

蛍光相関分光法による細胞内物質輸送測定法の開発

超分子分光研究分野 金城政孝
自律調節研究分野 内貴 猛

蛍光相関分光法は単一分子レベルの蛍光分子の検出法として、物理化学や生化学、生物物理学の分野で注目されている。この手法はきわめて小さな領域を観察できることから、細胞内の物質の移動や輸送、さらには輸送蛋白との相互作用を細胞内の場所を特定しながら解析できる可能性がある。細胞内で蛍光性蛋白質を発現させた培養細胞を用いて蛍光分子数や拡散速度の変化を検出できるか試みた。in vitro の条件とは異なり拡散速度が細胞内で一様でなく、プローブとした蛍光性蛋白質の周りの環境が複雑であることを示唆した。一方、分子数の変化から外からの刺激に対して蛋白質が細胞質から核へ輸送されることが示唆されたが、個々の細胞により多彩な変化を示した。

はじめに

蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, 以下 FCS) は溶液中の蛍光分子のブラウン運動を利用して分子の数と分子の大きさ、または形といった物理量を測定する方法である。FCS の基本的概念や理論は20年以上も前にすでに報告されているもの^[1-4]、実用的に広く利用できる方法ではなかった。しかしここ数年発展してきた高感度光学検出系やレーザー技術などの光技術と、また、パーソナルコンピューターを利用したデジタル解析装置などの発展により FCS は生体高分子の簡便な極微量高感度分析法・検出法として利用されるようになってきた^[5-7]。FCS の基本的な特徴は顕微鏡視野下の極微量領域における平均数個の蛍光分子のブラウン運動に由来する蛍光発光の「ゆらぎ」を通して、いわゆる均一溶液に含まれる蛍光分子の濃度や分子間相互作用を、物理的な分離過程を経ずに、しかもほぼ実時間でモニターできることである。そのため単一分子検出法の一つとして数えられている^[8]。

我々はこれまで in vitro における分子検出手法として FCS を利用してきたが^[9-13]、FCS が溶液中の自由な分子運動を検出していることに特に注目し、生きたままの細胞内における物質輸送や分子間相互作用の解析としても利用できないか検討した。

実験方法

蛍光相関分光法

使用した蛍光相関分光装置のダイアグラムを図 1a に示す。基本的な構成はレーザー光励起の共焦点蛍光顕微鏡を試料測定部とし、そこでの蛍光発光を検出器でとらえた後、デジタル相関器でデータの記録と解析を行うようになっている。試料測定部を模式的に図 2b に示した。励起光であるレーザー光は試料溶液のほんの一点に集中され、かつ共焦点光学系の特性からその一点からの蛍光発光を検出系でとらえることになる。実際の溶液中の測定領域は理想的な点ではなく図 1c に示すような円柱状の領域となり、その大きさは直径が約 400 nm、軸長が約 2 μm 、容積としてフェムトリットル (10^{-15} L) の領域になる。この大きさが FCS が対象としている領域であり容積となる。さて、1 M 濃度で 1 L の溶液には約 6×10^{23} 個の分子が存在しているが、フェムトリットル領域には 6×10^8 個の分子が存在し、実際の実験でもよく使われる 10 nM (10^{-8} M) 程度の濃度になるとその領域には平均 5, 6 個の分子が存在することになる。ここで FCS の測定領域は溶液中であり、各蛍光分子はブラウン運動を行っている。一定の測定領域における分子の数は常に一定ではなくある値を中心に変動し「数ゆらぎ」が起

