

GFPを用いた細胞内構造体の動態観察法

丁大橋

1. はじめに

今後の研究課題として、ゲノムプロジェクトなどから得られた分子レベルの知見を細胞レベルに統括していくことが、細胞機能を考える上で重要になるとと思われる。GFPの発見により、目的遺伝子にGFP遺伝子を融合させることにより、生きた細胞内で目的の生体分子を蛍光標識することが簡単にできるようになった[?]。本稿では、GFP融合タンパク質で蛍光標識された生細胞を、蛍光顕微鏡で観察する場合の観察方法について述べる。GFP融合遺伝子の作りかたに関しては、他の文献[1-5]を参照されたい。さらに、蛍光色素として分子特異的な蛍光プローブが多数開発されているが、その一例としてDNAを特異的に染めるHoechst33342を用いた場合の観察手順についても書きたい。このような生細胞観察により、時間的順序や短時間内で過渡的に起こるダイナミックな現象を捉えることが可能となった。

2. 原理

原理はいたって簡単である。GFP融合遺伝子を作製し、細胞に導入し、GFP融合遺伝子を発現する細胞を作製する。もしくは、分子特異的蛍光色素で染色した細胞を作製する。これらの細胞を蛍光顕微鏡で、コマ撮りで連続的に観察する。このような生細胞観察を成功させる秘訣は、1) 生理的状態の良い健康な細胞を用いる、2) 蛍光顕微鏡ハードウェアを工夫する、という2点にある。

1) に関しては、細胞の生理状態を悪くするような前処理や培養は出来るだけさけるべきである。それには、GFP融合遺伝子を発現させる方法、細胞への導入法、顕微鏡観察時の培養法(培養液や温度管理など)などを工夫する必要がある。2) に関しては、3.3 蛍光顕微鏡のセクションで詳しく述べる。忘れてはならない重要なことは、観察結果が正常な細胞機能を反映しているかどうか、検討する必要があるということである。その一つの指標として、観察した細胞が細胞分裂ができるか、減数分裂期の細胞なら孢子形成ができるかを確認する。

3. 準備

3.1. 試薬

GFPに関しては、様々な改変型があり、それぞれで波長特性や温度感受性などが異なっている[3][4]。コドン使用頻度をその生物の特性に合わせたものも多数開発されているので、自分の使用目的に合ったものを選択する。筆者らの経験では、野生型GFPでもS65T-GFP¹でもCLONTECH社のEGFP²でも分裂酵母での生細胞観察が可能であった。明るさとしては、分裂酵母ではS65T-GFPとEGFPは同程度の明るさが得られるが、野生型GFPは少々暗い。そのほか、グリーン以外の色の蛍光を出すGFPの改変型もいろいろあるので([3], [4]及びCLONTECH社のカタログに参照)、光学フィルターをうまく組み合わせれば、二重染色に使える可能性もある。GFP融合タンパク質を分裂酵母細胞で発現させるには分子生物学の手法が使われる。すなわちGFP融合遺伝子をマルチコピープラスミドに持たせたり、1コピーをゲノムに組み込む方法であるが、どちらの方法でも十分明るい蛍光を観察できる。しかし、GFPは分子量27KDaと大きいので、GFP融合により本来のたんぱく質機能や局在が阻害されていないかを特に注意する必要がある。

DNA特異的蛍光試薬、Hoechst33342はCalbiochem社などから購入できる。蒸留水に溶かし、10mg/mlのストック溶液として冷凍庫に保存する。ワーキング溶液はストック溶液を100倍希釈し(100ug/ml)の濃度で冷蔵庫に遮光保存するが、3ヶ月ぐらい使用できる。

蛍光色素で染色体を特異的に視覚化できるものにはDAPI, Hoechst33342およびHoechst33258などがある。そのなかではHoechst33342がもっとも生細胞観察に適している。Hoechst33342は細胞に対する透過性

