The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	細胞内蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質の開発
Author(s)	森川, 高光
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52234
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

細胞内蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質の開発

Evaluation of protein concentration using a hydrophobicity sensitive glycine-inserted mutant Förster resonance energy transfer (FRET) fluorescent protein

大阪大学大学院生命機能研究科　生命機能専攻

生命動態イメージングセンター(柳田研究室)

森川　高光

2015 年 3 月　博士学位論文

目次

要旨 5-6

第 1 章　研究背景

分子混雑とは 7-8

分子混雑と拡散 9-12

蛍光蛋白質 13-14

蛍光蛋白質を用いた指示薬 14-16

第 2 章　本研究の目的 17-18

第 3 章　蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質の開発

背景と目的 19

実験方法 20-23

結果 24-32

まとめと考察 33-37

第 4 章　GimRET を用いた細胞内蛋白質濃度の測定

背景と目的 38

実験方法 39-42

結果 43-52

まとめと考察 53-57

第 5 章　GimRET の蛍光強度比と拡散との比較

背景と目的 58

実験方法 59-60

結果 61-73

まとめと考察 74-77

第 6 章　GimRET を融合した蛋白質を用いた蛋白質濃度の時間的・空間的変化の測定

背景と目的　78

実験方法　79

結果　80-82

まとめと考察　83-85

総括と展望　86-87

謝辞　88

参考文献　89-98

業績　99-100

要旨

細胞内は、蛋白質や核酸などの分子によって非常に混雑した環境である。細胞内の蛋白質濃度は、350 mg/mL と見積もられており、この高密状態は分子混雑と呼ばれている。高蛋白質濃度下では、蛋白質の折りたたみや酵素の活性が変化することが報告されている。近年では、細胞内での蛋白質の立体構造を調べる in-cell NMR により、細胞内においては蛋白質がより不安定であることも報告されており、混雑さは、蛋白質の状態、ひいては細胞の状態を決める重要な要素の一つであると考えられている。

分子混雑は、FRAP (Fluorescent recovery after photobleahing)法や、FCS (fluorescent correlation spectroscopy)法など蛍光蛋白質や色素などのプローブの拡散係数を用いて見積もられている。しかしながら、細胞内には、細胞骨格などの構造体も存在するため、プローブが細胞内の分子や構造体と相互作用してしまい、拡散係数に反映される。そのため、拡散係数は、細胞内の混雑さを完全に反映しているとは言えない。細胞内の分子混雑を評価するためには、拡散係数のみならず、細胞内の分子の密度、つまりは濃度を同時に測定する必要がある。本研究では、蛋白質の濃度を検出するプローブの開発し、それにより細胞内蛋白質濃度を計測し、従来の拡散係数による評価方法と比較した。

プローブには、蛍光蛋白質を応用した。様々な発光色の蛍光蛋白質が開発されているが、その中でも黄色蛍光蛋白質(YFP)は、溶液中の蛋白質濃度に伴い蛍光強度が減少することが分かった。本研究では、さらに YFP の蛋白質濃度に対する感受性を増加させるため、YFP の 145 番目のチロシン残基の位置にグリシン残基を挿入した変異体(YFP1G)を作製した。結晶構造解析によれば、グリシン残基の挿入により蛍光蛋白質の発光団付近に水分子が配置されていることが分かった。結果として、YFP1G は溶液内の疎水性に強く反応するようになり、YFP に比べ蛋白質濃度に対する感受性が向上されていた。さらに YFP1G と蛋白質濃度に感受性を持たない青色蛍光蛋白質(CFP)とを融合させた FRET (Foster resonance energy transfer)プローブを作製した(GimRET, Glycine-inserted mutant FRET probe)。この FRET プローブは、蛋白質濃度に応じて CFP と YFP1G の蛍光強度比が変化する。GimRET の有用性を、細胞分裂過程、蛋白質合成／分解、および、細胞体積変化による蛋白質濃度変化の検出を行うことで、確かめた。

GimRET を用いて細胞内における蛋白質濃度と拡散との相関を調べた。GimRET の示す蛋白質濃度と FRAP により見積もられた拡散係数には確かに相関が観られたものの、その相関は、細胞核内と細胞質内では異なり、拡散係数が分子混雑を一意に定義していないことが示された。以上のことから、GimRET を用いた蛋白質濃度計測と FRAP による拡散係数計測との同時計測を、新しい細胞内分子混雑の評価方法として提案する。

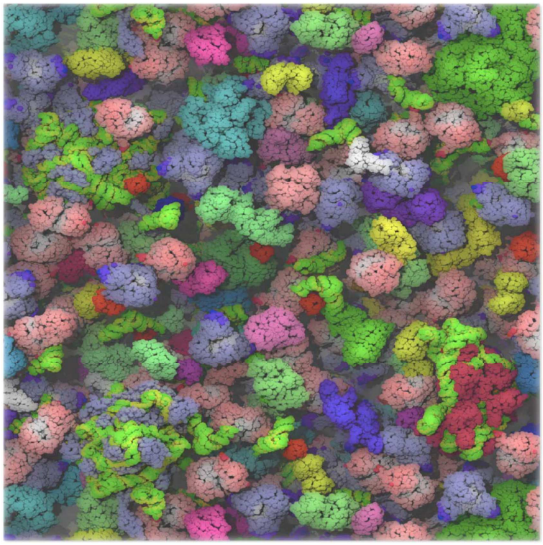
以上のように、YFP に疎水感受性を持たせることで、細胞内蛋白質濃度感受性 FRET プローブ GimRET の開発に成功した。さらに GimRET による蛋白質濃度計測と FRAP による拡散係数計測を組み合わせることで、分子混雑を正しく評価する方法の提案に至った。本研究課題が提案する方法は、古くから議論されてきながらも解明されてこなかった『分子混雑』に関して、新しい知見をもたらすと期待される。

第１章　研究背景と目的

分子混雑とは

細胞の内側は非常に混雑した環境である。図 1 (a)は、McGuffee らが 2010 年に、大腸菌内の蛋白質で混雑している環境を、コンピュータシミュレーションで再現したものである(McGuffee , 2010)。

(a)



(b)

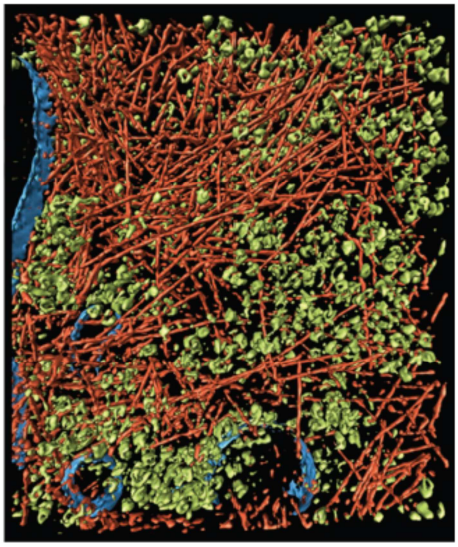


図 1 (a)大腸菌内の蛋白質で混雑した環境をシミュレートして示された細胞内の混雑さ(McGuffee , 2010)、(b)真核生物(細胞性粘菌)の細胞質における混雑さ(Medalia, 2002)

このシミュレーションでは 50 種類の蛋白質を原子レベルで再現している。しかし、実際の大腸菌では、4000 種類以上の蛋白質が発現しており、実際の細胞はさらに混雑していることが予想される。Goodsell らが描いた細胞内の環境の模式図では、細胞内は水分子よりも蛋白質や核酸などの高分子が多く表現されている。大腸菌の乾燥重量から見積もった値では、細胞内の蛋白質などの高分子の濃度は、350 mg/ml と見積もられている(Fulton, 1982 : Zimmerman, 1991)。真核生物の細胞質では、電子顕微鏡を用いた観察から、分子の混雑さに加え、細胞骨格が密に張り巡らされた状態であると考えられている(Medalia, 2002 図 1b)。このような分子により混雑した環境は、分子混雑(molecular crowding)と呼ばれている。溶液中の蛋白質の濃度を変化させることにより、溶液中の粘

性や(Pasawadee, 1977)、浸透圧が増加することが報告されており(Berns, 1970 : Minton, 2008)、実際の細胞内は、生化学などの実験を行う試験管内の環境とは大きく異なると考えられている。

In vitro の実験では、多糖類や蛋白質を用いて細胞内の混雑な環境を模した溶液中において、蛋白質のミセル化や凝集が引き起こされることが報告されている (Castelletto, 2008)。蛋白質の凝集が起こる一方で、混雑さにより蛋白質の折りたたみの速度が促進されることが報告されており(van den Berg, 1999, 2000 : Tokuriki, 2009)、細胞内の混雑な環境が蛋白質の構造に影響を与えると考えられている。実際に細胞内における蛋白質の立体構造を測定した例もある。近年行われた、細胞内における蛋白質の立体構造を決定する in-cell NMR 法により、*in vitro* な環境と比較して、細胞内では蛋白質の構造が著しく不安定であるとの報告がなされており、分子混雑が蛋白質の構造の安定性に非常に大きく影響していることが示唆された(Inomata, 2009 : Li, 2011 : Wang, 2011)。また、高分子で混雑した環境では、アクチンやチューブリンの相互作用や重合が促進されるという報告もあり(Drenckhahn, 1986 : Lindner and Ralston, 1997 : Herzog, 1978 : Rivas, 1999)、細胞内の構造体にも影響を与えている可能性がある。さらに、ポリメラーゼやシャペロニンなどの酵素活性の促進や(Zimmerman, 1987 : van den Berg, 1999 : Ovádi, 2004 : Martin, 1997 : Akabayov B, 2013)、シグナル伝達で重要な役割を果たす ERK が、混雑な環境にでは 2 重リン酸化される割合が増えるなど(Aoki, 2011, 2013)、蛋白質の機能にも影響を及ぼすことが確認されている。

以上のように、分子混雑は、蛋白質の状態に影響を与え、その結果として細胞の状態にも影響を与えると考えられるので、分子混雑は、細胞の状態を決める重要な要素の一つと考えることができる。

このように、細胞内の非常に混雑した環境と、生化学などの実験を行う試験管内の環境には大きな乖離があることは、幾度となく指摘されてきた(Fulton, 1982 : Zimmerman, 1993 : Ellis, 2001 : Germán, 2004)。しかし、重要視され始めたのはそれほど早くない。なぜなら、生細胞内での混雑さを測定する手法がなかったからである。

分子混雑と拡散

分子混雑の重要さは、1950 年代から指摘されてきたが(Foffi, 2012)、細胞内の混雑さを測定する方法がなかったため、高分子や蛋白質を用いた *in vitro* での議論が主であった。その後、1970 年代に顕微鏡上で、溶液中の拡散を測定する方法である FRAP や FCS などが開発されたことにより(Peters, 1974 : Elson, and Webb, 1972)、分子混雑は粘性、あるいは分子の拡散として計測されるようになった。その後、顕微鏡技術の発達と解析方法の発展により、1990 年代より蛍光顕微鏡を用いた分子拡散の計測が非常に広く用いられるようになったことで、細胞内の分子混雑を、分子の拡散定数を用いて比較することが一般的となった。

分子の混雑さは、溶液の粘度に相関がある(Pasawadee, 1977)。混雑さが高ければ粘度が上がり、低ければ粘度が下がる。粘度は、分子の溶液中での動きやすさ、拡散に影響する。つまり、分子の拡散から、溶液中の分子の混雑さを見積もることができる。実際の実験では、有機色素や蛍光タンパク質などをプローブとして用いて、溶液中での拡散を、拡散定数として測定している。

細胞内の分子拡散を見積もる方法でポピュラーな方法の一つが FRAP である(Lippincott-Schwartz, 2001)。FRAP は、Fluorescent recovery after photobleaching の略である。1976 年にはすでに細胞の細胞表面の分子の動きを調べるために用いられており(Edidin, 1976)、細胞を用いた FRAP の歴史はかなり古い。FRAP はその名の通り、ある特定範囲内の蛍光分子を褪色させ、その後の蛍光の回復から、蛍光分子の拡散を見積もる方法である。図 2 に、細胞内で FRAP を行う際の概略図を示す。

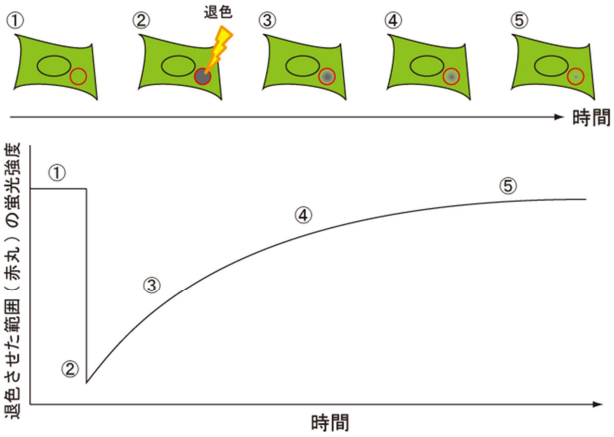


図 2　FRAP の概略図

細胞内にプローブが均一に分布した状態とする(図 2 ①)。そこに、ある特定の範囲に強力に光を照射し、プローブを褪色させる(図 2 ②)。細胞内のプローブは、自由に拡散するので、褪色したプローブが範囲外に、褪色していないプローブが範囲内にと、自由に移動する。そのため、褪色させた範囲は、時間とともに褪色していないプローブが流入するため、蛍光が回復する(図 2 ③－⑤)。回復する速度は、溶液の粘性に依存する。褪色させた範囲の蛍光の時間変化から、拡散定数を算出できる。FRAP の蛍光回復は、プローブが他の分子と相互作用した際に変化するので、細胞内での分子相互作用を調べたい蛋白質にプローブを結合させて FRAP を行うことで、細胞内での分子の相互作用の有無を観察する際にも用いられている(木村, 2007)。

また、FCS も多くの実験に用いられている(Lippincott-Schwartz, 2001 : Medina, 2002)。FCS は Fluorescence correlation spectroscopy の略である。FCS は、ある微小空間における蛍光強度の時間変化から、分子の拡散を見積もる方法である。図 3 に、FCS の手順の概要を示す。

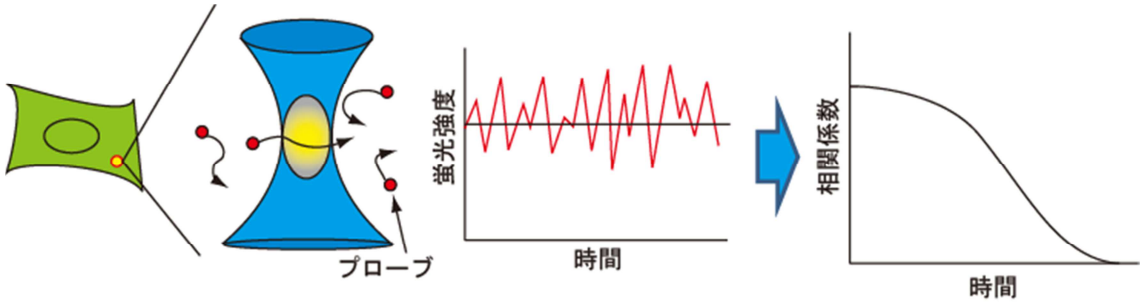


図 3　FCS の概略図

細胞内にプローブが均一に分布しているとする。溶液の微小範囲のみを励起、プローブの蛍光を検出し、その時間変化を計測する。計測範囲が小さければ、その範囲内に存在するプローブの数が制限される。つまり、微小範囲から検出される蛍光は、プローブの個数(蛍光の強弱)と溶液中の粘性(蛍光の変化する速度)により揺らぐ。蛍光強度の時間変化の自己相関から、プローブの拡散を算出する(金城, 2007)。FCS はまた、その検出領域とプローブの存在量をうまく操作することで、一分子の拡散を測定することができる(Schwille, 1999)。他にも、2 色のプローブを用いて拡散する 2 つの分子の相互作用を検出する FCCS (fluorescent cross-correlation spectroscopy)など、近年その応用が広がっている

(Bacia, 2006)。

現在、FRAP や FCS は、細胞内、あるいは細胞内の局所において様々な生命現象における分子の混雑さや動き、相互作用を観察するために広く用いられている。例えば FRAP を用いた実験では、核内におけるクロマチンの動きの程度や(Robert, 2000 : Schmiedeberg, 2003 : Bosˇkovic, 2014) 転写因子の動きの直接観察(Yao, 2006)、接着因子の拡散の程度と相互作用(Caroline Cluzel, 2005)、細胞表面上の G 蛋白質の拡散と相互作用の変化(Gregory, 2006)などが観察されている。FCS では、核内の裏打ち構造であるラミンの拡散と相互作用や(Shimi, 2008)、大腸菌内におけるシグナル伝達分子の拡散と濃度の定量(Cluzel, 2000)、核内でのクロマチンの動態の観察(Hihara, 2012)などが行われている。中には、FRAP と FCS を組み合わせたものもある(Yao, 2006 : Im, 2013 : Bosˇkovic, 2014)。また、FRAP、FCS 以外にも、RICS(Raster Imaging Correlation Spectroscopy, Norris, 2011)や FDAP(Fluorescence Decay After Photoactivation, Kiuchi, 2011)などの細胞内の拡散を測定する方法が次々に開発されており、分子混雑に対する注目度の高さがうかがえる。

これら拡散係数を測定する実験では、あらかじめポリエチレングリコールやスクロースなどの小分子を均一に分布させた粘性の異なる溶液中に、プローブを混合したサンプルを用いて計測を行い、測定された値(FRAP ならば、蛍光強度の時間変化を指数増加でフィットした際に求められる係数)と、粘性とプローブの大きさから計算された拡散係数とのキャリブレーションを行う。そうして細胞内で実験を行い、測定された値をキャリブレーションから求めた式で変換することで、細胞内の拡散係数を算出する(Müller, 2009 : Kalwarczyk, 2011 : Hihara, 2012)。

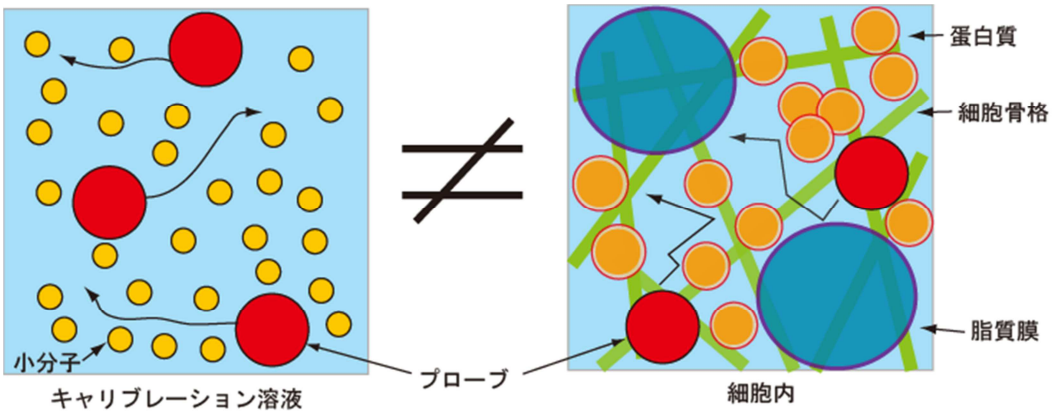


図 4　キャリブレーションに用いる小分子の溶液と細胞内の模式図

しかし実際は、細胞内は蛋白質や核酸などの高分子で満たされているため、小分子を用いて見積もった拡散係数と、単純に比較することはできない。なぜならば、高濃度の蛋白質溶液では凝集が起こるなどして(Castelletto, 2008)、均一な溶液ではないうえに、細胞骨格などの細胞内の構造体に、プローブが捕捉されることがあるからである。Gershoらの試算によれば、細胞質内のファイバー状の構造は細胞質の 20%以上を占めており(Gershon, 1985) 、細胞質内を分子が移動する際に、多くの分子がファイバー状構造体の表面と接触すると考えられている (Minton, 1990) 。また、プローブと細胞内のファイバー型の構造や脂質膜が接触した場合に、可逆的な非特異吸着が起こることも報告されている(Cutsforth, 1989 ; Lakatos, 1991 : Knull, 1992)。さらに、細胞内で測定された拡散定数は、それぞれの測定法により値が異なっており(Stasevich, 2011 : Norris 2011 : Bernas, 2014 : Diekmann & Hoischen, 2014)、現在でも活発に議論が行われているのだが、その違いの一因は、細胞内の構造体によるものであると考えられている。つまり、拡散だけでは、細胞内の混雑さを表現するには不十分であり、他の要素、例えば分子の密度などの情報が必要である。

細胞内の分子の密度、あるいは分子の濃度は、細胞内の混雑さを見積もる際に非常に有益な情報である。拡散と同時に測定できるならば、より正確な細胞内の混雑環境を推定することができると考えられる。最近では、分子の密度が生命現象に影響を及ぼす報告も出てきている。例えば、核内における蛋白質の拡散は、ヌクレオソームの密疎の状態により変化し、このことが、核内の蛋白質のクロマチンへのアクセスのしやすさに影響を与えることが報告されている(Hihara, 2012)。また、ヌクレオソームが密になると、放射線による DNA へのダメージが減少するとの報告もある(Takata, 2013)。つまり、分子の粗密さ、濃度も、細胞の状態を決める重要な要素である。しかしながら、これまで細胞内の分子の濃度を測定する方法は存在していない。そこで、細胞内高分子の多くを占める蛋白質の濃度を測定する蛍光蛋白質の開発を試みた。測定方法の確立ではなく蛍光蛋白質の開発を行ったのは、拡散を測定する方法と比較、あるいは組み合わせることで、「細胞内の分子混雑」をより正確に見積もることができると考えたからである。

蛍光蛋白質

1962 年に下村らによって、オワンクラゲから緑色蛍光蛋白質(Green Fluorescent Protein, GFP)が精製された(Shimomura, 1962)。その後、1994 年に Chalfie らにより線虫の神経細胞の観察が行われ(Chalfie, 1994)、細胞内蛍光イメージングへの応用が始まった。そして、1995 年以降、Tsien らにより、様々な色の蛍光蛋白質が開発されてからは、蛍光蛋白質は、生物学全般において利用されるようになった(Ormö, 1995 : Shaner, 2004 : Shcherbo,2009)。

オワンクラゲや腔腸動物から単離、改良された蛍光蛋白質は、その利用のしやすさから、生物学の様々な分野で利用されている(Tsien, 1998) 。蛍光蛋白質は、その名の通り蛋白質であるので、遺伝子を細胞内に入れるだけで、イメージングを行うことができる。有機色素やビーズなどのように、細胞内に導入する操作が必要ない。また、蛍光蛋白質の遺伝子配列を遺伝子に組み込むことで、外から導入する操作が必要なプローブでは不可能な、組織あるいは個体の内側の細胞も観察することが可能である。また、細胞内に局在する蛋白質や、局在シグナルを蛍光蛋白質に融合することで、細胞小器官のような局所の観察が可能である（木村, 2007）。

1995 年に、Ormö らによって、X 線結晶構造解析により、蛍光蛋白質の立体構造が解明された。図 5 に、蛍光蛋白質の立体構造を示す。

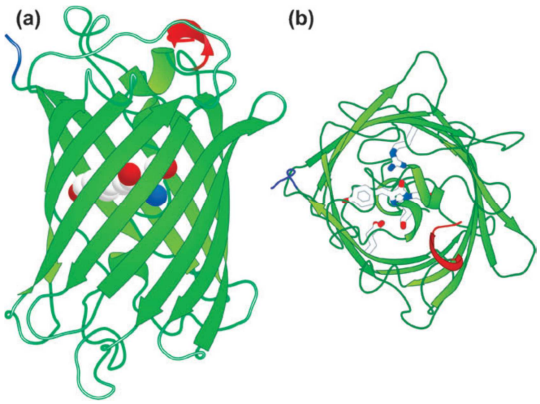


図 5　蛍光蛋白質の立体構造(Craggs, 2009)

蛍光蛋白質は、蛍光を発する蛍光団と、蛍光団を包むβバレル構造によって構築されている。蛍光団は、64 番目から 66 番目のアミノ酸配列の自己環化反応により形成される。

この 64 番目から 66 番目のアミノ酸配列によって、励起光／蛍光が変化する(Miyawaki, 2005：Chudakov, 2005)。また、黄色蛍光蛋白質(Yellow Fluorescent Protein, YFP)は、蛍光団と 203 番目のチロシン残基のπ－πスタックにより、励起／蛍光波長が長波長に変化している(Miyawaki, 2005：Chudakov, 2005)。

蛍光蛋白質を用いた指示薬

蛍光蛋白質は、細胞内の時間的、空間的な変化だけでなく、様々な細胞内環境の変化を検出する指示薬としても用いられている。その多くは、蛍光蛋白質と、環境変化に伴い変化する因子により構造変化するドメインを組み合わせにより構築されている。例えば、細胞内のシグナル伝達において、セカンドメッセンジャーとして広く用いられているカルシウムイオンの指示薬である G-CaMP は、GFP とドメインであるカルモジュリンと M13 を組み合わせることで構築されている(Pologruto, 2004)。

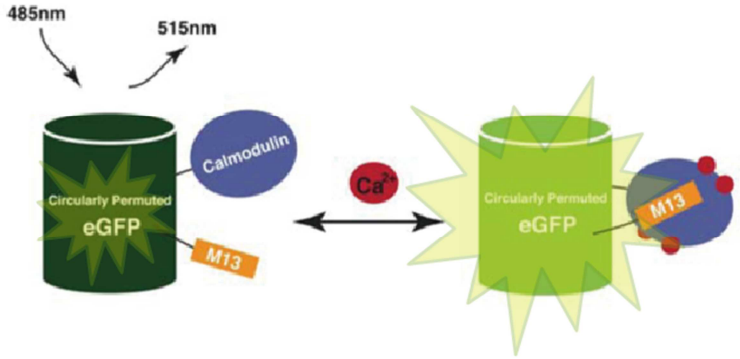


図 6　カルシウムイオン指示薬 G-CaMP の模式図(Hires, 2008 を改変)

図 6 のように、カルモジュリンと M13 はカルシウムイオンの有無により結合・解離する。カルシウムイオンの有無による構造変化が、GFP に伝わり、GFP の蛍光団周辺の構造を変化させ、蛍光強度が変化する。つまり、カルシウムイオンの有無によって、蛍光強度が変化するのである。

G-CaMP のように、因子の変化を蛍光強度の変化として検出できる指示薬は多数存在する。しかし、細胞間での比較や、定量的な議論はできない。なぜなら、蛍光蛋白質から放射される蛍光の強度は、励起された指示薬の存在量にも依存するためである。蛍光蛋白質は、蛋白質であるため、細胞内での発現量、つまりは存在量を厳密に制御するこ

とができない。フルオリンのように、一つの蛍光蛋白質が、2 つの励起波長において強い蛍光を示し、その 2 波長の強度の比が、因子により変化するものも存在するが(Miesenböck,1998 : Morimoto, 2011)、構築が非常に難しい。そのため、多くの指示薬は因子により構造が変化するドメインと、2 色の蛍光蛋白質を組み合わせた FRET プローブとして構築されている。

FRET(Förster resonance energy transfer)は Förster によって報告された現象である(Förster, 1948)。蛍光を発する分子ドナー、アクセプターが存在するとする。ドナーの蛍光波長は、アクセプターの励起波長と同じであるとする。ドナーとアクセプターが距離的に離れている場合、ドナーを励起すると、ドナーからのみ蛍光が放射される。ドナーとアクセプターが非常に近い場合(距離が 10 nm 以下)、ドナーの、励起光により励起されたエネルギーが、共鳴によりアクセプターに移動し、アクセプターからも蛍光が放射されるようになる。この時のエネルギーが移動する効率は、ドナーの量子収率やアクセプターの吸光係数、ドナーとアクセプターの距離などに依存する(Piston & Kremers, 2007 : 永井, 2007) 。多くの FRET プローブは、この FRET 効率の距離依存性を応用している。図 7 に、カルシウムイオン指示薬であるカメレオンを示す(Hires, 2008)。

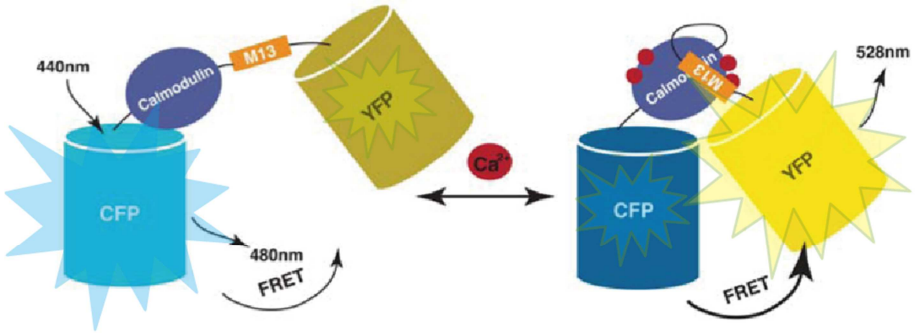


図 7　カルシウムイオン指示薬カメレオンの概略図(Hires, 2008 を改変)

カメレオンは、G-CaMP と同じように、蛍光蛋白質とカルモジュリン、M13 から構築される。違いは、ドナーとなるシアン蛍光蛋白質(Cyan fluorescent protein, CFP)とアクセプターとなる YFP の 2 つの蛍光蛋白質を用いている点である。カメレオンは、CFP と YFP の間に、カルモジュリンと M13 を挟んだ構造をしている。カルシウムイオンが存在しない場合は、カルモジュリンと M13 が結合しないので、CFP と YFP の距離は離れており、FRET が起こりにくいため、CFP を励起した場合、CFP の蛍光が YFP の蛍

光よりも多く検出される。カルシウムイオンが存在する場合は、カルモジュリンと M13 が結合し、CFP と YFP の距離が近づき、FRET が起こりやすくなるため、CFP を励起した場合に CFP の蛍光よりも YFP の蛍光が多く検出される。つまり、カルシウムイオンの有無により、カメレオン内のカルモジュリンと M13 の構造変化が起こり、それに伴う FRET 効率の変化により、CFP を励起した際の CFP と YFP の蛍光強度の比が変化する。カルシウムイオンの変化を、蛍光強度比の変化として検出できるのである。ドナーとアクセプターの蛍光強度の比は、ドナーとアクセプターの存在量が同じであるため、指示薬の存在量に影響されない。蛍光強度比の変化は、因子の変化を表している。実際、蛍光蛋白質を用いた FRET プローブは、カルシウムイオン(Nagai, 2001)や ATP(Imamura, 2009)、力学的な張力発生(Grashoff, 2010)まで、細胞の状態に影響を与える様々な因子の検出に用いられている。本研究において目的とした蛋白質濃度感受性指示薬も、FRET プローブをベースとした構築を目指した。細胞間、細胞内で指示薬の存在量を制御することはできない。プローブを用いて、細胞内、細胞間での比較を行うためには、指示薬の存在量に影響されないことが必須だったためである。

第 2 章　本研究の目的

本研究では、蛍光蛋白質を用いた FRET プローブの開発を目指した。従来の FRET プローブには、因子の有無に応じて構造変化を起こすドメインが必須である。カルシウムイオン指示薬であるカメレオンにはカルモジュリンと M13 が(Nagai, 2001)、ATP 指示薬である ATeam には F0F1ATPase の ATP 結合ドメインが(Imamura, 2009)、張力指示薬では、クモの糸で用いられている力学的な力により伸縮するドメインが(Grashoff, 2010)、それぞれ用いられている。しかし、現在までに、周囲の蛋白質濃度によって構造変化を起こす蛋白質は発見されていない。そこで、距離依存的な FRET 効率ではなく、他の要素を用いることを考えた。

FRET 効率は、ドナーとアクセプターの距離以外にも、ドナーあるいはアクセプターの性質に応じて変化する(永井, 2007)。例えば、蛋白質濃度によってアクセプターの吸光係数が変化するならば、FRET 効率が低下し、FRET が起きにくくなり、蛍光強度比が変化する。ドナーあるいはアクセプターが、蛋白質濃度によって何らかの変化が起こり、FRET 効率が変化すれば、蛋白質濃度に応じて蛍光強度比が変化するのである。ドナーあるいはアクセプターの、片方を蛋白質濃度感受性、もう片方を蛋白質濃度非感受性にすることで、蛋白質濃度に応じて蛍光強度比が変化するプローブとなると考えた。