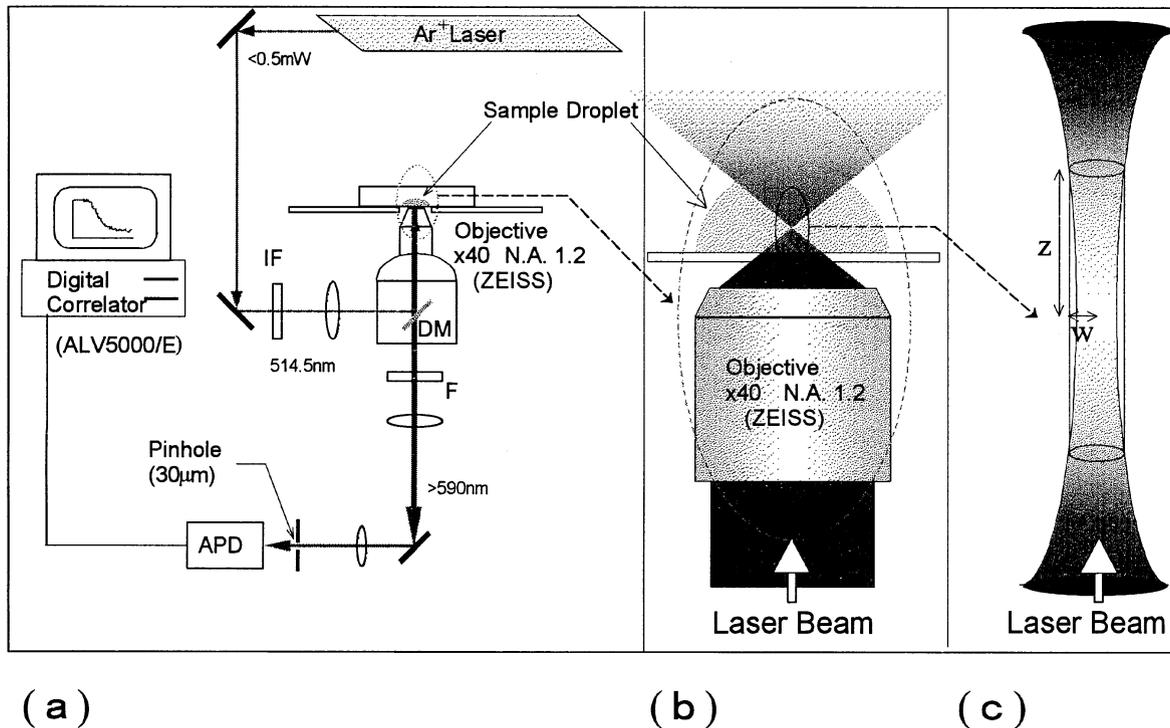


図1 (a) 蛍光相関分光装置の全体の模式図．アルゴンレーザーからの励起光は干渉フィルター (IF), ダイクロイックミラー (DM) と対物レンズを介してカバーガラス上の試料溶液に導かれる．蛍光発光はロングパスフィルター (F) を通り, 共焦点上のピンホールで焦点面以外のバックグラウンド光を取り除きアバランシェフォトダイオード検出計 (APD) へと導かれる．(b) 試料測定部の模式図．(c) 測定領域の拡大模式図．測定領域はここでは半径 w , 軸長 $2z$ で定義される円柱状の領域となる．

きている．さらにこの数ゆらぎに起因して, 測定される蛍光の強度に「強度ゆらぎ」発生することになる．この蛍光強度のゆらぎを解析することで拡散速度に関する情報と分子の数に関する情報を得ることができる．このようなランダムなゆらぎの強度や早さの程度を評価するために, ある時間 t における蛍光強度を $I(t)$ とし, その自己相関関数は,

$$G(\tau) = \frac{I(t)I(t+\tau)}{I(t)^2} \quad (1)$$

で示される．

図1で示される円柱形の領域における平均分子数 (N) と分子のその領域における平均通過時間 (τ) (平均滞在時間) との関係は下のように示されることがわかっている[9]．

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + 4D\tau/w_{xy}^2} \right) \left(\frac{1}{1 + 4D\tau/w_z^2} \right)^{1/2} \quad (2)$$