¹ S65T-GFPは発色団中にある65番のアミノ酸であるSer (S)をThr (T)に変えたGFPである。

² CLONTECH社がコドン使用頻度をヒトに合わせて開発した改変型GFPである。

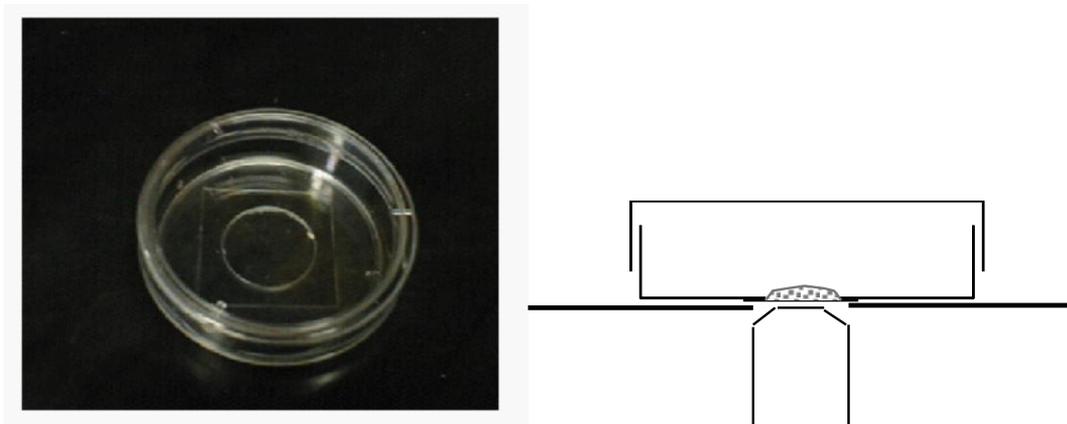
が高い上に、核からあまり排除されない。DAPIもHoechst33258も水の中で一旦染色体を染めることができるが、細胞を培地に戻すと速く核から排除されるため、生細胞観察に適していない。

分裂酵母生細胞観察時に細胞をガラスの表面に張り付けるために、ConcanavalinAが使われる。0.1~0.2%の水溶液を用意し、冷凍庫に保存する。繰り返し凍結融解して差し支えない。

3.2. 器具

基本的には二通りの観察法があつて、器具も二種類使い分ける。30分ぐらいの短時間観察の場合、大きいカバーガラス³ (60mmX24mm)の上に、サンプルを乗せて、そして小さいカバーガラス (18mmX18mm)を上からかぶせる。30分を超える長時間観察の場合、ガラスボトムカルチャーディッシュ (直径35mm) (図1) (MatTek社⁴)を用いる。ディッシュを用いる実験では、培地をたくさん加えられることによって細胞を元気に保つことが可能な上、観察の途中、阻害剤などの試薬を加えたりまた除いたりすることができる。

図1. ガラスボトムディッシュ



3.3. 蛍光顕微鏡

細胞を培養しながら観察するためには、倒立蛍光顕微鏡を用いるのが便利である。正立の蛍光顕微鏡を用いる場合には、4.2で紹介する2枚のカバーガラスもしくはスライドガラスとカバーガラスの間に細胞をはさみ込む方法が使えるが、培地の量が少なく、また酸素置換が悪いため、長時間の観察は難しい。

蛍光観察する際には、蛍光色素を励起するために、光源として水銀ランプの光を対物レンズで集光して試料を照射する。蛍光染色した生細胞に励起光を照射すると、一般的に細胞毒性を生じる。その毒性をいかに最小に抑えるかが、生細胞観察を成功させる秘訣である。そのためには、顕微鏡に工夫が必要である。幾つかの留意点を列挙する。

(1) 光学フィルター

³ 60倍などの高倍の対物油浸レンズの多くは、厚みが0.17mm程度 (松浪硝子No. 1s) のカバーガラスを用いるように設計されている。

⁴ 日本における代理店はメリディアンインスツルメンツファーイースト(株)。最近松浪硝子からも売り出されている。

蛍光顕微鏡観察には、適切な励起フィルター、バリアフィルターを用いることが重要である。GFPの観察にはGFP用のフィルター⁵も市販されているが、FITC用のフィルターでも観察できる。通常、蛍光顕微鏡に標準でついているバリアフィルターはロングパスのものが多く、このフィルターを波長選択幅の狭いバンドパスのフィルターに換えるだけでも、画像はかなり改善する。