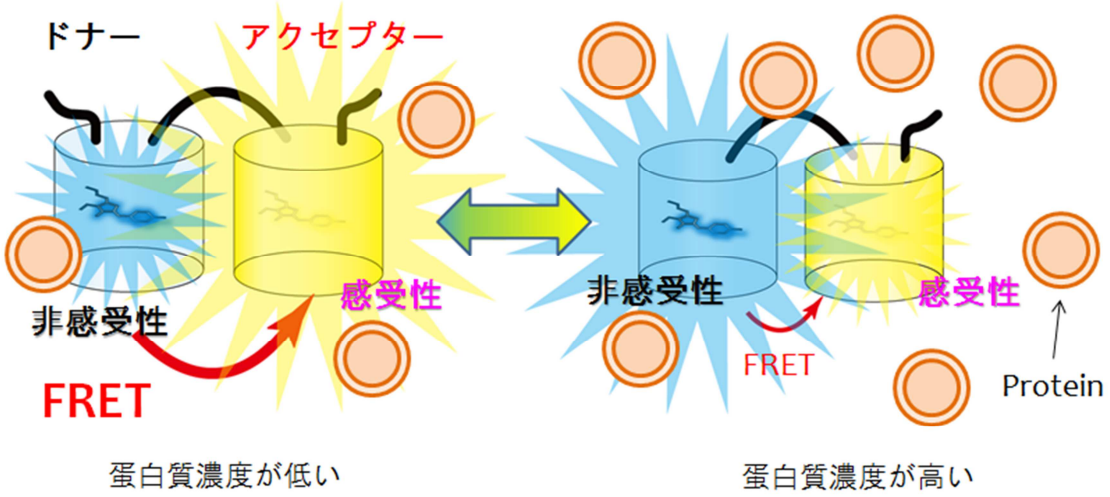


図 8 蛋白質濃度感受性 FRET プローブの概略図

本研究では、初めに、各種蛍光蛋白質の蛋白質濃度感受性を調べ、ドナーとアクセプターの候補を探索した。次に、蛋白質濃度感受性のアクセプターに変異を加えて、感受性の改善を行った。蛋白質濃度感受性のアクセプターと蛋白質濃度非感受性のドナーを組み合わせ、FRET プローブとし、細胞内での機能の評価を行った。拡散と蛋白質濃度の関係を調べるために、細胞内での拡散を測定する方法である FRAP を、開発した蛍光蛋白質を用いて行い、細胞内におけるプローブの拡散係数と蛋白質濃度の比較を行った。最後に、プローブの有用性を示すために、プローブを他の蛋白質と融合して、細胞局所における蛋白質濃度の時間的・空間的な変化を測定した。

第３章　蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質の開発

背景と目的

細胞内の蛋白質濃度を測定するために、蛋白質濃度に反応する蛍光蛋白質の開発を行った。蛍光蛋白質をベースとした指示薬は、何らかの因子に対して反応した場合、その反応の多くは蛍光蛋白質が放射する蛍光の強度の変化として検出される(Pologruto, 2004)。しかし、蛍光蛋白質は蛋白質なので、細胞内における発現量を厳密に制御することが難しい。細胞内の蛍光強度は、蛍光蛋白質の発現量にも依存するため、細胞内の異なる領域や、細胞間で単純に比較することはできない。そのため、蛍光蛋白質を用いた指示薬の多くは、FRET をベースとしている(Piston & Kremers, 2007）。FRET（Förster resonance energy transfer)は、2 つの蛍光を発する分子が非常に近い距離にある場合に起こる現象で、励起された分子(ドナー)の励起エネルギーが、共鳴により励起されていない分子(アクセプター)に移動し、アクセプターから蛍光が放射される。FRET をベースとした指示薬では、何らかの因子に対して反応した場合、ドナーとアクセプターの蛍光の強度がそれぞれ異なる変化を示す(Nagai, 2001：Imamura, 2009 : Grashoff, 2010)。この時のドナーとアクセプターの蛍光の強度の比の変化を用いて、因子の有無や存在量を評価する。FRET では、ドナーとアクセプターは同じ量存在するため、ドナーとアクセプターの蛍光強度の比は、指示薬の存在量に依存しない。そのため、細胞間での比較も可能である。蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質も、FRET をベースとしたプローブの開発を目指した。

FRET は、ドナーとアクセプターの距離依存的なエネルギー伝達を基にしている。通常の FRET プローブでは、ドナーとアクセプターの間に、カルシウムイオンなど検出したい因子の有無により構造変化するドメインを挿入し、その蛍光スペクトルの変化を観察する(カメレオン)。しかしながら、蛋白質の濃度により構造変化を起こすドメインが存在しないため、この方法を使うことができない。そこで、蛋白質濃度感受性のアクセプターと非感受性のドナーを組み合わせた、新しい FRET プローブの開発を行った。

実験方法

DNA 構築

哺乳類細胞一過性発現用ベクターの構築

哺乳類細胞発現用ベクターpECFP-C1、pEGFP-C1、pmCherry-C1 を Clonetech から、pmKate2-C を evorgen から購入した。

EYFP のベクターは、pEGFP-C1 の EGFP に 4 つの変異(S65G, V68L, S72, T203Y)を加えることにより構築した(Ormö, 1995)。

YFP1G と YFP3G のベクターは、EYFP の DNA を鋳型として、EYFP の 144 番目の Asn と 145 番目の Tyr の間に Gly を一つあるいは 3 つ挿入したプライマーを用いて PCR により増幅することにより構築した(Watanabe, 2013)。

CFP-YFP と GimRET のベクターは、YFP あるいは YFP1G の cDNA を鋳型として、制限酵素サイト BspEI を含む CFP の C 末端の配列と GGSGGT×3 のリンカーの配列からなるセンスプライマーと、制限酵素サイト XhoI を含むアンチセンスプライマーを用いて PCR 法により増幅し、PCR 産物を BspEI/XhoI で制限酵素カットした pECFP-C1 とライゲーションを行い構築した。

大腸菌蛋白質発現用ベクターの構築

大腸菌発現用ベクターpAL7 を BIO-RAD から購入した。pAL7 は、eXact タグという蛋白質精製用のタグの直後にマルチクローニングサイトを持つベクターである。

ECFP、EGFP、EYFP、YFP1G、YFP3G、GimRET、CFP-YFP のベクターは、各 cDNA を鋳型として、制限酵素サイト NheI を含むセンスプライマー、HindIII を含むアンチセンスプライマーを用いて PCR 法により増幅し、PCR 産物を NheI/HindIII で制限酵素カットした pAL7 とライゲーションを行い構築した。

Long-linker GimRET のベクターは、GGSGGT×6 制限酵素サイト NheI と long-linker (GGSGGT×6)を含むセンス、アンチセンスプライマーをアニーリングし、NheI で制限酵素カットした GimRET のベクターとライゲーションを行い構築した。

全てのベクターは蛋白質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3) (Merck Millipore, DE)に遺伝子導入を行った。

蛍光蛋白質精製

ECFP、EGFP、EYFP、YFP1G、YFP3G、GimRET、CFP-YFP、CFP-longlinker-YFP1G をコードした pAL7 ベクターの遺伝子導入された Rosetta2 を、LB 培地で振盪培養した(37℃、200 rpm)。Rosetta2 を培養した培地の OD600 の値が 0.6~0.8 になるまで培養し、終濃度 1 mM isopropyl β-d-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した。IPTG 添加後、暗所にて 23℃、16-18 時間振盪培養した。各蛍光蛋白質を発現した Rosetta2 を、4℃、6000G、5 分の条件で遠心し回収した。回収した Rosetta2 を 100 mM リン酸ナトリウム溶液 (pH 7.2、以下 100 mM SPB)で懸濁した。懸濁した Rosetta2 を、超音波破砕機を用いて破砕した(30 秒超音波、30 秒氷上で放置を 20 回)。破砕した溶液を、4℃、20000 G、40 分の条件で遠心し、上澄み(可溶各分)と沈殿(不溶各分)に分けた。蛍光蛋白質は可溶各分に含まれるため、上澄みを回収した。遠心では取り除けなかった不溶各分を除去するため、上澄みを 0.22 μm のフィルタに通した(以下、上澄み用液)。

蛍光蛋白質の精製には、Profinity eXactTM Fusion-Tag system (BIO-RAD)の 5 ml Bio-Scale Mini Profinity eXact cartridge(以下、カートリッジ)を用いた。カートリッジ内の溶液交換には、AKTAprime plus (GE ヘルスケアバイオサイエンス)を用いた。初めに、100 mM SPB を流し、カートリッジ内の溶液を 100 mM SPB に置換した。溶液置換後、上澄み用液を流し、カートリッジに蛍光蛋白質を、eXact タグを介して結合させた。カートリッジ内の洗浄のため、50 mL の 100 mM SPB を流した。eXact タグは、高濃度のハロゲンにより切断される。洗浄後、eXact タグを切断し蛍光蛋白質を溶出するため、カートリッジ内の溶液を 100 mM NaF を含む 100mM SPB に置換し、一晩 4℃で放置した。翌日、20 mL の 100 mM NaF を含む 100mM SPB を流し、蛍光蛋白質を溶出した。溶出後、Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Merck Millipore) を用いて限外濾過を行い、蛍光蛋白質の濃縮と、蛍光蛋白質溶液の溶媒を 1 mM HEPES (pH 8.0)への置換を行った。終了は 4-5 mg であった。蛍光蛋白質の溶液は、10 mg/mL、4℃で保存した。

蛍光スペクトルの測定

各蛋白質溶液の調整

BSA は Sigma-Aldrich から購入した。BSA は溶液に溶解することにより、溶液の pH の低下を引き起こす。そのため、BSA を各溶媒(100mM HEPES (pH 8.5, 8.0, 7.4, 7.0)、100mM MES (pH 6.5, 6.0))に溶解後、pH を調整し、250 mg/mL に調整した。

PEG6000、スクロースは、100 mM HEPES pH7.4 に溶解した。

各有機溶剤は 100 mM HEPES pH7.4 を用いて希釈した。

塩化リゾチームはナカライタスクから購入した。蛍光蛋白質の中には塩素イオンに感受性のあるものが存在するので、塩素イオンを取り除く必要がある。そのため、塩化リゾチームを 100 mM HEPES (pH7.4)に溶解後、透析を行い、塩素イオンを取り除いた。

アクチンはウサギの骨格筋から精製したものを使用した(Spudich and Watt,1971)。アクチンを、0.2 mM ATP, 0.1 mM $CaCl_2$, and 1mM 2- mercaptoethanol を含む 2mM HEPES (pH 7.8) に溶解した(G アクチン溶液)。G アクチン溶液に、200 mM KCl と 10 μM ファロイジンを加えて一晩 4℃で放置することで、アクチンをアクチンフィラメントにした。この溶液を 4℃、100000 G、10 分で遠心し、上澄みを取り除き、再度 0.2 mM ATP、0.1 mM $CaCl_2$、1mM 2- mercaptoethanol を含む 2mM HEPES (pH 7.8) に溶解した(F アクチン溶液)。

チューブリンは牛の脳から精製したものを理研生命システム研究センターの島知弘さんに提供していただいた(Murofushi, 1986)。チューブリンは、1 mM $MgCl_2$、1 mM EGTA、1 mMGTP を含む 100 mM Pipes (pH 6.9)に溶解させた(チューブリン溶液)。チューブリン溶液の温度を 37℃に上昇させ、15 分放置することでマイクロチューブを形成させ、タキソール 1 mM を加えてマイクロチューブを安定化した(マイクロチューブ溶液)。

Rosetta2 を一晩振盪培養して増殖させ、4℃、6000G、5 分の条件で遠心した。遠心によりできたペレットを、ペレットと同じ重量の 100 mM HEPES (pH7.4)で懸濁し、超音波破砕機で破砕した(30 秒超音波、30 秒氷上で放置を 20 回)。トネインを用いて溶液の蛋白質の濃度を定量したところ、160 mg/mL であった。この溶液を lysate:buffer = 1:1 溶液とした。lysate:buffer = 1:1 溶液を 100 mM HEPES (pH7.4)で 4 倍、8 倍にした溶液を lysate:buffer = 1:4 溶液 lysate:buffer = 1:8 溶液とした。

スペクトル測定

各溶液に、終濃度が 0.1 mg/ml になるように蛍光蛋白質溶液を加えた。この混合溶液を石英セルに移し、分光蛍光高度計(Hitachi RF5300-PC fluorescence spectrophotometer)を用いて蛍光スペクトルを測定した。

励起波長、蛍光波長は以下の通りである。

	励起波長(nm)	蛍光波長(nm)
ECFP	440	450-700
EGFP	488	500-700
EYFP	488	500-700
YFP1G	488	500-700
YFP3G	488	500-700
GimRET	440	450-700
CFP-YFP	440	450-700
CFP-longlinker-YFP1G	440	450-700

表 1 各蛍光蛋白質とその励起、蛍光波長

オクタノール/水分配係数の算出

オクタノール/水分配係数(LogKow)は、対象物(今回は 8 種類の有機溶剤)が、水とオクタノールの二相溶媒に溶解した時の、平衡状態における濃度比を常用対数で示したものである。この値が高いほど疎水性が高く(水に溶けにくく)、低いほど疎水性が低いほど親水性が高い(水に溶けやすい)。各有機溶剤のこの値は、US environmental protection agency (http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm)により求められた値を使用した。

結果

各種蛍光蛋白質の蛋白質濃度に対する感受性

初めに、様々な蛍光蛋白質が蛋白質濃度に対して感受性を示すかどうかを調べた。試した蛍光蛋白質は、オワンクラゲから単離、改良された GFP、CFP、YFP、サンゴから単離、改良された mCherry、mKate2 の 5 種類である(Ormö, 1995, Shaner, 2004, Shcherbo, 2009)。

BSA(Bovine serum albumin)は、ブラッドフォード法などで蛋白質濃度を調べる際の指標として用いられる蛋白質であり、また、細胞内を模した高濃度蛋白質溶液を *in vitro* で再現する際によく使用されている(van den Berg, 1999 : Tokuriki, 2004)。この実験では、溶液中の蛋白質濃度を変化させる蛋白質として、BSA を用いた。

各濃度の BSA 溶液に蛍光蛋白質をそれぞれ混合し、その蛍光強度を測定することで、蛍光蛋白質の蛋白質濃度に対する感受性を調べた。

250 mg/mL BSA 溶液では、GFP、YFP、mKate2 の蛍光強度が、0 mg/mL の溶液と比較して約 20%減少した。一方で、CFP と mCherry の蛍光強度はほぼ変化しなかった。

この中で FRET ペアにするならば、蛋白質濃度に対して感受性のない CFP と、最も感受性のあった YFP が良いと考えた。

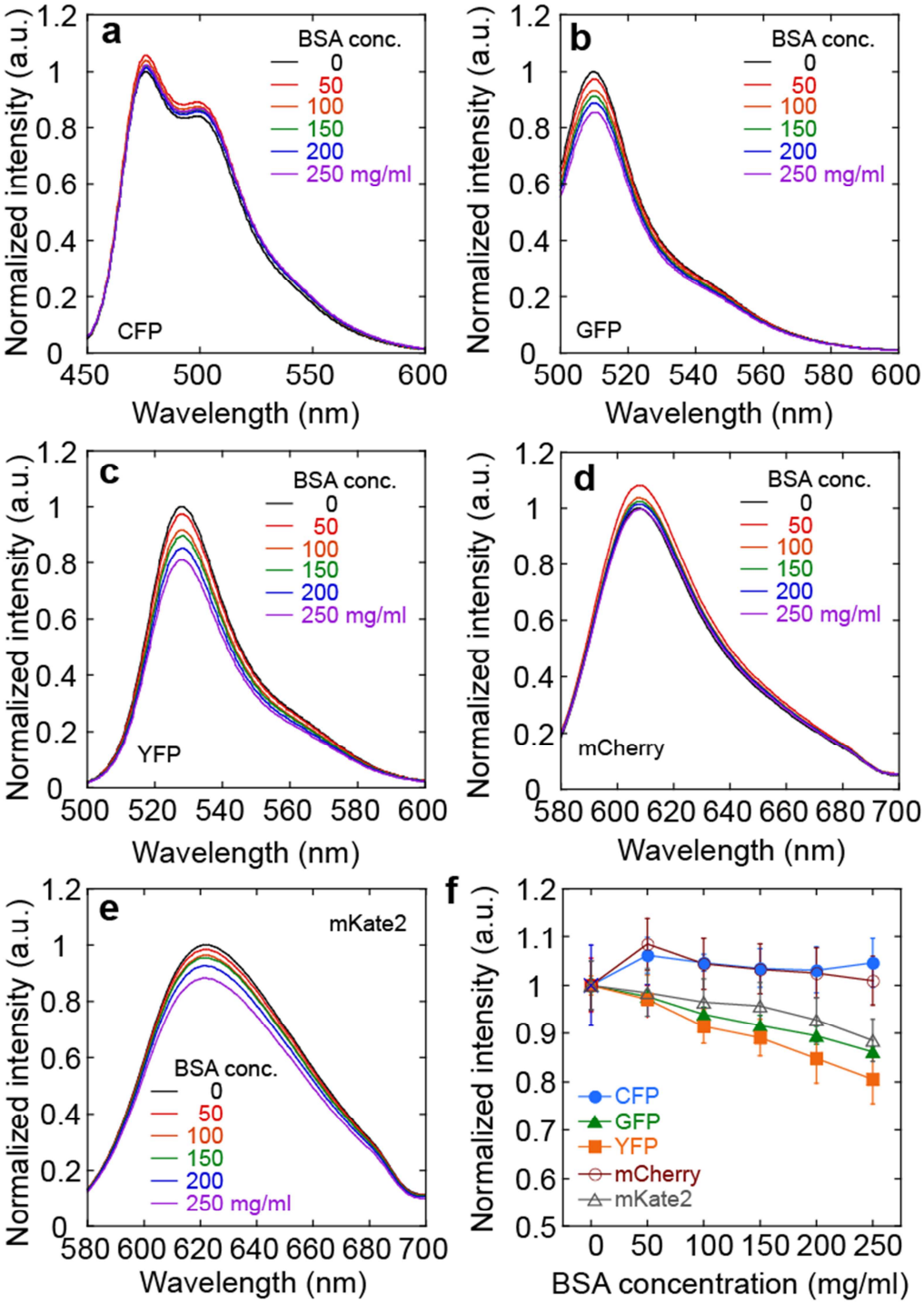


図 9　(a)-(e)各蛍光蛋白質の蛋白質濃度に対する蛍光スペクトルの変化　(a)CFP、(b)GFP、(c)YFP、(d)mCherry、(e)mKate2(黒：0 mg/mL、赤：50 mg/mL、オレンジ：100 mg/mL、緑：150 mg/mL、青：200 mg/mL、紫：250 mg/mL BSA)、(f)各蛍光蛋白質の蛍光強度の BSA 濃度依存性。青：CFP、緑：GFP、黄：YFP、赤：mCherry、灰色：mKate2

YFP の蛋白質濃度に対する感受性の改善

次に、YFP の感受性を改善しようと試みた。

溶液中の蛋白質濃度の増加は、粘度や水和などの水の状態を変化させる(Berns, 1970 : Castelletto, 2008 : Minton, 2008) 。2012 年に渡邉らは、145 番目のチロシン残基の前にグリシン残基を 1 つあるいは 3 つ挿入することで、蛍光団と水との相互作用を変化させ、静水圧に対する感受性を持たせることに成功している(Watanabe, 2013)。渡邉らが開発した YFP 変異体、YFP1G と YFP3G は、YFP と比べて水との相互作用しやすくなっているため、蛋白質濃度に対する感受性が増強されていると考えた。そこで YFP1G と YFP3G の蛋白質濃度に対する感受性を調べた。予想通り、250 mg/mL BSA 溶液では、YFP よりも変化量が 10%増加していた。

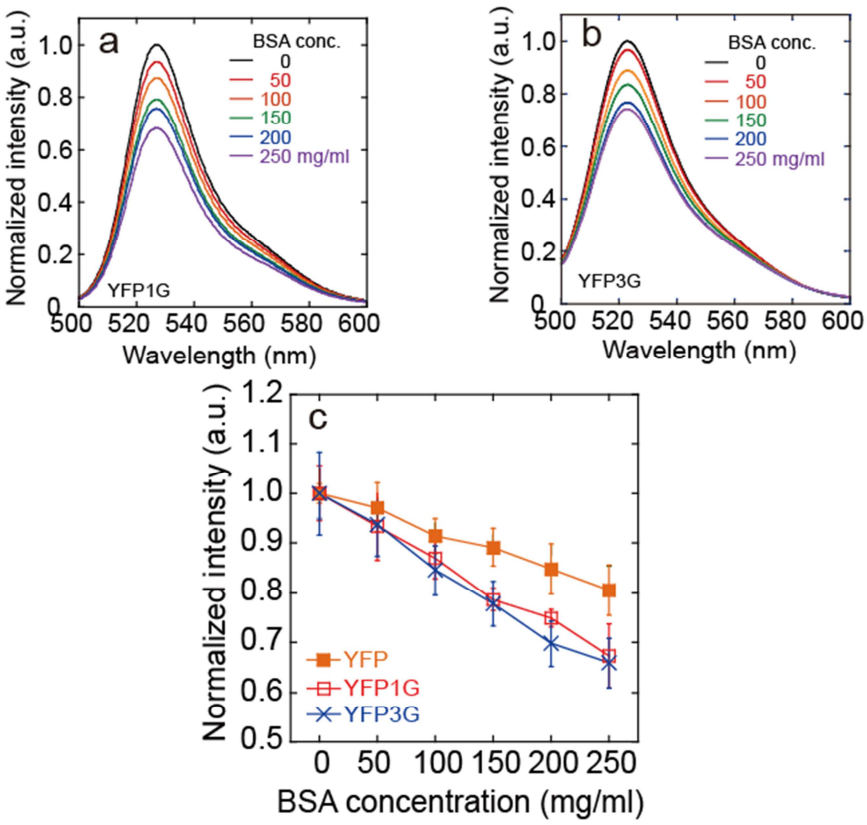


図 10 (a)-(b) YFP 変異体の蛋白質濃度に対する蛍光スペクトルの変化(a)YFP1G、(b)YFP3G (黒 : 0 mg/mL、赤 : 50 mg/mL、オレンジ : 100 mg/mL、緑 : 150 mg/mL、青 : 200 mg/mL、紫 : 250 mg/mL BSA)、 (c)YFP と YFP 変異体の蛍光強度の BSA 濃度依存性 オレンジ : YFP、赤 : YFP1G、青 : YFP3G

蛋白質濃度感受性の由来の解明

蛋白質濃度に対する感受性が何に由来するかを確かめるために、溶液中の分子混雑を変化させる物質としてよく用いられている、ポリエチレングリコール(PEG6000)、スクロース、グリセロールに対する YFP、YFP1G、YFP3G の反応を調べた。PEG6000 は溶液中の粘性を、スクロースは浸透圧を、グリセロールは粘性と疎水性を変化させる。PEG6000 に対しては、YFP3G のみが感受性を示した。スクロースに対しては、YFP のみが感受性を示した。グリセロールに対しては、その溶液中の割合の増加に伴い、YFP1G の蛍光が大幅に減少した。一方で、YFP と YFP3G は感受性を示さなかった。

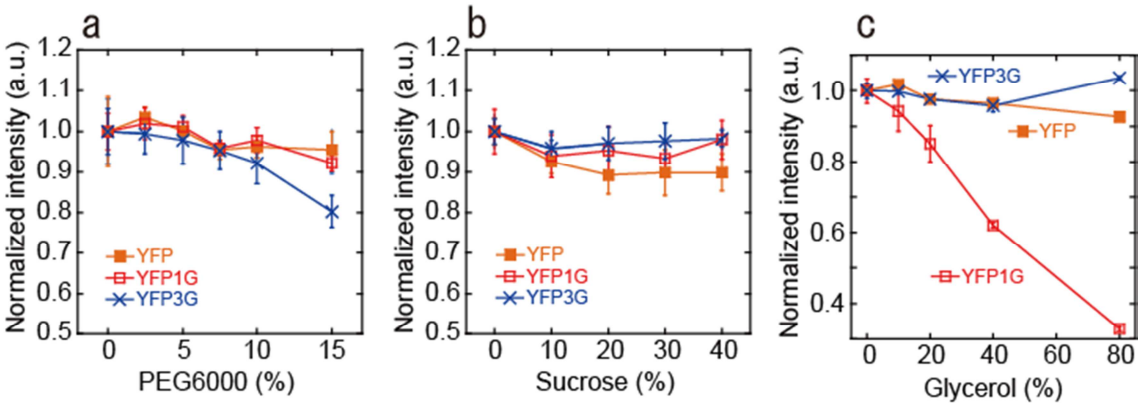


図 11　YFP と YFP 変異体の PEG6000(a)、スクロース(b)、グリセロール(c)に対する依存性 オレンジ：YFP、赤：YFP1G、青：YFP3G

その中で、YFP1G のグリセロールに対する感受性に注目した。YFP と YFP3G と比べて、変化が非常に大きかったからである。溶液のグリセロールは、溶液中の粘性と疎水性を増加させる。一方で、粘性を変化させる PEG6000 に対して YFP1G は感受性を示さなかったので、YFP1G は疎水性に対して感受性があると推測された。そこで、様々な有機溶剤を用いて溶液中の疎水性を変化させた場合に、YFP1G が感受性を示すかどうかを調べた。

8 種類の有機溶剤(メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、2-ブタノール、γ-ブチロラクトン、2-ピロリドン、ジエチレングリコール)に対する YFP1G の反応を調べた。

YFP1G は、すべての有機溶剤に対して、その割合の増加に伴い、蛍光が減少した。各有機溶剤の割合に対する蛍光強度の変化を $I = \exp(-k*x)$ （I：蛍光強度、x：有機溶剤の

溶液中の割合(%)、k：減衰定数(%$^{-1}$))でフィットした際の k の値を y 軸に、各有機溶剤の、物体の親水性/疎水性を示す指標として用いられるオクタノール/水分配係数を x 軸にしたグラフを図 12 に示す(Meylan & Howard, 1995）。k の値は、YFP1G の有機溶剤に対する感受性が高ければ大きくなり、低ければ小さくなる。つまり、感受性の指標として用いることができる。グラフを見ると、分配係数が小さい、つまり親水性の高い有機溶剤では k が小さく、分配係数が大きい、つまり疎水性の高い有機溶剤では k が大きくなっている。よって、YFP1G の感受性は、有機溶剤の疎水性に相関があることがわかる。

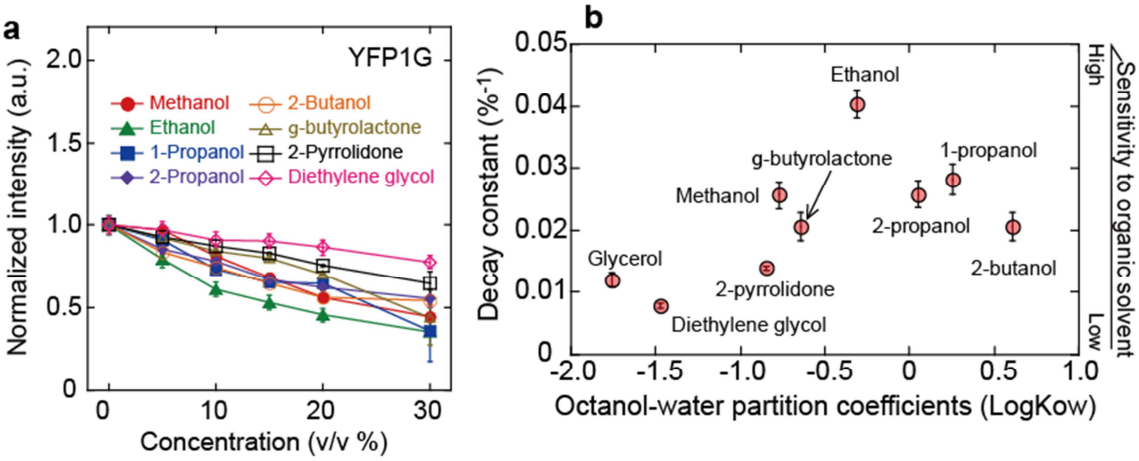


図 12　(a)YFP1G の有機溶剤に対する依存性（赤：メタノール、緑：エタノール、青：1-プロパノール、紫：2-プロパノール、黄：2-ブタノール、茶：γ-ブチロラクトン、黒：2-ピロリドン、ピンク：ジエチレングリコール)、(b)各有機溶媒に対する YFP1G の感受性と、各有機溶媒の疎水性　縦軸：減衰係数(感受性)　横軸：疎水性とオクタノール／水分配係数

以上の実験から、YFP1G は、疎水性を感受すること、そして疎水性を介して蛋白質濃度を感受していることが分かった。YFP と YFP3G の蛋白質濃度に対する感受性は、様々な要素の複合反応であると推測される。

YFP は様々な細胞内要素、例えば pH や Cl^- イオンなどに対して感受性を示す。グリシンを挿入して事でこれらに対する感受性が変化したかを調べたころ、YFP とほぼ同じであった。以上より、YFP1G が、調べた蛍光蛋白質の中で蛋白質濃度を検出するのに最も適していると結論付けた。

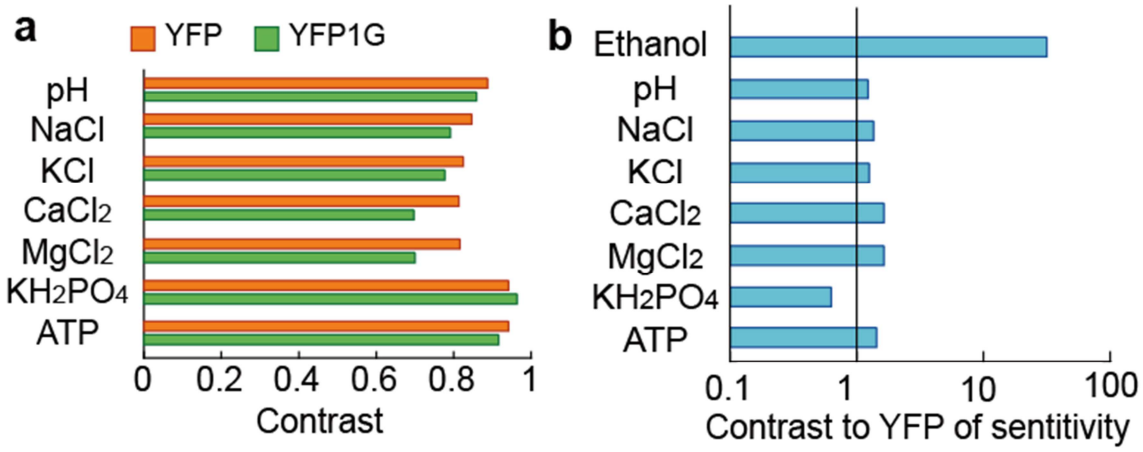


図 13　(a) 20 mM HEPES pH8.0 と、各イオン(200 mM NaCl、200 mM KCl、200 mM $CaCl_2$、200 mM $MgCl_2$、 200 mM KH_2PO_4、 4 mM ATP)を混合した溶液における蛍光強度の比較、(b)YFP の感受性を 1 とした場合の YFP1G の各イオンに対する感受性

GimRET の構築と評価

CFP と YFP1G を、柔軟性のある 18 アミノ酸で構築したリンカー(GGSGGT×3)を介して繋ぎ、FRET プローブとした。この FRET プローブの蛋白質濃度に対する感受性を調べた。結果、蛋白質濃度の増加に応じて、CFP の蛍光強度が増加し、YFP1G の蛍光強度が減少した。CFP の蛍光(460-500 nm)と YFP1G の蛍光(520-560 nm)の強度比をプロットすると、蛋白質濃度に対して直線的に相関を示した。この FRET プローブを、GimRET (Glycine inserted mutant FRET probe) と名付けた。

