吸光係数、蛍光量子収率といった蛍光色素としての性質以外で蛍光タンパク質を発現する細胞の蛍光輝度

を変動させる要因の一つは発現量である。一般のタンパク質と同様に、高発現プロモーターを用いることにより蛍光タンパク質の発現量を高めて輝度を上げることができる。また、自分の観察する生物種に対するコドン最適化を行うことにより発現量が高まることが期待される。発現量以外ではタンパク質の折りたたみと発色団の成熟化が細胞内蛍光輝度に関与する。折りたたみ・成熟化に失敗した分子の割合が多くなることは、その分だけ蛍光輝度を落としてしまうことを意味する。また、折りたたみ・成熟化が遅いとmRNAの合成と蛍光の出現の間に大きなタイムラグを生じることになり、レポータ遺伝子として使用するには都合が悪い。蛍光タンパク質の改良の過程では、折りたたみ・成熟化に関与する変異が導入されており、論文などでは折りたたみ・成熟化の速度を指標に蛍光タンパク質間での比較が行われている。

蛍光タンパク質は改変を加えていない野生型においては、ホモ二量体やホモ四量体を形成するものが多い。単に蛍光タンパク質そのものを細胞内で発現させるのであればこのホモ多量体形成は大きな問題にはならないが、標識タグとして用いる場合には標識を施した目的のタンパク質の機能や局在に異常が生じることがある¹⁵⁾。特にアクチンやチューブリンのような繊維状構造を取るタンパク質が正しく局在しなくなることがよく知られている。このような状況を避けるために、最近では、開発した蛍光タンパク質を論文発表したり商品化したりする際には単量体化されていることが必要条件として求められているが、単量体化されていてもなお融合タンパク質として発現させることで目的のタンパク質の機能や局在に影響を与えることがある。そういった場合に効果が得られる可能性のある解決方法としては、融合させる位置(N末端, C末端, 内部挿入)を変えてみる, 目的タンパク質と蛍光タンパク質の間のリンカー配列の長さやアミノ酸の種類を変えてみる, といった工夫があげられる^{16,17)}。そして、選択の余地があるのならば、思い切って別の蛍光タンパク質に乗り換えることが解決の近道となる場合もある。

蛍光寿命

蛍光強度と波長をイメージングに応用することは比較的容易に思いつくことができるが、それ以外にも励起された蛍光分子が蛍光を放射して基底状態に戻るまでの時間を反映した蛍光寿命を用いて、蛍光寿命イメージング (FLIM) を行うことができる。蛍光タンパク質は数ナノ秒のオーダーの蛍光寿命を持つことが知られている (図1)¹⁸⁾。蛍光寿命は蛍光強度とは独立のパラメーターであるため、蛍光タンパク質間で励起波長や蛍光波長に

オーバーラップがある場合でも蛍光寿命に十分な違いがあればそれらを見分けることが可能である。蛍光寿命はFRETによっても変化するため (FRETが起こるとドナー蛍光分子の蛍光寿命が短くなる) それらを組み合わせたFLIM-FRETとしてタンパク質間の相互作用のイメージングに応用されている¹⁹⁾。

おわりに

蛍光タンパク質を用いたイメージング技術の発展は2008年の下村脩先生のノーベル賞受賞以降も衰えを知らず、センサーや超解像イメージングへの応用で発展を続けている。本稿では、蛍光タンパク質の具体例をあげることをなるべく控えて、既存の蛍光タンパク質やこれから開発されるであろう新たな蛍光タンパク質に出会った時にどのように評価すべきか、どんな問題が起こりうるのかを考えるうえでのヒントとなるような情報を提供した。蛍光タンパク質を用いたイメージングを行う機会が訪れた際には、本稿で書かれているキーワードをもとに他の解説書や文献で理解を深めながら、ご自身の研究・開発に蛍光タンパク質イメージングを大いに役立てていただきたい。

文 献

- 1) Ormo, M. *et al.*: *Science*, **67**, 509 (1998).
- 2) Reid, B. G. *et al.*: *Biochemistry*, **36**, 6786 (1997).
- 3) 宮脇敦史: 蛍光イメージング革命, 第6章3, p. 216, 秀潤社 (2010).
- 4) Drobizhev, M. *et al.*: *Nat. Methods.*, **8**, 393 (2011).
- 5) 原口徳子, 平岡 泰: 新・生細胞蛍光イメージング, 第6章, p. 43, 共立出版 (2015).
- 6) Kogure, T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **24**, 577 (2006).
- 7) Miyawaki, A. and Tsien, R. Y.: *Methods Enzymol.*, **327**, 472 (2000).
- 8) Tomosugi, W. *et al.*: *Nat. Methods.*, **6**, 351 (2009).
- 9) Benčina M.: *Sensors (Basel).*, **13**, 16736 (2013).
- 10) Mukhtarov, M. *et al.*: *Front. Mol. Neurosci.*, **6**, 9 (2013).
- 11) 木村 宏, 和田郁男: 新・生細胞蛍光イメージング, 第16章, p. 148, 共立出版 (2015).
- 12) Takemoto, K. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 2629 (2013).
- 13) 松田知己, 永井健治: 生体の科学, **65**, 101 (2014).
- 14) 永井健治, 松田知己: 1分子ナノバイオ計測, 第15章, p. 190, 化学同人 (2014).
- 15) Ai, H. W. *et al.*: *Nat. Protoc.*, **9**, 910 (2014).
- 16) 宮脇敦史: GFPとバイオイメージング, 第2章1, p. 46, 羊土社 (2000).
- 17) 宮脇敦史: 蛍光イメージング革命, 第8章1, p. 235, 秀潤社 (2010).
- 18) 中林孝和, 太田信廣: 日本レーザー医学会誌, **30**, 441 (2010).
- 19) 村越秀治, 安田涼平: 生物物理, **50**, 23 (2010).