GFP単独の染色の場合ならフィルター切換えは必要ではないが、GFPとHoechst 33342などの二重染色の場合は、光学フィルターの切換えが必要である。このためには、幾つかの光学フィルターを回転盤に組み込み、コンピュータ制御下で波長の自動切換えを行う。このようなフィルター切換え装置は、各種市販されており、顕微鏡メーカーに相談するのがよい。

(2) 冷却CCD

励起光の照射による細胞のダメージを防ぐために、できるだけ少ない照射で微弱な蛍光画像を検出した。このためには、ノイズが低く高感度な冷却CCDを受光器として用い、これをコンピュータに接続して用いるのがよい。CCDで得られた顕微鏡画像は、画面上でただちに見ることができ、デジタルデータとしてコンピュータに蓄積される。生細胞で経時変化を記録するなら、グラフィックス性能の高いワークステーションを用いるのが望ましい。

(3) シャッター

撮影時以外の無駄な励起を避けるために、励起光路上(水銀ランプと顕微鏡本体の間)にシャッターを入れ、データ撮影時のみシャッターを開けて励起光を照射する。電磁シャッターを用いると、0.05秒の短い露光をすることができる。電磁シャッターは市販のものが入手できるが⁶、取り付けには顕微鏡に適合する形状のアダプターが必要である。これも顕微鏡メーカーに相談するのがよい。

筆者らの顕微鏡システム⁷は、これらの他に焦点制御や温度制御の機能を備えているが、ここでは分裂酵母の生細胞観察に最低限必要なものを列挙した。顕微鏡システムに関する詳細は文献を参照されたい[6]。

4. 実験法

4.1. Hoechst33342を用いて核染色体の生細胞染色

細胞(GFP融合タンパク質を発現している細胞でもよい)を培養する。液体培養でもプレート培養でもかまわないが、なるべく増殖期の細胞を用意する。

約0.5ml集菌する

滅菌蒸溜水0.5mlで2回洗う

滅菌蒸溜水 0.1 ml に懸濁する

最終濃度1 μ g/mlのHoechst33342を入れて、室温で30minインキュベーションする。

遠心して、Hoechst33342溶液を除いて⁸、培地⁹に懸濁する。

4.2. カバーガラスのサンドイッチによる生細胞観察法

⁵ Chroma Technology社(カタログ番号は41001)。日本における販売代理店は有限会社R. P. S. 電話03-3921-9376

⁶ 米国Vincent Associates社のUniblitz Electro-Programmable Shutter Systems

⁷ 現在Delta VisionとしてApplied Precision社から市販されている。日本における代理店はセキテクノロン株式会社

⁸ Hoechst33342を除かなくても差し支えない。細胞によってHoechst33342に対して透過性の悪い場合、つまり染めにくい場合は観察中も培地にHoechst33342を添加する。