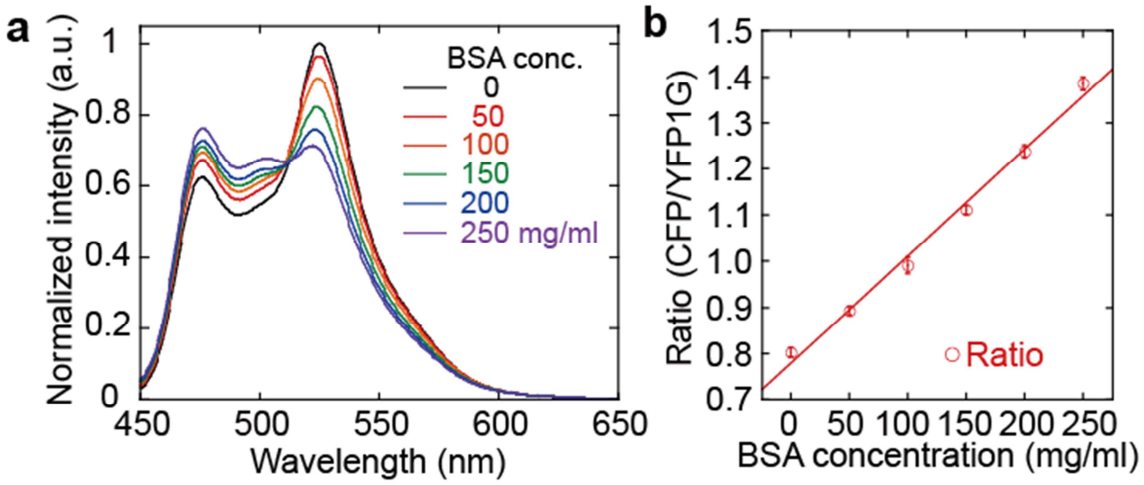


図 14　GimRET の蛋白質濃度に対する依存性　(a)GimRET の各 BSA 濃度における蛍光スペクトル(黒 : 0 mg/mL、赤 : 50 mg/mL、オレンジ : 100 mg/mL、緑 : 150 mg/mL、青 : 200 mg/mL、紫 : 250 mg/mL BSA)、(b)各 BSA 濃度における蛍光強度比(CFP/YFP1G)

CFP と YFP1G を FRET プローブとすることで蛋白質濃度に対する反応性が改善されていることを示すため、CFP と YFP1G の間のリンカーの長さを 40 アミノ酸にした CFP-longlinker-YFP1G を作製し、GimRET と比較した。結果、FRET プローブとすることで、反応性が 2 倍に増加していることを確認した。

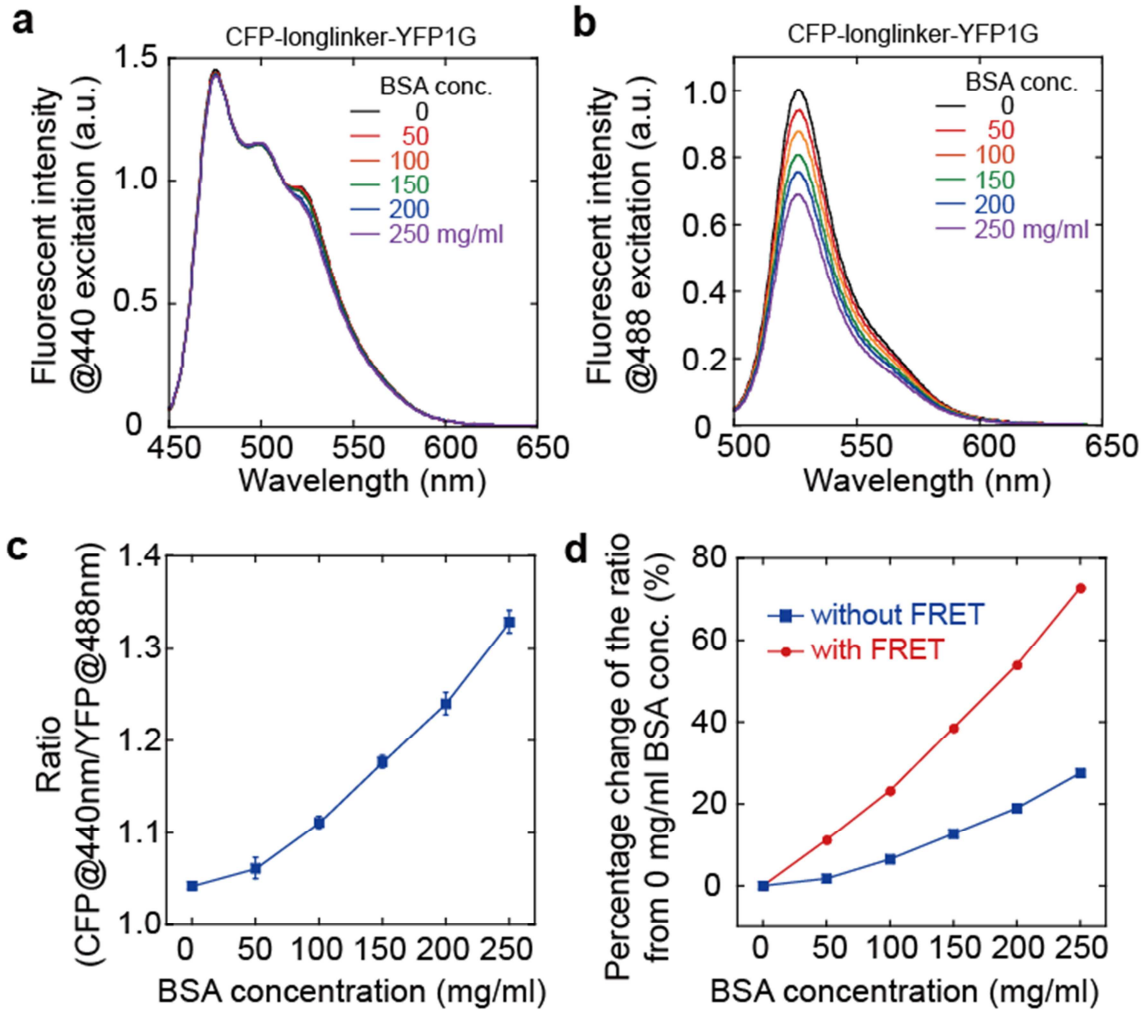


図 15　(a)CFP-longlinker-YFP1G の各 BSA 濃度における蛍光スペクトル、440 nm 励起、(b) CFP-longlinker-YFP1G の各 BSA 濃度における蛍光スペクトル、488 nm 励起、(黒 : 0 mg/mL、赤 : 50 mg/mL、オレンジ : 100 mg/mL、緑 : 150 mg/mL、青 : 200 mg/mL、紫 : 250 mg/mL BSA)、(c)各 BSA 濃度における蛍光強度比(CFP 440 nm 励起/YFP1G 488 nm 励起)、(d)GimRET と CFP-longlinker-YFP1G の BSA の各濃度における蛍光強度比の変化量

GimRET が、BSA 以外の蛋白質に対しても感受性を示すかどうかを調べた、実験には、リゾチーム、アクチン、チューブリンを用いた。GimRET はリゾチーム、アクチン、チューブリンに対して反応した。核酸に対しても同様の反応を示した。アクチンとチューブリンを重合させてもその反応性は変わらなかった。また、プローブに対する蛋白質の非特異吸着が分子混雑に影響を及ぼすことが知られている(McConkey, 1982 : Wang, 2011)。しかしながら、蛋白質溶液のイオン強度を 300 mM まで増加させて非特異吸着を増加さ

せても、GimRET の蛍光スペクトルは変化しなかった。最後に、大腸菌の破砕液を用いて、細胞内の分子混雑を模した溶液に対しての感受性を調べたところ、予想通りの感受性を示した。

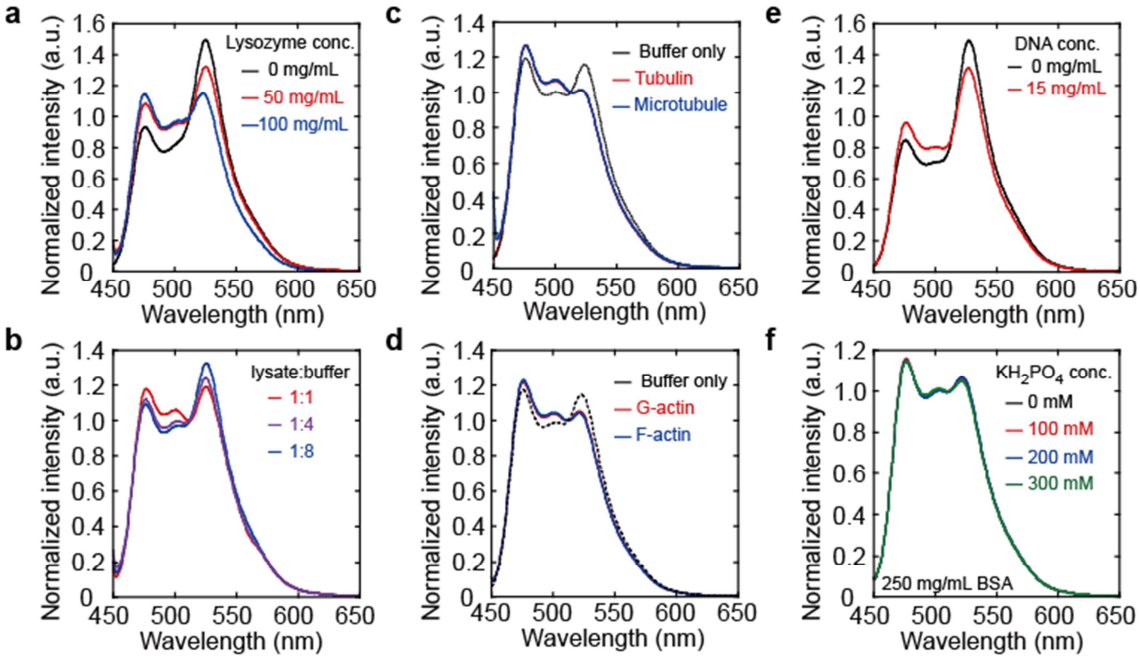


図 16　蛋白質、DNA、細胞破砕液に対する GimRET の蛍光スペクトルの変化　(a)リゾチーム、(b)細胞破砕液、(c)10 mg/mL チューブリン、(d)9.7 mg/mL アクチン、(e) 15 mg/mL DNA、(f)各濃度の KH_2PO_4 を含む 250 mg/mL BSA 溶液における GimRET の蛍光スペクトル(黒：0 mM、赤：100 mM、青：200 mM、緑：300 mM KH_2PO_4)

まとめと考察

各種蛍光蛋白質の蛋白質濃度に対する反応性を調べたところ、250 mg/mL BSA 溶液において、GFP、YFP、mKate2 の蛍光強度が減少し、CFP と mCherry の蛍光強度はほぼ変化しなかった。この結果は、各蛍光蛋白質は蛋白質濃度に対して感受性を持っていることを示しており、これらを用いたプローブでは、その影響を考慮する必要があることを示唆している。

YFP の 145 番目のチロシンの位置に、グリシン残基を挿入することで、YFP の蛋白質濃度に対する反応性を改善することに成功した。しかし、YFP とその変異体では、蛋白質濃度を感受するメカニズムは異なると考えられる。

また、挿入するグリシンの数を変えた場合に、感受性が変化することを示した。これまでの蛍光蛋白質の改変では、アミノ酸の置換が行われてきた(Miyawaki, 2008)。今回の論文では、アミノ酸の挿入という新たな蛍光蛋白質の改変方法の有用性を示している。アミノ酸挿入は、蛍光蛋白質に細胞内の様々な要素に対する感受性を持たせる有用な方法になりうるのではないかと考えている。

YFP1G の蛋白質濃度に対する感受性は、蛋白質や核酸による疎水性に由来すると考えられる。溶液中の疎水性を検出する蛍光色素 POLARIC を用いて、高濃度の蛋白質溶液では疎水性が高いことを確認した(Son, 2011)。蛋白質濃度の増加に伴う疎水性の増加が、YFP1G の蛍光強度に影響を与えていることは確実である。

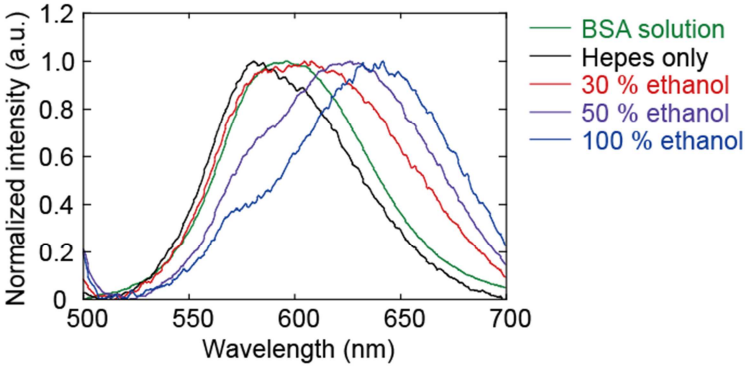


図 17　各溶液における、疎水性により蛍光スペクトルが変化する色素 POLARIC 蛍光スペクトル（緑：BSA250 mg/mL 溶液、黒：100 mM HEPES のみ、赤：30%エタノール溶液、紫：30%エタノール溶液、青：エタノールのみ）

YFP と YFP1G を BSA 溶液に混合し、その吸収スペクトルを測定した。結果、YFP の吸収スペクトルは BSA の濃度を変化させても変化しなかったが、YFP1G の吸収は大幅に減少した。この結果は、蛋白質濃度の増加に伴う蛍光強度の減少は、YFP では量子収率の減少によるものであり、YFP1G ではモル吸光係数の減少によるものであると考えられる。

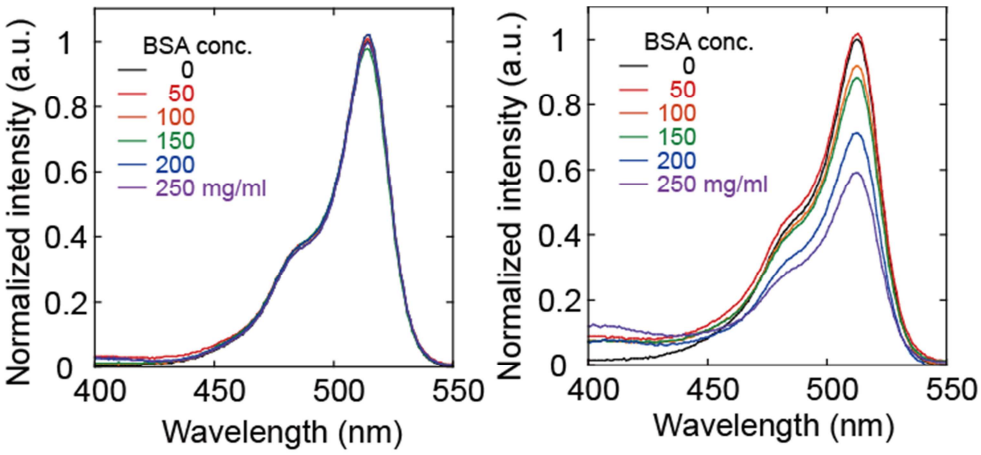


図 18　各 BSA 濃度における、YFP と YFP1G の吸収スペクトル(黒：0 mg/mL、赤：50 mg/mL、オレンジ：100 mg/mL、緑：150 mg/mL、青：200 mg/mL、紫：250 mg/mL)

蛍光蛋白質のモル吸光係数の減少は、蛍光団と水分子との静的な相互作用により引き起こされる(Lakowicz, 2006)。2012 年の渡邉らの論文において、YFP1G の X 線結晶構造が行われている。YFP と YFP1G の立体構造を比べると、YFP1G では、水分子に由来すると思われる酸素原子が、蛍光団周辺に存在できるようになっていることがわかる。構造解析の際の結晶内の溶媒の割合は約 40%であった。つまり、蛍光蛋白質が残りの 60%を占めている状態、言い換えれば非常に蛋白質濃度が濃い環境における立体構造である。周囲の蛋白質濃度が増加すると、YFP1G の蛍光団周辺に水分子が配位するようになると考えることができる。

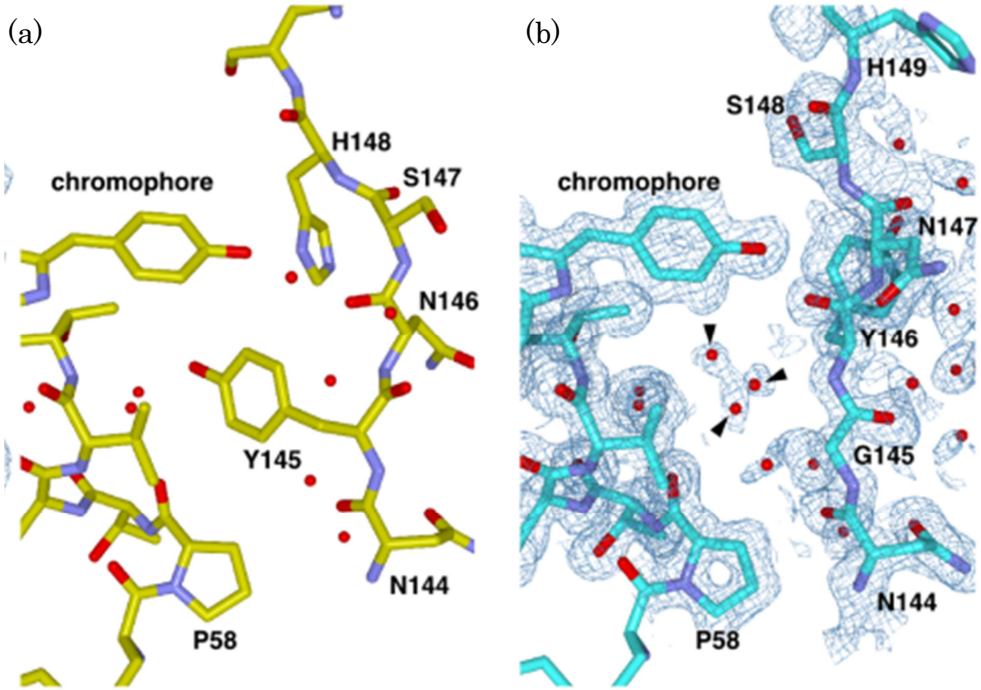


図 19　(a)YFP(1YFP)、(b)YFP1G(3W1C) の蛍光団周辺の立体構造

以上のことから、YFP1G が疎水性を感受するメカニズムを推測することができる。

蛍光蛋白質の蛍光団は、水分子と相互作用すると、蛍光が弱まってしまうため、通常はβバレル構造が水分子と蛍光団が相互作用することを防いでいる。YFP でも同様に、蛍光団はβバレル構造の内側の非常に疎水性の高い領域に存在するため、通常は YFP の周囲の疎水性が増加しても、水分子と相互作用することはない。しかし、YFP1G では 145 番目のチロシンの位置にグリシン残基を挿入したことにより、βバレル構造が崩れ、蛍光団の周囲が少しだけ親水的になっている(図 20a)。そのため、YFP1G の周囲が、蛋白質濃度の上昇などにより疎水的な環境になった時に、水分子が蛍光団の周辺に逃げ込み、蛍光団と相互作用してしまい、モル吸光係数が減少、結果として蛍光強度が減少してしまう(図 20b)。

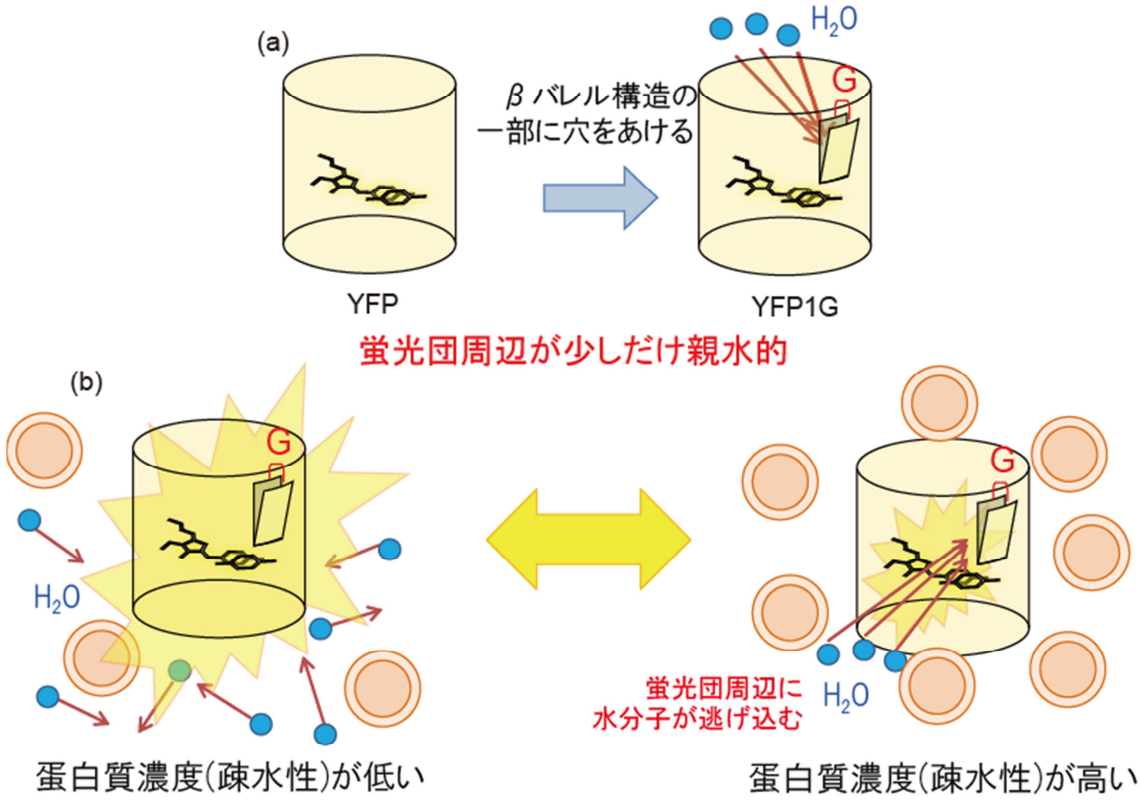


図 20　YFP1G が蛋白質濃度(疎水性)を感受するメカニズム

以上のようなメカニズムにより YFP1G が疎水性、ひいては蛋白質濃度に感受していると考えられる。

YFP1G は、確かに疎水性を介して蛋白質濃度に対して感受性を示すが、その詳細なメカニズムは今回の実験では示せていない。その解明には、高濃度の蛋白質溶液中において NMR を行うなどして、立体構造の変化を見る必要があると考えられる。

蛋白質濃度にほぼ感受性のない CFP と、感受性を持つ YFP1G を組み合わせることで、蛋白質濃度に応じて蛍光強度比が変化する FRET プローブ。GimRET を構築した。YFP1G は、FRET プローブとすることでその変化量が約 2 倍になった。また、CFP と YFP を、GimRET と同じように柔軟なリンカーでつなげた CFP-YFP を作製し、その蛋白質濃度に対する感受性を調べた。結果、GimRET と同じように変化したが、その変化量は GimRET と比べて小さかった。以上のことから、CFP と YFP1G を組み合わせた FRET プローブが、蛋白質濃度に対して最も感受性が高いことを示した。

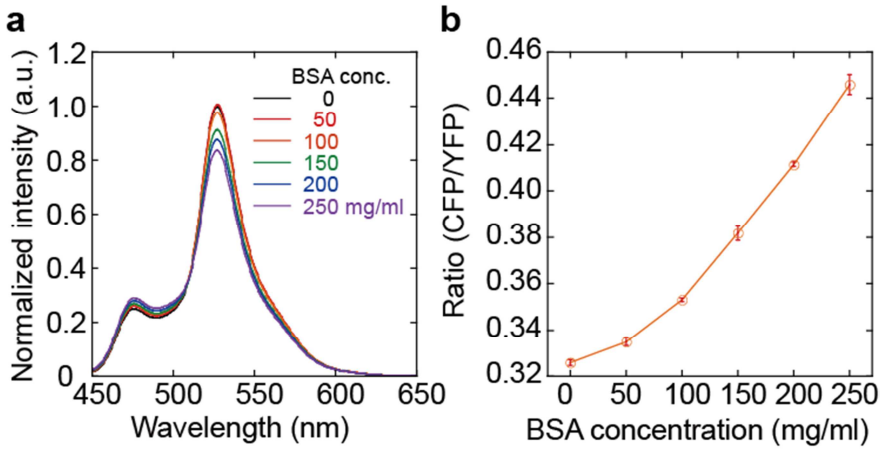


図 21　CFP-YFP で構築した FRET プローブの、各 BSA 濃度における蛍光スペクトル(黒 : 0 mg/mL、赤 : 50 mg/mL、オレンジ : 100 mg/mL、緑 : 150 mg/mL、青 : 200 mg/mL、紫 : 250 mg/mL)、(b)各 BSA 濃度における蛍光強度比(CFP/YFP)

GimRET は様々な蛋白質に感受性を示し、また、核酸、細胞破砕液に対しても反応した。このことは、細胞内での、様々な蛋白質や核酸によって変化する分子の混雑さに対して、感受性があることを示している。各蛋白質 1 mg/mL における GimRET の蛍光強度比の変化率は、BSA では 0.17%、 リゾチーム では 0.38%、アクチンでは 1.6% 、チューブリンでは 3.1% であった。蛋白質の分子量と変化率を比べてみたが、相関はなかった。また、アクチンとチューブリンを重合しても、GimRET の蛍光強度比は変化しなかった。以上のように、GimRET は確かに蛋白質濃度を検出しているが、蛋白質の種類により感受性が異なるので、細胞内の蛋白質の組成が大きく異なる細胞種間での比較などでは注意が必要である。

本章では、蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質 YFP1G を用いて、蛋白質濃度により蛍光強度比が変化する FRET プローブ、GimRET を開発した。

第４章　GimRET を用いた細胞内蛋白質濃度の測定

背景と目的

前章にて、蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質 YFP1G の開発と、CFP と YFP1G を組みわせることで、蛋白質濃度に応じて蛍光強度比が変化する FRET プローブ、GimRET の構築を行った。

In vitro の実験において GimRET は蛋白質濃度に感受性を示した。この章では、GimRET が、細胞内においても機能することを確認した。

細胞内の蛋白質濃度は、時間的に変化している。例えば細胞は、細胞分裂後に蛋白質の合成を行う(Lodis, 2011)。GimRET が細胞内でも蛋白質濃度に反応するならば、この変化も捉えることができるはずである。そこで、GimRET を用いて、細胞分裂後の細胞内の蛋白質濃度の増加と減少を検出できるかを試した。

また、人為的に細胞内の蛋白質濃度を変化させた場合に、GimRET が反応するかを調べた。細胞内でのタンパク質合成／分解を阻害した場合、細胞内の蛋白質濃度が減少／増加する。それぞれの阻害剤を作用させた場合、GimRET がその変化を検出できるかを調べた。

細胞外の浸透圧を変化させた場合、細胞にかかる圧力が変化するので、細胞の体積が変化する(Fernández, 2013)。また、細胞は、細胞骨格により細胞の形を保っているので、細胞骨格を崩壊させれば、その形が変わり、細胞の体積を変化させるはずである。そこで、細胞にかかる浸透圧を変化させる、あるいは細胞骨格を崩壊させることで、細胞の体積を変化させ、それに伴う細胞内の蛋白質濃度の変化を、GimRET が検出できるかを調べた。

実験方法

細胞培養

HeLa 細胞(human epithelial carcinoma cell line)細胞を用いた。細胞を 37℃、5%CO_2 条件下で、10％ウシ胎児血清(Sigma-Aldrich)、1%ペニシリンーストレプトマイシン(Sigma-Aldrich)を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium、Sigma-Aldrich)培地で培養した。

細胞が 70～80％コンフルエントの時にトリプシン処理を行い、1×10^5 個の細胞をコラーゲン I コートガラスボトムディッシュに撒いた。ガラスボトムディッシュに撒き、24 時間後、ディッシュ 1 枚につき、100 μl OPTI-MEM(Gibco)に遺伝子導入試薬である FuGEN-HD(Roche) 6 μl と一過性発現用ベクター2 mg を混合した溶液を加えた。溶液を加えて 24‐48 時間後、PBS(-)で FuGENE を洗い流した後、フェノールレッドの入っていない DMEM 培地に変え、顕微鏡で観察した。

インキュベータ付き二光子顕微鏡

細胞のイメージングには、多光子励起レーザー走査型顕微鏡 (FV1000-MPE, オリンパス)に 2 光子励起用の Ti:Sapphire レーザー(Mai Tai DeepSee; Spectra Physics)を搭載したものを使用した。細胞を長期間観察するために、ステージをインキュベータ(CytoGROW™ GLP, Sanyo)内に設置した。対物レンズには、25 倍((NA 1.05、水浸、XLPLN、オリンパス)と 60 倍(NA 1.49、油浸、PLAPON、オリンパス)を用いた。25 倍レンズを用いた場合、観察領域は 508.43×508.43 μm^2 (1024×1024pixels)、0.497 μs /pixel の条件で観察した。60 倍対物レンズを用いた場合は、211.76×211.76 μm^2 (1024×1024pixels)、0.207 μs /pixel の条件で観察した。各画像は、5 回平均像である。GimRET、CFP‐YFP は 880 nm(2 光子励起のため 440nm)により励起され、その蛍光を 505 nm のダイクロイックミラーで CFP と YFP の蛍光に分けられ、460-500 nm と 520-560 nm のバンドパスフィルターを通ってディテクターに投射した。

画像解析

画像解析には ImageJ を用いた。各蛍光像からバックグラウンドを引き、測定したい範囲を選択し、範囲内の蛍光強度を測定した。得られた CFP の蛍光強度を、YFP1G の蛍光強度で割ることで、蛍光強度比とした。

長時間タイムラプスイメージング

細胞分裂前後での蛋白質混雑の変化を観察するために、長時間タイムラプスを行った。GimRET を発現した細胞を、蛍光顕微鏡上において、37℃、5%CO_2 条件下、30 分に一回、50 時間撮影した。観察には 25 倍の水深レンズを用いた。

細胞内蛋白質分解・合成阻害剤を用いた実験では、観察開始後 2.5 時間に、顕微鏡上において 1 mM cycloheximide (WAKO)、あるいは 0.25 μM MG132 (WAKO)を混合した培地に交換、交換後 24 時間観察した。

SNARF を用いた細胞内 pH のイメージング

SNARF は、溶液の pH に応じて蛍光スペクトルが変化する蛍光色素である。SNARF の蛍光スペクトルは 570 nm と 650 nm にピークを持っており、pH によりその 2 つのピークの蛍光強度比が変化する。この特性を生かして、細胞内の pH をこの 2 つの蛍光強度比から求めることができる(Buckler, 1990)。

5-(and-6)-carboxy SNARF®-1 (SNARF-1)と 5-(and-6)-carboxy SNARF®-1, acetoxymethyl ester, acetate(SNARF-AM)を Molecular Probes から購入した。

SNARF-1 を DMSO に溶解し、終濃度が 10 μM になるように各 pH の溶液(100mM HEPES (pH 8.5, 8.0, 7.4, 7.0)、100mM MES (pH 6.5))と混合した。SNARF-1 を混合した pH 溶液を、蛍光顕微鏡上で観察した。SNARF は緑レーザー(FV10-LD473, Olympus, JAPAN)で励起、その蛍光を 560 nm のダイクロイックミラーで分離し、スペクトロフォトメーターを用いて 500-560nm (Green)と 640-700 nm (Red)の蛍光を検出した。得られた蛍光像から、各 pH における 640-700 nm (Red)/500-560nm (Green)の蛍光強度比を計算した。横軸に pH を縦軸に 640-700 nm (Red)/500-560nm (Green)のグラフを作成した(図 22)。

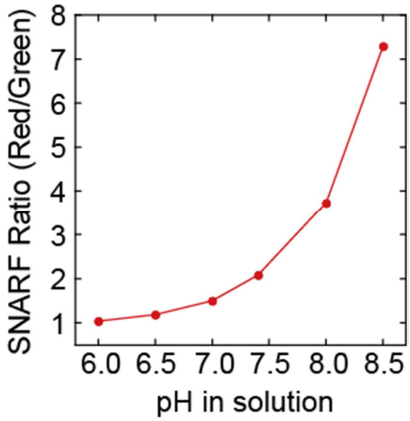


図 22　各 pH における SNARF の蛍光強度比(Red/Green)

細胞を培養している培地を 5 μM SNARF-AM を混合した培地に置換した。30 分後、PBS で細胞に取り込まれなかった SNARF-AM を洗い流し、フェノールレッドなしの培地に置換し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞内の SNARF の蛍光の観察には上記と同じ条件を用いた。得られた蛍光像から SNARF の蛍光強度比を計算し、上記で求めたグラフから、pH を算出した。

強制的な細胞体積の変化

GimRET、CFP-YFP を発現させた HeLa 細胞、あるいは SNARF で染色した細胞の培地を、150 mM スクロースを混合した 20 mM PBS (pH 7.4) に置換した。10 分後、蛍光顕微鏡を用いて細胞の観察を行った。観察後、顕微鏡上で、培地にスクロースの入っていない 20 mM PBS (pH 7.4)を等量加え、培地のスクロースの濃度を 75 mM に減少させた。スクロースの濃度を減少させて 30 秒、1 分、3 分、5 分、10 分後に、初めに観察したものと同じ細胞を観察した。

