解説**REVIEW ARTICLE****マルチカラーイメージング法による細胞機能の可視化**新野 祐介¹, 岡 浩太郎^{1, 2*}¹慶應義塾大学大学院理工学研究科 基礎理工学専攻,²慶應義塾大学 先端生命科学研究所

(平成17年9月1日受理, 平成17年11月14日掲載決定)

Multicolor imaging for visualization of cellular functionsYusuke Niino¹, Kotaro Oka^{1, 2*}¹ School of Fundamental Science and Technology, Keio University,² Institute for Advanced Biosciences, Keio University

(Received September 1, 2005, Accepted November 14, 2005)

要 旨

細胞内シグナル分子の時間的空間的挙動を把握する上で、蛍光イメージングは有用である。最近では、生命をシステムとして理解するため、複数の蛍光分子を細胞に導入し、より多数のシグナル分子を同時に可視化するマルチカラーイメージングの技術発展が進んでいる。本解説では、はじめに同手法を支える蛍光分子・蛍光プローブの充実について言及し、多色の蛍光シグナルの検出に対応した顕微鏡の光学系に関して概説する。各々の光学系において、励起・蛍光波長の選択の自由度や蛍光像取得の同時性などの特徴と問題点を議論する。さらに、多色の導入によって生じた蛍光のかぶりの問題を解決する計算機的手法について解説し、生きた細胞におけるマルチカラーイメージングへの私達の試みを紹介する。

Abstracts

Fluorescent imaging is a useful tool for monitoring spatiotemporal dynamics of intracellular signals and understanding of a lot of biological phenomena. Recently, multicolor imaging technique has been highlighted, using many color variation of fluorescent molecules. This commentary article has a brief summary for development of colorful variants of fluorescent protein and quantum dots sustaining multicolor imaging. We also review optical systems for multicolor imaging, discussing the flexibility of excitation and detection lights and the temporal and spatial consistency of detected images. Though overlapping emission spectra limits the number of fluorescent molecules that can be detected simultaneously, some computational methods have been proposed to overcome this issue. We introduce our preliminary work for live cell multicolor imaging and review the numerical solutions for multicolor imaging.

Key Words: Multicolor imaging, Fluorescent protein, FRET, Spectral imaging, Linear unmixing¹〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1 (3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8522)²〒997-0035 山形県鶴岡市馬場町14-1 (14-1 Baba-cho, Tsuruoka City, Yamagata 223-8522)

Corresponding author : oka@bio.keio.ac.jp (岡浩太郎)

1. 緒言

生命現象を理解する上で、その現象に関わるシグナル分子が、生体内あるいは細胞内で、空間的・時間的にどのような挙動を示すかは重要な情報となる。さらに細胞のシグナル伝達系を明らかにするには、シグナル分子間の関係を知る必要がある。このような要求に対し、現在、蛍光イメージングは一般的なアプローチとなった。また、蛍光のエネルギー移動 (FRET) を利用したプローブは、1対1のシグナル分子間のインタラクションを数多く明らかにしてきた。しかし、複数の蛍光分子を導入し、多くの関連分子のふるまいを同じ空間、同じ時間に一挙に可視化できるようになれば、生物をシステムとして議論する上でより有用な情報が得られるだろう。

固定細胞や切片における蛍光抗体染色であれば2色や3色の蛍光分子で対象とするタンパク質を染色し、その局在を可視化することは広く行われている。しかし、生きた細胞や試料におけるマルチカラーイメージングは容易ではない。しかし最近の蛍光イメージングの技術発展がその可能性を大きく広げている。

一つの要因は、蛍光分子のカラーバリエーションの充実が進んだことである。有機化合物の蛍光分子に加え、新たな蛍光タンパク質の発見、優れた蛍光タンパク質の変異体の開発がつづいている。分子の材質と径とでその蛍光波長をコントロールできるquantum dotも、その実用化が進んでいる。細胞内イオンやセカンドメッセンジャーを可視化する蛍光指示薬や蛍光指示タンパク質も、細胞内シグナルの種類に加え、蛍光の色の面においても充実してきた。

検出する側である光学系の分野でも、マルチカラーイメージングに対応した様々な装置が開発されている。一方、蛍光が多色になることで生じる蛍光のかぶりのように、顕微鏡およびその周辺のハードウェアでは解決できない問題に対して、ソフトウェアによる解決を図る例が報告されるようになった。本稿では、現在利用可能なマルチカラーイメージングのためのリソースとその報告例をまとめ、実際に観察系を組み上げる上での留意点にふれるとともに、私達の取り組みを紹介する。

2. 蛍光分子・蛍光プローブの充実

有機化合物の蛍光分子としてAlexa FluorシリーズやCyシリーズなどに一通りの蛍光波長のラインナップが存在し、マルチカラーの蛍光抗体染色において、従来より広く用いられているが、生細胞や*in vivo*標本の蛍光イメージングでは蛍光タンパク質が重宝する。しかし、対象となるタンパク質と蛍光タンパク質との融合タンパク質を、細胞内に大量に発現させることは、細胞機能を阻害する可能性がある。また、蛍光タンパク質のmaturation (蛍光を発する状態への成熟) の過程では H_2O_2 が発生し¹⁾、やはり大量の発現は細胞へのダメージから好ましくない。加えて、元々、リポフェクション法などの簡易な遺伝子導入法では、導入できるDNAの量におおのずと限界がある。マルチカラーイメージングでは単色の蛍光イメ

Fig.1 Fluorescence color and brightness of fluorescent proteins developed before 2002 (opened circle), in or after 2002 (gray square), and 2004 (black diamond). The brightness is a product of extinction coefficient and fluorescent quantum yield, divided by 1000.