ここで D は並進拡散定数, w_{xy} , w_z は観測視野の

半径と軸長をそれぞれ示す．

ここで注目してもらいたいことは $\tau=0$ の時, 式(2)は $G(0) = (1/N) + 1$ となり, y 軸切片の値の逆数がその領域に存在する分子数を直接示すことである．

また分子を球とすると, その半径 r と拡散常数 D の関係はアインシュタイン・ストークスの式で次のように関係づけられる．

$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

κ_B , T , η はそれぞれボルツマン定数, 絶対温度, 及び溶媒の粘性である．

観測される蛍光発光のゆらぎを与えるものはここで注目しているブラウン運動 (並進拡散) の他にも, 回転拡散や化学平衡によるゆらぎが考えられるが時間領域が異なる場合が多いのでここでは深く議論はしない．

測定

グルココルチコイド受容体はステロイドホルモンを受容するとホモダイマーを形成し、核内の特定領域に結合して遺伝子発現の調節をする事が知られている。グルココルチコイド受容体と蛍光蛋白質 (Green Fluorescence Protein, GFP) の融合蛋白質 (GRGFP) 遺伝子を細胞内で発現させた繊維芽細胞を用いて、細胞外から自由拡散によりグルココルチコイドの一つであるデキサメサゾン (DEX) を加えて刺激を行なった。その時の観測領域における分子数変化、分子の拡散速度、並びに分子あたりの蛍光強度を FCS により測定した。

結果

細胞内で発現した GFP 融合蛋白質量は各細胞あたり均一ではなく、顕微鏡下の観察では発現量にかなりのばらつきがあるのが観察された。そこでまず FCS の測定に最適と思われる蛍光強度の細胞を選び出し、細胞内の GFP 蛋白質の蛍光相関関数の測定を行った。細胞内で発現した GRGFP と *in vitro* で測定した GFP の蛍光相関関数を図 2 に示した。*in vitro* における GFP の拡散時間は 0.115 msec と見積もることができたが、一方細胞内の GRGFP の拡散時間はそれよりもさらに長く 1 msec まで遅くなった。

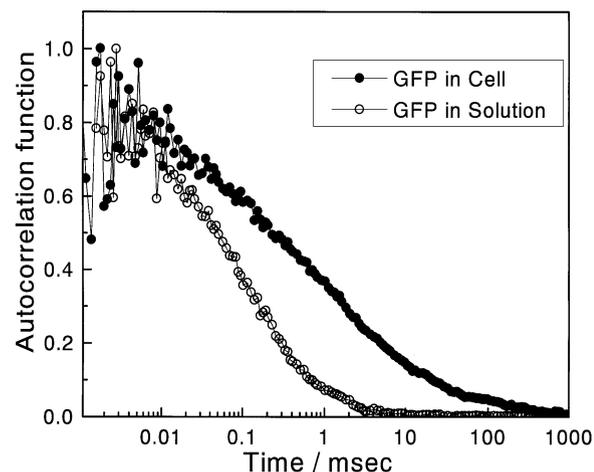


図 2 (●) 細胞中の GRGFP . (○) 緩衝液中 (25 mM Tris HCl pH 7.8, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) の GFP (0.01 mg/ml) . 相関関数は規格化してある。

次に細胞内に発現した GRGFP に対して DEX による刺激を行った。DEX は拡散により溶液中から細胞膜を介して細胞質内へ取り込まれるので、DEX 刺激後 FCS の測定を時間を追って連続測定を行った。連続測定した DEX 刺激後の拡散時間の変化、分子数の変化、分子あたりの蛍光強度の変化の結果を図 3 に示す。拡散時間は刺激後も特に変化は見られなかったが (図 3a), 分子数の変化は時間とともに減少するのが観察された (図 3b) . また、観測領域で測定される蛍光強度を分子数で割り付けた、いわゆる分子あたりの蛍光強度の値は時間とともに増加し、刺激前と比較して約 2 倍まで上昇したのが観察された (図 3c) .

