

# フォトクロミック蛍光タンパク質を使って探る 生体分子ダイナミズム

宮脇 敦史

## Photochromic Fluorescent Proteins for Cellular Imaging

Atsushi MIYAWAKI

Protein diffusion and transport are dynamically regulated within cells. Here we outline the development of a monomeric fluorescent protein that displays photochromism. While the protein absorbs at 503 nm and emits bright green fluorescence, it can be converted by strong irradiation at 488 nm to a non-fluorescent state absorbing at 390 nm, and can be switched back to the original emissive state with minimal irradiation at 405 nm. The light-induced conversion between the bright and dark states can be repeated over 100 times, creating a protein with a molecular memory usable as a multiple-use read/write medium. These photochromic characteristics provide an unprecedented technique for studying fast protein dynamics at multiple time points in individual cells. Through repeated labelling of the same regions, we observed the real-time flow of mitogen-activated protein kinase across the nuclear envelope, demonstrating that its nucleocytoplasmic shuttling rate increased following growth factor stimulation.

**Key words:** fluorescent protein, photochromism, nucleocytoplasmic shuttling, optical highlighting, mitogen-activated protein kinase

生体分子は、生きて細胞の中で活発に動いている。動力の種類によって、“拡散”あるいは“輸送”とよばれる。細胞内で起こる現象の時間的・空間的パターンの機構を理解するためには、そこで活躍する生体分子の動きを把握しなければならない<sup>1)</sup>。拡散に関していえば、ある生体分子が拡散する度合いと他の分子と出会って反応する度合いとのバランスが重要となる。たとえば、反応の度合いが拡散の度合いに比べてはるかに大きいと、現象の時間的・空間的パターンの変化はその生体分子の拡散によって決定される可能性が高くなる（拡散律速）。生体分子を特異的にラベルしそのシグナルを経時観察する技術が進歩したおかげで、生体分子の動き、そして細胞内現象の時間的・空間的パターンの機構に関するわれわれの知見は膨らみつつある<sup>2)</sup>。

生体分子の動きを解析するアプローチを、大きく2つに分けることができる。

1) 多分子イメージング：生体分子に蛍光ラベルして蛍

光シグナルを追跡する蛍光イメージングの大半は、多分子イメージングである。しかし、得られるシグナルは多数の分子の平均である。一般的には、ラベルされた生体分子の分布の定常状態を観察することしかできない。細胞外刺激によって、たとえば細胞質から核へあるいは形質膜へ、ラベルされた生体分子が集団移動するような大まかな変化は捉えられやすいが、動きに関する定量的な情報は得られにくい。

2) 一分子イメージング：一分子イメージングは、個々のラベルされた生体分子の挙動を追跡する。動きや反応の素過程にまで踏み込むことができる。多数回の観測から、注目する生体分子の平均的な挙動について情報を得ることができる。一分子イメージングは、日本の生物物理が世界をリードする技術分野である。しかし、一分子イメージングの生細胞への適用に関しては、まだ技術的課題が多い。局所的な照明によって背景光を減らしS/N比を上げることを基本とするた

め、観察する領域が三次元的に小さい。個々の観察時間も短い。ラベルが蛍光であると、蛍光色素の退色によって観察が中断してしまう危険性ははらむ。したがって一分子イメージングでは、細胞の生理的コンテキストに沿う知見が得られにくい。それでも、生細胞の形質膜における受容体やシグナル伝達分子の、膜との相互作用、膜上での拡散や会合などに関して、多くの細胞生物学者の興味をひく研究成果が出てきている<sup>3-5)</sup>。