⁹ なるべく無色の人工合成培地を使う。YPDを使うと、Hoechst33342が速く核から排除される。

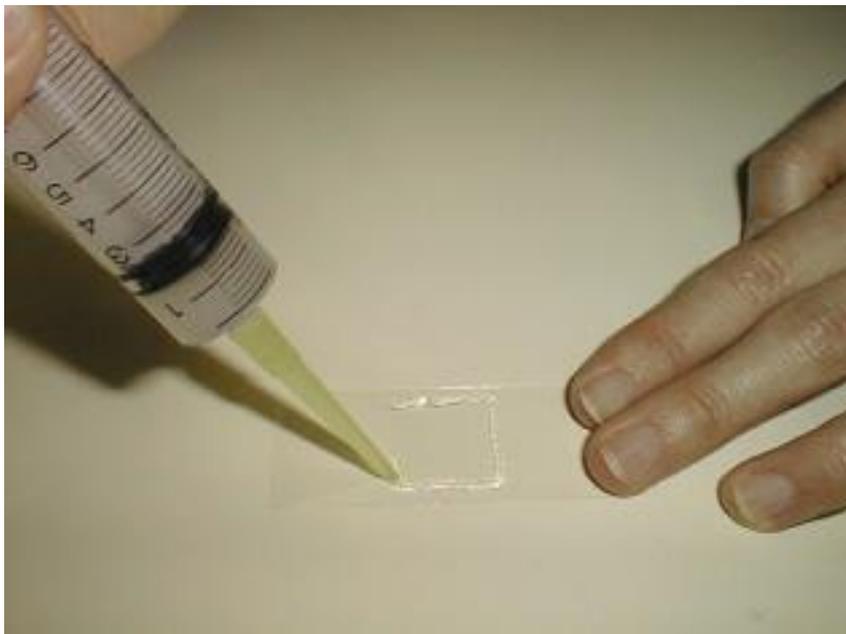
大きいカバーガラス(60mmX24mm)の上に, Hoechst33342で染色した細胞, あるいはGFP融合たんぱく質を発現している細胞2.5ul~3ulを乗せる.

小さいカバーガラス(18mmX18mm)をゆっくり, 気泡が入らないようにかぶせる.

小さいカバーガラスの周辺をシリコングリースで密封する(図2)

油浸レンズ¹⁰を使う場合, 大きいカバーガラスの裏側に無蛍光のイマーシジョンオイルを1滴垂らして観察する.

図2. シリコングリースを用いてカバーガラスをシールする. シリコングリースを注射器に詰めて, イエローチップを注射口にセットするとやりやすい.



4.3. ガラスボトムディッシュによる長時間生細胞観察法

観察の約2時間前¹¹ にガラスボトムディッシュのガラスボトムに50ul 0.2%のConcanavalinAを薄く塗布し, 余った液を除いて暗所で乾燥する.

ConcanavalinAでコートしたガラスボトムに50ul程度の細胞を乗せる. 細胞の濃度が濃いと何層の細胞が重なる状態になり, 観察の邪魔になるので, 細胞をかなり薄目にのせる.

乾燥を防ぐために, ディッシュ内に濡らした脱脂綿などを入れて, パラフィルムで密封する.

顕微鏡に乗せて, 10分くらい静置したあと観察を始める.

5. トラブルシューティング

¹⁰ 分裂酵母の場合, 60倍の油浸レンズを用いることが多い.

¹¹ ConcanavalinAコーティングは使用直前に行う. 時間がたつと効かなくなる. また, 長時間水溶液にいると, ConcanavalinAの粘着力はだんだんなくなる.

よく発生するトラブルその1, 細胞が染まらない.

顕微鏡の問題として, 以下の通りチェックする. 1. 水銀ランプが点灯しているか. 2. 光学フィルターが正しいものが使われているか. 3. 光路のどこかが閉じていないか. 顕微鏡本体の背面部にスライド式のシャッターがあるものでは, シャッターが開いているか確認する. 減光フィルターがあるものは減光フィルターを除く. 4. レンズは正しいか. 5. 水銀ランプの使用時間を確認する. ランプの寿命が過ぎているものは交換する. 6. 水銀ランプの使用時間は短いにもかかわらず励起光量が少ない場合は光軸合わせをする.

サンプル側の問題として, まずGFP融合遺伝子のシクセスと読み枠が正しいか確認する. そして発現法に間違いがないか確認する. タンパクによって量の問題もあるので, 1コピーで見えない時は多コピーを導入して見る. Hoechst33342観察の場合には, なるべく染色直後の細胞を観察する. Hoechst33342染色して, 培地に戻した後, 30分~1時間経った細胞では, 暗くて観察できない. また, 冷蔵庫で保存しているHoechst33342溶液が古くなったことも考えられる.

よく発生するトラブルその2, 褪色が激しい. 固定細胞と異なり, 褪色防止剤を使用できない. そのため, 無駄な励起を避けるのが, 褪色を防ぐ唯一の方法である. 焦点合わせの時などの無駄な蛍光励起を避けるべきである.

