

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

蛋白質・核酸・酵素 (1997) 42(7):1069-1074.

生体機能を見る技術 生体内部を見る 細胞・生体レベルで見る 生きた蛋白質分子
を見る 蛍光標識生物活性物質の応用

平塚寿章

生きた蛋白質分子を見る —— 蛍光標識生物活性物質の応用 ——

平塚寿章

本来の生物活性を残したままで有用な蛍光団が標識されている蛍光標識生物活性物質を使うと、細胞などの生きている系にある蛋白質分子を生かしたままで可視化できるばかりか、その生体中で挙動をリアルタイムで観察することもできる。この方法の概要と応用例、そして実験上の注意点についてまとめた。

Key words 【蛍光染色】 【蛋白質分子】 【蛍光標識生物活性物質】
【生体イメージング】

はじめに 蛍光を使って細胞など生きている系にある蛋白質分子を可視化する場合、最も注意しなければならない点は、①可視化により蛋白質分子本来の生物活性を損なわない、②目的とする蛋白質分子だけを可視化する、の2点であろう。通常、手軽に行なわれている蛍光試薬による染色で可視化すると、非特異的染色が原因となって間違った結論を導くことがある。また共有結合的および非共有結合的染色法のいずれを使っても、可視化はできたけれど染色により蛋白質は死んでしまい、その後の蛋白質の挙動が追跡不可能になったりする。ところが蛍光標識生物活性物質を使って蛋白質を可視化すると、これらの問題がほとんど起きない。それは、この方法では見たい蛋白質分子だけに特異的に結合する生物活性物質を選択してこれを蛍光標識し、得られた蛍光標識生物活性物質の本来の生物活性に基づいた生物学的親和性を利用して蛋白質を可視化するからである。つまり通常の蛍光染色法とは異なり、蛋白質にとっては“異物”を結合して可視化されていることにはならない。したがって、可視化されても問題の蛋白質は本来の性質がほとんど損なわれないうままに挙動する。ここでは、この方法の概要と注目すべき応用例、そして実験上の注意点について解説する。

1. 蛍光顕微鏡

可視化された蛋白質を観察するために使われる蛍光顕微鏡は、ほとんどの場合、励起光を対物レンズに向かって標本に照射する方式（透過型）と対物レンズを通して標本に照射する方式（落射型）のどちらかが使われている。透過型は、暗視野を背景に観察するのでコントラストのよい鮮明で明るい蛍光像が得られ、蛍光の退色も遅いなどの長所をもつ反面、強拡大では蛍光が暗く、コンデンサーの調整と保守が煩わしいなどの短所もあわせもつ。一方落射型は、観察したい視野にだけ励起光を照射でき、標本に焦点を合わせると自動的に最適の照明が得られ、コンデンサーがないので操作が簡単であるなどの長所をもつ反面、蛍光像の鮮明さとコントラストが劣り、強拡大の観察では蛍光の退色が遅いなどの短所もあわせもつ。可視化する蛋白質分子や可視化してどんな現象を観察したいかによってどちらを使うかが決まってくる。どちらか一方を用意するのであれば、同じ研究目的で長期間使用している研究者の意見を聞いて決めるのがよいだろう。

従来使われている蛍光顕微鏡での観察では、深さ、方

向などの3次元的同定は非常に困難であった。この問題を解決した装置が共焦点レーザー走査顕微鏡である。この顕微鏡を使うと、焦点のあった像だけを鮮明に観察でき、コンピュータによる画像の重ね合わせ、観察対象の立体的再構築や立体視像の作成、蛍光の定量化やスペクトルの測定などを容易に行なえる。たとえば、 Ca^{2+} などの細胞内動態は蛍光プローブを用いると従来の顕微鏡でも解析可能であるが、焦点深度が深いので細胞内の空間分布の解析は困難であった。しかし、共焦点レーザー走査顕微鏡は焦点深度が浅く、蛍光の定量化ができるので、細胞内の Ca^{2+} 分布を3次元的に観察測定することが可能である¹⁾。共焦点レーザー走査顕微鏡は細胞内の経時的な物質の移動や形態変化などの連続的観察においてはまだ問題が残るものの、これから技術の進歩とともに改良された装置が開発され、将来的にはライフサイエンス分野でますます使われるようになるだろう。