### 1. 光感受性の蛍光タンパク質の開発

生細胞における多分子蛍光イメージング技術は、green fluorescent protein (GFP) などオワンクラゲやサンゴ・イソギンチャクに由来する蛍光タンパク質の開発によって、ここ10年の間に飛躍的に進歩した<sup>6,7)</sup>。純タンパク質性の蛍光色素ゆえに、遺伝子工学的手法を用いることで生体分子を蛍光でラベルすることができる。近年、この技術領域において、生体分子の動きを解析するための多分子イメージング技術が洗練されてきた。従来は蛍光の退色を用いるFRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 技術が使われていたが、ある領域内の蛍光の退色を完遂するのに時間がかかるため、遅い動きしか追跡できないという問題があった。光をあてることで生体分子の蛍光を瞬時にスイッチオンする技術 (光で任意に分子をラベルする技術) が蛍光タンパク質と組み合わせさせたのは2002年のことである。PA (photoactivatable)-GFP<sup>8)</sup>、Kaede<sup>9)</sup>、PS (photoswitchable)-CFPなどの蛍光タンパク質が登場した。しかし、これら蛍光タンパク質の光ラベルは不可逆的である。1つの生細胞につき1回のラベルしか施行できない。生体分子の動きを、ある時間1点でしか追跡できないことになる。生体分子の動きは、刺激の前後などで変化することが予想される。同一の細胞で何回も繰り返して生体分子の動きを観測するためには、定期的にリセットをかけて (以前にラベルした蛍光を消去して) 新たに光ラベルし動きを観測できるような技術が必要となる。

### 2. フォトクロミック蛍光タンパク質の開発

そこで、筆者らが2004年に報告した技術を紹介する。ウミバラ科の石サンゴに由来する新規緑色蛍光タンパク質に遺伝子変異を加えることによって、フォトクロミックな性質を示す変異体を開発することができた<sup>10)</sup>。普段は、青色領域に吸収をもっており、青色のかなり弱い光 (1~5 mW/cm<sup>2</sup>) をあてると明るい緑色の蛍光を発する。ところが、青色の光を非常に強くあてる (0.1~0.5 W/cm<sup>2</sup>) と、



図1 ガラスに塗った Dronpa に顕微鏡を用いて描いた文字。はじめに背景をアルゴンレーザーで消去し、その上から紫色半導体レーザーで字を描く、という作業を繰り返した。

その吸収帯がなくなって、代わりに紫色領域に吸収が現れてくる。次に、紫色の光を弱くあてる (10~100 mW/cm<sup>2</sup>) と、瞬時に、最初の状態にもどる。異なる2つの波長の光で、緑色蛍光のオン (青色領域に吸収がある場合) と緑色蛍光のオフ (紫色領域に吸収がある場合) とを繰り返すことができる。緑色蛍光の消失、出現を、それぞれ、“Dron (忍者用語で姿をくらますこと)”, “pa (光活性化, photo-activation に由来)” になぞらえ、このタンパク質を「Dronpa (ドロンパ)」と命名した。オン状態およびオフ状態の構造を決定し両者を比較することで、Dronpa フォトクロミズムの分子機構の解明に挑んでいる。

Dronpa をカバーガラスの上に一様に塗り広げ、アルゴンレーザー (488 nm) と半導体レーザー (405 nm) を搭載した通常の共焦点レーザー走査顕微鏡を使って、緑色蛍光の消去、書き込み、読み出しを行うことができる (図1)。これは、「書き換え可能な分子メモリーシステム」とよぶことができる。CD-RW や DVD-RW に相当するものといえる。ジアリールエテンなどの有機化合物などが光メモリーの新材料として注目されているが<sup>11)</sup>、フォトクロミック蛍光をタンパク質で実現したのは今回の成果がはじめてである。遺伝子導入で発現可能、水環境で動作可能、生分解可能といったバイオマテリアルとしての特徴を生かした応用が期待できる。

### 3. 反復的光マーキング技術の細胞生物学への応用

筆者らは、Dronpa を使った可逆的光ラベル技術を細胞生物学実験に応用した。細胞内には、外界の刺激にตอบสนองして、細胞質と核とを行ったり来たりする分子がたくさんある。なかでも、MAP kinase (MAPK) とよばれる酵素は有名である。EGF (epidermal growth factor) などの増殖因子の刺激が来ると、細胞質から核へ移行し、さまざまな転写因子をリン酸化して遺伝子発現を制御すると考えられている。しかし、GFP 融合 MAPK を使った多分子イメージングでは、この分子の定常的分布の変化しか探ることができない。そこで、Dronpa 融合 MAPK (MAPK-Dronpa) を作製し培養細胞に発現させた。全体の蛍光を消去したあと、細胞質にある MAPK-Dronpa を光ラベルし、それらが核へ移行するさまを観察し、その後再び全体を消去し、今度は核にある MAPK-Dronpa を光ラベルし、それらが