GimRET、CFP-YFP を発現させた HeLa 細胞、あるいは SNARF で染色した細胞の培地をフェノールレッドの入っていない培地に置換し、蛍光顕微鏡で細胞の観察を行った。観察後、顕微鏡上で、ノコダゾール 10 μM を混合した培地に交換した。30 分後、初めに観察したものと同じ細胞を観察した。

細胞外液の浸透圧変化による大腸菌の体積変化

この実験は、Mille らの実験手法を参考に行った(Mille, 2002)。GimRET を発現誘導した大腸菌を HEPES 100 mM (pH 7.4)、27% (10 MPa)、50% (30 MPa)グリセロール溶液(HEPES 100 mM(pH 7.4)と混合)に混合した。この混合溶液をポリエルリジンコートしたガラスボトムディッシュ上にのせ、顕微鏡上で観察した。その際、60 倍の対物レンズを用いて観察した。

強制的な細胞内 pH の変化

SNARF で染色した細胞の培地を、20 mM PBS (pH 7.4)に置換した。10 分後、蛍光顕微鏡を用いて細胞の観察を行った。観察後、顕微鏡上で、培地を pH 8.5 あるいは pH 6.5 の PBS に置換した。30 分後、同じ細胞を観察した。細胞内 pH は図 22 のグラフから算出した。

GimRET を発現させた HeLa 細胞を用いて同様の実験を行った。上記実験より求めた細胞内 pH を横軸に、それぞれの pH における GimRET の蛍光強度比を縦軸にプロットした。

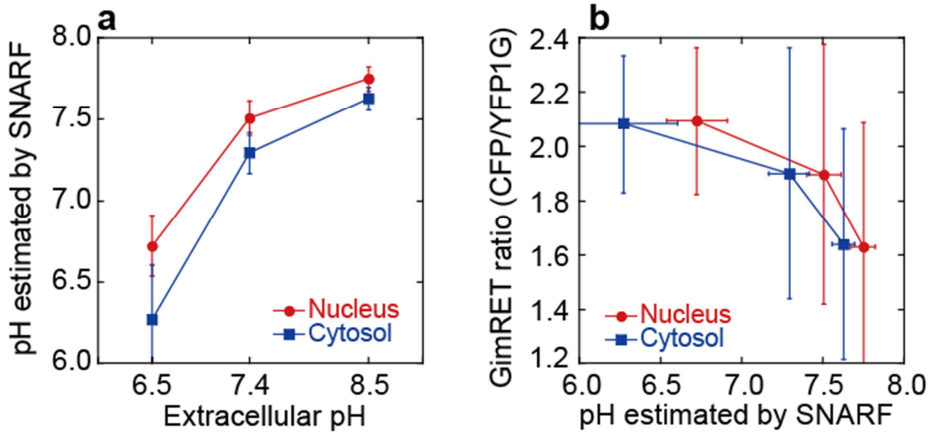


図 23　(a)細胞外液の pH を変化させた場合の、核と細胞質の pH、横軸 : 細胞外液の pH、縦軸 : 核と細胞質の pH、(b)細胞内 pH と GimRET の蛍光強度比、横軸 : 核と細胞質の pH、縦軸 GimRET の蛍光強度比

結果

GimRET を用いた細胞分裂後の細胞内蛋白質濃度の時間変化の検出

GimRET が細胞内の蛋白質濃度の変化をとらえることができるかを調べるため、細胞分裂後の GimRET の蛍光強度比の変化を調べた。この実験は、GimRET を発現させた HeLa 細胞で行った。予想通り、GimRET の蛍光強度比は細胞分裂後に増加し始めた。コントロールとして CFP-YFP でも同様の実験を行ったが、CFP-YFP の蛍光強度比には変化がみられなかった。

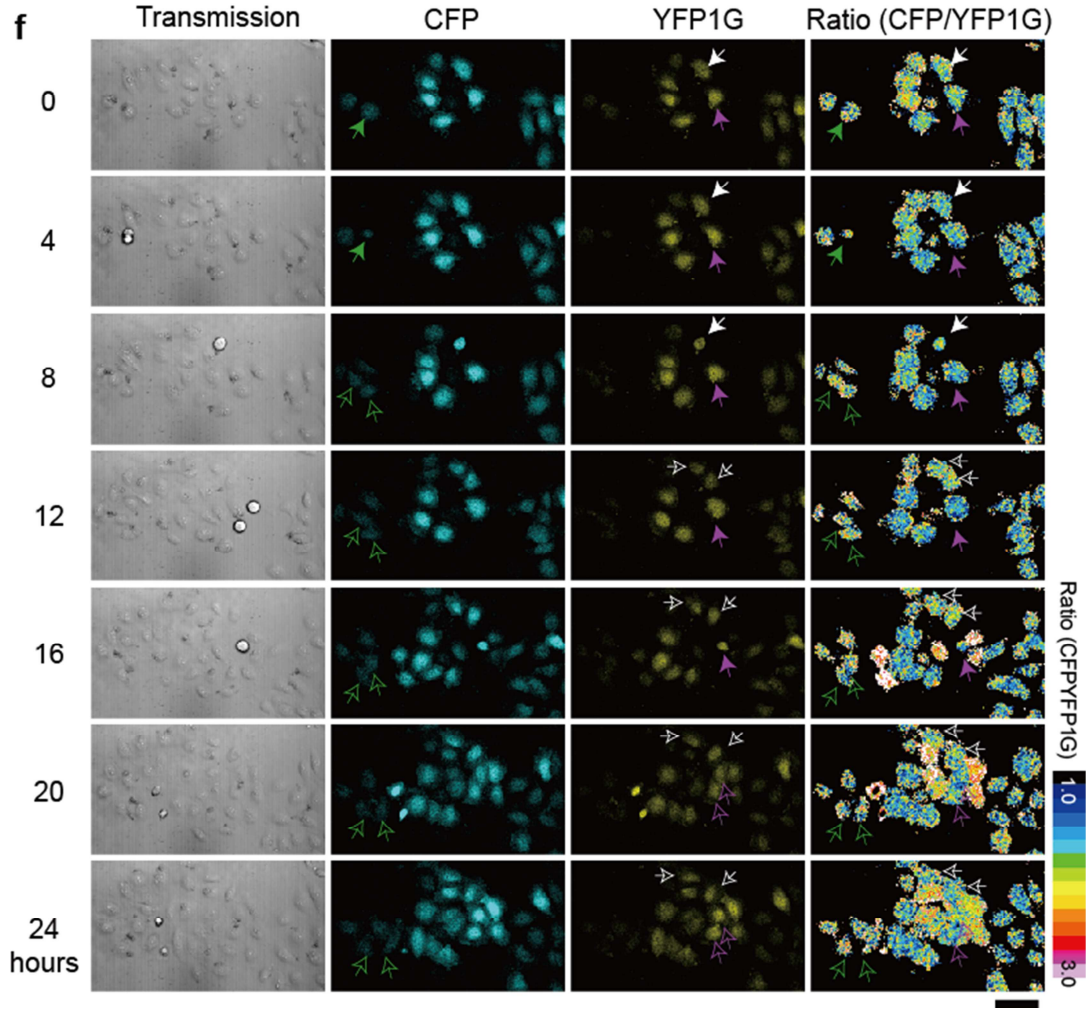


図 24　細胞分裂中のタイムラプスイメージング、左；明視野像、中央左：CFP(460-500 nm)の蛍光像、中央右：YFP1G(520-560 nm)の蛍光像、右：蛍光強度比像、矢印：分裂している細胞

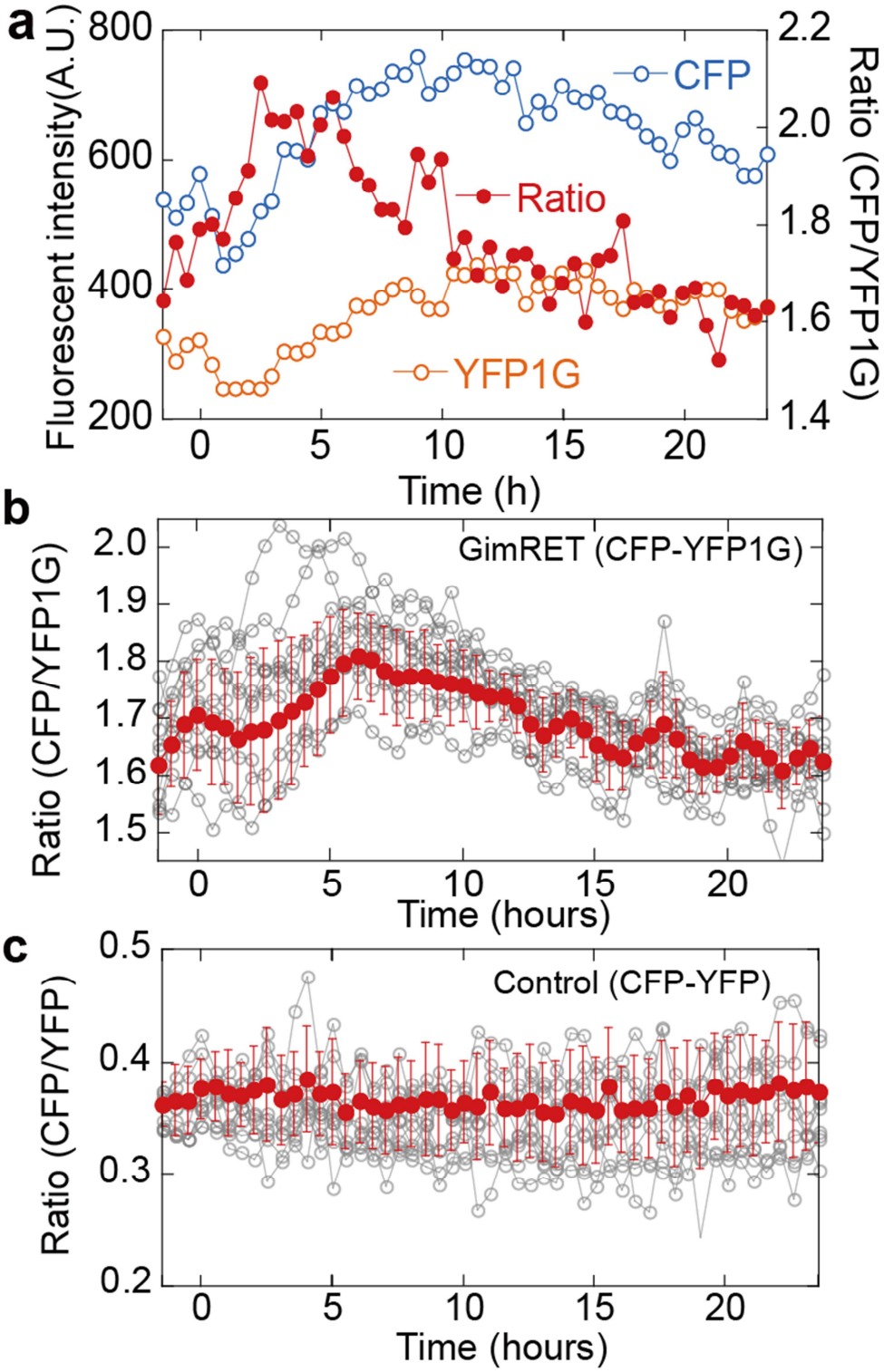


図 25　(a)細胞分裂後の細胞内の蛍光強度と蛍光強度の変化の代表的なトレース、(b)細胞分裂後の蛍光強度比の時間変化、灰:代表的なトレース、赤:平均トレース、(c) CFP-YFP を発現させた細胞における、細胞分裂後の蛍光強度比の時間変化、灰：代表的なトレース、赤：平均トレース　時間 0 において細胞分裂している。

薬剤を用いた蛋白質合成／分解阻害

また、薬剤を用いて、細胞内の蛋白質合成、あるいは分解を阻害した際に、GimRET の蛍光強度比が変化するかを調べた。タンパク質合成阻害剤として、リボソームに作用することで、翻訳を阻害するシクロヘキシミドを(Ferraiuolo, 2005）、分解阻害剤として、26S プロテアソームを阻害する MG132 を使用した（Han, 2009）。シクロヘキシミドを細胞に作用させたところ、GimRET の蛍光強度比が減少した。MG132 を細胞に作用させたところ、GimRET の蛍光強度比が増加した。この結果は、タンパク質合成を阻害したことによる細胞内蛋白質濃度の減少と、蛋白質分解を阻害したことによる細胞内蛋白質濃度の増加をとらえていると考えられる。同様の実験を CFP-YFP で行ったところ、同様に変化したが、その変化量は GimRET と比べて小さかった。以上の結果から、GimRET を用いることで、細胞内の蛋白質濃度の時間的な変化をとらえることができることを示した。

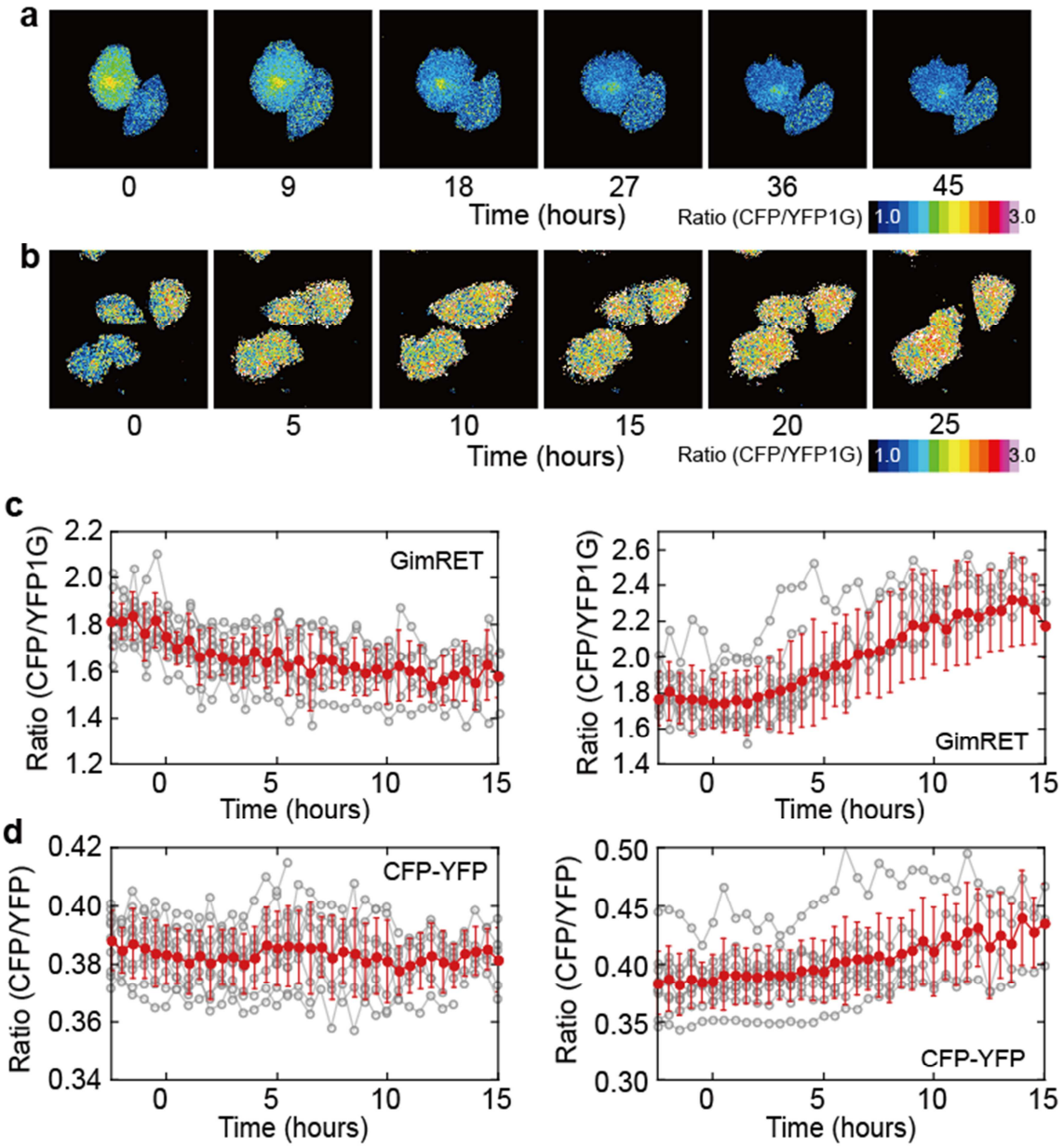


図 26　蛋白質合成阻害剤(a)、分解阻害剤(b)を作用させた細胞の蛍光強度比像、(c, d) GimRET(c)あるいは CFP-YFP(d)を発現させた細胞における、蛋白質合成阻害剤(左)、蛋白質分解阻害剤(右)を作用させる前後の蛍光強度比の時間変化、灰：代表的なトレース、赤：平均トレース

強制的な細胞体積の変化

細胞の体積変化は、細胞内の蛋白質濃度を変化させる細胞外液の浸透圧を変化させることで、細胞の体積を変化させ、その変化を GimRET が検出できるかを調べた。外液のスクロースの濃度を 150 mM から 75 mM に変えると、浸透圧が低下し、細胞が膨らむため体積が増加する。細胞内の GimRET の蛍光強度比を、濃度を変化する前、変化後 30 秒、1 分、3 分、5 分、10 分において測定した。外液のスクロースの濃度を変化させたところ、30 秒後には細胞内の GimRET の蛍光強度比が減少した。47 細胞のうち、46 細胞において細胞外のスクロース濃度の変化後 30 秒で蛍光強度比の減少が見られた。

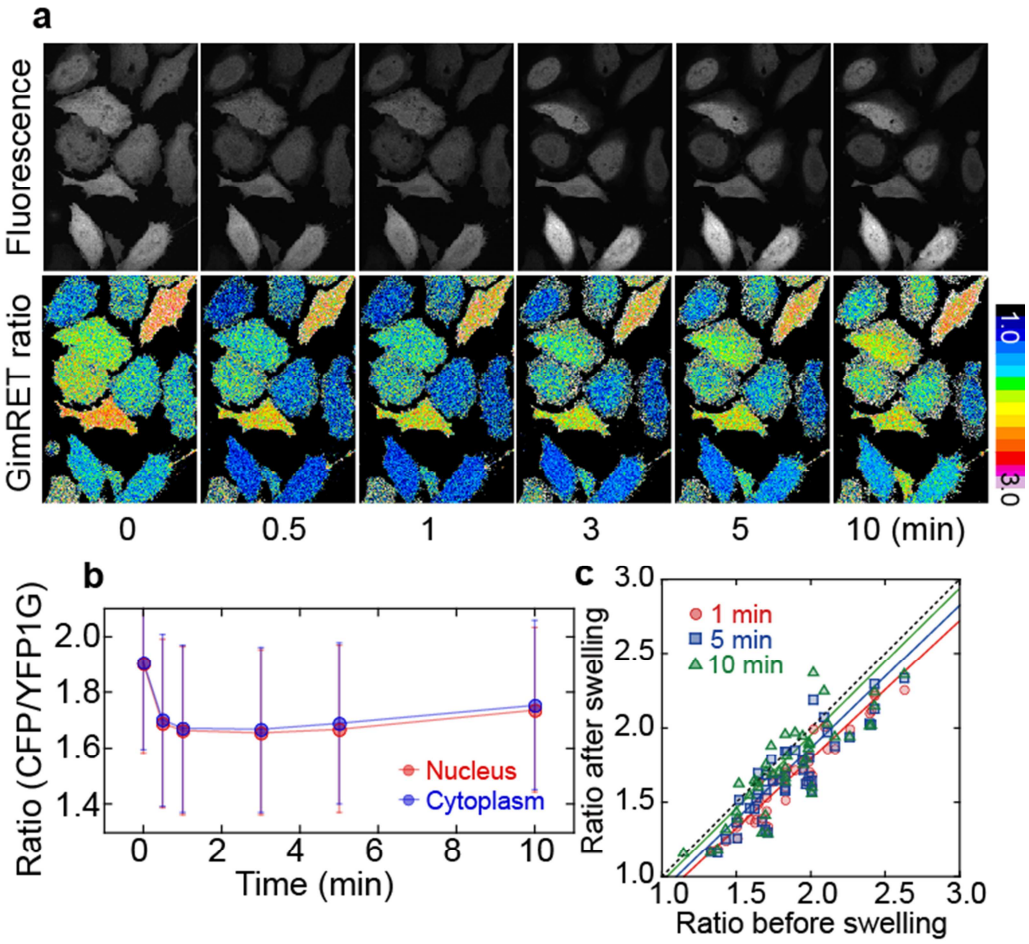


図 27　(a) GimRET を発現させた細胞細胞外液のスクロースの濃度を変化させた場合の細胞内の蛍光像(上)と蛍光強度比像(下)、(b)細胞外液のスクロースの濃度を変化させた場合の蛍光強度比の時間変化、(c)細胞外液のスクロースの濃度を変える前後における、同じ細胞の蛍光強度比の変化　横軸：変化前、縦軸：変化後

また、CFP と YFP1G の蛍光強度を合わせた全蛍光強度の変化を調べると、スクロース濃度の変化後 30 秒で蛍光強度が減少し、その後徐々に元の値に戻ることが分かった。この短時間では、蛋白質の合成と分解が起こらないので、細胞の体積変化に応じて蛍光強度が変化したと考えられる。つまり、細胞の体積が増加したため蛍光強度が減少し、増加した体積が元の大きさに戻ったため蛍光強度も元の値に戻った、ということである。蛍光強度比の変化と蛍光強度の変化を比べると、強い相関がみられた。細胞ごとに変化を見てみると、蛍光強度比と蛍光強度は同じように変化していた。

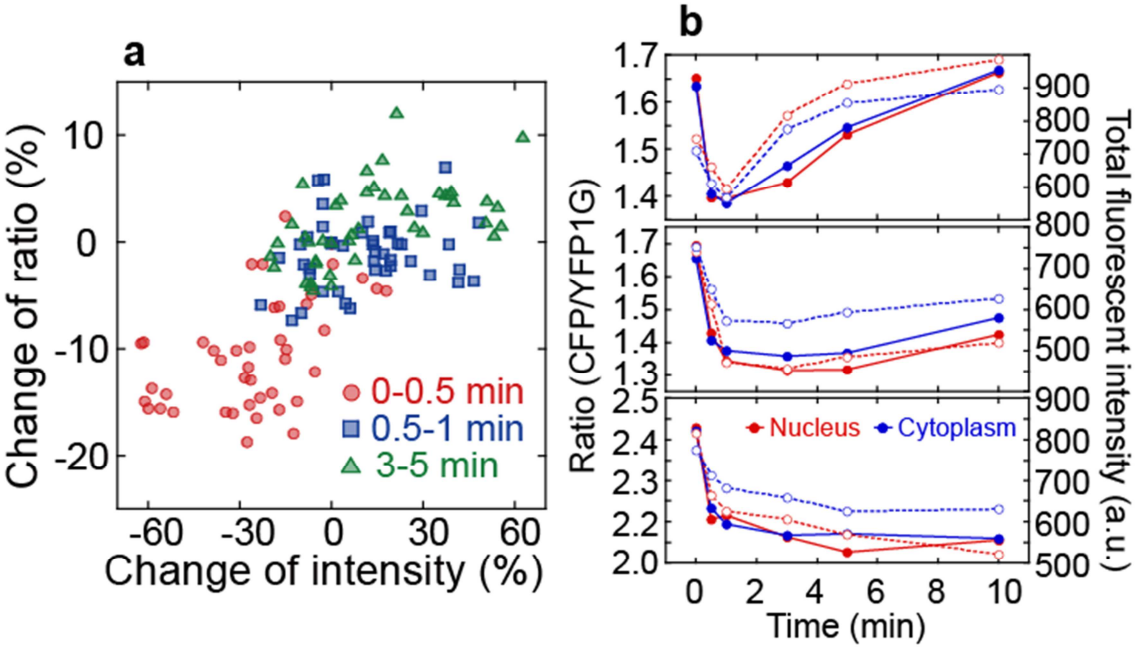


図 28 (a)GimRET を発現させた細胞細胞外液のスクロースの濃度を変化させた場合のそれぞれの時間における蛍光強度と蛍光強度比の変化量、(b) 異なる細胞のおける GimRET を発現させた細胞細胞外液のスクロースの濃度を変化させた場合の蛍光強度と蛍光強度比の時間変化

CFP-YFP を用いて同様の実験を行った場合、GimRET と同じように変化した。しかし、その変化量は GimRET よりも小さかった。以上のことから、GimRET により人為的な細胞体積の増加に伴う蛋白質濃度の減少を検出できることを示した。

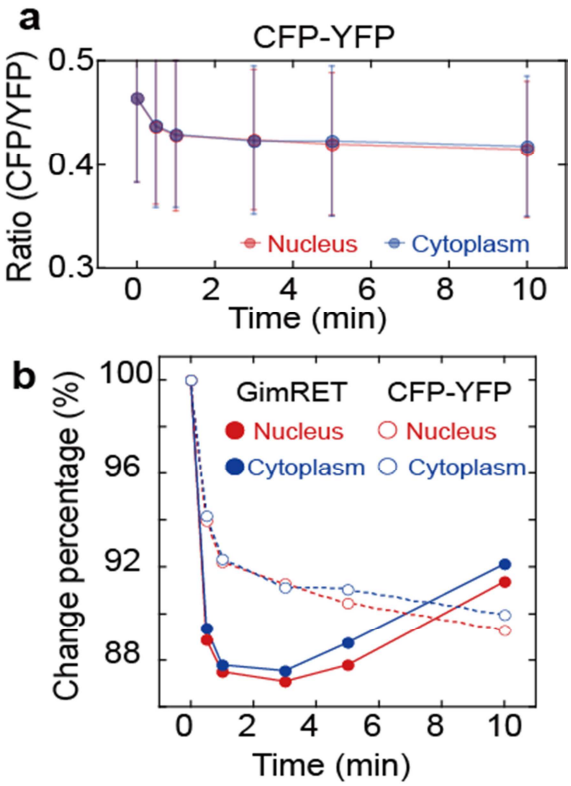


図 29　(a)CFP-YFP を発現させた細胞の細胞外液のスクロースの濃度を変化させた場合の蛍光強度比の時間変化、(b)GimRET と CFP-YFP を発現させた細胞の細胞外液のスクロースの濃度を変化させた場合の蛍光強度比の時間変化の比較

細胞を収縮させ細胞の体積を減少させる実験を行った。この実験には、微小管を崩壊させるノコダゾールを使用した。ノコダゾール 10 μM を細胞に 30 分作用させたところ、細胞内の GimRET の蛍光強度比が減少した。細胞内の全蛍光強度を測定したところ、蛍光強度はノコダゾールを作用させる前と比べて増加していた。つまり、細胞体積の減少に伴う蛋白質濃度の増加を GimRET で検出することに成功した。

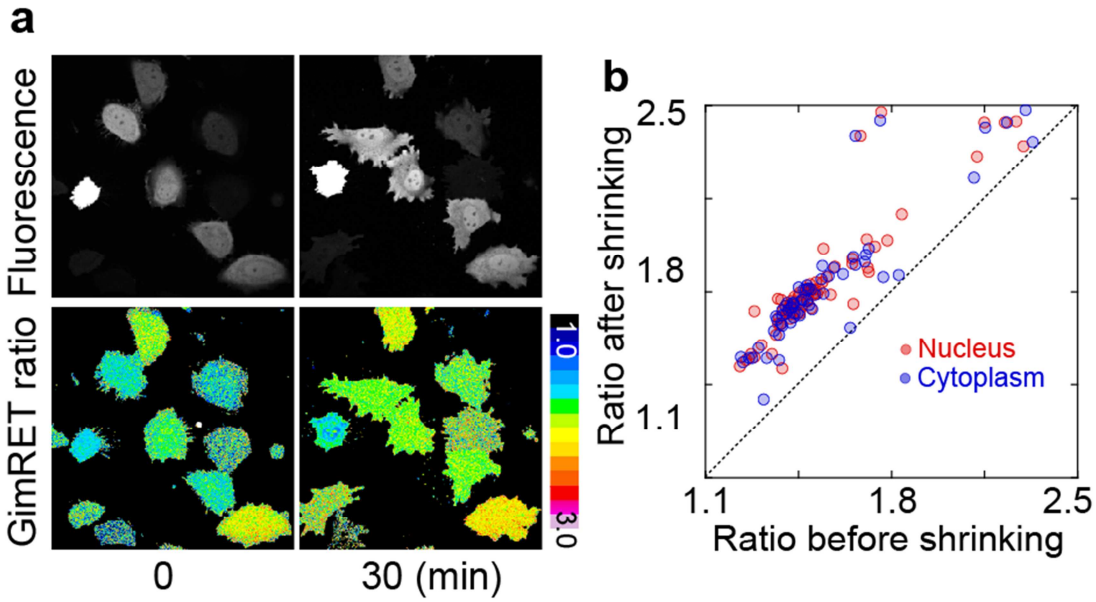


図 30　(a)ノコダゾールを用いて細胞を縮ませる前後の GimRET を発現させた細胞の蛍光像と蛍光強度比像、(b)同じ細胞における、ノコダゾールを作用させる前後での蛍光強度比の比較、横軸：作用前の蛍光強度比、縦軸：作用後の蛍光強度比

同様の結果が、大腸菌を用いた実験でも得られている。GimRET を発現させた大腸菌を、浸透圧の高い溶液に入れて細胞を収縮させた場合、GimRET の蛍光強度比は体積の減少に伴い増加していた。

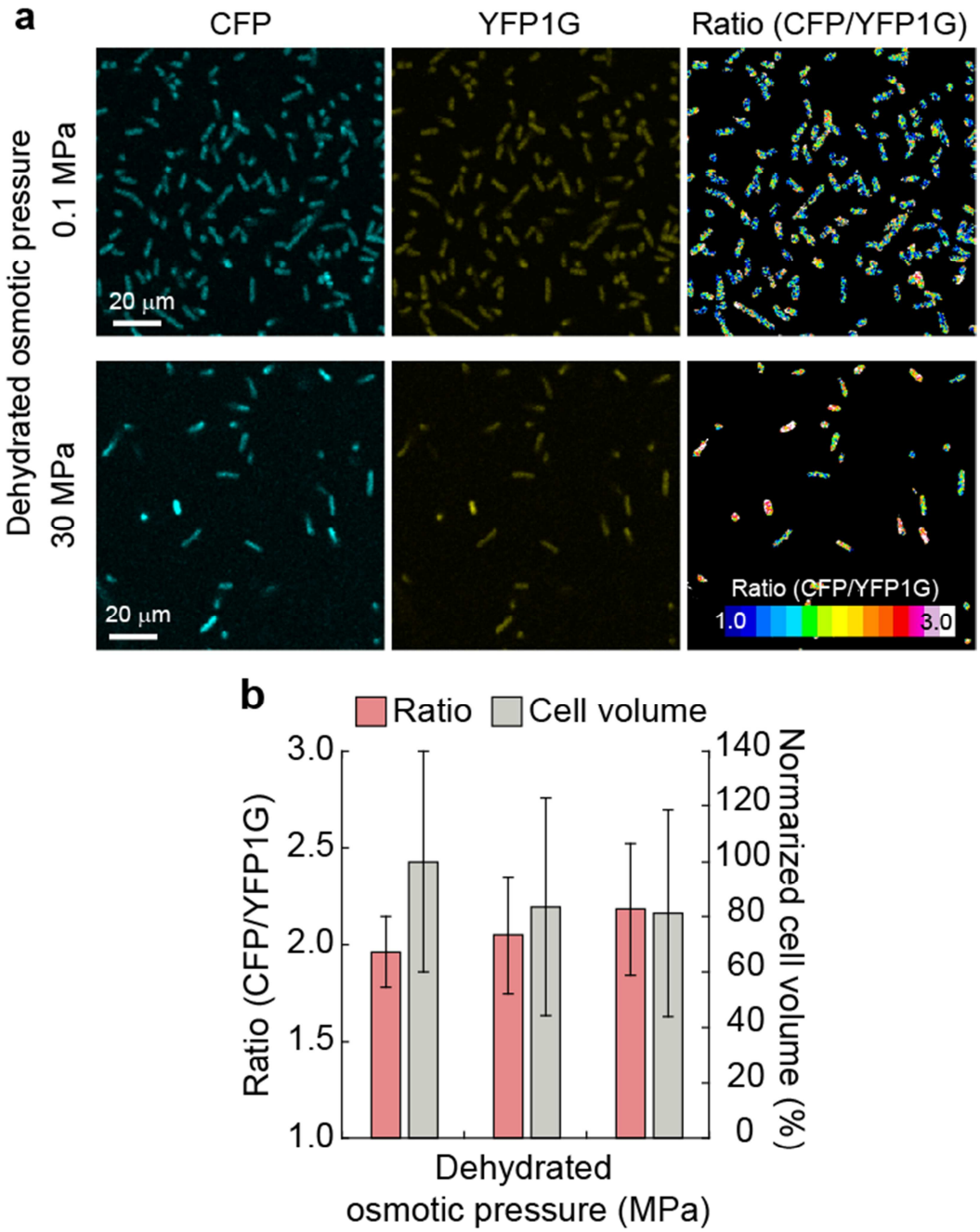


図 31　(a)GimRET を発現させた大腸菌の外液の浸透圧が 0.1 MPa(上)、30 MPa(下)の場合の蛍光像と蛍光強度比像、(b)それぞれの浸透圧における GimRET を発現させた大腸菌の蛍光強度比と細胞の体積

