

## 蛍光スイッチングイメージング

松田 知己

下村脩先生が発見しその功績でノーベル化学賞を受賞されたGFP (green fluorescent protein, 緑色蛍光タンパク質) などの蛍光タンパク質を用いたライブセルイメージングの技術は発展を遂げ、現在では生物学研究であたりまえのように使われるようになってきている。これまでに、紫外領域付近から赤外領域付近までに至る幅広い波長領域の蛍光タンパク質が開発され、その使い道もレポーター遺伝子として遺伝子発現を調べる、タンパク質タグとして局在を知るといった古典的なものから、カルシウムセンサーなどのバイオセンサーとして生体内の機能を調べるといった応用的な使い道まで広がりを見せている。この流れに乗って、見たい現象に応じたさまざまな有用なバイオセンサーが作られていくのが、蛍光タンパク質イメージングの今後の発展の一つの方向であろう。

ところで、蛍光のon, off制御を行うことのできる蛍光タンパク質 (光スイッチング蛍光タンパク質) を用いたイメージングをご存じでしょうか? 蛍光バイオセンサーを用いた機能イメージングに比べると自身の研究に取り入れている研究者の裾野はまだまだ広くはないが、蛍光タンパク質イメージングのさらなる発展に欠かせない技術として期待されている。本稿では、この蛍光スイッチングイメージングについて紹介する。

オワンクラゲ由来のGFPには吸収波長の異なる二つの状態が混在しており、紫外光付近の光を照射してやると長波長側の吸収を持つ分子種の割合が増えるため、長波長側の励起による蛍光の強度が増大することが知られていた。PattersonとLippincott-Schwartzは、この野生型GFPの持つ特性をアミノ酸変異導入により増強させ、紫外光付近の照射により100倍程度蛍光強度が増大させることのできる、蛍光イメージングへの応用に足るPA-GFP (photoactivatable GFP) を開発したり、この光刺激により蛍光off状態からon状態へと変化させることのできるPA-GFPの開発をきっかけにして、蛍光スイッチングタンパク質は次々と開発されるようになった。現在では、①光刺激によって不可逆的に蛍光をon/offできるタイプ、②光刺激によって蛍光の波長を変化させることのできるタイプ、③異なる2波長の光刺激によって蛍光のon/offを可逆的に変化させることができるタイプ、の大きく三つのタイプに分類される光スイッチング蛍光タンパク質の開発と改良が行われている<sup>2)</sup>。

細胞や組織を生きたまま可視化するライブイメージングにおいて、光スイッチング蛍光タンパク質のもっともストレートな使い道は蛍光状態を変化させた分子や細胞の追跡である<sup>3)</sup>。通常、蛍光タンパク質を標的タンパク

質のタグとして用いると、その発現量に応じた強度の蛍光が観察される。一方、光スイッチング蛍光タンパク質を用いた標識を行った場合は、刺激光を照射する範囲を限定してそのうちの一部だけに蛍光を持たせてやり、イメージングを続けてそれらの限られた分子のダイナミクスを解析することが可能である。得られたデータには分子の移動方向や蓄積といった情報の他にも拡散速度や分子間相互作用といった情報も含まれている。さらに、スイッチングによりハイライトする範囲を調節して、オルガネラや組織・個体内での細胞の動きといったさまざまな階層での動態を観察することが可能である。

この他に、光スイッチング蛍光タンパク質は、最先端の蛍光イメージング技術である超解像顕微鏡観察法の鍵を握る蛍光プローブとしても用いられている。超解像技術を用いると、通常の光学顕微鏡の分解能の限界を超えた、電子顕微鏡に迫る微細構造の判別が可能となる。PALM (photoactivated localization microscopy) 法では、微弱な刺激光でごく少数の分子に関してスイッチングを起こさせ、その重心位置を記録する、といったことを全分子が検出できるまで繰り返してやることにより細胞全体の画像を再構成させる。これにより個々の分子の輝点が放つ蛍光同士が重ならないようにして解像度を高めている<sup>4)</sup>。また、RESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transition) 法では、可逆的な蛍光スイッチングタンパク質を用いて励起された蛍光分子のうち、焦点外縁の分子からの邪魔な発光をスイッチングで抑制することにより、高い空間分解能を達成する<sup>5)</sup>。しかし、これらの超解像技術は撮影に長時間を要することがライブイメージングへの応用の障壁となっており、より蛍光輝度が高くスイッチング速度の速いものや、スイッチングの波長と励起の波長にオーバーラップのないものなど更なる高性能な蛍光タンパク質の開発が進められている。

本稿で紹介した、光スイッチング蛍光タンパク質を用いたライブイメージングにより、従来の蛍光イメージングで見過ごしてきたタンパク質の動態変化や微小構造のダイナミクスと生命現象との間の関係性が次々に明らかにされていくことが期待される。

- 1) Patterson, G. H. *et al.*: *Science*, **297**, 187 (2002).
- 2) Tiwari, D. K. *et al.*: *Develop. Growth Differ.*, **55**, 491 (2013).
- 3) 松田ら: 蛋白質 核酸 酵素, **53**, 1858 (2008).
- 4) 藤田: 生物物理, **50**, 174 (2010).
- 5) Hofmann, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17565 (2005).