II. 蛍光標識生物活性物質のデザインと応用

蛍光標識生物活性物質を使って蛋白質分子を可視化するためには、まず対象とする蛋白質と可視化により何を観察したいかを考えて、目的に合った蛍光標識生物活性物質をデザインして調製しなければならない。現在さまざまな蛍光標識生物活性物質が市販品としても入手できるが²⁾、まだ一部のものに限られ、純度や価格の点でも不満が残る。研究目的に合ったものを各自がデザインして調製するのはそれほど困難ではない。蛍光標識生物活性物質の一般的なデザインと調製法についてはすでに総説など^{3,4)}を書いているので、ここでは重複しないように解説したい。

蛍光標識する方法と標識する蛍光分子(蛍光団)の選択は実験の成否を大きく左右する⁵⁾。注意すべき点は、母体分子である生物活性物質の活性発現に関与している部分を避け、できるだけサイズの小さな、目的に合った蛍光特性をもつ蛍光団を選んで標識することである^{3,4)}。以下に、このような目的に合った蛍光団の特性とこれを使った蛍光標識生物活性物質の応用例などについて述べたい(図1, p.1072)。

1. ビレン

ビレンは非常に疎水性の高い、青色蛍光を出す蛍光団で、分子吸光係数と蛍光量子収率は中程度であるが光安定性は比較的良好である。ビレンの特徴は、他の

多くの蛍光団と違って蛍光寿命が100ナノ秒と非常に長いので、これを結合した蛋白質の回転運動をはじめとする比較的遅い運動の解析に応用できることである。ビレンの構造から明らかなように、水に対する溶解度が低いことが欠点であるが、この点を改良するために水溶性の高いスルホン基を導入したものも開発されている。

アセチルコリンを母体分子としてビレンを標識した蛍光標識物は神経・筋接合部に特異的に結合し、非常に低濃度(μM 程度)でシナプスにあるレセプターを可視化できた⁶⁾。

2. アントラニロイル基

アントラニロイル基(Ant基)は青色蛍光を出す、分子サイズの小さな蛍光団のなかでは最も強い蛍光を出す。しかし分子吸光係数が小さいのが欠点である。

筆者らは、GTPやATPをはじめとする5'-ヌクレオチドやcAMPやcGMPの3',5'-サイクリックヌクレオチドの糖部分にAnt基を標識したヌクレオチド誘導体を開発した⁶⁻⁸⁾。これらは、さまざまな生体反応においてほとんど母体分子のヌクレオチドと同じように使うことができる⁹⁾。これは、標識されているAnt基の分子サイズが小さいために、標識ヌクレオチドが蛋白質に結合しても本来の生体反応にほとんど影響を与えないためである。

微小管を構成する主要な蛋白質のチューブリンには交換可能なGTPが1分子結合している。外からAnt-GTPを加えると、チューブリンはこれをGTPと区別できないので交換反応が起こり、Ant-GTPを結合した蛍光標識チューブリンとなる。この方法を使ってウシ脳の微小管のネットワークを可視化できた⁴⁾(カラー図1, p.1071)。

3. ダンシル基

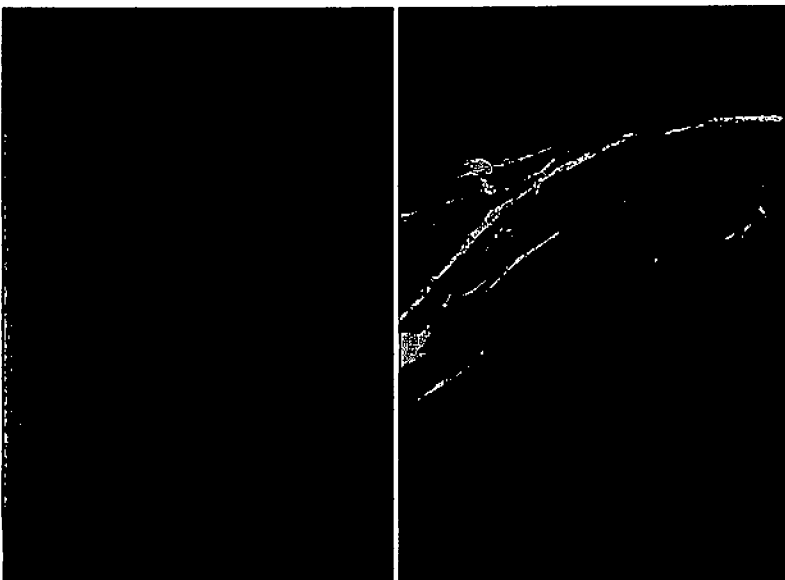
ダンシル基(Dns基)はアミノ酸や蛋白質の蛍光標識試薬として非常に早くから使われている。分子サイズが比較的小さく、いわゆるStokesシフトが長いので環境変化に対する感度が高いのが特徴で、光安定性も良好である。しかし、分子吸光係数が非常に小さいという欠点も持っている。一方、蛍光量子収率と蛍光の色調が置かれた環境に大きく依存して変化する。たとえばDns基が出す蛍光の色は、環境に依存して緑青、緑、黄、橙とさまざまに変化する。この特性は、リガンドの結合による蛋白質の構造変化などを検出するに