コントロールとして CFP-YFP を発現させた細胞でノコダゾールを作用させ収縮を行ったが、蛍光強度比は変化しなかった。以上の結果は、GimRET が人為的な細胞体積の減少に伴う蛋白質濃度の増加を検出できることを示した。

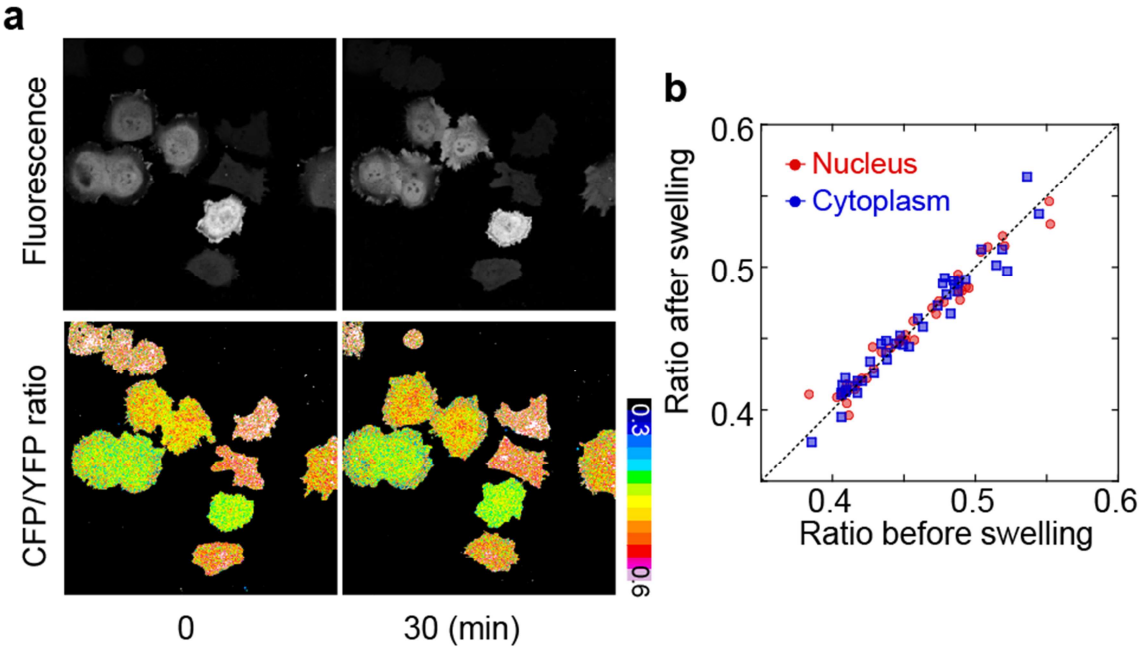


図 32　(a)ノコダゾールを用いて細胞を縮ませる前後の CFP-YFP を発現させた細胞の蛍光像と蛍光強度比像、(b)同じ細胞における、ノコダゾールを作用させる前後での蛍光強度比の比較、横軸：作用前の蛍光強度比、縦軸：作用後の蛍光強度比

まとめと考察

GimRET を発現させた細胞を用いて、細胞分裂後の蛋白質濃度の増加と減少を検出することに成功した。細胞は分裂後の間期において蛋白質を合成するので、その際蛋白質濃度が上昇し、蛋白質濃度が変化する。GimRET の蛍光強度比が、細胞分裂後に増加し、その後徐々に減少した。この蛋白質濃度の変化は、以前に報告があった酵母を用いた細胞内での蛋白質の濃度変化と一致していた(Cookson, 2010）。

細胞分裂時に、蛍光強度比が増加している。これは、細胞分裂時の細胞の収縮により、細胞の体積が減少したことで、細胞内の蛋白質濃度が増加したためであると考えられる。

細胞分裂後の G1 期では、蛋白質の合成が頻繁に行われるとされている(Lodis, 2011)。図 25 から、平均トレースでは、分裂後約 6 時間蛍光強度比が増加しており、この増加は G1 期における蛋白質の合成を反映していると考えられる。また、蛍光強度比が 1.6 から最大で 1.8 まで増加していた。この値を BSA 濃度に換算すると 350 mg/mL から 450 mg/mL に増加したこととなり、分裂後は蛋白質濃度が約 1.3 倍に増加したことになる。

蛍光強度比は、分裂後約 6 時間増加し続けた後、10 時間程度かけて分裂直後と同程度の値まで減少している。この減少は、蛋白質の分解によるものではなく、細胞の体積の増加に伴う細胞内蛋白質濃度の減少によるものであると考えられる。細胞の体積の急激な増加が起こるとするならば、分裂後蛍光強度比の増加は起こらず、代わりに減少が起こるはずである。実際はそのような変化は見られていない。本結果から、細胞分裂後の G1 期における蛋白質の合成中、あるいは合成後から細胞の体積の増加が起こると考えられる。もし仮に、蛋白質濃度の変化により体積の増加が始まるのであれば、蛋白質濃度も細胞周期を制御する一つの要素となりうる。GimRET の蛍光強度比と、細胞の体積の時間変化を同時に測定することができれば、細胞周期と蛋白質濃度の関係、加えて、蛋白質濃度による細胞周期の制御機構を示すことができるのではないかと考えている。

GimRET を用いて、蛋白質合成を阻害したことによる細胞内蛋白質濃度の減少と、蛋白質分解を阻害したことによる細胞内蛋白質濃度の増加を計測した。GimRET の蛍光強度比は、予想通りの変化を示した。細胞内の蛋白質の合成／分解には、GimRET の合成と分解も含まれている。そこで、全蛍光強度の時間変化を測定したところ、合成阻害で

は蛍光強度が減少し、分解阻害では蛍光強度が増加していた。この結果は、蛋白質合成／分解の阻害が起こっていること、GimRET の蛍光強度比の変化は、阻害の結果として蛋白質濃度が変化したことによるものであるという傍証となる。蛋白質合成を阻害した際の全蛍光強度の時間変化を指数減少 $I = \exp(-kd^* t)$ （I：蛍光強度、t：時間(hour)、kd：分解速度(hour^{-1})）で、蛋白質分解を阻害した際の全蛍光強度の時間変化を直線 $I = ks^* t$（I：蛍光強度、t：時間(hour)、ks：増加定数(hour^{-1})）でフィットすることで、GimRET の分解速度と合成速度を求めることができる。結果、kd=0.032 (hour^{-1})、ks=0.080 (hour^{-1})となった。

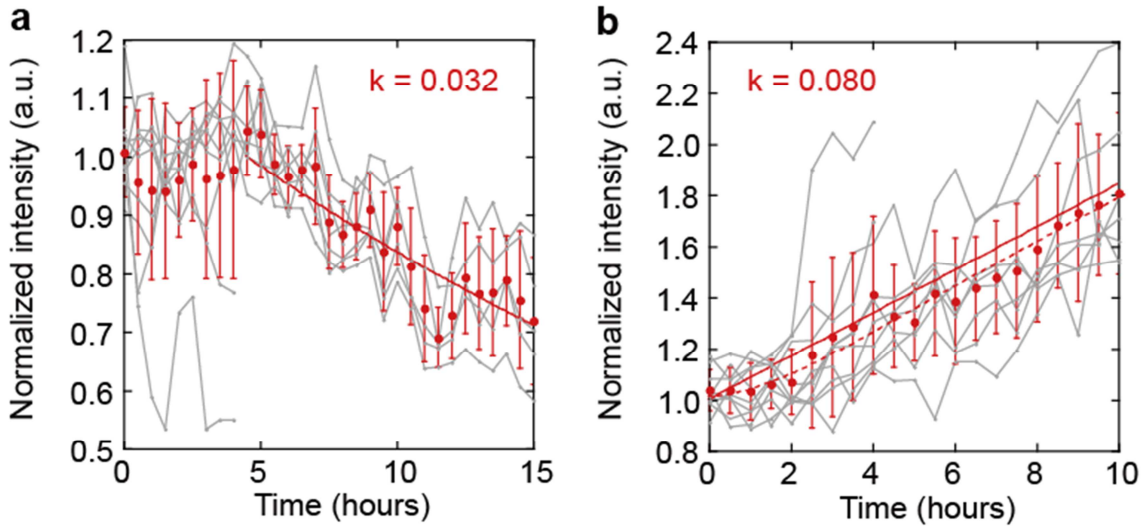


図 33　蛋白質合成阻害剤(a)、分解阻害剤(b)を作用させた後の細胞内の蛍光強度の変化, 赤：阻害剤作用後の平均トレース、灰：元となったトレース　実線はそれぞれのプロットを(a)指数減少、(b)直線でフィットした場合のグラフ

細胞外の溶液の浸透圧を変化させることで、細胞の体積を変化させ、細胞の蛋白質濃度を変化させた。その際、GimRET が蛋白質濃度の変化を検出できることを示した。細胞の体積変化は、1 分以内に変化が起こっている。GimRET の合成／分解は、この短時間では起こりえないので、蛍光強度の変化は、蛋白質濃度の変化によるものであると考えられる。また、細胞外液の浸透圧を変化させて 30 秒後には GimRET の蛍光強度比が変化している。つまり、GimRET の、蛋白質濃度の変化に対する反応は、少なくとも 30 秒以内に起こる。これは、細胞内における素早い蛋白質濃度の変化を、GimRET を用いることで検出できることを示している。

微小管を崩壊させるノコダゾールを使用することで、細胞を収縮させ、細胞の体積を減少させた。体積の減少に伴う蛋白質濃度の増加を、GimRET を用いて検出することに成功した。また、大腸菌を用いた実験により、同様の結果を得た。

以上のように、GimRET により、細胞内の蛋白質濃度の減少/増加を検出できることを示した。

蛍光蛋白質を用いたプローブ開発において、pH 感受性は大きな問題である(Nagai, 2001： Piston & Kremers, 2007：永井, 2007：Imamura, 2009：Grashoff, 2010）。異なる pH 溶液に溶かした BSA 溶液に対する GimRET の感受性を図 34 に示す。GimRET の蛋白質濃度に対する反応性は、溶液の pH により変化している。

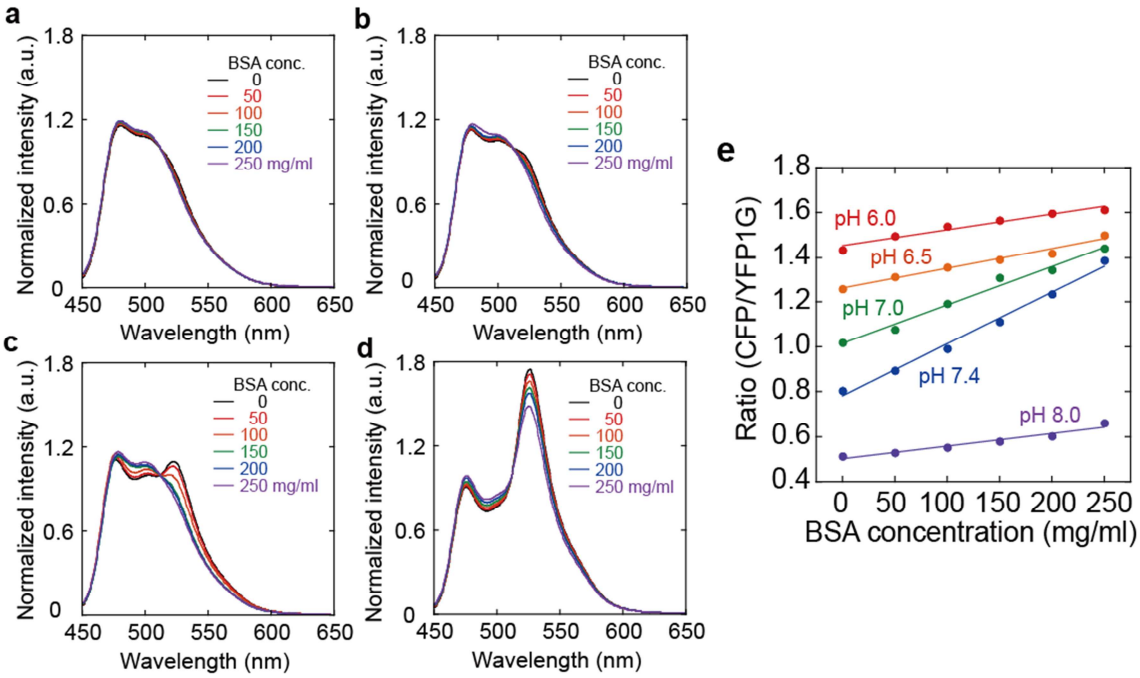


図 34　各 pH の BSA 溶液に対する GimRET の蛍光スペクトル、(a)pH6.0、(b)pH6.5、(c)pH7.0、(d)pH8.0(黒：0 mg/mL、赤：50 mg/mL、オレンジ：100 mg/mL、緑：150 mg/mL、青：200 mg/mL、紫：250 mg/mL)、各 pH の BSA 溶液の濃度に対する GimRET の蛍光強度の変化、(赤：6.0、オレンジ：6.5、緑：7.0、青：7.4、紫：8.0)

GimRET もまた pH に対して感受性を示すので、GimRET の示す変化が蛋白質濃度によるものなのか、pH によるものなのかということを考慮しなければならない。細胞内

pH の指示薬として広く利用されている SNARF-1 を用いて、細胞を膨らませ細胞の体積を増加させた際の pH 変化を調べたところ、すべての細胞で pH が下がる様子が観察された。もしも GimRET の蛍光強度の変化が pH によるものであるならば、蛍光強度比が下がるはずである。しかし実際は、反対の反応を示した。

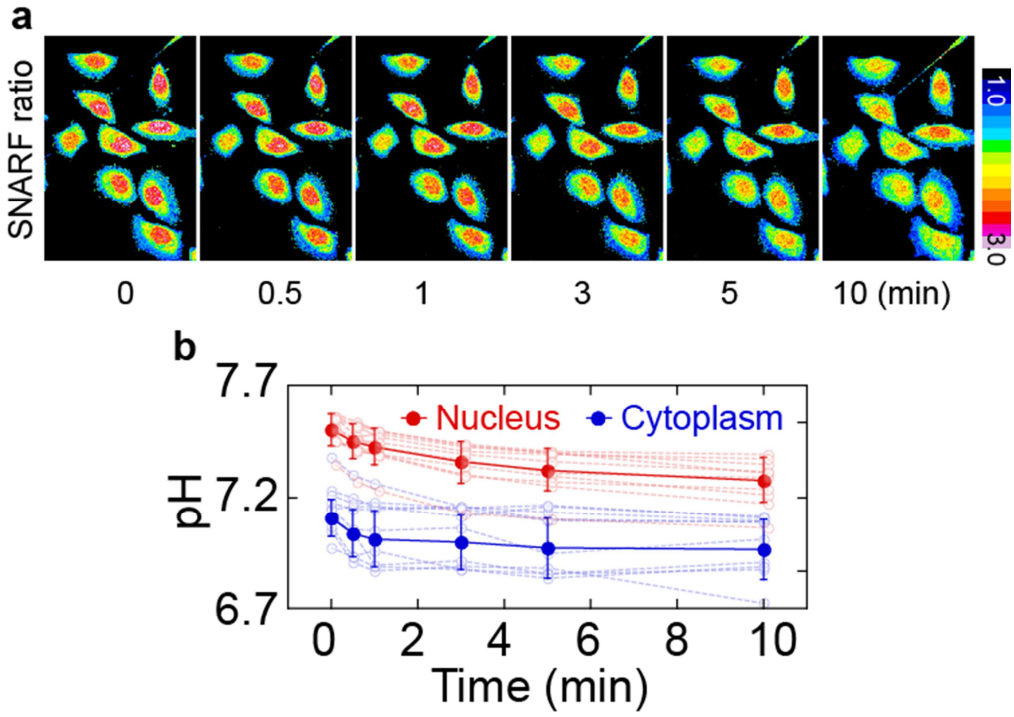


図 35　SNARF で染色した細胞の、細胞外液の濃度を変化させた場合の蛍光強度比像、(b) 細胞外液の濃度を変化させた場合の核と細胞質における pH の時間変化

SNARF を用いて、ノコダゾール処理による細胞の収縮時の pH 変化を調べたところ、細胞を膨張させた時と同じように、pH は減少していた。その際、核の pH は 7.6 から 7.5 に、細胞質の pH は 7.1 から 6.7 に変化していた。

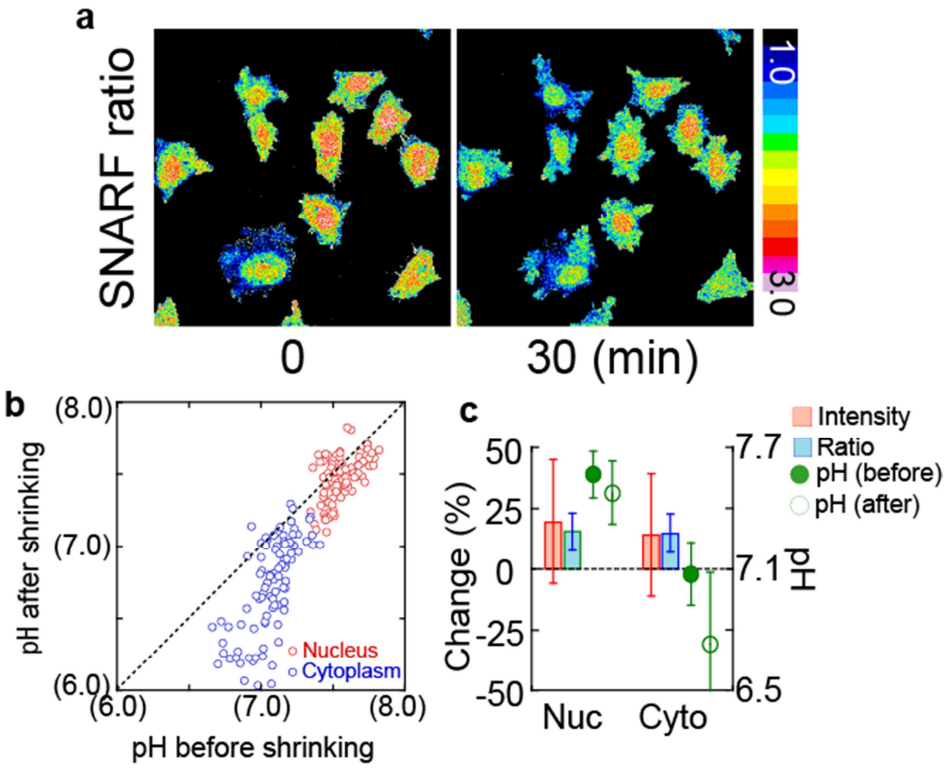


図 36　SNARF で染色した細胞に、ノコダゾールを作用させる前後の蛍光強度比像、(b)ノコダゾールを作用させる前後における、同じ細胞の核と細胞質の pH の比較、横軸：作用前、縦軸作用後、(c)ノコダゾールを作用させた前後での、核と細胞質における GimRET の蛍光強度、蛍光強度比の変化率と pH

細胞内の pH を強制的に変えた場合の GimRET の蛍光強度比の変化のグラフを図 23 に示す。このグラフから、細胞の収縮にともなう pH 変化により GimRET の蛍光強度比がどの程度変化するかを換算すると、核では 6%、細胞質では 4%蛍光強度が減少することとなる。しかし実際は、細胞を収縮させた場合には核では 23%、少なくとも 17%の変化が見られた。この変化量は pH によるものよりも大きく、そのため蛋白質濃度の変化が、GimRET の蛍光強度比の変化に大きく作用していると考えられる。

本章では、GimRET が細胞内の蛋白質濃度を検出できることを、細胞分裂過程、蛋白質合成／分解、および、細胞体積変化による蛋白質濃度変化の検出を行うことで確認した。

第５章　GimRET の蛍光強度比と拡散との比較

背景と目的

前章で、GimRET を用いて細胞内の蛋白質濃度を測定できることを示した。これまで報告された細胞内の蛋白質濃度は乾燥重量から求められたものであり(Zimmerman, 1991)、生細胞内の蛋白質濃度を計測したという報告はない。また、多数の細胞の平均の値なので、個々の細胞間で蛋白質濃度がどの程度ばらついているかわかっていない。加えて、細胞内で蛋白質濃度がどのように分布しているか、ということもわかっていない。GimRET は蛍光蛋白質なので、個々の細胞内の蛋白質濃度を測定することができる。また、細胞全体に分布するので、細胞内での蛋白質濃度の分布を観察することもできる。本章では、GimRET を Cos7 細胞で発現させ観察することで、細胞間、細胞内蛋白質濃度の測定と比較を行った。

これまで細胞内の分子の混雑さは、蛍光蛋白質や有機色素などをプローブの拡散定数の比較により議論されてきた(Stasevich, 2011 : Norris 2011 : Bernas, 2014 : Diekmann & Hoischen, 2014)。しかし、細胞内は蛋白質などの高分子が混雑した環境であり、そのような環境では蛋白質の凝集などが起こるため、小分子を用いたキャリブレーションから求めた拡散係数と単純に比較することができない。また、細胞骨格や脂質膜などの細胞内の構造体とプローブが相互作用してしまうと、拡散係数が変化するので、分子の混雑さと拡散で、異なる状況を示してしまう(Cutsforth, 1989 ; Lakatos, 1991 : Knull, 1992)。細胞内の拡散だけでは、細胞内の分子の混雑さを正しく示せていない可能性があった。

GimRET は、蛍光蛋白質であるので、溶液中の拡散を求める測定法にプローブとして利用することができる。そこで、GimRET を発現させた Cos7 細胞で、細胞内の拡散係数を求める際にもっとも多く用いられている方法の一つである FRAP を行い、蛋白質濃度と拡散係数を比較した。

実験方法

この実験では、Cos7 細胞(African green monkey kidney-derived cell line)を用いた。細胞の培養、蛍光蛋白質の一過性発現は、第 4 章と同じ方法を用いた。

細胞の観察、解析には第 4 章と同じ方法を用いた。

顕微鏡上における GimRET の蛍光強度と蛍光強度比の比較

精製した GimRET を 250 mg/mL BSA (pH7.4)で 20、10、5.0、2.5、1.0 μg/mL に希釈し、蛍光顕微鏡上で、各濃度の GimRET の溶液の CFP の蛍光と YFP1G の蛍光を観察した。得られた蛍光画像から、GimRET の各濃度における CFP と YFP1G の蛍光強度を求めグラフにした。

大腸菌を用いた蛍光蛋白質の folding と maturation 時間の計測

この実験は Lee らの実験を参考に行った(Lee, 2005)。CFP、YFP、YFP1G、GimRET、CFP-YFP のプラスミドを遺伝子導入した大腸菌を LB 培地にて 12 時間 37 度で振盪培養した。遠心機を用いて集菌した後、M9 培地を用いて OD600 値が 0.1 になるように大腸菌を懸濁した。懸濁した大腸菌の溶液に IPTG を終濃度が 1 mM になるように加え、96well に移し、プレートリーダー(Multilabel Reader 2030 ARVO X3、Perkin Elmer)を用いて、37℃における大腸菌内で発現した蛍光蛋白質の蛍光強度の経時変化を測定した。CFP は 430 nm で 、YFP と YFP1G は 510 nm で励起した。CFP の蛍光は 475-485 nm の、YFP と YFP1G の蛍光は 535-545 nm の蛍光を検出した。

非特異吸着色素を用いた細胞内蛋白質量と GimRET の蛍光強度の比較

GimRET を発現させた Cos7 細胞を、4%パラフォルムアルデヒドと 0.1%Triton-X を混合した PBS を用いて固定した。固定後、溶液を 1μg/mL Alexa Fluor 568 NHS Ester (molecular probes)を混合した PBS に置換し、細胞内の蛋白質を非特異的に染色した。20 分後、一度細胞を PBS で洗い、蛍光顕微鏡で GimRET の蛍光と Alexa の蛍光を観察した。Alexa は赤色レーザー(FV10-LD559, Olympus)で励起、スペクトロフォトメーターを用いて 640-700 nm の蛍光を検出した。

Multi-photon fluorescence recovery after photobleaching (MP-FRAP)

MP-FRAP は Brown E.B.らの論文を参考にした(Brown, 1999)。時間分解能を向上するため、MP-FRAP の際は観察領域を 10.56x0.56 μm^2 (64×64pixels)に設定した。時間分解能は 1 フレームあたり 0.10 秒に設定した。褪色させる範囲は、3x3 μm^2 (20x20pixels)に設定した。3 秒間(30 フレーム)細胞を蛍光観察した後、2 秒間 3x3 μm^2 (20x20pixels)の範囲を褪色、その後 27 秒(270 フレーム)観察した。データの解析には、ImnageJ と Origin を用いた。褪色させた領域における蛍光強度の回復の時間変化を測定し、$I = 1\text{-exp}(-k*t)$ の式でフィットすることで、回復係数 k を求めた (I: 蛍光強度、t: 時間(s)、k: 回復係数)。FRAP により見積もられる拡散係数は、そのモデルによって大きくことなる(Shimi, 2004)。そこで、異なる粘性の溶液を用いてキャリブレーションを行った。グリセロールは水と混合する割合によって、その粘性が変わる。粘性と、プローブとして用いる分子から、その拡散係数を計算することができる(Cheng, 2008)。GimRET は 2 つの蛍光蛋白質がタンデムにつながった構造をしている、20 nm のビーズは、GimRET の大きさと同じくらいである。20 nm のビーズを 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80%のグリセロール:水溶液と混合し、この混合溶液で FRAP を行い、各粘性(拡散係数 D)における回復係数を測定した。計測した回復係数から、$D = 27.429*\exp(-k/0.86638)$のの式を用いて、GimRET の細胞内における拡散係数を算出した。

結果

細胞内、細胞間の蛋白質濃度の比較

GimRET を Cos7 細胞で発現させ、25 倍対物レンズで観察した。蛍光強度比の画像は、CFP の蛍光像(460-500 nm)と YFP1 G の蛍光像(520-560 nm)をそれぞれ取得し、その強度比から作製した。結果、細胞間で GimERT の蛍光強度比が 1.0 - 3.0 と大きく異なっていた。

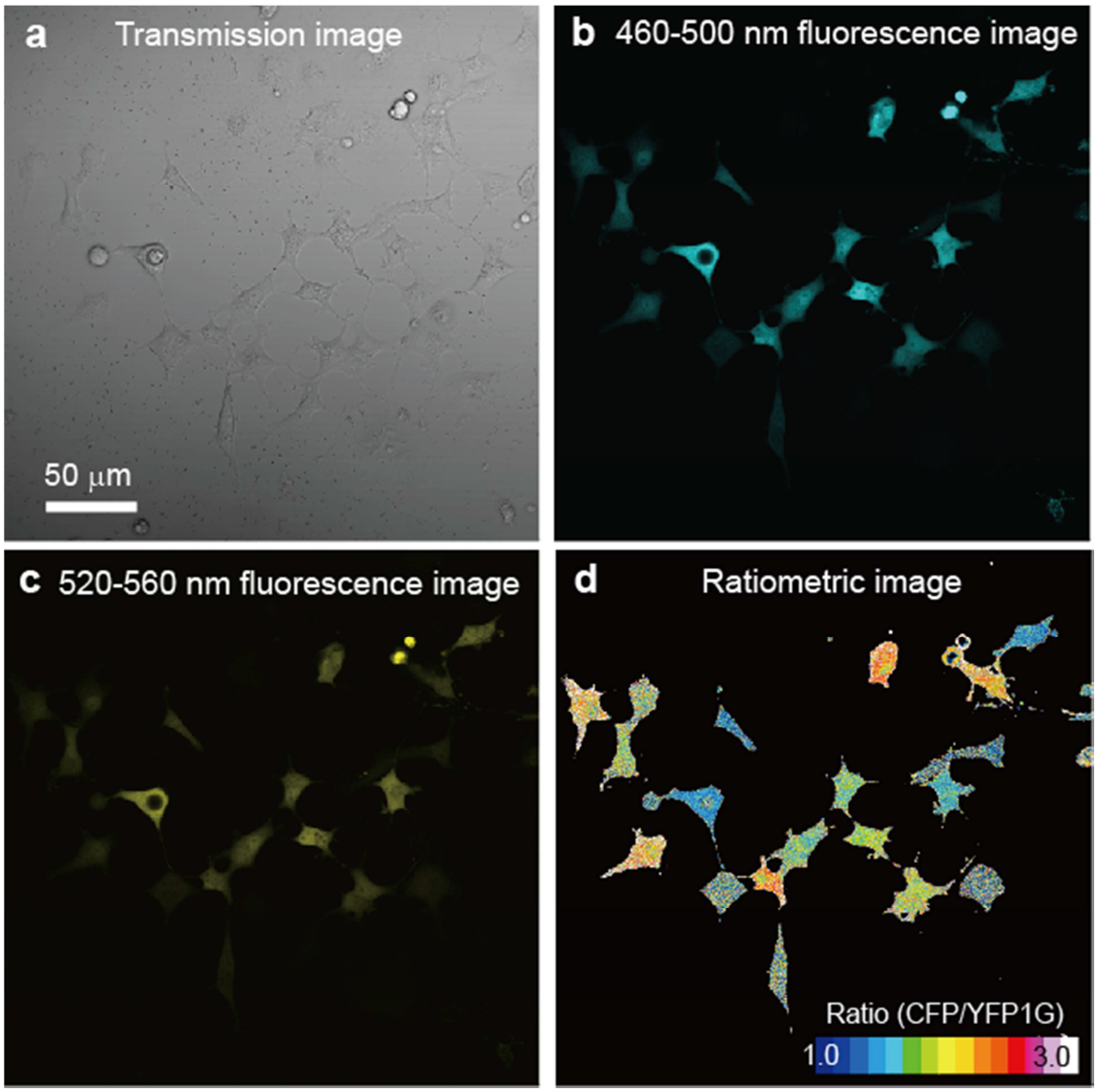


図 37　GimRET を発現させた Cos7 細胞を 25 倍の対物レンズで観察した場合の、明視野像(a)、CFP(460-500 nm)の蛍光像(b)、YFP1G(520-560 nm)の蛍光像(c)、蛍光強度比像(d)