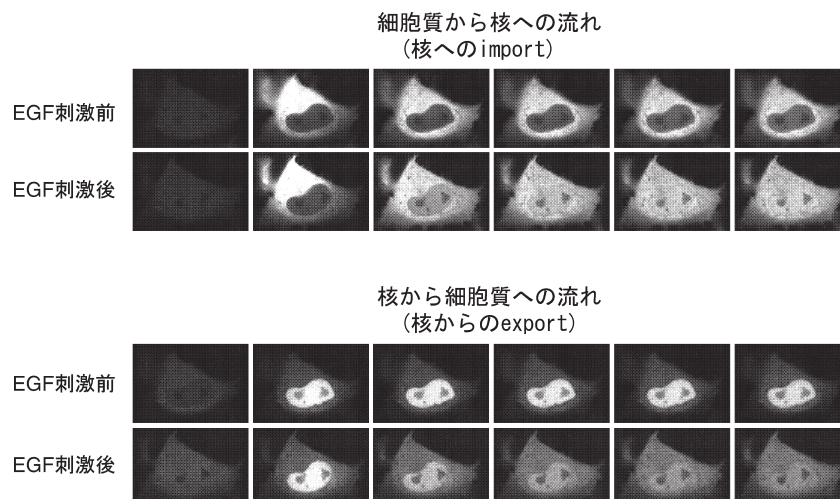


図2 Dronpa 技術を用いて観察した、培養細胞における MAPK の動態. EGF 刺激によって、細胞質→核の移行および核→細胞質の移行、両方が亢進することがわかる。

細胞質へ移行するさまを観察した。核への移行、細胞質への移行ともに効率が低いことが認められた (図2, EGF 刺激前)。続いて、同じ細胞に EGF をふりかけたうえで、上記の細胞質→核、核→細胞質を観る実験を何回も繰り返した。EGF 添加後 10~15 分してから、MAPK-Dronpa の移行が両方向性に亢進するのが観察された (図2, EGF 刺激後)。核における MAPK の情報制御が、この酵素の細胞質-核間のシャットリング (行き来) のスピードによって制御されている可能性を示すことができた。

#### 4. フォトクロミック蛍光タンパク質がもたらすイメージング技術革新の展望

Kaede や Dronpa のような蛍光タンパク質の登場によって、蛍光イメージングのための生物顕微鏡に変革が起こりつつある。蛍光タンパク質のシグナルを観察するための照明光学系に加えて、蛍光タンパク質の特性をコントロールするための照明光学系が独立に導入された顕微鏡システムが開発されてきている。生体分子ダイナミズムの時間的・空間的制御を解析するのに活躍している。さらに昨今、近接場顕微鏡法以外のアプローチで、光学顕微鏡における空間分解能を向上させたという報告がなされている。STED 顕微鏡 (stimulated emission depletion microscopy)<sup>12)</sup> や PALM (photoactivated localization microscopy)<sup>13)</sup> が有名である。これらいずれにも、Dronpa のフォトクロミズムが活用される可能性が高い。200 nm 以下のサイズの構造体の時間的変化を、生きたサンプルの中で追跡できると期待される。

フォトクロミック蛍光タンパク質そのものにも進展がある。筆者らは変異導入を繰り返すことによって、Dronpa

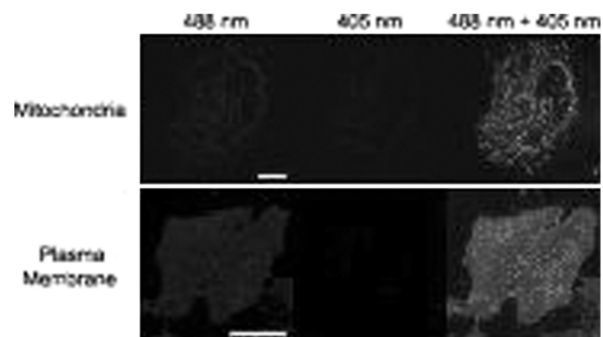


図3 Dronpa-3 を HeLa 細胞のミトコンドリア (上) または形質膜 (下) に発現させ、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。左から、488 nm 単独照射、405 nm 単独照射、488 nm プラス 405 nm 照射で観察した蛍光画像。