は非常に便利ではあるが、反面、蛋白質を可視化する場合には欠点となる。

皮膚がんの強力な発がんプロモーターであるホルポールエステル (TPA) に Dns 基を標識した Dns-TPA が開発されている⁹⁾。Dns-TPA は母体分子とほとんど



カラー図 1 Ant-GTP を結合した微小管
倍率: $\times 185$ (名古屋大学理学部 加藤豊樹氏提供)



カラー図 2 NBD-コルセミドを結合した微小管
倍率: $\times 500$ (左), $\times 185$ (右) (名古屋大学理学部 加藤豊樹氏提供)

変わらない生物活性をもち、細胞質にある TPA のレセプターやプロテインキナーゼ C などに特異的に結合するので、わずか 25 nm の Dns-TPA を用いてこれらを可視化できた⁹⁾。

4. フルオレセイン

ライフサイエンスの分野で蛍光顕微鏡を使っている研究者にとって、最も身近な蛍光団はフルオレセインであろう。分子吸光係数のみならず蛍光量子収率も非常に大きく、水に溶けやすいという長所も持っている。また、その蛍光は人間の眼にとって最も観察しやすい緑色である。しかし、いくつかの欠点もあわせている。一番問題になるのは、光安定性が悪く蛍光顕微鏡で観察中に蛍光の退色が起きてしまうことである。また pH が 8 付近より低くなると蛍光強度が急に減少することも欠点といえる。一方、蛍光標識生物活性物質をデザインする場合、その大きな分子サイズも欠点となる。しかしながらフルオレセインで可視化された像の素晴らしさには捨てがたいものがあり、これが現在でも最もよく使われている理由であろう。

フルオレセインの分子サイズは大きいので、蛍光標識生物活性物質をデザインする場合、標識部位の選び方を間違えるとほとんど生物活性の残っていないものを調製する結果となる。これはとりわけ母体分子が低分子化合物になればなるほど大きな問題となってくる。し

かし、アルキル基などのアームを伸ばすなどの工夫をして、できるだけ蛍光団を母体分子から離して標識すれば、かなり生物活性の残っている蛍光標識生物活性物質を調製できる。たとえば、ペプチドホルモンであるリシンバソプレシンを母体分子として、生物活性のかなりよく保存されたものが開発されている。これを使って細胞表面にあるバソプレシンレセプターをはっきりと可視化できた¹⁰⁾。