よく発生するトラブルその3, 観察している細胞の細胞周期が進行しない. 死細胞はピカピカに明るく染まっていることが多い. フィルターやレンズなどの顕微鏡設定が悪いと, 暗い生細胞が見えずにこのような死んだ細胞しか見えていないことがあるので注意する. それはもともと死んだ細胞か, 観察しているうちに死んでしまった細胞である. 観察しているうちに蛍光が明るくなっていくものは死にかけているものの可能性が高いので注意する.

6. 実験例: GFP-チューブリンとHoechst33342を用いて分裂酵母における減数分裂前期の核運動および微小管動態の観察

6.1. 目的: 分裂酵母の減数分裂前期に"horse-tail"運動と呼ばれる核運動が知られている. その核運動の際に起こる微小管のダイナミズムを調べる.

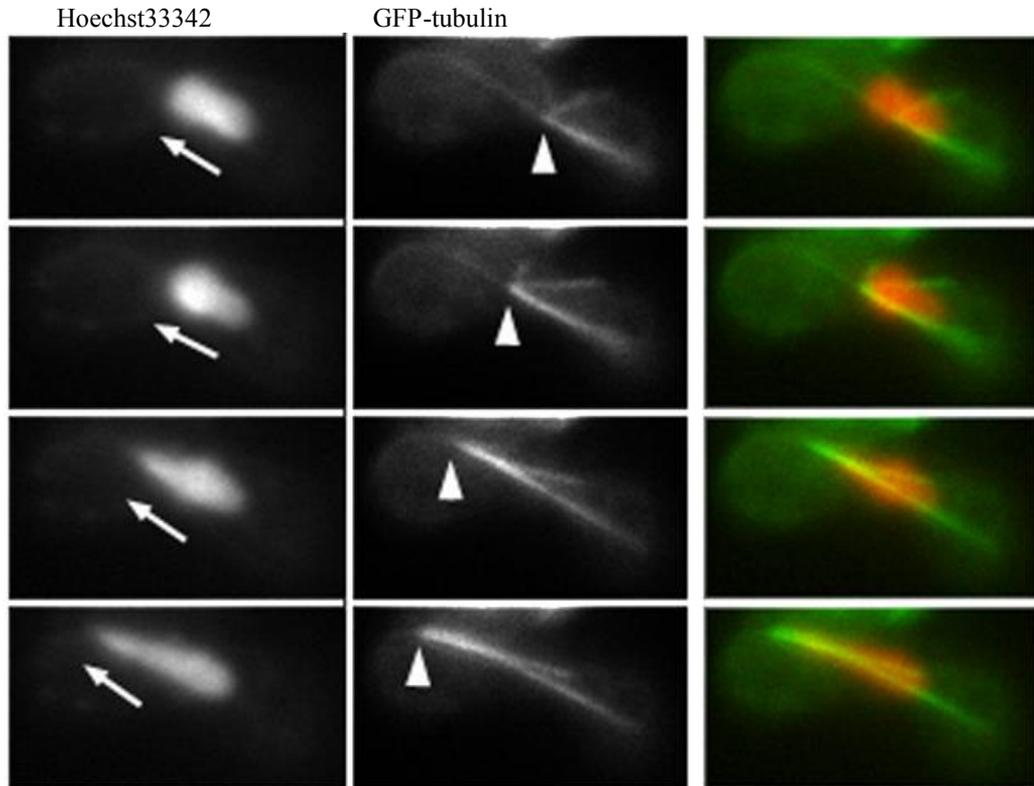
6.2. GFPとチューブリンの融合遺伝子の製作[6]

分裂酵母に $\alpha 1$, $\alpha 2$ と β の3つのチューブリン遺伝子が存在する. そのうち $\alpha 1$ と β が必須遺伝子で, $\alpha 2$ は必須ではない. すでにチューブリン遺伝子のC末端がタンパク機能に非常に重要であることが知られているから, $\alpha 2$ チューブリンのN末端にGFPをつけた融合タンパクを製作した. プロモータとして, チアミンで制御できるnmt1プロモータを用いた. このようにできたプラスミドを細胞に導入し, チアミン存在下, すなわち誘導をかからない条件下観察を行った. チアミンを除き, 誘導をかけると致死となった.