各細胞の GRGFP の発現量が異なることが観察され、従って細胞中に含まれる GRGFP の数も異なることが当然予想される。次に発現量の異なる細胞での分子数の変化を測定してみた (図 4) . 細胞内の GRGFP の分子数は刺激後様々に変化し、増加するもの、減少するもの、さらに振

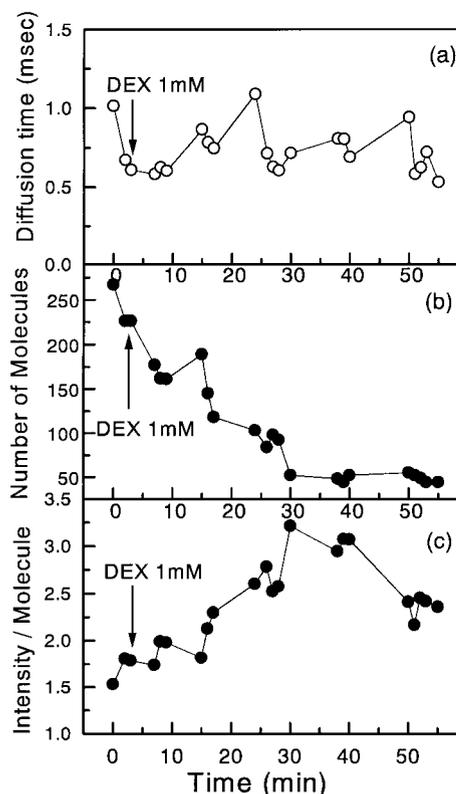


図 3 デキサメサゾン (DEX) を培養液に加えた後の (a) 拡散速度, (b) 分子数及び, (c) 分子あたりの蛍光強度の変化。

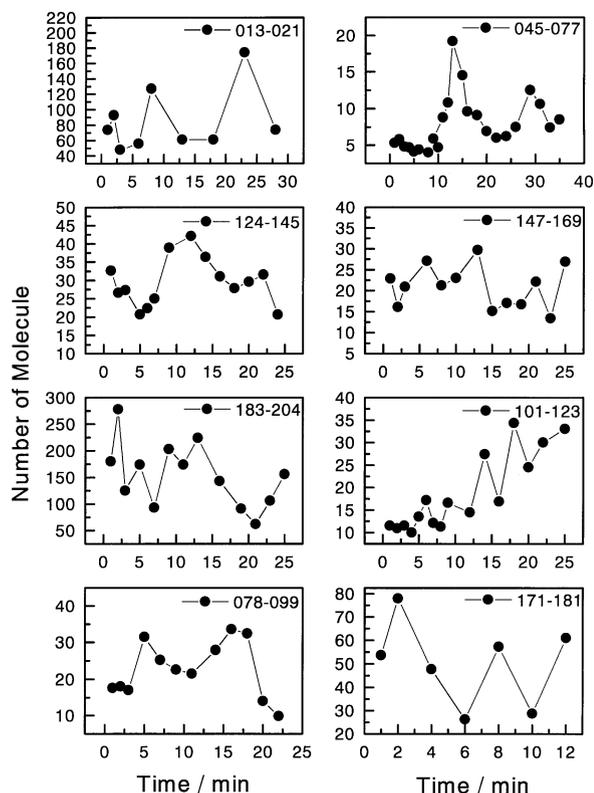


図4 デキサメサゾン (DEX) を培養液に加えた後の、様々な細胞における分子数変化の例。

動のような変化をするものが見られた。

考察

FCS は基本的に光学顕微鏡を利用し、直径約 400 nm の領域を観察する事ができる。これは多くの真核生物の細胞より小さく、従って個々の細胞を区別して、さらに細胞内の特定の場所を測定することが可能であることを示している。細胞を活きたままで FCS 測定を行うためには何らかの方法で細胞内に蛍光色素を入れなくてはならない。我々は GRGFP 融合蛋白質遺伝子を利用することで、細胞に大きな負担をかけないで細胞内に蛍光色素を導入することができた。細胞内の GRGFP の拡散時間は約 1msec であったが、これは *in vitro* での GFP 単独での拡散時間より 10 倍も遅いのが観察された。GFP の分子量が約 30 kDa であり、また GRGFP の分子量が 100 kDa であることや、式 (3) を考慮すると、GRGFP が遅くなった原因を単純に分子量の変化だけで説明