フルオレセインの大きな分子サイズは、標識される母体分子が蛋白質である場合はそれほど問題にはならない。これは、この蛍光団が抗体を標

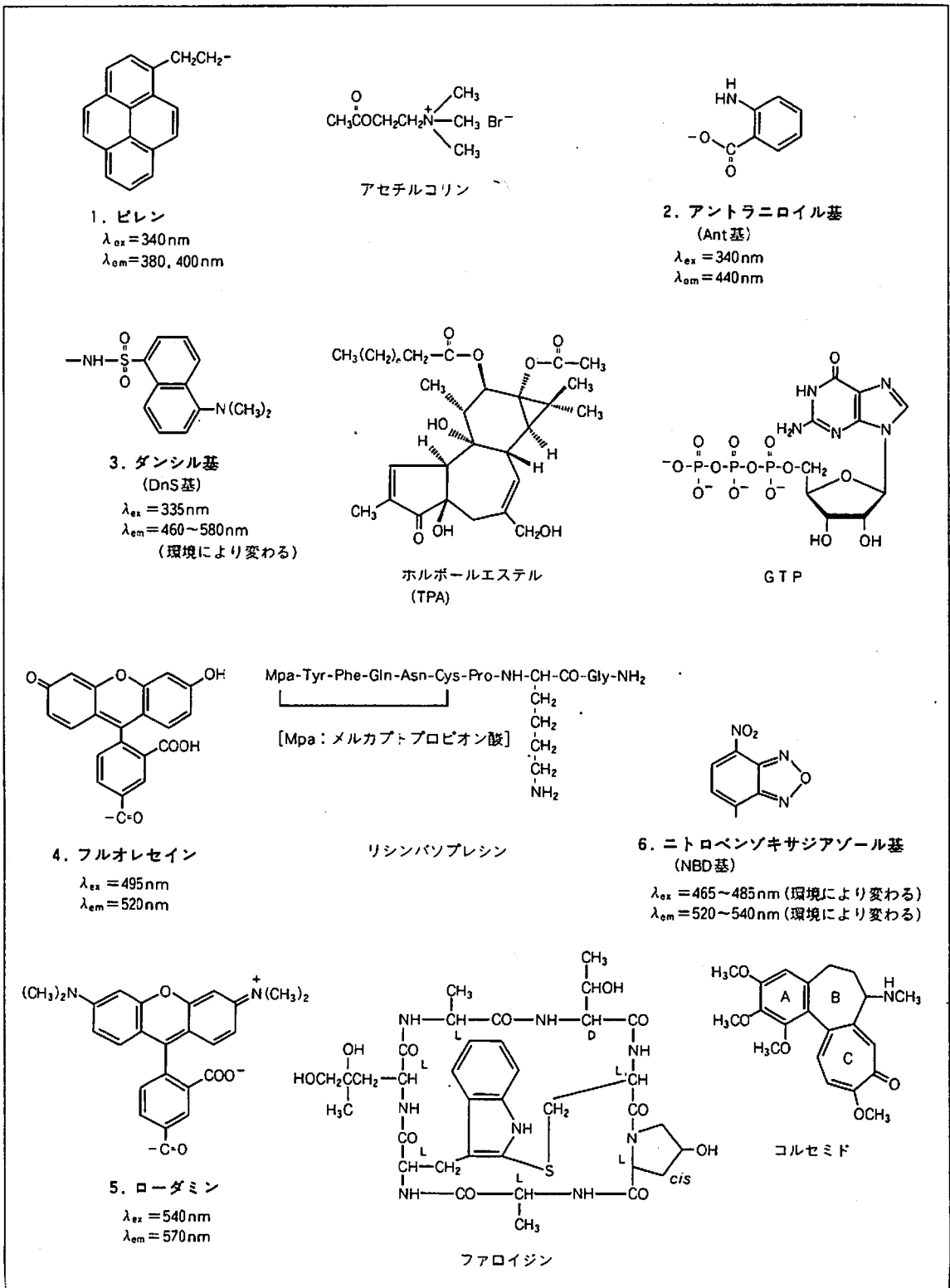


図 1 蛍光団の構造および蛍光特性と標識された生物活性物質の構造
 λ_{ex} : 励起波長, λ_{em} : 蛍光波長.

識するのによく使われていることからもうかがえる。チューブリンなどの微小管蛋白質やアクチンは可逆的に重合・解離する生物活性をもつ。この性質を利用すると、生物活性を損なわないようにして蛍光標識したこれらの蛋白質と重合する非標識蛋白質も可視化できる。

フルオレセインを標識してもチューブリンの重合活性はほとんど元と同じで、非標識チューブリンに対する親和性も変化しない。このチューブリンをマイクロインジェクション法で生細胞に入れると、細胞内のチューブリンも可視化でき、続いて起きる微小管のネットワーク形成の様子もリアルタイムで追跡できた¹¹⁾。同様にアクチンにフルオレセインを標識しても本来の生物活性は損なわれない。マクロファージに注入された蛍光標識アクチンはただちに細胞骨格系に組み込まれ、細胞内におけるアクチンの分布状態をリアルタイムで観察できた¹²⁾。