6.3. 染色体と微小管のダイナミクス生細胞観察

減数分裂に誘導された細胞をプレートから少し掻き取って, 4.1にしたがってHoechst33342染色を行って, 染色した細胞を窒素源を除いた人工合成培地EMM2-Nに懸濁し, 4.3にしたがってConcanavalinAでコートしたガラスボトムディッシュに載せて, 観察を始める. 30秒置きにGFP-チューブリンによる微小管像とHoechst33342染色像を0.5秒ずつとる. その結果, 図3で示すようにhorse-tail核の先端から微小管が放射状に細胞質に伸長し, その微小管の重合と脱重合によってhorse-tail核が細胞内で動き回る様子(図3)が観察できた.

図3 分裂酵母Horse-tail期における核と微小管のダイナミクス. 染色体と微小管をHoechst33342とGFP-チューブリンで2重染色し, 10秒ごとに0.5秒ずつ露光した.



7. おわりに

上に紹介した蛍光顕微鏡による分裂酵母核の動態観察は初期には、Hoechst33342による減数分裂前期の染色体の観察が行われた。その時、筆者らが見たものは、細胞の中を細胞全長にわたって動き回る染色体(細胞核)である。その結果は、筆者らの予想を大きく越えたものであり、感動さえ覚えたものである。それに前後して、その"horse-tail"運動の先端部分に、染色体の末端であるテロメアが位置していることが発見され[8]、減数分裂期の染色体構造の特殊構造が一気に注目されるきっかけになった。

このように、細胞内構造体は常に動きと変化を伴っており、蛍光生細胞観察は他の方法では証明出来ない細胞内の分子の動きを明らかにすることが出来る。今や、GFPの発見により、このような分子特異的な生細胞観察が誰にでも可能な範囲になった。蛍光顕微鏡装置に少し工夫を加えることにより、もしくはそのような機能を備えた顕微鏡装置を購入することにより、生細胞によるGFPの動態観察は、誰にでも出来る実験方法となると思われる。これまでの遺伝学、分子生物学、生化学等の手法に加えて、このような分子特異的な動態観察を行えば、新たに動的な観点に立った情報が得られる。

我々の研究室では、分裂酵母のゲノムDNAにランダムにGFPを融合させ、細胞に発現させたGFP fusion libraryを作製した。これらのGFP融合タンパク質の動態の画像libraryをつくることも、原理的には不可能ではない。実現すれば、DNA一次配列と細胞内での挙動の情報が、データベースとして得られることになり、遺伝子とその細胞機能の研究は大きく進展することと思われる。

参考文献

1. 宮脇敦史, 坂口敬人, 御子柴克彦 (1995) GFP creates a new window on the cell. 細胞工学Vol. 14, No. 9, 1063-1068
2. Cubitt AB, Heim R, Adams SR (1995) Understanding, improving and using green fluorescent protein. Trends Biochem. Sci. 20, 448-455

3. Miyawaki A, Liopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M and Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882-887
4. Gerstein RM (1998) レポーター遺伝子GFPの活用. *細胞工学* Vol. 17, No. 2, 286-294
5. 野島博(編)(1997) 顕微鏡の使い方ノート: 光学顕微鏡からCCDカメラまで 羊土社
6. 平岡泰 原口徳子(1998) 生細胞のマルチカラー蛍光画像化 *細胞工学* 17: 956-965
7. Ding DQ, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y (1998) Oscillatory nuclear movement in fission yeast meiotic prophase is driven by astral microtubules, as revealed by continuous observation of chromosomes and microtubules in living cells. *J Cell Sci* 111(6):701-712
8. Chikashige, Y., D. Q. Ding, H. Funabiki, T. Haraguchi, S. Mashiko, M. Yanagida, and Y. Hiraoka (1994) Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast. *Science*. 264: 270-273