



技術解説

細胞内情報伝達系を生きた細胞で可視化する

松田 道行*

Visualizing the intracellular signal transduction in living cells

Key Words : Fluorescence resonance energy transfer, imaging, G proteins, kinase

1. はじめに：なぜ情報伝達の可視化が必要なのか？

21世紀生物学の野望は細胞をコンピューター上の仮想空間で再現することにある。例えば3万個のヒトの蛋白群から、1個の細胞を再構成することを考えよう。最初に、1個の細胞に発現している蛋白の種類が幾つか、そしてそれらがいくつつあるかを知る必要がある。ついで、個々の蛋白の活性を座標と時間を変数とする関数として表す必要がある。最後に、これらの関数群をもとにした人工細胞を仮想空間に作るという手順だろう。しかし、いざやろうとすると我々は最初から大きな障壁にぶつかることになる。これまでの生物学躍進の原動力であった生化学・分子生物学の手法は、細胞を集団として解析するので、個々の分子がいつ、どこにあるかという時空間パラメータを全く与えてくれないからである。ここに、21世紀の生物学を立ち上げるためには、分子機械である蛋白の活性を、生きた細胞で可視化するテクノロジーが是非とも必要性だという理由がある。

2. 細胞内情報伝達を可視化する技術

細胞内情報伝達を可視化する試みはここ数年でようやく成功の兆しが見えてきた。嚆矢となったのは、TsienらのcAMPのイメージングであるが^[1]、この技術が広がるきっかけになったのは宮脇らの緑色蛍光蛋白を用いたカルシウムイメージングの成功

だ^[2]。われわれは、この技術をさらに発展させて、G蛋白やチロシンリソ酸化酵素の活性化イメージングに成功している^[3-6]。現在、筆者らが使っている方法の基礎となるのは緑色蛍光蛋白(Green fluorescence protein, GFP)を用いた蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescent resonance energy transfer, FRET)という原理である。まずこのキーワードを解説しよう。

① 緑色蛍光蛋白： 緑色蛍光蛋白とは、オワンクラゲより単離された蛋白β缶構造と呼ばれる筒状の構造をしており、この内部のアミノ酸が変化して蛍光発色団が形成される。このような蛍光蛋白は、遺伝子としてその材料が提供されうるという点で、他の化学合成される蛍光物質や、補酵素を必要とする発光システムに対し大きな優位性を有している。すなわち、目的とする蛋白の遺伝子と蛍光蛋白の遺伝子とを結合することで、「蛍光標識された蛋白」の遺伝子を作ることができるからだ。遺伝子として供給できれば、細胞内への導入が簡単、細胞内で定常的に発現させることができる、などなど数多くの分子生物学的技術の利点を使える。

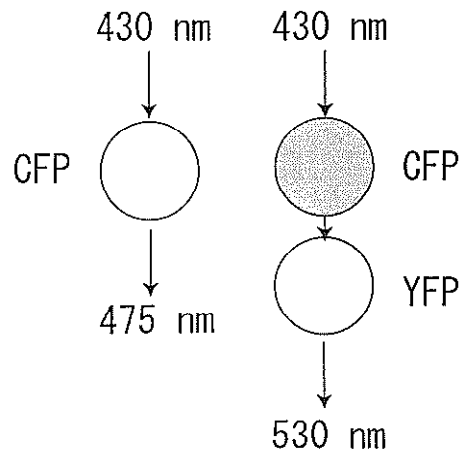


図1 FRETの概念図



* Michiyuki MATSUDA
1958年4月生
1987年東京大学大学院医学系研究科第3基礎医学専門課程(病理学)修了
現在、大阪大学微生物病研究所・腫瘍ウイルス分野、教授、医学博士、腫瘍学
TEL 06-6879-8316
FAX 06-6879-8314
E-Mail matsudam@biken.osaka-u.ac.jp

②蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)： 蛍光共鳴エネルギー移動の厳密な定義はここではスキップして、実際に蛍光蛋白を使つての蛍光共鳴エネルギー移動がどのようなものか説明しよう(図1)。二つの蛍光蛋白、シアン蛍光蛋白(CFP)と黄色蛍光蛋白(YFP)とを使う。CFPは430nmの光で励起すると475nmのシアン色の蛍光を発生し、YFPは500nmの光で励起すると530nmの黄色の蛍光を発生するものである。さてここで、CFPとYFPとがごく近傍(約7nm以内といわれている)にあると、CFPを430nmの光で励起されたCFPのエネルギーがYFPへ遷移し、YFPからの黄色の蛍光が観察できる。この現象をFRETという。このFRETを上手に使うことにより「情報伝達を行っている最中の特異的分子間結合」と「個々の情報伝達分子の構造変化」とを可視化するのである。

3. FRET を用いた分子プローブ群

さて、3万といわれる細胞内蛋白全ての可視化を最初から狙うのは得策ではない。筆者らは、細胞内情報伝達系のキープレイヤーである、リン酸化酵素とG蛋白の活性化を可視化することで、情報伝達の大要を押さえるという戦略を立てた。名づけてPhosphorylation and Guanine Nucleotide Exchange Monitoring Project 略してPHOGEMONプロジェクトである。以下に代表的なプローブRaichuを解説する^[3]。低分子量G蛋白、あるいはRasスーパーファミリーG蛋白と呼ばれる分子群は20-30kDaの分子量を有し、GTPに結合したOnとGDPに結合したOffの状態を持つ分子スイッチである。Onになると、そのエフェクタードメインと呼ばれる領域に