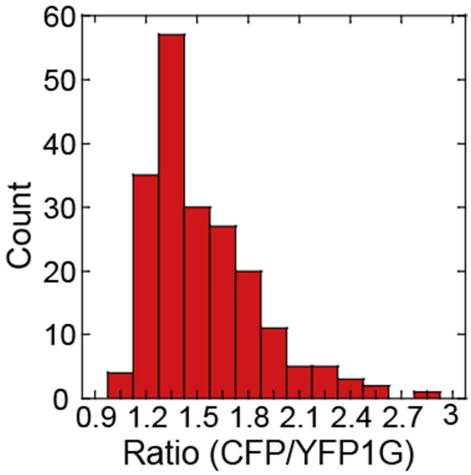


図 38　GimRET を発現させた Cos7 細胞内の蛍光強度比のヒストグラム

このばらつきが、蛋白質濃度以外に由来する可能性があったので、検証した。

まずは、細胞内 pH の違いによるばらつきの可能性を考えた。そこで、SNARF 用いて、Cos7 細胞における細胞内 pH を測定した。

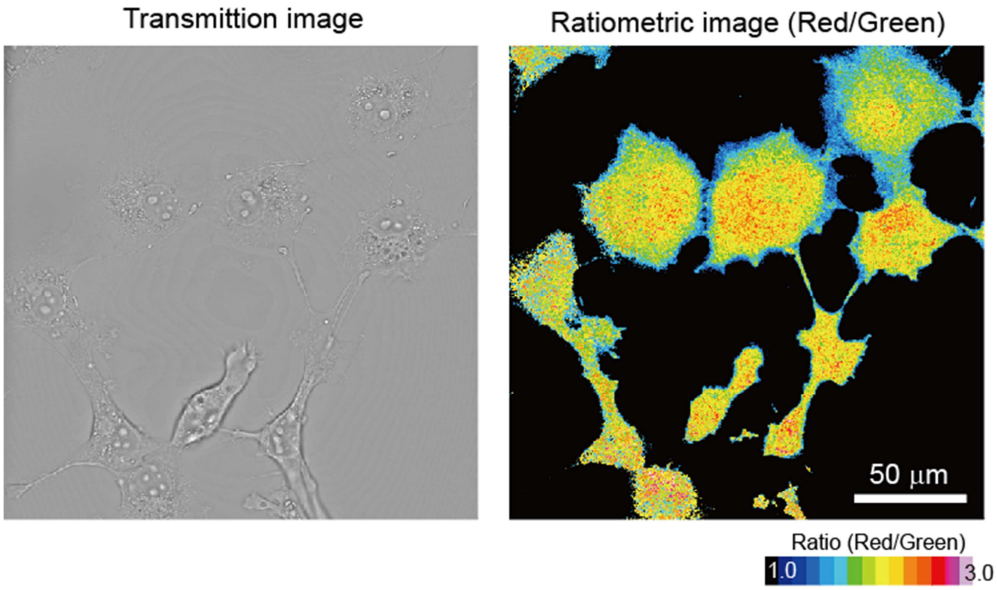


図 39　Cos7 細胞を SNARF で染色した場合の明視野像(左と）蛍光強度比像(右)

Cos7 細胞 pH は、核で 7.6±0.1、細胞質で 7.5±0.1 であった。この値を図 23 のグラフから GimRET の蛍光強度比に換算すると、それぞれ 1.8±0.1 と 1.7±0.1 となった。Cos7 細胞間の GimRET の蛍光強度比は非常に広くばらついており、このばらつきは pH

によるものではないと結論付けた。

次に GimRET の発現量に依存して、蛍光強度比が変化している可能性を考えた。

HEPES 溶液、250 mg/mL BSA 溶液に、10 mg/mL と 100 mg/mL の GimRET を混合し、スペクトルを測定し、GimRET の濃度によってスペクトルが変化するかを調べたところ、変化はなかった。顕微鏡上で、GimRET の濃度を変換させても、蛍光強度比に大きな変化はなかった。

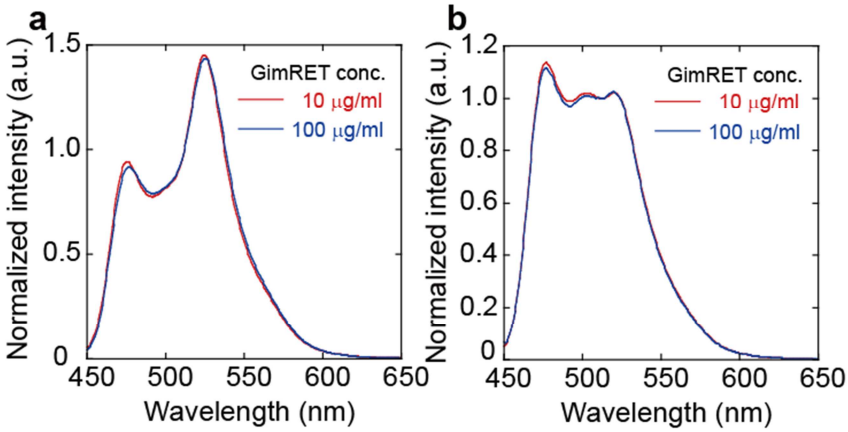


図 40　100 mM HEPES(a)と 250 mg/mL BSA(pH7.4)溶液に、終濃度が 10 μg/mL(赤)と 100 μg/mL(青)になるよう GimRET を混合した場合の蛍光スペクトル

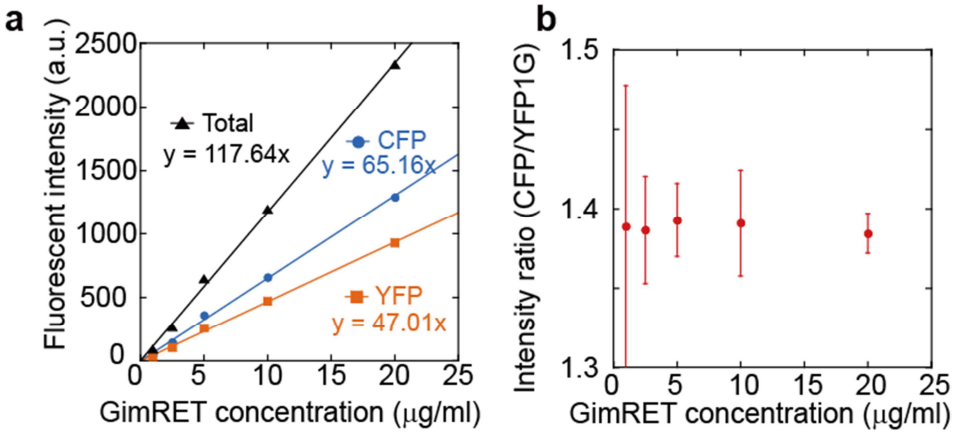


図 41　250 mg/mL BSA(pH7.4)溶液に、終濃度が 1、2.5、5、10、20 μg/mL になるよう GimRET を混合し、その溶液を顕微鏡上で観察した際の CFP(460-500 nm)、YFP1G(520-560 nm)、CFP と YFP1G の総和の蛍光強度、GimRET の濃度と蛍光強度比の相関

また、細胞内における CFP と YFP1G の蛍光強度と GimRET の蛍光強度比の相関を調べたところ、相関がみられなかった。

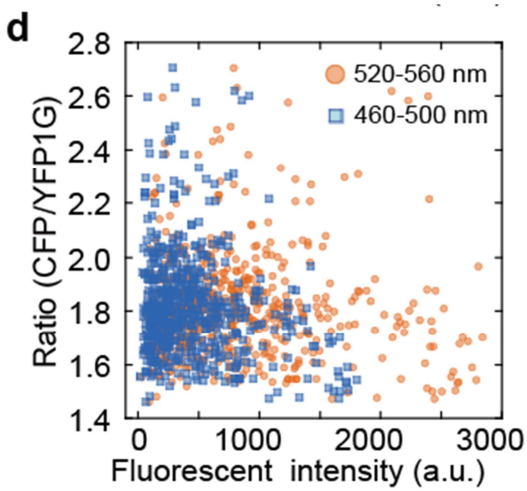


図 42　GimRET を発現させた Cos7 細胞の、同じ細胞の CFP、YFP1G それぞれと蛍光強度比の相関

GimRET の濃度に応じて蛍光強度比が変わらないこと、細胞内において CFP と YFP1G の蛍光強度と GimRET の蛍光強度比との間に相関がないことから、この細胞間での蛍光強度比のばらつきは、GimRET の発現量に由来するものではない。

細胞間での GimRET の蛍光強度比の違いが、蛋白質の合成／分解によるものである可能性があったので、検証してみた。

FRET プローブのドナーとアクセプターとなる蛍光蛋白質の folding と maturation の時間の違いも、蛍光強度比に影響を与える。大腸菌を用いた実験により、CFP、YFP、YFP1G、GimRET、CFP-YFP の folding と maturation の時間を測定した。結果、YFP1G の folding と maturation は CFP よりも遅いが、YFP とほぼ変わらない、あるいは少し早いことが分かった。最大蛍光強度の 50%に到達した時間は、CFP は 136.9 mins、YFP は 218.5 mins、YFP1G は 204.3 mins であった。

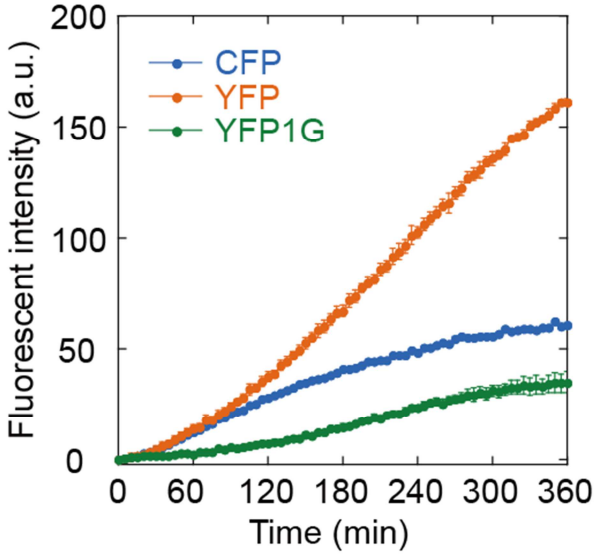


図 43　YFP(オレンジ)、CFP(青)、緑(YFP1G)のプラスミドが遺伝子導入された大腸菌を発現誘導した後の、大腸菌内の蛍光強度の経時変化

また、興味深いことに、YFP1G を単独で発現させた場合よりも、GimRET としてさせた場合に早くなることが分かった。この結果は、GimRET の蛍光強度比を試算する際に、folding と maturation による影響が減ることにつながる。それでも、蛍光強度が安定するまでに少なくとも 90 分は必要である。

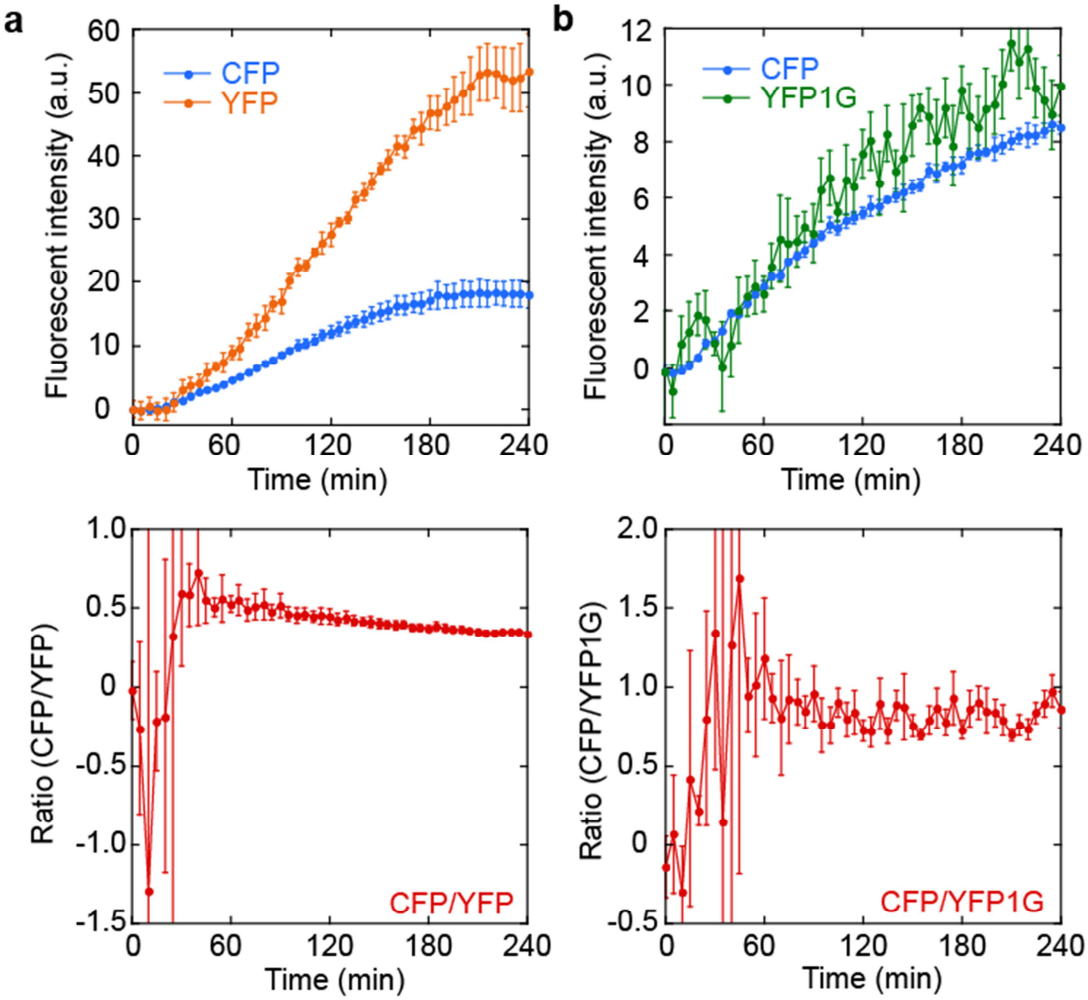


図 44　CFP-YFP(a)、GimRET(b) のプラスミドが遺伝子導入された大腸菌を発現誘導した後の、大腸菌内のそれぞれの蛍光蛋白質の蛍光強度(上)と蛍光強度比(下)の経時変化

第 5 章において、細胞内の GimRET の合成／分解速度を計算した。合成速度、分解速度ともに folding と maturation の速度の 10 倍程度遅いことが分かった(0.667 $hour^{-1}$)。そのため、この細胞間のばらつきは、蛋白質の合成/分解によるものではないと結論付けた。

最後に、細胞間の蛍光強度のばらつきが蛋白質濃度に由来することを示すために、蛋白質に非特異吸着する色素で細胞内の蛋白質を染色し、その蛍光強度と GimRET を比較した。GimRET を発現させた細胞を固定し、分子に非得意吸着する蛍光色素で染色、同一細胞内の GimRET の蛍光強度比と非得意吸着した色素の蛍光強度を測定したところ、

両者には相関があった。つまり、GimRET の蛍光強度比は細胞内の蛋白質の量を反映している。

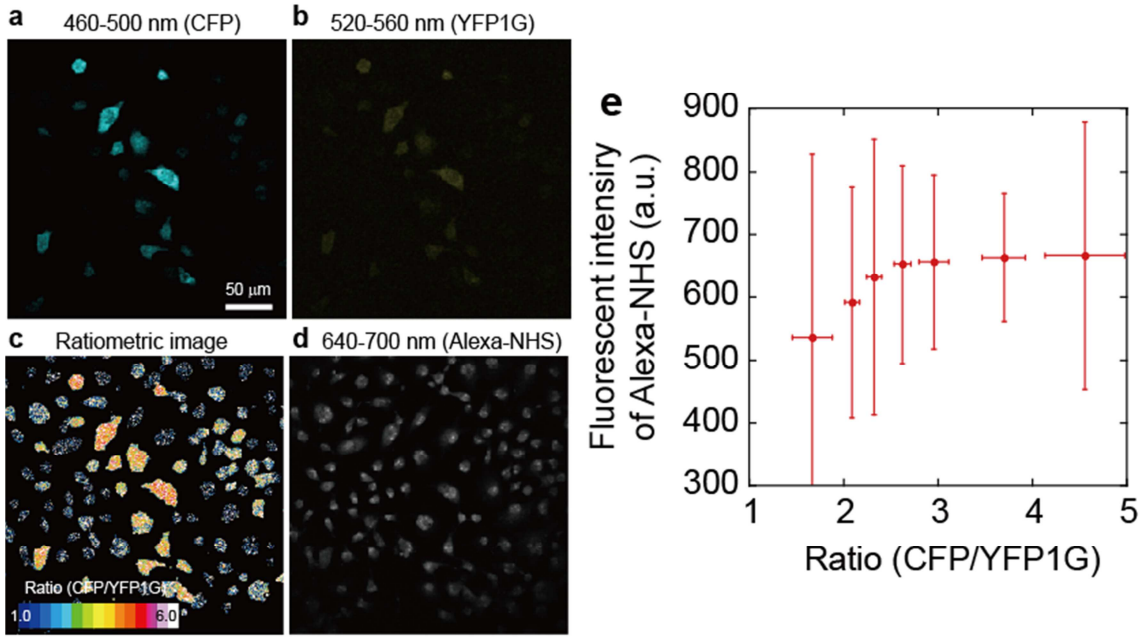


図 45　細胞を固定後 Alexa で染色した細胞を 25 倍の対物レンズを用いて観察した場合の、CFP(460-500 nm)の蛍光像(a)、YFP1G(520-560 nm)の蛍光像(b)、蛍光強度比像(c)、(d)Alexa の蛍光像(640-700 nm)、(e)GimRET の蛍光強度比と Alexa の蛍光強度の相関

細胞を拡大して観察してみると、Cos7 細胞の内側は、ほぼ一様であった。GimRET の蛍光強度比の異なる細胞を観察したところ、多くの細胞において、核と細胞質で GimRET の蛍光強度比が同じであったが、一方で、いくつかの細胞においては違いがみられた。同じ細胞の核における GimRET の蛍光強度比を縦軸に、細胞質における GimRET の蛍光強度比を横軸にしたグラフを図 46 に示す。蛍光強度比が 1.0 から 1.5 の細胞においては、核と細胞質の蛍光強度比がほぼ同じであったが、1.5 以上の細胞においては、核の蛍光強度比が細胞質に比べて低いことがわかった。

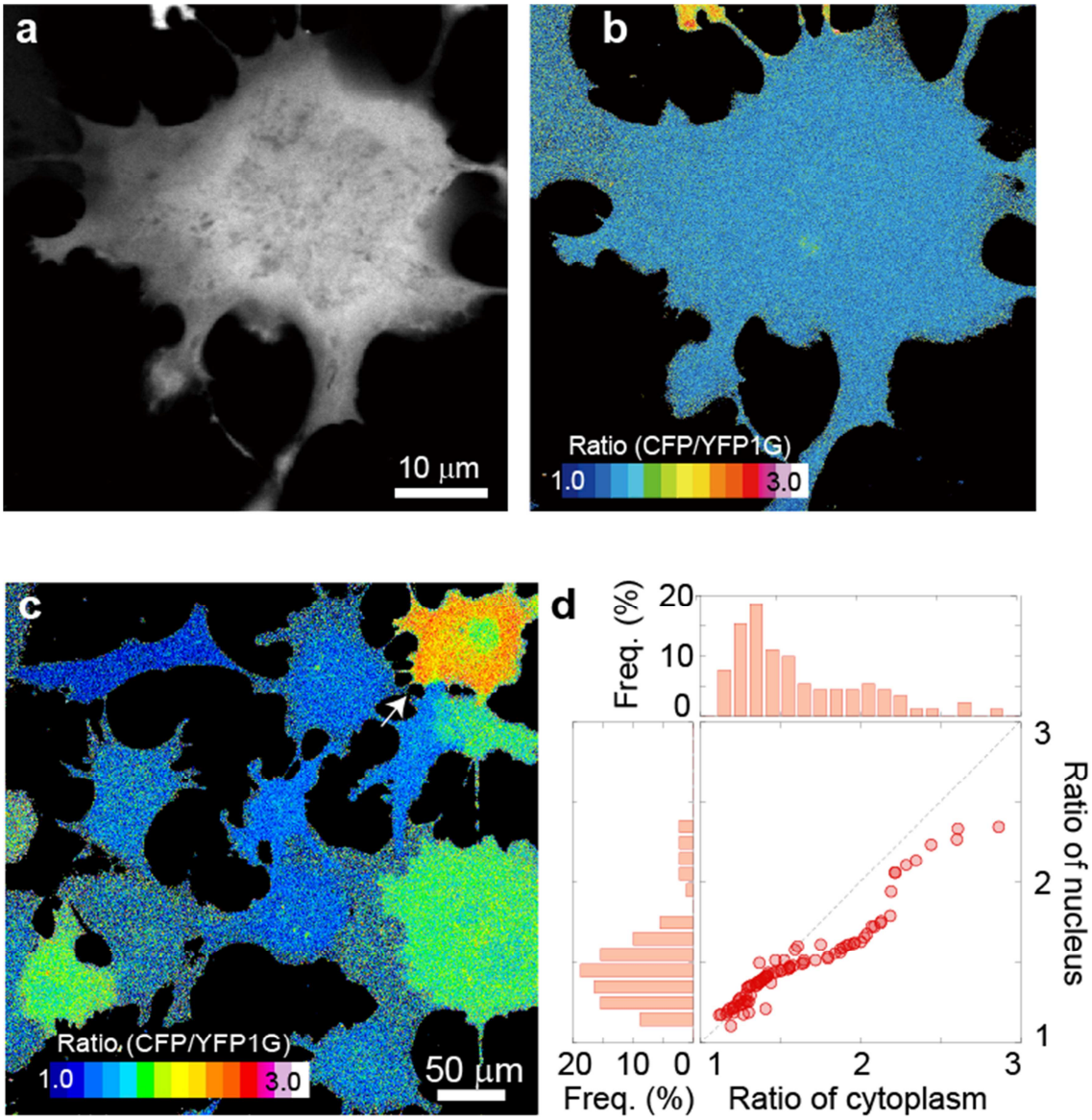
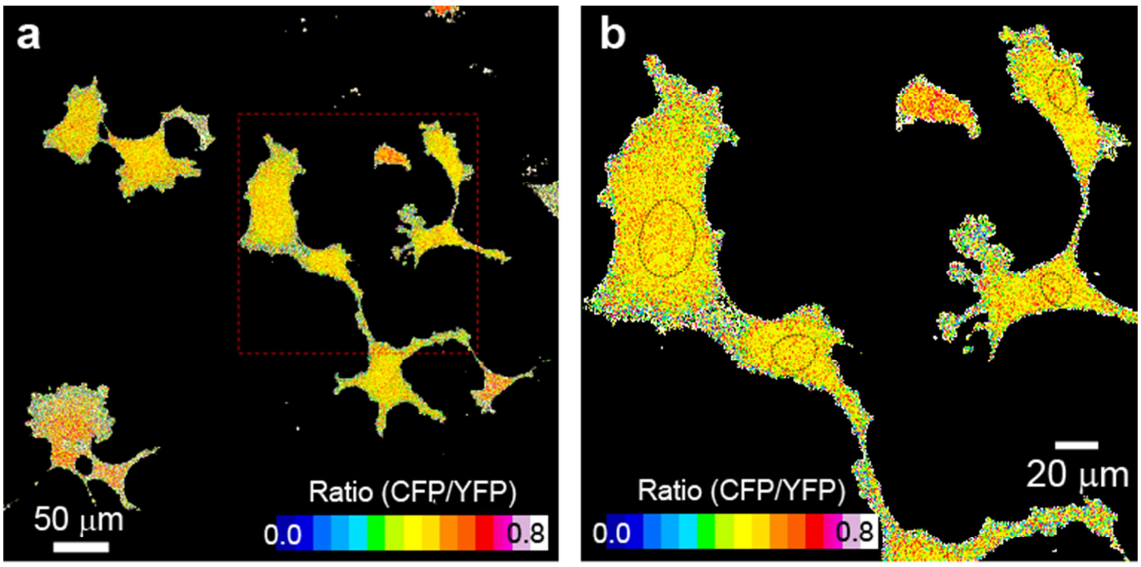


図 46　GimRET を発現した Cos7 細胞を (a)60 倍対物レンズを用いて観察した場合の蛍光像、(b, c)蛍光強度比像、(d)同じ細胞の核と細胞質の蛍光強度比の比較

CFP-YFP を発現させた細胞でも同様に核と細胞質で蛍光強度比を比較したが、違いがみられなかった。



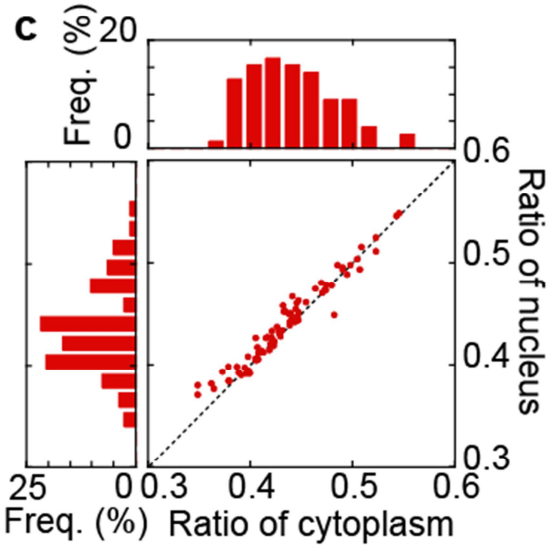


図 47　(a,b)CFP-YFP を発現させた Cos7 細胞を 25 倍の対物レンズを用いて観察した場合の蛍光強度比像、(c)同じ細胞における核と細胞質での CFP-YFP の蛍光強度比の比較

蛋白質濃度と拡散係数の比較

GimRET の蛍光強度比と拡散係数との関係を調べるために、GimRET をプローブとして、FRAP (fluorescence recovery after photo-bleacing)を行い、GimRET の蛍光強度比と拡散定数を比較した。FRAP は、溶液の粘性を見積もる方法の一つである。粘性を見積もりたい溶液に蛍光色素や蛍光蛋白質などのプローブを自由拡散させておき、溶液中の特定範囲を、レーザーを強力に照射することで褪色させ、褪色させた範囲にプローブが拡散する様子から、その粘性を見積もる。溶液中の粘性を変化させる物質として一般的に用いられる PEG6000、スクロース、BSA 溶液に GimRET を混合し FRAP を行ったところ、BSA において、拡散と GimRET の蛍光強度比に強い相関がみられた。これは、GimRET を用いた FRAP により、蛋白質濃度の変化と、蛋白質濃度の増加に伴う溶液の粘性の変化を同時に検出できることを示している。

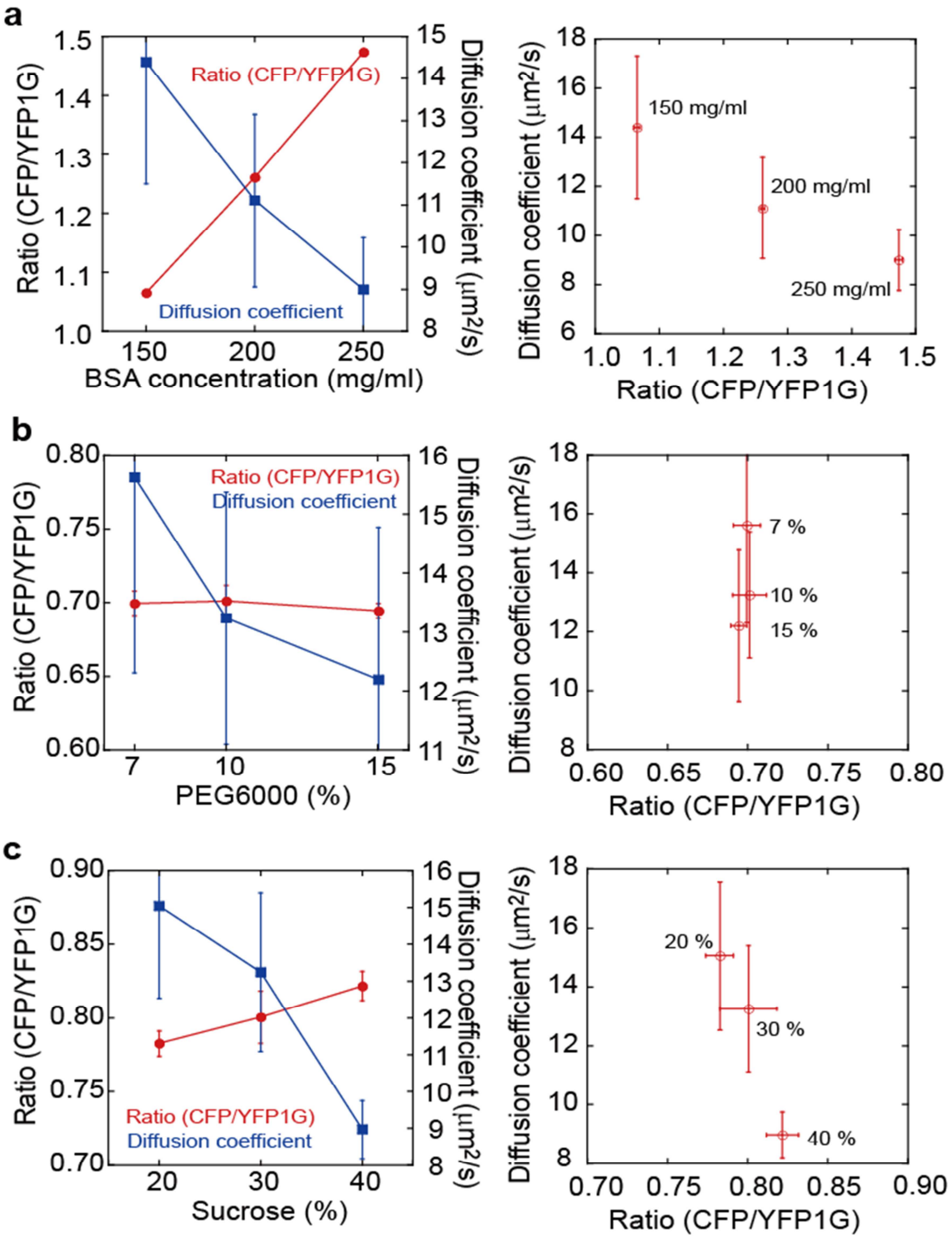


図 48　BSA 溶液(a)、PEG6000 溶液(b)、スクロース溶液(c)の濃度、蛍光強度比、拡散係数の相関図(左)と、拡散係数と蛍光強度比の相関図(右)

GimRET を発現させた Cos7 細胞の核と細胞質においてそれぞれ FRAP を行った。図 50 からわかるように、蛍光強度比によって、蛍光の回復する速度が異っている。各細胞の領域において、GimRET の蛍光強度比と拡散係数には相関がみられた。この結果は、細胞内において GimRET の蛍光が、蛋白質濃度と分子の移動性と相関があることを示している。一方で、核と細胞質において蛋白質濃度が同じであるにもかかわらず、細胞質の拡散が遅いことが分かった。

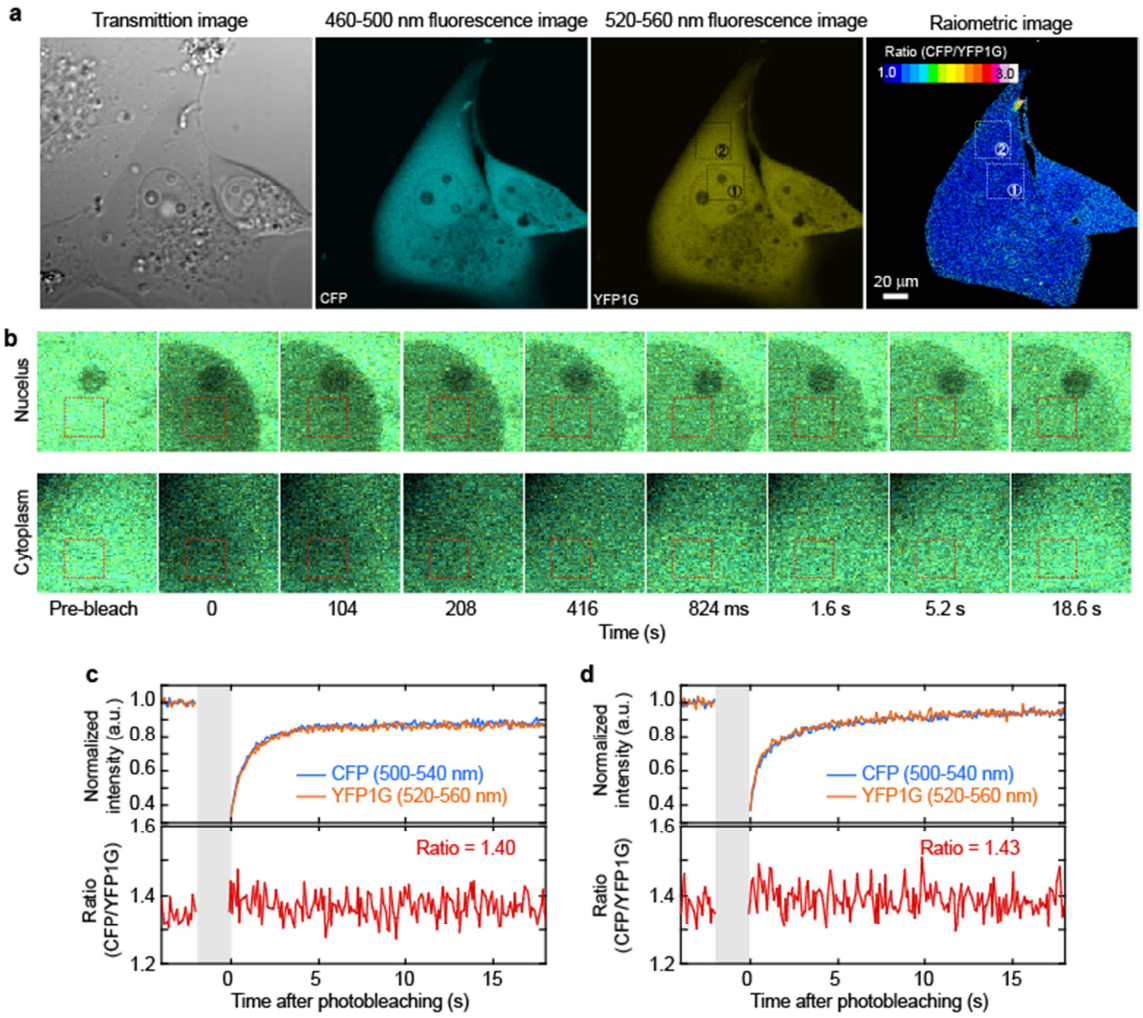


図 49　(a)FRAP を行う前の、GimRET を発現させた Cos7 細胞を、60 倍対物レンズを用いて観察した場合の明視野像(左)、CFP の蛍光像(中央左)、YFP1G の蛍光像(中央右)、蛍光強度比像(右)、(b)核、細胞質の GimRET を褪色する前後での蛍光像の時系列変化、核(c)、細胞質(d)における褪色前後での、褪色させた領域における蛍光強度の時間変化