の光スイッチの効率を飛躍的に向上させることに成功した。新しい Dronpa 変異体を Dronpa-3 と命名した<sup>14)</sup>。Dronpa-3 に青色光を照射すると直ちにオフ状態に移行するため、緑色の蛍光シグナルは実質的に得られない。一方、Dronpa-3 に紫色光を照射しても、オン状態にもどるのみで緑色の蛍光はまったく得られない。ところが、青色光と紫色光を同時に照射すると、Dronpa-3 がオン状態とオフ状態との間で往復し、励起オン状態のポピュレーションを増やすことができる。結果、明るい緑色の蛍光シグナルを得ることができるのである (図3)。たとえば、488 nm のレーザービーム (青色光) と 405 nm のレーザービーム (紫色光) を別々の対物レンズを通して、Dronpa-3 を発現するサンプルに同時に照射するような実験を考案している。Dronpa-3 の蛍光シグナルは2つのレーザービームの交点でのみ発生するので、シグナルは wide-field 検出モードで効率よく取り込むことができそうである。ゼブラフィ

ッシュやショウジョウバエなどの発生個体における蛍光イメージングに役立つものとして技術開発を推し進めている。

## 文 献

- 1) A. Miyawaki: "Innovations in the imaging of brain functions using fluorescent proteins," *Neuron*, **48** (2005) 189-199.
- 2) A. Miyawaki: "Fluorescent proteins in a new light," *Nat. Biotechnol.*, **22** (2004) 1374-1376.
- 3) T. Tani, Y. Miyamoto, K. E. Fujimoto, T. Taguchi, T. Yanagida, Y. Sako and Y. Harada: "Trafficking of a ligand-receptor complex on the growth cones as essential step for the uptake of nerve growth factor at the distal end of the axon: A single-molecule analysis," *J. Neurosci.*, **25** (2005) 2181-2191.
- 4) A. D. Douglass and R. D. Vale: "Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells," *Cell*, **121** (2005) 937-950.
- 5) K. Suzuki, K. Ritchie, E. Kajikawa, T. Fujiwara and A. Kusumi: "Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques," *Biophys. J.*, **88** (2005) 3659-3680.
- 6) A. Miyawaki: "Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling," *Dev. Cell*, **4** (2003) 295-305.
- 7) A. Miyawaki, A. Sawano and T. Kogure: "Lighting up cells: Labeling proteins with fluorophores," *Nat. Cell Biol.*, (2003) S1-7.
- 8) G. H. Patterson and J. Lippincott-Schwartz: "A photo-activatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells," *Science*, **297** (2002) 1873-1877.
- 9) R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno and A. Miyawaki: "An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99** (2002) 12651-12656.
- 10) R. Ando, H. Mizuno and A. Miyawaki: "Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting," *Science*, **306** (2004) 1370-1373.
- 11) M. Irie, S. Kobatake and M. Horichi: "Reversible surface morphology changes of a photochromic diarylethene single crystal by photoirradiation," *Science*, **291** (2001) 1769-1772.
- 12) K. I. Willig, S. O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn and S. W. Hell: "STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis," *Nature*, **440** (2006) 935-939.
- 13) E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Lenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz and H. F. Hess: "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science*, **313** (2006) 1642.
- 14) R. Ando, C. Flors, H. Mizuno, J. Hofkens and A. Miyawaki: "Highlighted generation of fluorescence signals using simultaneous two-color irradiation on Dronpa mutants," *Biophys. J.*, **92** (2007) L97-L99.

(2007年8月11日受理)