さまざまな酵素が結合し、下流へと情報を伝える。そこでこの分子群の活性化は、G蛋白とその標的分子との結合を指標に検出することにした。最も代表的なG蛋白であるRasの場合は、標的分子の中のRafセリンスレオニンリン酸化酵素を道具に用いた。活性化モニターRaichuの構造は図2に示したとおりである。すなわち、G蛋白の活性が低いときにはRasとRafが離れているので、FRETはおきない。ところが、Rasが活性化されGTP結合型になるとRafに結合するので、YFPとCFPとの距離が近くなってFRETがおきる。

4. 画像化の実際

最後に、細胞内情報伝達系の可視化の方法を具体的に解説する(図3)。まず、分子プローブをコードする遺伝子をガラス底のプレートに培養した細胞内に導入し、細胞内で蛋白として発現させる。この細胞を倒立型蛍光顕微鏡で観察する。蛍光顕微鏡には、励起フィルター、蛍光フィルターを高速で交換するためのフィルターチェンジャー、高感度冷却CCDカメラ、これらの機械をコントロールし、かつ画像を解析するためのPCが付属している。FRETが起きているかどうかを観察するには、まず、430nmの光を当て、CFPの蛍光像を撮影し、ついで、同じ430nmの光を当て、FRETによるYFPの蛍光像を撮影する。CFPとYFPの画像から、各画素ごとにFRETの効率を計

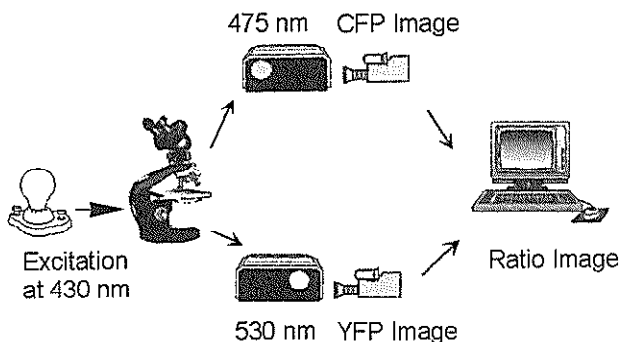


図2 低分子量Gタンパクのモニター分子Raichuの構造

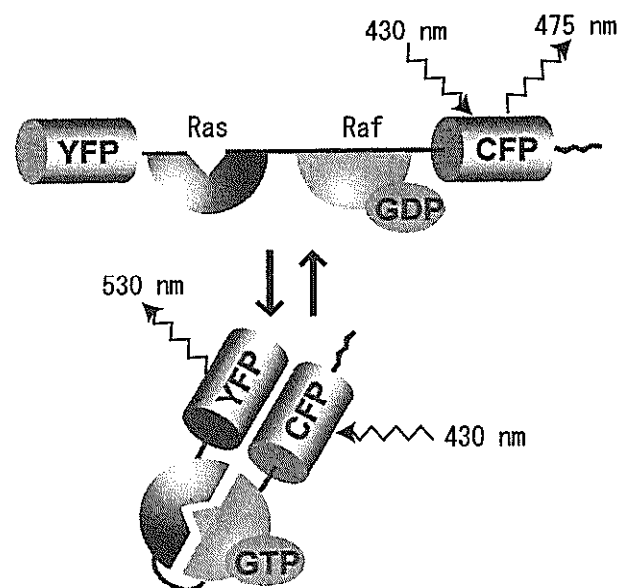


図3 イメージングの方法

算し, FRETが起きていれば赤, 起きていなければ青の色を与え, 擬似カラーによるFRET画像として表示する. 実際の画像をお示ししたいのだが, カラーの動画をこの紙面で見せるのはさすがに無理がある. 是非, Web上のビデオ画像をご覧いただきたい (www-tv.biken.osaka-u.ac.jp/e-phogemon/). 今や細胞内情報伝達は目で見える時代であるのが実感いただけると思う.

5. 細胞内情報伝達系のシミュレーションへ向けて

このように分子モニターを使うことにより, 個々の情報伝達分子が細胞内のいつ, どこで, どのようにに活性変化するかが追跡できる. 次のステップは, これらの情報を詳細に解析し, その制御機構を数式化し, コンピューター上でシミュレーションすることである. 今後は, このような画像データをもとにしたシミュレーションやモデル構築の研究が進むだろう. 特に, 情報系のシステムバイオロジーの研究者と実験にベースを置くシミュレーションの研究者とが手を取り合って研究を進めることが, 21世紀の課題であるバーチャル細胞の発展には必須と考えている.

7. 文 献

- [1] S.R. Adams, A.T. Harootunian, Y.J. Buechler, S.S. Taylor, and R.Y. Tsien. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* 349 : 694 - 697, 1991.
- [2] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J.M. McCaffery, J.A. Adams, M. Ikura, and R.Y. Tsien. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388 : 882 - 887, 1997.
- [3] N. Mochizuki, S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki, and M. Matsuda. Spacio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411 : 1065 - 1068, 2001.
- [4] K. Kurokawa, N. Mochizuki, Y. Ohba, H. Mizuno, A. Miyawaki, and M. Matsuda. A pair of FRET-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo. *J. Biol. Chem.* 276 : 31305-31310, 2001.
- [5] R. E. Itoh, K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. Activation of Rac and Cdc42 video-imaged by FRET-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* 22 : 6582-6591, 2002.
- [6] H. Yoshizaki, Y. Ohba, K. Kurokawa, R. E. Itoh, T. Nakamura, N. Mochizuki, K. Nagashima, and M. Matsuda. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162 : 223-232, 2003.