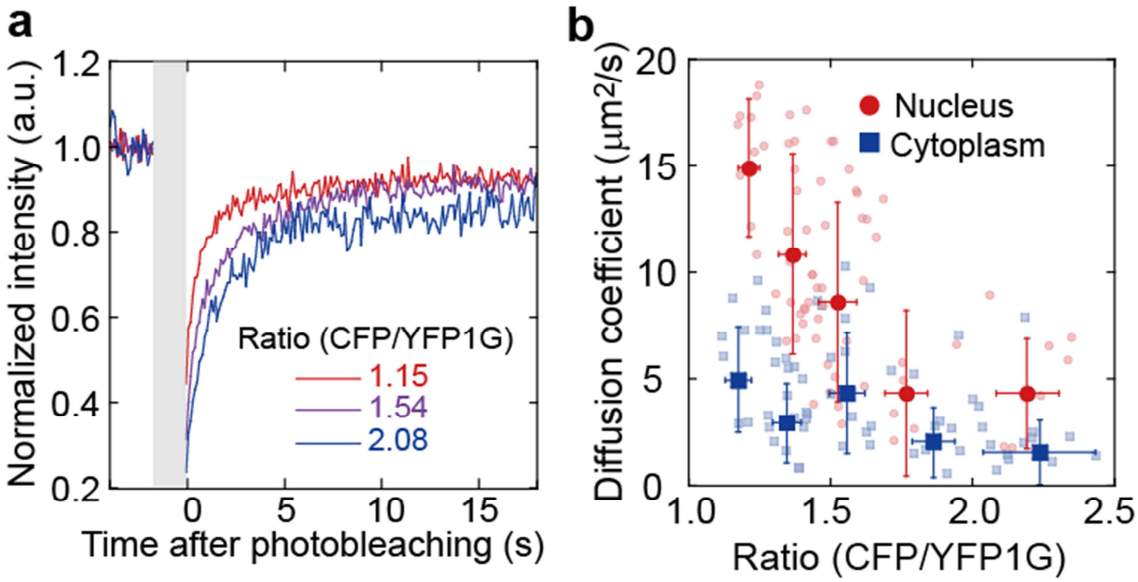


図 50　(a)各蛍光強度比の細胞における、褪色前後での蛍光強度の時間変化、(b)核と細胞質それぞれの領域での蛍光強度比と拡散係数の相関

まとめと考察

GimRET を発現させた Cos7 細胞においては、GimRET の蛍光強度比が、細胞間でばらついていた。これまでに見積られた細胞内の蛋白質濃度は、非常に多くの細胞の平均である(Zimmerman , 1991)。細胞間で蛋白質濃度がどの程度違うかは、これまでに報告がない。そのため、GimRET の蛍光強度比のばらつきが、蛋白質濃度以外の要因でばらついている可能性があると考え、細胞内 pH、GimRET の発現量、GimRET の folding と maturation の時間を調べた。細胞内 pH のばらつきは、GimRET の蛍光強度比のばらつきと比べて非常に小さかったため、pH ではないと考えた。GimRET の蛍光強度比は、GimRET そのものの濃度によって変化せず、また、細胞内の蛍光強度との間に相関がなかったため、GimRET の発現のばらつきは、蛍光強度比のばらつきに影響しないと考えた。GimRET の folding と maturation の速度は、GimRET そのものの合成／分解の 10 倍以上速いため、細胞内の GimRET の発現のばらつきに伴う folding と maturation は、蛍光強度比に影響しない。今回の実験で調べたいずれの要因も、細胞間での蛍光強度比のばらつきの原因ではないと考えられる。一方で、蛋白質に非特異吸着する蛍光色素の蛍光強度と GimRET の蛍光強度比を比較したところ、相関がみられた。つまり、細胞間の蛋白質濃度の違いを、GimRET は蛍光強度比として検出していることになる。同じ細胞種なので、発現している蛋白質の種類が大きく違わないと考えると、細胞間の蛍光強度のばらつきは、蛋白質濃度のばらつきが反映されていると考えられる。

なぜ細胞間でこれほど蛋白質濃度にばらつきがあるのかはわからない。ただし、今回使用した Cos7 細胞はガン細胞であり、遺伝子の突然変異が起こりやすいので、細胞間での変異の違いにより、蛋白質の発現の促進や抑制が異なるため、細胞間での蛋白質濃度に大きなばらつきがあったのではないかと考えている。

GimRET を発現させた HeLa 細胞の蛍光強度比を見てみると、細胞間でばらついている。しかし、そのばらつきは、Cos7 細胞と比べて小さかった。Cos7 細胞は、細胞間で大きさが非常にばらついている、多核細胞が存在するなど、細胞間で細胞の状態が大きく異なっている。一方で HeLa 細胞は、それほど細胞の大きさがばらついておらず、ま

た、多核細胞のような細胞はあまり観察されない。蛍光強度比のばらつきは、このような細胞種間での性質の違いを反映しているのではないかと考えられる。

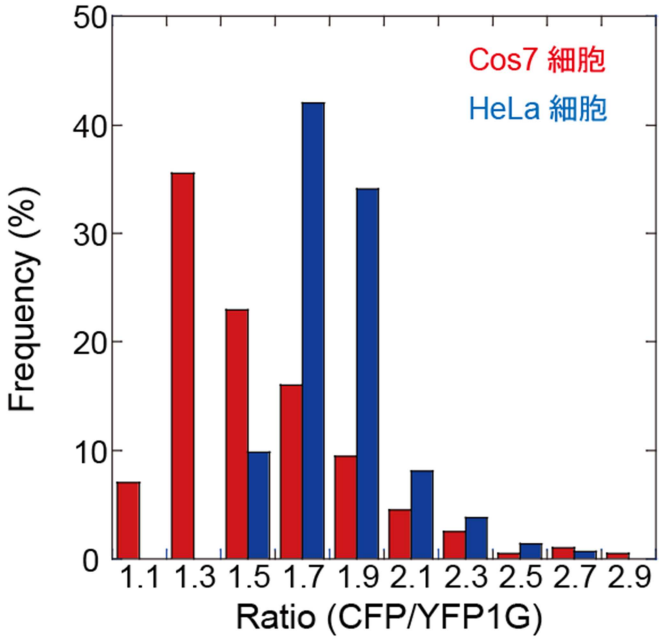


図51　Cos7細胞とHeLa細胞の細胞間の蛍光強度比のばらつきの比較　赤:Cos7細胞、青：HeLa細胞

GimRET を発現させた Cos7 細胞においては、GimRET の蛍光強度比が、細胞内で一様であった。これは、細胞質において、局所的な拡散係数の違いがなかったという報告と一致する(Kühn, 2011 : Nakane, 2012)。

細胞間の蛍光強度比の平均は、細胞質において 1.67±0.40、核において 1.55±0.28 であった。蛍光強度比から換算した蛋白質濃度は、細胞質において 387±200 mg/mL、核において 345±140 mg/mL であった。

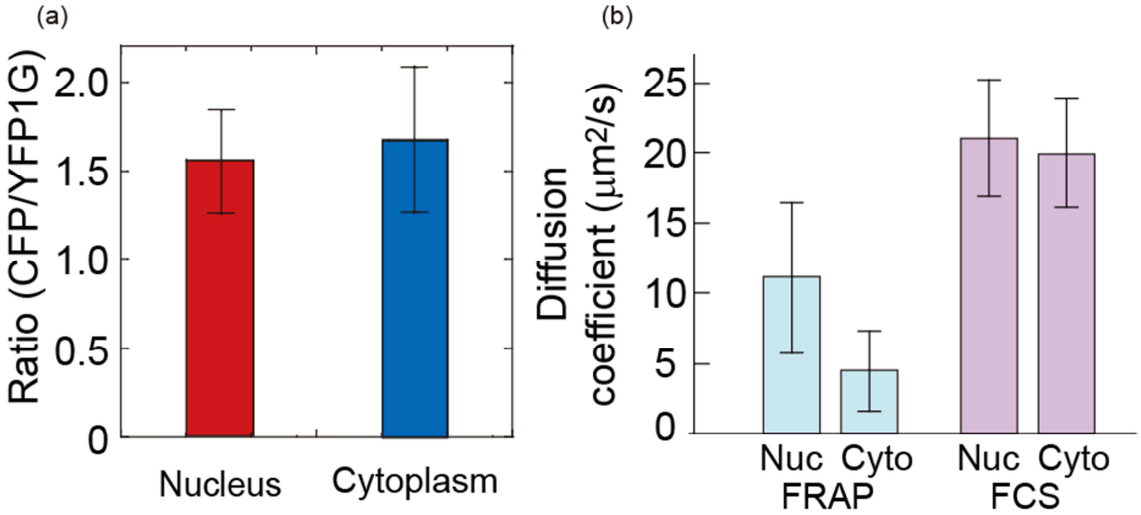


図 52　(a)核と細胞質における GimRET の蛍光強度比の平均、(b)GimRET をプローブとして用いた FRAP と FCS から求めた核と細胞質の拡散係数

Cos7 細胞の核と細胞質の拡散係数を、GimRET をプローブとして FRAP と FCS を用いて測定したところ、FRAP では大きな差があったが、FCS では差が見られなかった(FCS は金城研の北村さんに実験していただいた)。GimRET を用いた蛋白質濃度の比較では、核と細胞質では大きな違いはなかった。GimRET は、GimRET 周辺の蛋白質濃度を検出している。つまり、狭い領域の蛋白質濃度、分子混雑を表していると考えられるので、微笑空間におけるプローブの拡散を調べる FCS と同じように、核と細胞質であまり違いがなかったと考えられる。

核と細胞質は核膜によって隔てられており、核内への高分子の流入には核局在シグナルが必要とされているが、蛍光蛋白質を何も修飾をせずに細胞内で発現させた場合でも核内に局在する(Hihara, 2012)。そのため、細胞内で発現している一般的な蛋白質も核内外を自由に行き来できるため、細胞質と核の間ではそれほど大きな蛋白質濃度の違いがなかったと考えられる。

また、細胞質の蛍光強度比が 1.5 以上では、細胞質と比較して核の蛍光強度が低かった。この結果は、蛍光強度比が 1.5 以上、蛋白質濃度に換算すると 300 mg/mL 以上になると、核と細胞質で蛋白質濃度が不均一になることを示している。核膜に、核内の蛋白質濃度、あるいは分子混雑に応じて、蛋白質の流入を止める、あるいは流出を促進するような機構があるのではないかと考えている。

GimRET と FRAP を組み合わせることで、拡散と蛋白質濃度の関係を調べた。蛍光強度の異なる細胞では、蛍光の回復速度が異なっていた。つまり、蛋白質濃度により、プローブの動きやすさが異なることを示している。GimRET の蛍光強度比と拡散係数の相関を調べた結果、細胞質、核それぞれの領域で相関がみられた。しかし、同じ蛋白質濃度であるにもかかわらず、核と比べて細胞質における拡散が遅かった。この、細胞質において拡散が遅いという結果は、細胞骨格や小さな脂質などにより、蛋白質の拡散が遅くなったためであると考えられる。つまり、拡散だけでは正確な細胞内の環境を表現できておらず、細胞内の分子の混雑した環境を示すのに不十分であることを示している。本研究にて開発した GimRET と拡散係数を測定する手法を組み合わせることで、より正確な「細胞内の分子混雑」を示すことができると考えている。

今回の実験では、FRAP と GimRET を組み合わせた。拡散定数は、測定法によって異なるので(Stasevich, 2011 : Norris, 2011 : Bernas, 2014 : Diekmann & Hoischen, 2014)、FRAP 以外の手法と GimRET の比較も行う必要があると考えている。

一方で、核、細胞質において、同じ蛋白質濃度でも、拡散係数がばらついている。第 3 章で示したように、GimRET はアクチン、チューブリンの重合、脱重合を検出できていない。この、局所的な蛋白質の構造や状態変化が、同じ蛋白質濃度における拡散係数のばらつきを生んでいると考えられる。つまり、GimRET を用いても細胞内の混雑さを示すには完全ではない。これらの状態を検出できるような改良が必要であると考えられる。

本章では、GimRET を用いて、細胞間、細胞内の蛋白質濃度の比較を行った。また、GimRET を用いた FRAP により、拡散だけでは分子混雑を示すには不十分であり、蛋白質濃度と組み合わせることで、より正確な「細胞内の分子混雑」を表すことができることを示した。

第６章　GimRET を融合した蛋白質を用いた蛋白質濃度の時間的・空間的変化の測定

背景と目的

これまでの章では、GimRET を細胞内で発現させ、細胞全体における蛋白質濃度を観察してきた。しかし、細胞内では、第 3 章の細胞分裂後のように時間的にも、細胞小器官内などの局所的な環境、つまり空間的にも変化が起こる。

FRAP や FCS は、非常に強力な手法であるが、欠点もある。それは、時間的、空間的な変化の観察が難しいという点である。FRAP は、プローブが、褪色させた範囲に戻る様子を観察する必要がある。しかし、プローブの量は有限であり、複数回 FRAP を行うと測定できなくなる。また、ある程度の範囲を必要とするので、細胞内の局所的な混雑さを測定するには不向きである。FCS は、微小範囲における観察であるため、細胞が移動する、あるいは細胞小器官が移動してしまうと、正確な値を示すことができない。また、測定に時間がかかるため、時間変化を追うことができない。加えて、拡散を測定するいずれの方法も、観察対象に対して強力にレーザーを照射する必要があるため、複数回の観察を行うと光毒性のため細胞が弱ってしまう。

蛍光蛋白質が、細胞のイメージングに用いられる一つの理由が、蛍光蛋白質に局在化シグナルや、局在する蛋白質を融合することで、細胞内で局在させることができるからである。また、蛍光蛋白質が褪色しない励起条件を用いることで、時間的な変化を追うことも可能である。

GimRET も、蛍光蛋白質なので、他の蛋白質と融合することができる。この章では、クロマチン構造を構築する蛋白質で、核内に局在する H2B に GimRET を融合し、細胞分裂前後における核内の蛋白質濃度の変化の時間変化を調べた。

また、フィロポディアの先端に局在する蛋白質であるミオシン X に GimRET を融合し、細胞質とフィロポディアの先端での蛋白質濃度の比較を行い、GimRET が細胞内の局所的な蛋白質濃度の違いを調べた。

実験方法

H2B-GimRET の観察

H2B-GimRET のベクターは、ヒストン 2B(H2B)の cDNA を鋳型として、制限酵素サイト NheI を含むセンス、アンチセンスプライマーを用いて PCR 法により増幅し、PCR 産物を NheI で制限酵素カットした GimRET のベクターとライゲーションを行い構築した。全てのベクターは DH5α に遺伝子導入を行った。

実験には HeLa 細胞を使用した。細胞の培養方法や蛍光蛋白質の一過性発現には、第 4 章と同じ方法を用いた。細胞周期をそろえるため、H2B-GimRET のベクターを遺伝子導入して 24 時間後に、細胞を培養している培地を、1 mM ヒドロキシ尿素を混合した培地に置換した。ヒドロキシ尿素を用いることで、細胞周期を S 期にそろえることができる。16 時間後、ヒドロキシ尿素を PBS で洗浄し、フェノールレッドなしの培地に置換し、蛍光顕微鏡上において、37℃、5%CO_2 条件下、30 分に一回、24 時間撮影した。観察には 25 倍の対物レンズを用いた。観察領域を 338.61×338.61 μm2 (1024×1024pixels)、0.331 μs /pixel の条件で観察した。画像は 5 回平均像である。拡大像は 60 倍対物レンズで撮影した。41.943×41.943 μm^2 (1024×1024pixels)、0.041 μs/pixel の条件で観察した。画像は、20 回平均像である。解析は ImageJ を用いて行った。

GimRET-MyosinX の観察

GimRET-MyosinX のベクターは、GimRET の cDNA を鋳型として、制限酵素サイト NheI を含むセンス、アンチセンスプライマーを用いて PCR 法により増幅し、PCR 産物を NheI で制限酵素カットしたミオシン X のベクターとライゲーションを行い構築した。
全てのベクターは DH5α に遺伝子導入を行った。

実験には Cos7 細胞を用いた。細胞の培養方法や蛍光蛋白質の一過性発現には、第 4 章と同じ方法を用いた。ただし、マトリジェルでコートしたガラスボトムディッシュに細胞をまいた後にベクターの遺伝子導入を行った。観察には 60 倍の対物レンズを用いて行った。。観察領域を 41.943×41.943 μm^2 (1024×1024pixels)、0.041 μs/pixel の条件で観察した。画像は、20 回平均像である。解析は ImageJ を用いて行った。

結果

核内の蛋白質濃度の分布と時間変化

ヒストン H2B は、クロマチン構造を構成する 5 つのヒストン蛋白質の一つであり、核内のクロマチンのイメージングを行う際に良く用いられている(Campos, 2009 : Bancaud, 2009)。GimRET を H2B に繋げ (H2B-GimRET)、HeLa 細胞で発現させ観察した。60 倍の対物レンズを用いて観察したところ、核内の GimRET の蛍光強度比は一様であった。蛍光像を見ると、一様ではない像が見られた。

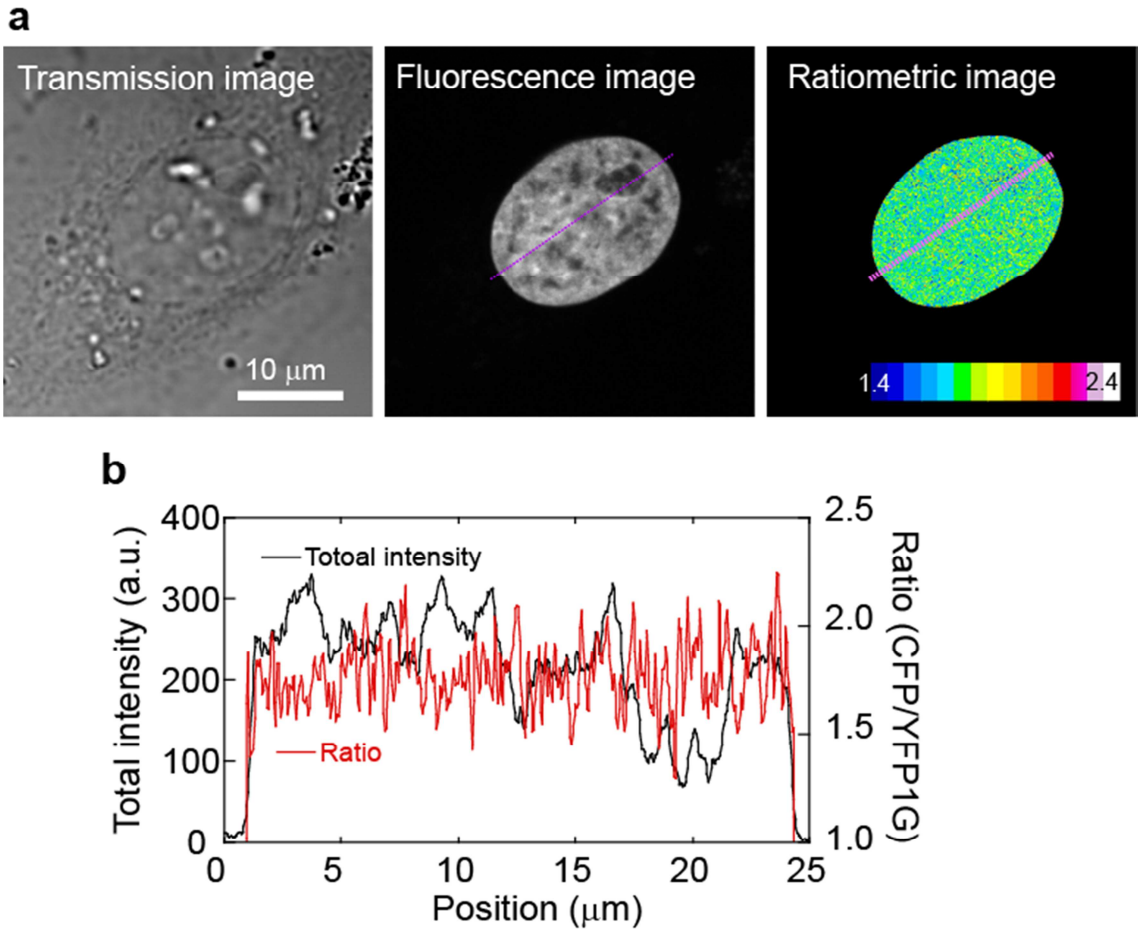


図 53　(a)GimRET-H2B を発現させた HeLa 細胞を、60 倍対物レンズを用いて観察した場合の明視野像(左)、蛍光像(中央)、蛍光強度比像(右)、(b)(a)の蛍光像と蛍光強度比像のクロスセクション

25 倍の対物レンズを用いて、細胞分裂中における H2B-GimRET の蛍光強度比の変化を追った。H2B-GimRET の全蛍光強度と蛍光強度比の時間変化の平均トレースを図 54 に示す。H2B-GimRET の蛍光強度比は、G2 期の後半から増加し始め、相同染色体を形成するときに最大となり、その後徐々に減少した。

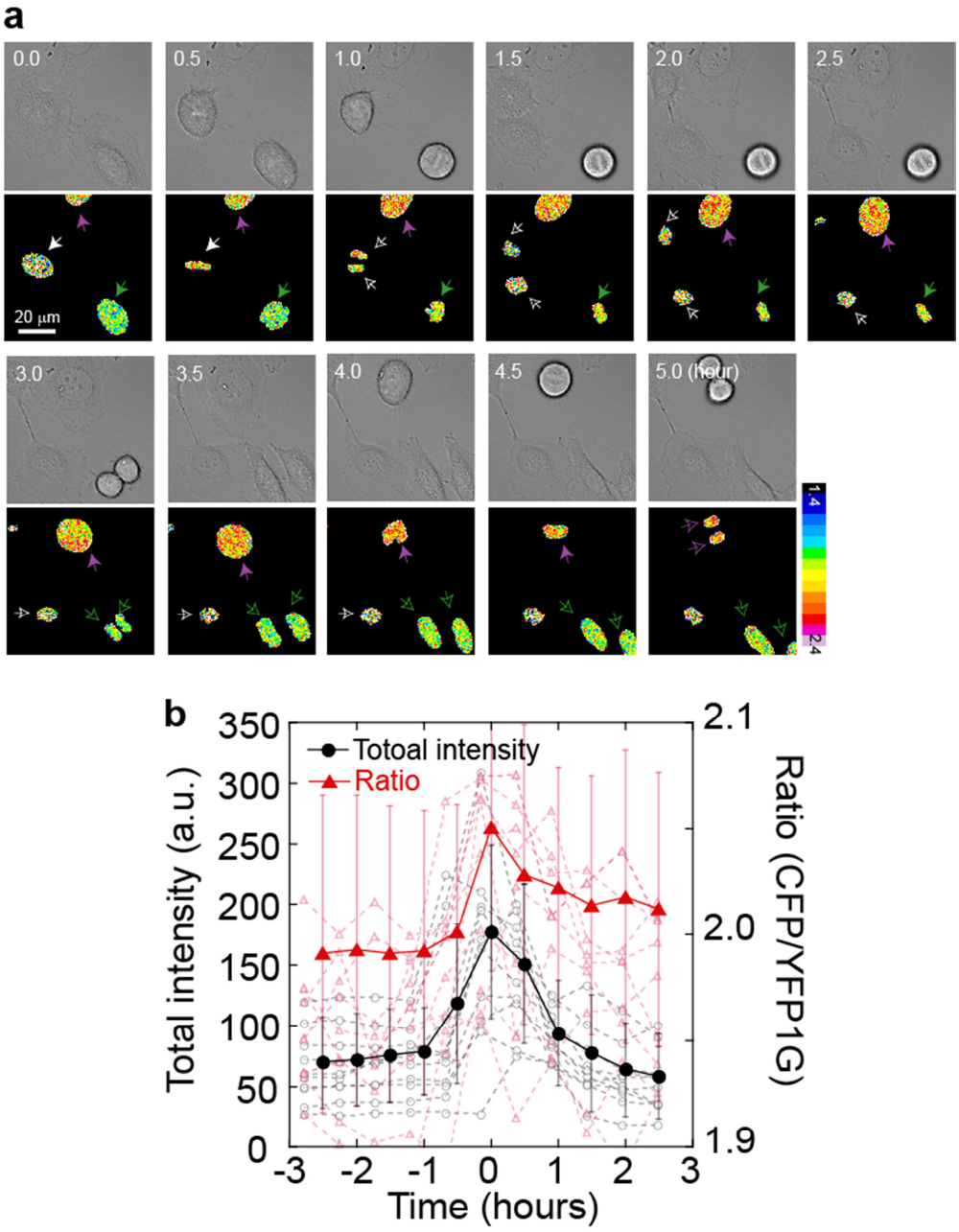


図 54　(a)GimRET-H2B を発現させた HeLa 細胞の、細胞分裂前後における明視野像(上)と蛍光強度比像(下)、(b)細胞分裂前後における蛍光強度(黒)と蛍光強度比(赤)の時間変化

細胞局所における蛋白質濃度

また、GimRET をミオシン X に繋げ（GimRET-MyosinX)、Cos7 細胞で発現させ観察した。ミオシン X は脊椎動物においてのみ発現するミオシンで、フィロポディア形成に関係している(Berg, 2000)。図 55 のように、ミオシン X は細胞質にも存在しているが、一部はフィロポディアの先端に局在している。GimRET-MyosinX の蛍光強度比を見てみると、細胞質と比べてフィロポディアの先端は低いことがわかった。

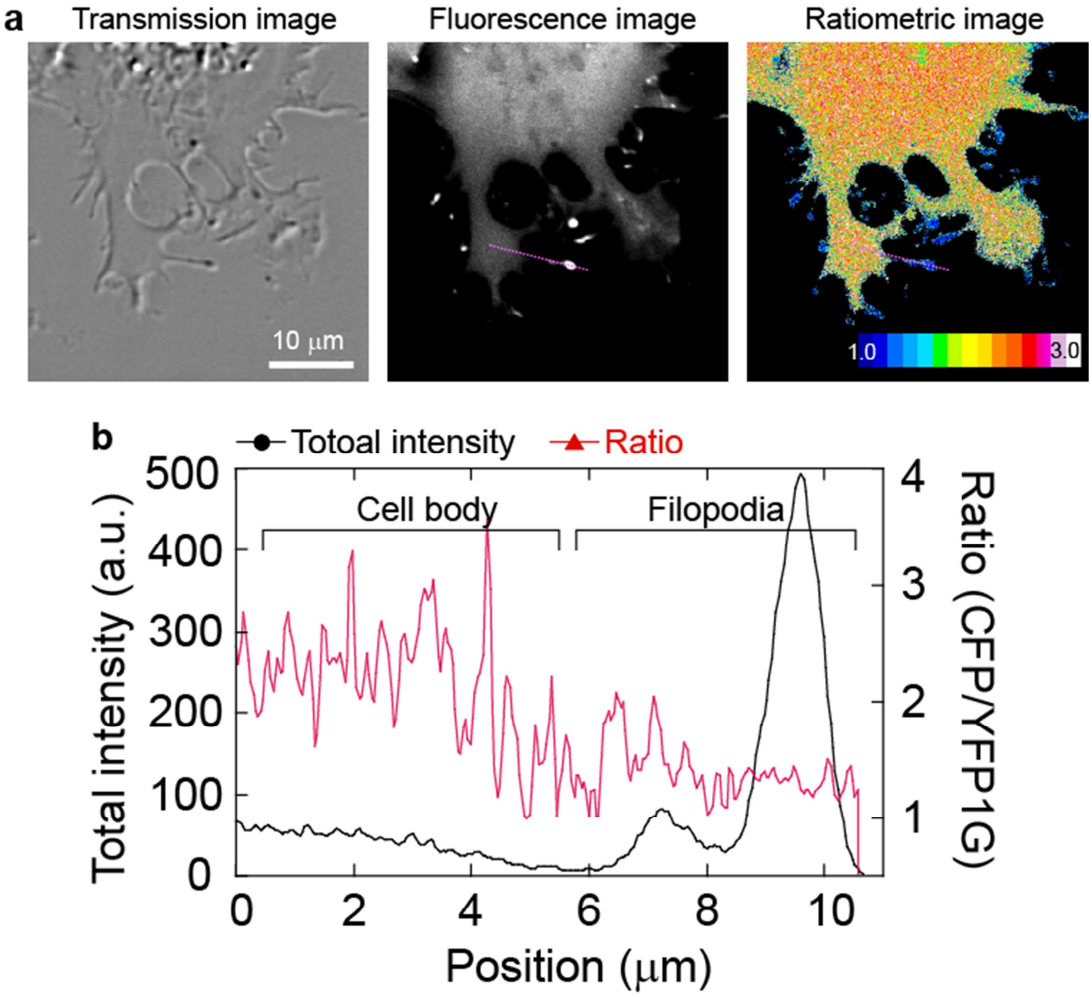


図 55　(a)GimRET-myosinX を発現させた Cos7 細胞を、60 倍対物レンズを用いて観察した場合の明視野像(左)、蛍光像(中央)、蛍光強度比像(右)、(b)(a)の蛍光像と蛍光強度比像のピンクの線のクロスセクション

以上のように、GimRET を融合した蛋白質を用いて、細胞内の局所的な蛋白質濃度の時間、空間的な変化を追うことに成功した。

まとめと考察

GimRET を H2B に融合した GimRET-H2B を用いることで、核内の蛋白質濃度の分布を観察することに成功した。核内は、蛋白質濃度が一様であった。一方で蛍光像は、クロマチン構造を反映した不均一な像であった。GimRET の分子量は約 50KDa であり、H2B の分子量は 13KDa である。GimRET は H2B と比べて 3 倍以上の分子量であるため、GimRET-H2B の局在は、本来の H2B の局在と異なっていると考えられる。つまり、GimRET-H2B が入りこむことができる、クロマチン構造が密でない領域において局在しやすく、そうでない領域において局在していないため、蛍光像が均一ではなかったのではないかと考えられる。蛍光強度比像は、GimRET-H2B の周囲の蛋白質濃度を示しており、クロマチン構造の粗密さそのものを反映していないため、蛍光強度比像と蛍光像で異なる像を示したと考えている。またこの結果は、蛍光強度比が蛍光強度によるものでない一つの証拠である。

核内の蛋白質濃度の時間変化を追うことに成功した。分裂期において、染色体の蛋白質濃度が増加していた。この結果は、間期と比べて分裂期では、クロマチン構造内の拡散が遅くなるという報告と一致する(Hihara, 2012)。GimRET は蛋白質濃度だけでなく、DNA などの核酸にも感受性を示すので、今回観察された GimRET-H2B の経時変化は、クロマチン構造の周りの、ヒストンなどの蛋白質に加えて、DNA の密度の変化も感受している。本実験では、蛋白質濃度が大きく変化すると予測して、分裂前後の変化を測定した。細胞周期において、S 期では DNA 量が 2 倍になる(Lodis, 2011)。DNA に加えて、DNA に結合しているヒストンなどの蛋白質の量も 2 倍になる。GimRET を用いて核内の蛋白質濃度を観察することで、細胞周期中の核内の分子の混雑さの変化を調べることができると考えている。