5. ローダミン

ローダミンはフルオレセインと同様に高い分子吸光係数と蛍光量子収率をもつ。しかしフルオレセインと違って光安定性が良好で、より長波長の赤色蛍光を出し、蛍光強度は生理的 pH 付近ではほぼ一定であるという長所をもつ。一方、分子中にジメチルアミノ基を2つもつことにより水溶性が低くなり、分子サイズもフルオレセインよりさらに大きくなるという欠点もある。しかし光安定性がよいので、可視化後のリアルタイム測定に適しており、蛍光標識生物活性物質の蛍光団としてよく使われている。

アクチンに特異的に結合する毒ペプチドのファロイジンを母体分子としたローダミンファロイジンを使うと非常に簡単にアクチンを可視化できる¹³⁾。この方法は特異性も高く、蛍光抗体法に比べて短時間で手軽に実行できるので、現在までの応用例はかなりの数になる。

筋肉蛋白質のミオシン分子は ATPase 活性とアクチン結合能をもつ重鎖部分 (HC) とこれに結合している低分子量の軽鎖部分 (LC) からなっている。ニワトリの骨格筋ミオシンから単離した LC にローダミンを標識してもミオシン HC に結合する活性は損なわれない。この蛍光標識 LC を生きている筋細胞や非筋細胞にマイクロインジェクション法によって入れるとミオシン分子が可視化され、細胞質分裂の進行に伴ってミオシン分子が赤道付近に集まり、続いて形成される分裂溝に集積されていく様子をリアルタイムで観察できた¹³⁾。

6. ニトロベンゾキサジアゾール基

ニトロベンゾキサジアゾール基 (NBD 基) は、分子吸光係数や蛍光量子収率はフルオレセインやローダミンより小さいものの、蛍光標識生物活性物質に使う蛍光団としては最も理想的である。NBD 基が出す黄色蛍光は比較的強く、そのうえフルオレセインやローダミンよりも光安定性が良好で、蛍光の pH 依存性も非常に小さい。しかし、何よりも NBD 基が優れている点は、分子サイズの小さなことと細胞毒性がほとんどないことであろう。このためさまざまな生物活性物質を NBD 基で標識しても、多くの場合本来の生物活性はかなりよく残されており、細胞を使った研究などにも広く使用されている。

ユリ科のイヌサフランに含まれているアルカロイドのコレヒチンはチューブリンに特異的に結合する。コレヒチンの B 環の構造を少し変えて、メチルアミノ基を置換したものがコレセミドである (図 1)。コレセミドはコレヒチンと同じ生理作用をもつが、その生物活性はより強い。

筆者らは、コレセミドの A 環と C 環は活性発現に関与しているが B 環は活性発現にそれほど関与していない点に着目し、チューブリンを可視化する目的でコレセミドのメチルアミノ基に NBD 基を標識した NBD-コレセミドを開発した¹⁴⁾。NBD-コレセミドの生物活性は元のコレセミドとほとんど変わらず、チューブリンのヘテロ 2 量体あたり 1 mol が 10^6 M 程度の結合定数で強く結合した。

蛍光標識生物活性物質と蛋白質の相互作用を考えると、標識されている疎水性の蛍光団と蛋白質の疎水性アミノ酸残基どうしの相互作用に起因する非特異的結合の可能性を考えなければならない。NBD-コレセミドについてもこの可能性が検討されている¹⁵⁾。その結果、①蛍光団である NBD 基だけではチューブリンに結合しないこと、②尿素やグアニジン塩酸などの変性剤でチューブリンの高次構造を壊すと NBD-コレセミドはまったく結合しなくなること、③コレヒチン存在下では、NBD-コレセミドはチューブリンにまったく結合しないこと、④逆に NBD-コレセミドが結合しているとコレヒチンの結合が著しく阻害されること、⑤血清アルブミン、リゾチーム、パパイン、ヘキソキナーゼ、リプレッサーなどのさまざまなタイプの蛋白質への結合の程度は、チューブリンへの結合に比べて 2~16% しかないことなどから、NBD-コレセミドはチューブリンに対してコレセミドやコレヒチンと同じように特異的