することは困難である。このことは GRGFP の周りの環境、すなわち細胞内の粘性が通常の溶液のよりも高いことがその原因であると考えの方が妥当であろう。また、細胞内の GRGFP の拡散時間を式 (2) を拡張した 3 成分までの解析式で求めようとしたが、さらに多くの成分が含まれていることが示唆された。このことは細胞内の GRGFP の周りの環境が単純でなく、かなり複雑であることを示している。細胞内の物質の移動や輸送を調べるためには、分布関数を含めたような解析方法が今後有効と考えられる。

DEX によりグルココルチコイド受容体は 2 量体を形成することが *in vitro* の実験で知られている。しかし測定した結果では拡散速度の変化は見なかった。このことは FCS で測定される拡散時間は分子を球としたときのその半径に関係することから、2 倍程度の分子量の変化では測定にかからないものと考えられる。しかし、観察視野における分子数の変化は時間とともに減少し、かつその時、分子あたりの蛍光強度は増加した。このことは *in vitro* での測定結果と同じく、GR が細胞質内で 2 量体を形成し、その後核の中へ運ばれていくという仮説を支持するものと考えられる。

一方、我々は一つの培養細胞の中でも、実際は GRGFP の発現量に多くの変位があることを観察した。このことは細胞の中の環境がすべて一様でなく、GRGFP の様々な濃度の違いがあると想像できる。細胞内の発現量が異なる細胞に対して GRGFP の分子数の変化を調べると、ほとんど統一的な説明ができないほどに多様であった。このことは GRGFP が結局外来性の蛋白であり、かつ蛍光性蛋白を含む融合蛋白質が原因であるのか、さらに細胞の個性のような問題であるのかは今後の課題であろう。

今回 FCS を用いて細胞内の物質の輸送や移動を観察することが可能であることを示した。今後、細胞の生理的状态を含めて蛋白質の動きや刺激に対する反応と密接に関連して調べていくことが重要と考えられる。

謝辞

GFP 融合 GR 発現細胞は旭川医大第二内科田

中廣壽助教授からいただきました。ここに感謝申し上げます。

[参考文献]

- [1] M. Ehrenberg. and R. Rigler: Chemical Physics. **4** (1974) 390.
- [2] E. L. Elson. and D. Magde: Biopolymers. **13** (1974) 1.
- [3] D. E. Koppel: Physical Review A. **10** (1974) 1938.
- [4] N. Thompson: *Fluorescence correlation spectroscopy*, J. R. Lakowicz. (Plenum Press, New York and London. 1991) Vol. **1**, p. 337.
- [5] M. Eigen. and R. Rigler: Proc Natl Acad Sci USA. **91** (1994) 5740.
- [6] R. Rigler: J Biotechnol. **41** (1995) 177.
- [7] S. Maiti, U. Haupts. and WW Webb: Proc Natl Acad Sci USA. **94** (1998) 11753.
- [8] R. Rigler, Mets, J. Widengren. and P. Kask: Eur Biophys J. **22** (1993) 169.
- [9] M. Kinjo. and R. Rigler: Nucleic Acids Res. **23** (1995) 1795.
- [10] M. Kinjo: Anal Chim Acta. **365** (1998) 43.
- [11] M. Kinjo. and G. Nishimura: Bioimaging. **5** (1997) 134.
- [12] G. Nishimura, R. Rigler. and M. Kinjo: Bioimaging. **5** (1997) 129.
- [13] M. Kinjo, G. Nishimura, T. Koyama, Ū Mets. and R. Rigler: Anal Biochem. **260** (1998) 166.