これまで行われてきた細胞内分子混雑の実験の中で、核内の分子混雑について調べたものは非常に多い(Schmiedeberg, 2004 : Yao, 2006 : Phair, 2006 : Catez : 2006 : Raska, 2006 : Cardarelli, 2007: Bancaud, 2009 : Hihara, 2012 : Bošković, 2014 : Bernas, 2014)。これは、核内の混雑さ、あるいはヌクレオソーム構造の粗密さが、転写因子などの活性に影響し、その結果細胞の機能に影響すると考えられているためである。これまでの実験では、電子顕微鏡を用いた観察や、FRAP や FCS などの拡散係数の比較などにより、核内の分子混

雑の議論が行われてきた。しかしこれらの手法では、時間的・空間的な制約があるため、核内での分子混雑の比較や、同一細胞の時間的な分子混雑の変化を追うことができなかった。本実験では、同一細胞の核内の混雑の時間変化を追うことに成功している。また、蛍光像から、クロマチン構造の粗密の違いを観察することもできる。本研究で開発された GimRET を用いることで、核内の分子混雑の時間的・空間的な新たな知見を示すことができると考えている。

GimRET をミオシン X に融合することで、細胞の局所的な蛋白質濃度の違いを観察することに成功した。GimRET-MyosinX を発現させた細胞では、フィロポディアにおいて細胞質と蛍光強度比に違いが見られた。興味深いことに、フィロポディアの先端だけではなく、フィロポディア全体の蛍光強度比が低い、つまり蛋白質濃度が低いことが観察された。このような違いは、GimRET 単体で発現させた場合には観察されていない。その違いは 0.8 であり、蛋白質濃度に換算すると、400 mg/mL に相当する。ただし、周囲の蛋白質によって変化率が違う上、蛍光蛋白質をベースとした FRET プローブを他の蛋白質に融合した場合に、その感受性が変化するので、単純比較はできない。ただ少なくとも、細胞質と比べてフィロポディアの蛋白質濃度が低いことは確実である。
フィロポディア内の模式図を図 56 に示す。

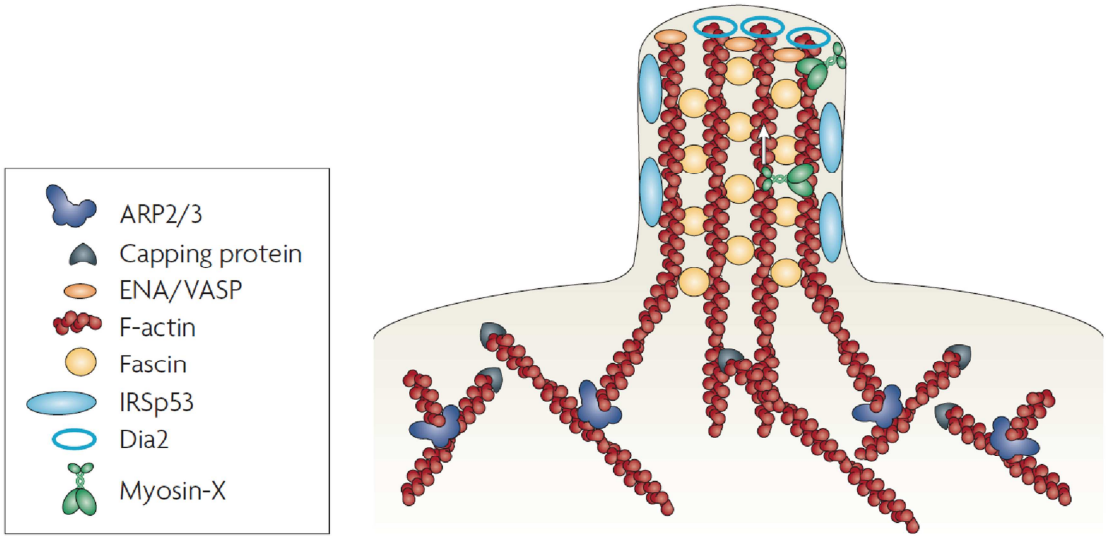


図 56　フィロポディア内の模式図　(Mattila, 2008)

図 56 のように、フィロポディア内は、fascin によりアクチンフィラメントがバンドル化しており(Mellor, 2010)、さらに他の蛋白質も存在することから、フィロポディア内は蛋白質で非常に混雑していると予測された。しかし、実際は逆の結果を示した。この結果は、フィロポディア全体、あるいは根幹部分において、他の蛋白質がフィロポディア内部に簡単に拡散できないような構造体、例えばバンドル化していないアクチンフィラメントがメッシュ状に張り巡らされているなどが形成されているため、フィロポディア全体の蛋白質濃度が低いのではないかと考えられる。GimRET-MyosinX と同時に、アクチンや fascin などの、フィロポディアの形成に関係する蛋白質を同時に観察することで、フィロポディア内の本当の環境を示すことができると考えている。

今回の観察では、フィロポディアの伸長が止まった細胞を観察している。フィロポディアの形成過程をイメージングすることで、フィロポディア内における蛋白質濃度の時間的、空間的な変化を観察できると考えている。

本章では、GimRET を融合した蛋白質を用いることで、細胞の局所的な蛋白質濃度の時間的・空間的な変化を検出することができることを示した。

総括と展望

本研究では、蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質の開発を行い、蛋白質濃度によって蛍光強度比が変化する FRET プローブ、GimRET の開発に成功した。細胞分裂過程、蛋白質合成／分解、および、細胞体積変化による細胞内の蛋白質濃度の変化の測定により、GimRET が細胞内の蛋白質濃度を検出できることを確認した。GimRET と、細胞内の分子の拡散係数を測定する方法である FRAP を組み合わせることで、細胞内の混雑さを示すには、拡散だけでは不十分であることを示した。また、細胞内で局在する蛋白質と融合することで、細胞内局所における時間的、空間的な蛋白質濃度の変化を検出することにも成功した。

本研究で作製した蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質、YFP1G は疎水性に対して顕著な感受性を示すため、蛋白質濃度を感受する際に、少なくとも疎水性が関与していると考えられる。しかし、実際に溶液中の蛋白質濃度を増加させた際に、どのようなメカニズムで YFP1G の蛍光強度が変化するのかは解明できていない。そのメカニズムの解明には、高蛋白質濃度の溶液中、あるいは細胞内における YFP1G の立体構造を調べなければならない。NMR を用いて、溶液中での構造変化、あるいは蛍光団と水分子との相互作用を調べる必要があると考えている。メカニズムを解明することで、より高感度に蛋白質濃度を検出できる蛍光蛋白質の開発や、新たな機能持つ蛍光蛋白質を開発できると期待している。

蛋白質濃度を検出する GimRET と拡散係数を測定する FRAP を比較することで、蛋白質濃度が同じであるにもかかわらず、拡散定数が異なる場合がある、つまり、拡散だけでは、細胞内の混雑さを示すには不十分であることを示した。この結果は、細胞内の混雑さを、拡散定数だけで議論した場合に誤った結論に到達する可能性を示しており、蛋白質濃度などの情報と組み合わせることで、より正確な「細胞内の分子混雑」を示すことができると考えている。一方で、蛋白質の局所的な構造変化を検出できないなど、GimRET だけでは不十分である。本研究では FRAP との比較を行ったが、今後は他の拡散を測定する方法、FCS や RICS などと GimRET を比較し、GimRET とどの手法を組み合わせることが、細胞内の混雑さを調べるのに最適かを検証したいと考えている。

GimRET を用いることで、細胞内における蛋白質濃度の違いや、細胞分裂後の蛋白質濃度の時間的な変化を測定することに成功した。また、H2B と GimRET を融合することで核内の蛋白質濃度の時間的な変化を、ミオシン X と融合することで、フィロポディア内という局所における蛋白質濃度の違いを観察することに成功した。これまでの、細胞内の拡散を調べる手法は様々な制約により、分子混雑の時間的、空間的な変化を調べるのに不向きであった。GimRET は蛍光蛋白質なので、時間的、空間的変化を調べることにアドバンテージがある。組織、あるいは個体の内部における細胞の蛋白質濃度、分子混雑も測ることが可能である。

GimRET の応用として、ガン細胞では、転写因子である myc が蛋白質の合成を促進しているなどの報告があり(Tansey, 2014)、通常の細胞と比べて蛋白質濃度が高い可能性がある。GimRET を、普通の細胞の中からガン細胞を見分ける目安として用いることができるかもしれない。また、再生医療に用いられる iPS 細胞には、完全に未分化状態の細胞と不完全な細胞が混在して存在しており、その違いが、ヒストンアセチル化・メチル化による、ユークロマチン/ヘテロクロマチンといった、核内のクロマチン状態の違いであるとの報告もある(Hiratani, 2010：Fussner, 2011)。GimRET を融合させたヒストン蛋白質を、完全に未分化な細胞の選択を行う指標として用いることや、山中 4 因子を体細胞に導入した後の、細胞が未分化に戻る瞬間を観察するプローブとして用いることなどができるのではないかと考えている。GimRET を用いることで、細胞内の蛋白質濃度の変化、ひいては分子混雑の変化を一細胞レベルで観察することができる。がん化や未分化、分化などの、細胞間で分子混雑が変化する現象を捉えることに、GimRET を応用できるのではないかと考えている。

現在、すでに複数の研究室に GimERT を提供している。GimRET は、これまで混雑さを調べることができなかった生命現象の、時間的・空間的な変化を調べる新たなツールとして広く活用することができると考えている。

謝辞

本研究を遂行し、本論文を執筆するにあたりまして、たくさんの方にお世話になりました。この場を借りて感謝いたします。

指導教官の渡邉朋信先生には、研究の方向性や実験手法に始まり、研究に対する心得、思考の仕方までありとあらゆる面でご指導いただきました。この博士論文をまとめることができたのも渡邉先生のご尽力の賜物です。心よりお礼申し上げます。

柳田敏雄先生は、修士課程から 5 年間、温かく見守っていただきました。本研究を行う環境や金銭的支援など､様々な場面で援助をしていただきました｡また、本審査の主査も引き受けていただきました。心より感謝いたします。

大変お忙しい中、予備審査委員会の主査を快く引き受けてくださいました難波啓一教授、副査を引き受けてくださいました月田早智子教授、八木健教授に感謝申し上げます。

実験の基礎の基礎を教えていただきました慶澤景子様に感謝申し上げます。また、本研究について指導・議論してくださいました理化学研究所生命システム研究センター先端バイオイメージング研究チームの皆様にも感謝いたします。

本研究の実験をお手伝いいただきました森本雄佑博士、島智弘博士に感謝申し上げます。また、楽しく刺激的な研究生活を与えてくれました理研生命システム研究センターの皆様にも感謝いたします。

研究に集中できるよう支援いただきました武内保子様、山本ゆう様に感謝申し上げます。

最後に、現在に至るまでの精神的、金銭的な支援をしてくださいました両親と家族に感謝申し上げます。ようやく社会人として独り立ちできます。これから恩返ししていきたいと思います。

2015 年 3 月　森川高光

参考文献

1 McGuffee SR, Elcock AH, Diffusion, Crowding & Protein Stability in a Dynamic Molecular Model of the Bacterial Cytoplasm. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(3):e1000694.

2 Goodsell DS, The Machinery of Life, 2nd ed, (Springer, New York, 2009)

3 Fulton A, How crowded is the cytoplasm? *Cell* 1982; 30, 345–347

4 Zimmerman SB, Trach SO, Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1991;222(3):599-620.

5 Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D, Gerisch G, Baumeister W, Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*. 2002;298(5596):1209-13

6 Pradipasena P & Rha C, Effect of concentration on apparent viscosity of a globular protein solution. *Polymer Engineering and Science*, 1977; 17(12):861-864.

7 Berns DS, Protein aggregation in phycocyanin — Osmotic pressure studies. *Biochem Biophys Res Commun*. 1970;38(1):65-73

8 Minton AP, Effective Hard Particle Model for the Osmotic Pressure of Highly Concentrated Binary Protein Solutions. *Biophys J*. 2008;94, L57–L59

9 Castelletto V, Hamley IW, Clifton LA & Green RJ, Osmotic pressure and aggregate shape in BSA/poly(ethylene glycol)-lipid/Dextran solutions. *Biophys Chem.* 2008; 134, 34-38

10 van den Berg B, Ellis RJ, & Dobson CM, Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* 1999; 18, 6927-6933

11 van den Berg B, Wain R, Dobson CM, Ellis RJ, Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: implications for folding inside the cell. *EMBO J*. 2000;19(15):3870-5

12 Tokuriki N, Kinjo M, Negi S, Hoshino M, Goto Y, Urabe I, Yomo T., Protein folding by the effects of macromolecular crowding. *Protein Sci.* 2004;13(1):125-33.

13 Li C, Charlton LM, Lakkavaram A, Seagle C, Wang G, Young GB, Macdonald JM, Pielak GJ., Differential dynamical effects of macromolecular crowding on an intrinsically disordered protein and a globular protein: implications for in-cell NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2008;130(20):6310-1.

14 Inomata K, Ohno A, Tochio H, Isogai S, Tenno T, Nakase I, Takeuchi T, Futaki S, Ito Y, Hiroaki H, Shirakawa M., High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature.* 2009;458(7234):106-9

15 Wang Q, Zhuravleva A & Gierasch LM, Exploring weak, transient protein-protein interactions in crowded in vivo environments by in-cell nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry.* 2011; 50, 9225-9236

16 Drenckhahn D & Pollard TD, Elongation of actin filaments is a diffusionlimited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J. Biol. Chem*. 1986 ;261, 12754-12758.

17 Lindner RA & Ralston GB, Macromolecular crowding: effects on actin polymerization. *Biophys. Chem*. 1997;66, 57-66.

18 Herzog W and Weber K, Microtubule formation by pure brain tubulin in vitro. The influence of dextran and polyethylene glycol. *Eur. J. Biochem*. 1978;91, 249-254.

19 Rivas G, Fernandez JA and Minton AP, Direct observation of the enhancement of non-cooperative protein self-assembly by macromolecular crowding indefinite linear self-association of baterial cell division protein FtsZ. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 2001;98, 3150-3155

20 Zimmerman SB & Harrison B, Macromolecular crowding increases binding of DNA polymerase to DNA: an adaptive effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 1987;84(7): 1871–1875.

21 Akabayov B, Akabayov SR, Lee SJ, Wagner G, Richardson CC, Impact of macromolecular crowding on DNA replication. *Nat Commun.* 2013;4:1615

22 Martin J, Hartl FU, The effect of macromolecular crowding on chaperonin-mediated protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(4):1107-12.

23 Ovádi J, & Saks V, On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol Cell Biochem.* 2004; 256-257, 5-12

24 Aoki K, Yamada M., Kunida K, Yasuda S & Matsuda M, Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108, 12675-12680

25 Aoki K, Takahashi K, Kaizu K, Matsuda M. A quantitative model of ERK MAP kinase

phosphorylation in crowded media. *Sci Rep*. 2013;3:1541

26 Zimmerman SB, Macromolecular crowding effects on macromolecular interactions: some implications for genome structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.,* 1993;1216 (2): 175–85.

27 Ellis RJ, Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(10):597-604.

28 Rivas G, Ferrone F, Herzfeld J, Life in a crowded world. *EMBO Rep*. 2004; 5(1): 23–27

29 Foffi G, Pastore A, Piazza F, Temussi PA, Macromolecular crowding: chemistry and physics meet biology (Ascona, Switzerland, 10-14 June 2012). *Phys Biol*. 2013;10(4):040301

30 Peters R, Peters J, Tews KH, Bahr W, A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1974;367(3):282?294.

31 Axelrod D, Koppel D, Schlessinger J, Elson E, Webb W, Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical J.* 1976;16 (9): 1055–69.

32 Magde D, Elson EL, Webb WW, Thermodynamic fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys Rev Lett*, 1972;29, 705–708.

33 Edidin M, Zagyansky Y & Lardner TJ, Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* 1976;191, 466–468

34 Lippincott-Schwartz J, Snapp E and Kenworthy A, Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(6):444-56.

35 Reits EA, Neefjes JJ., From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol.* 2001;3(6):E145-7.

36 Klonis N, Rug M, Harper I, Wickham M, Cowman A, Tilley L, Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. *Eur Biophys J*. 2002 ;31(1):36-51.

37 木村宏, 和田郁夫, 講義と実習:生細胞蛍光イメージング, 85-92 (2007)

38 Matsuda T, Nagai T, Quantitative measurement of intracellular protein dynamics using photobleaching or photoactivation of fluorescent proteins. *Microscopy* (Oxf). 2014;63(6):403-408.

39 Ries J & Schwille P, New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008;10, 3487-3497

40 金城政孝, 講義と実習:生細胞蛍光イメージング,101－109 (2007)

41 Schwille P, Korlach J and Webb WW, Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometry*. 1999;36(3):176-82

42 Bacia K, Kim SA, Schwille P, Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods*. 2006;3(2):83-9.

43 Phair RD, Misteli T., High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*. 2000 6;404(6778):604-9.

44 Schmiedeberg L, Weisshart K, Diekmann S, Meyer Zu Hoerste G, Hemmerich P., High- and Low-mobility Populations of HP1 in Heterochromatin of Mammalian Cells. *Mol Biol Cell.* 2004;15(6):2819-33.

45 Bošković A, Eid A, Pontabry J, Ishiuchi T1, Spiegelhalter C, Raghu Ram EV, Meshorer E, Torres-Padilla ME, Higher chromatin mobility supports totipotency and precedes pluripotency in vivo. *Genes Dev.* 2014 ;28(10):1042-7

46 Yao J, Munson KM, Webb WW, Lis J., Dynamics of heat shock factor association with native gene loci in living cells. *Nature*. 2006;442(7106):1050-3.

47 Cluzel C, Saltel F, Lussi J, Paulhe F, Imhof BA, Wehrle-Haller B, The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. *J Cell Biol*. 2005;171(2):383-92.

48 Gregory J. Digby, Robert M. Lober, Pooja R. Sethi, and Nevin A. Lambert, 2006, Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(47):17789-94.

49 Shimi T, Pfleghaar K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Goldman AE, Adam SA, Shumaker DK, Kinjo M, Cremer T, Goldman RD., The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* 2008;22(24):3409-21

50 Cluzel P, Surette M, Leibler S., An Ultrasensitive Bacterial Motor Revealed by Monitoring Signaling Proteins in Single Cells. *Science.* 2000;287(5458):1652-5.

51 Hihara S, Pack CG, Kaizu K, Tani T, Hanafusa T, Nozaki T, Takemoto S, Yoshimi T, Yokota H, Imamoto N, Sako Y, Kinjo M, Takahashi K, Nagai T, Maeshima K., Local nucleosome

dynamics facilitate chromatin accessibility in living mammalian cells. *Cell Rep.* 2012;2, 1645-1656

52 Im KB, Schmidt U, Kang MS, Lee JY, Bestvater F, Wachsmuth M , Diffusion and Binding Analyzed with Combined Point FRAP and FCS. *Cytometry* . 2013;83(9):876-89.

53 Müller CB, Eckert T, Loman A, Enderlei J & Richtering W, Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A robust tool to study molecular crowding. *Soft matter*, 2009;5, 1358–1366

54 Kalwarczyk T, Ziebacz N, Bielejewska A, Zaboklicka E, Koynov K, Szymański J, Wilk A, Patkowski A, Gapiński J, Butt HJ, Hołyst R. Comparative Analysis of Viscosity of Complex Liquids and Cytoplasm of Mammalian Cells at the Nanoscale. *Nano Lett.* 2011;11, 2157-2163

55 Gershon ND, Porter KR and Trus BL, The cytoplasmic matrix: its volume and surface area, and the diffusion of molecules through it. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985 ; 82:5030-5034.

56 Minton AP, Holobiochemistry: an integrated approach to the understanding of biochemical mechanism that emerges from the study of proteins and protein associations in volume-occupied solutions. In Structural and Organizational Aspects of Metabolic Regulation. P. A. Srere, M. E. Jones, and C. K. Mathews, editors. Wiley- Liss, New York. 1990; 291-306

57 Cutsforth G, Whitaker R, Hermans J. and Lentz BA, new model to describe extrinsic protein binding to phospholipid membranes of varying composition: application to human coagulation proteins. *Biochemistry* 1989;28, 7453-7461

58 Knull HR & Walsh JL, Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Curr. Top. Cell. Regul*. 1992;33, 15-30.

59 Lakatos S & Minton AP, Interactions between globular proteins and F-actin in isotonic saline solution. *J. Biol. Chem.* 1991;266, 18707-18713

60 Stasevich TJ, Mueller F, Michelman-Ribeiro A, Rosales T, Knutson JR, McNally JG, Cross-Validating FRAP and FCS to Quantify the Impact of Photobleaching on In Vivo Binding Estimates. *Biophys J.* 2010;99(9):3093-101

61 Norris SC, Humpolíčková J, Amler E, Huranová M, Buzgo M, Macháň R, Lukáš D, Hof M,

Raster image correlation spectroscopy as a novel tool to study interactions of macromolecules with nanofiber scaffolds. *Acta Biomater.* 2011;7, 4195-4203

62 Kiuchi T, Nagai T, Ohashi K, Mizuno K. Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. *J Cell Biol.* 2011;193:365–80

63 Bernas T, Brutkowski W, Zarębski M & Dobrucki J, Spatial heterogeneity of dynamics of H1 linker histone. *Eur Biophys J.* 2014;43, 287-300

64 Diekmann S & Hoischen C, Biomolecular dynamics and binding studies in the living cell. *Phys Life Rev.* 2014;11, 1-30

65 Takata H, Hanafusa T, Mori T, Shimura M, Iida Y Ishikawa K, Yoshikawa K, Yoshikawa Y, Maeshima K, Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage. *PLOS ONE* 2013;8, e75622

66 Shimomura O & Johnson FH, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous Hydromedusan. *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962;59, 223-239

67 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC, Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;263 (5148)

68 Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ, Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* 1996 ;273 (5280): 1392–5

69 Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004;22(12):1567-72

70 Shcherbo D, Murphy CS, Ermakova GV, Solovieva EA, Chepurnykh TV, Shcheglov AS, Verkhusha VV, Pletnev VZ, Hazelwood KL, Roche PM, Lukyanov S, Zaraisky AG, Davidson MW, Chudakov DM, Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J*. 2009;418(3):567-74.

71 Tsien, RY, The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 1998;67, 509-44

72 Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H, Engineering fluorescent proteins. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2005;95:1-15.

73 Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.* 2005;23(12):605-13.

74 Müller-Taubenberger A, Anderson KI, Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;77(1):1-12

75 Craggs TD, Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chem. Soc. Rev*., 2009;38, 2865-2875

76 木村宏, 金城政孝, 原口徳子, 平岡泰, 永井健治, 講義と実習:生細胞蛍光イメージング. 54-78 (2007)

77 Pologruto TA, Yasuda R, Svoboda, Monitoring neural activity and [Ca2+] with genetically encoded Ca2+ indicators. *J Neurosci.* 2004;24(43):9572-9.

78 Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE, Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. 1998; 9 ; 394 (6689) : 192-5.

79 Morimoto YV, Kojima S, Namba K, Minamino T, M153R mutation in a pH-sensitive green fluorescent protein stabilizes its fusion proteins. *PLoS One*. 2011;6(5):e19598.

80 Förster T, Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys*. 1948;437, 55-57

81 Piston DW & Kremers GJ, Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci.* 2007;32, 407-414

82 Ohba Y, Fujioka Y, Nakada S, Tsuda M, Fluorescent protein-based biosensors and their clinical applications. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;113:313-48

83 永井健治, 小寺一平, 講義と実習:生細胞蛍光イメージング,110-117, 2007

84 Hires SA, Tian L, Looger LL, Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators. *Brain Cell Biol*. 2008;36(1-4):69-86

85 Nagai T, Sawano A, Park ES & Miyawaki A, Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+}. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98, 3197-3202

86 Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H, Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106, 15651-15656

87 Grashoff C, Hoffman BD, Brenner MD, Zhou R, Parsons M, Yang MT, McLean MA, Sligar SG, Chen CS, Ha T, Schwartz MA, Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature.* 2010;466, 263-266

88 Watanabe TM, Imada K, Yoshizawa K, Nishiyama M, Kato C, Abe F, Morikawa TJ, Kinoshita M, Fujita H, Yanagida T, Glycine Insertion Makes Yellow Fluorescent Protein Sensitive to Hydrostatic Pressure. *PloS One* 2013;8, e73212

89 Spudich JA & Watt S, The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem*, 1971;246, 4866-71

90 Murofushi H, Kotani S, Aizawa H, Hisanaga S, Hirokawa N, Sakai H. Purification and characterization of a 190-kD microtubule-associated protein from bovine adrenal cortex. *J Cell Biol*. 1986;103, 1911-9

91 Meylan WM & Howard PH, Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci.* 1995;84, 83-92

92 McConkey EH, Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79, 3236-3240

93 Son SH, Yamagishi Y, Tani M, Yuasa M, Yamada K, Spectral shifts of the environment-sensitive fluorophore POLARIC in heterogeneous interfaces. *Chem. Lett.* 2011;40, 989-911

94 Lakowicz, JR, *Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd ed.* (Springer, New York, 2006)

95 Fernández JM, Di Giusto G, Kalstein M, Melamud L, Rivarola V, Ford P, Capurro C, Cell volume regulation in cultured human retinal Müller cells is associated with changes in transmembrane potential. *PLoS One*. 2013;8(2):e57268.

96 Buckler KJ, & Vaughan-Jones RD, Application of a new pH-sensitive fluoroprobe (carboxy-SNARF-1) for intracellular pH measurement in small, isolated cells. *Pflugers Arch.* 1990;417, 234-239

97 Mille Y, Beney L & Gervais P, Viability of *Escherichia coli* after combined osmotic and thermal treatment: a plasma membrane implication. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1567:41-48

98 Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR, Sonenberg N, A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol.* 2005;170, 913-924

99 Han YH, Moon HJ, You BR & Park WH, The effect of MG132, a proteasome inhibitor on *HeLa* cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep*. 2009;22, 215-221

100 Cookson NA, Cookson SW, Tsimring, L. S. & Hasty, J. Cell cycle-dependent variations in protein concentration. *Nucleic Acids Res.* 2010;38, 2676-2681

101 Lodis H, Matsudaira P, Krieger M, Berk A, Kaiser CA, 石浦章一,須藤和夫, 丸山工作, 石川統, 野田春彦 分子細胞生物学第６版 (2011).

102 Brown EB, Wu ES, Zipfel W, Webb WW, Measurement of molecular diffusion in solution by multiphoton fluorescence photobleaching recovery. *Biophys J.* 1999;77, 2837-2849

103 Shimi T, Koujin T, Segura-Totten M, Wilson KL, Haraguchi T, Hiraoka Y., Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct Biol*. 2004;147, 31-41

104 Cheng NS, Formula for the Viscosity of a Glycerol-Water Mixture. *Ind. Eng. Chem. Res*. 2008;47 3285-3288

105 Lee SK & Keasling JD, A propionate-inducible expression system for enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71, 6856-6862

106 Kühn T, Ihalainen TO, Hyväluoma J, Dross N, Willman SF, Langowski J, Vihinen-Ranta M, Timonen J, Protein diffusion in mammalian cell cytoplasm. *PLoS One.* 2011;6, e22962

107 Nakane Y, Sasaki A, Kinjo M and Jin T, Bovine serum albumin-coated quantum dots as a cytoplasmic viscosity probe in a single living cell. *Anal. Methods*, 2012;4, 1903–1905

108 Cardarelli F, Serresi M, Bizzarri R, Giacca M and Beltram F, In Vivo Study of HIV-1 Tat Arginine-rich Motif Unveils Its Transport Properties. *Molecular Therapy* 2007;157, 1313–1322.

109 White J, Stelzer E, Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol.* 1999 ;9(2):61-5.

110 Verkman AS, Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends*

Biochem Sci. 2002;27, 27-33

111 Digman MA, Brown CM, Sengupta P, Wiseman PW, Horwitz AR, Gratton E, Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope. *Biophys J.* 2005;89, 1317-1327

112 Campos EI & Reinberg D, Histones: annotating chromatin. *Annu. Rev. Genet*., 2009;43, 559-599

113 Catez F, Ueda T, Bustin M, Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells, *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(4):305-10.

114 Bancaud A, Huet S, Daigle N, Mozziconacci J, Beaudouin J, Ellenberg J, Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J.* 2009;28, 3785-3798

115 Berg JS, Derfler BH, Pennisi CM, Corey DP & Cheney RE, Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *J Cell Sci.* 2000;113, 3439-3451

116 Raska I, Shaw PJ, Cmarko D, Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(3):325-34.

117 Mattila PK, Lappalainen P, Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(6):446-54

118 Mellor H, The role of formins in filopodia formation. *Biochim Biophys Acta.* 2010 ;1803(2):191-200.

119 Tansey WP, Mammalian MYC Proteins and Cancer., *New Journal of Science*, 2014; 757534

120 Hiratani I, Gilbert DM, Autosomal lyonization of replication domains during early Mammalian development, *Adv Exp Med Biol.* 2010;695:41-58

121 Fussner E, Djuric U, Strauss M, Hotta A, Perez-Iratxeta C, Lanner F, Dilworth FJ, Ellis J, Bazett-Jones DP, Constitutive heterochromatin reorganization during somatic cell reprogramming., *EMBO J.* 2011;30(9):1778-89

業績

発表論文

1. Evaluation of intracellular crowding using a hydrophobicity sensitive glycine-inserted mutant Förster resonance energy transfer (FRET) fluorescent protein, TJ Morikawa, H Fujita, A Kitamura, T Horio, J Yamamoto, M Kinjo, A Sasaki, H Machiyama, K Yoshizawa, T Ichimura, K Imada, T Nagai, T Yanagida, TM Watanabe (Nature Methods 誌に投稿中)

2. Glycine insertion makes yellow fluorescent protein sensitive to hydrostatic pressure, TM Watanabe, K Imada, K Yoshizawa, M Nishiyama, C Kato, F Abe, TJ Morikawa, M Kinoshita, H Fujita, T Yanagida, *PLoS One*. 2013;8(8):e73212

国際会議・学会

1. *Arabidopsis thaliana* Myosin XI is a preprocess motor with a broad stepsize, T Morikawa, K Ito, A,Kimura, K Ikezaki, T Komori, K Fujita, M Iwaki, T Yanagida, The biophysical socisty 55th annual meeting

2. Enhancing temperature and pressure sensitivity of various fluorescent proteins, T Morikawa, M Nishiyama, K Yoshizawa, T Yanagida, TM, Watanabe, The biophysical socisty 56th annual meeting

3. Intracellular measurement of macromolecular crowding by a genetically-encoded indicator, T Morikawa, K Imada, K Yoshizawa, T Yanagida, T Nagai, TM Watanabe, The biophysical socisty 57th annual meeting

4. Evaluating intracellular crowded with a glycine-inserted mutant fluorescent protein, T Morikawa, H Machiyama, K Okamoto, K Yoshizawa, H Fujita, T Ichimura, K Imada, T Nagai, T Yanagida, TM Watanabe, The biophysical socisty 58th annual meeting

国内会議・学会

1. *Arabidopsis thaliana* Myosin XI properties make it ideal for fast transport, T Morikawa, K Ito, A,Kimura, K Ikezaki, T Komori, K Fujita, M Iwaki, T Yanagida, 日本生物物理学会第49 回大会

2. ミオシンＸＩの一分子解析, 森川高光、岩城光宏、伊藤光二、木村篤、富永基樹、池崎圭吾、小森智貴、藤田圭介、中野明彦、山本啓一、柳田敏雄, 日本植物学会第 76 回大会

3. 蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質の開発, T Morikawa, K Imada, K Yoshizawa, T Yanagida, T Nagai, TM Watanabe, 日本生物物理学会第 50 回大会

4. 細胞内蛋白質混雑感受性蛍光蛋白質の開発, 森川高光、慶澤景子、藤田英明、今田勝巳、永井偉治、柳田敏雄、渡邉朋信, 第 65 回日本細胞生物学会大会

5. 細胞内蛋白質混雑感受性蛍光蛋白質の開発, T Morikawa, K Yoshizawa, H Fujita, K Imada, T Nagai, T Yanagida, TM Watanabe, 日本生物物理学会第 51 回大会

6. Glycine-inserted mutant Forster resonance energy transfer (FRET) fluorescent protein to evaluate intracellular crowding, T Morikawa, H Machiyama, K Okamoto, K Yoshizawa, H Fujita, T Ichimura, K Imada, T Nagai, T Yanagida, TM Watanabe, 日本生物物理学会第 52 回大会

その他

第 65 回日本細胞生物学会大会　若手発表賞受賞