に相互作用し、非特異的結合の心配はまったく無用であることがわかった。

NBD-コレシドを470 nmで励起すると、530 nm付近にピークをもつ強い黄色蛍光が出る。たいへん都合なことに、この蛍光はチューブリンに結合すると十数倍にも強くなる。このため、ウシ脳のチューブリンを重合させてプレパラート上に置き、これにNBD-コレシドを添加するだけでチューブリンのネットワークを可視化できた(カラー図2, p.1071)¹⁴⁾。結合していないNBD-コレシドの蛍光は、蛍光顕微鏡下ではほとんど観察できないほど弱かった。

III. 実験上の注意点

蛍光標識生物活性物質を使って目的とする蛋白質を可視化する場合、最低、以下の点をチェックする必要がある。これらは、NBD-コレシドの応用例でも具体的な手順が述べられているが、ここにもう一度一般的注意としてまとめておく。

(1) 可視化の実験を行なう前に、蛍光標識生物活性物質の生物活性が標識前に比べてどれくらい残っているかを生化学的方法で定量的に調べる。

(2) 標識されている蛍光団だけでは蛋白質が可視化されないことを確かめる。

(3) 過剰の非標識母体分子の存在下で蛍光標識生物活性物質を加えても可視化されないことを確かめる。

(4) これとは逆に、蛍光標識生物活性物質を結合して可視化されている標本に過剰の非標識母体分子を加え、蛍光像が見えなくなることを確かめる。ただし、このチェックは実際にはうまくいかないこともある。このような場合でも、(3)が確かめられたら十分である。

以上、少なくとも(1)~(3)をチェックし、満足する結果が得られたなら、目的とする蛋白質を特異的に生かしたままで可視化していると考えて間違いないであろう。これらを十分に行なわずに結論を出してしまい、あとになって非特異的結合に起因するアーティファクトであることが判明したケースはいくつもある。

おわりに 蛍光標識生物活性物質を使って蛋白質分子

を生かしたままで可視化する方法のメリットは、何といてもその高い選択性と、可視化だけに終わらずにその蛋白質が生体反応で実際に活性を発現している様子をリアルタイムで感度よく観察できる点にある。この方法の欠点は、目的とする蛋白質にだけ特異的に結合する生物活性物質を必要とし、さらにこの活性を損なわずに蛍光標識された誘導体を入手しなければならないことである。しかしながら、この目的に合ったさまざまな蛍光標識生物活性物質の開発は年ごとに盛んになり、市販品として入手できる品目も増え続けている。以上のことを考えあわせると、ここで述べた可視化の方法は今後さらに発展していくものと期待される。

文 献

- 1) 梶谷文彦・徳田周子：蛋白質 核酸 酵素, 39, 1911-1919 (1994)
- 2) Haugland, R. P.: *in Handbook of fluorescent probes and research chemicals* (6th ed.), Molecular Probes 社, Eugene (1996)
- 3) 平塚寿章：蛋白質 核酸 酵素, 39, 2322-2334 (1994)
- 4) 平塚寿章：現代化学, 283, 20-25 (1994)
- 5) Barrantes, F. J., Sakmann, B., Bonner, R., Eibl, H., Jovin, T. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3097-3101 (1975)
- 6) Hiratsuka, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 742, 496-508 (1983)
- 7) Hiratsuka, T.: *J. Biol. Chem.*, 257, 13354-13358 (1982)
- 8) Hiratsuka, T.: *J. Biochem.*, 96, 147-154 (1984)
- 9) Liskamp, R. M. J., Brothman, A. R., Arcoleo, J. P., Miller, O. J., Weinstein, I. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 131, 920-927 (1985)
- 10) Lutz, W. H., Londowski, J. M., Kumar, R.: *J. Biol. Chem.*, 265, 4657-4663 (1990)
- 11) Keith, C. H., Feramisco, J. R., Shelanski, M.: *J. Cell Biol.*, 88, 234-240 (1981)
- 12) Amato, P. A., Unanue, E. R., Taylor, D. L.: *J. Cell Biol.*, 96, 750-761 (1983)
- 13) Mittal, B., Sanger, J. M., Sanger, J. W.: *J. Cell Biol.*, 105, 1753-1760 (1987)
- 14) Hiratsuka, T., Kato, T.: *J. Biol. Chem.*, 262, 6318-6322 (1987)
- 15) Sengupta, S., Puri, K. D., Surolia, A., Roy, S., Bhattacharyya, B.: *Eur. J. Biochem.*, 212, 387-393 (1993)