ージングより高いシグナル検出効率 (S/N) が望まれ、かつ細胞に導入できる各色の蛍光分子は少なくなる。そのためより明るい蛍光タンパク質が必要となる。

最近、新しい蛍光タンパク質の発見や蛍光の明るい変異体の開発が相次いでいる²⁻⁹⁾。現在用いることができる蛍光タンパク質をFig. 1に列挙した。横軸に蛍光スペクトルのピークの波長、縦軸にモル吸光係数と蛍光の量子収率の積をとり、従来のものを○で、2002年以降に発見・改良されたものを■で、2004年以降のものを◆で示した。蛍光の明るさの改善とカラーバリエーションの広がりが見てとれる。

これらの蛍光タンパク質には、蛍光の明るさの他、多量体を形成するかどうか、N末端C末端それぞれでのフュージョンタグとしての有用性、maturationの速さ、モル吸光係数および量子収率のpH依存性、褪色のしにくさなど留意すべき点が多く存在する。またRFPに関しては、赤緑蛍光を示すまでのmaturationの過程において、一度緑色蛍光を発する状態を経ることが知られており、残存する緑色蛍光は、マルチカラーイメージングの障害となる。この性質を積極的に利用するのでなければ、緑色蛍光の分子が速やかに赤色蛍光に移行する変異体を利用する必要がある^{3,5,9)}。最近ではCFP・YFP・RFPを用いて3つの分子のインタラクションをFRETにより可視化することが試みられている^{10,11)}。蛍光タンパク質のさらなる改良は、より多くのシグナル分子間現象の同時可視化を可能にすると期待される。

quantum dotはそのカラーバリエーションに関わらず、短波長に励起波長が存在しており、非常に明るく、褪色はほぼないため、マルチカラーイメージングに向いた蛍光分子といえる。市販品で、抗体を標識したもの、ストレプトアビジンを標識したもの、F-actinと特異的に結合

するファロイジンを蛍光標識したものなどが入手できる。生きた細胞での使い勝手はまだよいとはいえないが、ジヒドロリボ酸 (DHPLA) 修飾を行い、Hisタグを付加し蛍光標識したタンパク質に対するFRETのdonorとして用いるなど、様々な利用方法が報告されており¹²⁾、汎用化が望まれる。

一方、多くの細胞内シグナルを同時に可視化するためには、カラーバリエーションもさることながら、対象とする各シグナルに対する適切なプローブが必要となる。本研究室では、既存のmag-fura-2やmag-indo-1などと異なり、カルシウムイオン濃度に影響されずに正確に細胞内マグネシウムイオン濃度を測定できる蛍光指示薬KMGシリーズを、応用化学科 鈴木孝治研究室と共同で開発した¹³⁾。PC12細胞にFura-2とKMGの両方を導入することで、細胞内カルシウムイオン濃度・マグネシウムイオン濃度を一挙に可視化し、それらの細胞内動員系を比較、観察した。

有機化合物を用いた蛍光プローブは、カラーバリエーションを増やすことを考えても、設計や合成が必ずしも容易とはいえないが、その点、蛍光タンパク質を利用した蛍光プローブでは容易である。たとえば、細胞内セカンドメッセンジャーであるIP₃は、PLC- δ のpleckstrin homology domain (PHD) と蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いて、その細胞質と細胞膜との移動を指標に可視化することができる¹⁴⁾。このような場合には、フュージョンタグとして用いる蛍光タンパク質を替えることで、カラーバリエーションをつくることができる。

また、G-CaMP¹⁵⁾ やpericam¹⁶⁾ に代表されるcircularly permuted GFP (cpGFP) を利用した蛍光指示タンパクにおいても、カラーバリエーションが報告されている。Kawaiらはタンパク質のリン酸化を可視化するプローブとしてcpCFPとcpGFPのバリエーションを生細胞に発現させ機能確認をしている¹⁷⁾。蛍光タンパク質のFRETを利用したプローブは現在非常に豊富であり、タンパク質のリン酸化のプローブも既に存在している¹⁸⁾。しかしFRETには1つのプローブにつき2色の蛍光分子が必要となる。検出に必要な蛍光の色の数を減らすことも、マルチカラーイメージングを行う上での一つのアプローチといえる。

以上のような蛍光分子、蛍光指示薬、蛍光指示タンパク質の充実、様々なカラーバリエーションの充実が、今後のマルチカラーイメージングにおいても重要な支えとなるだろう。

3. マルチカラーイメージングのための光学系

次に検出に用いる光学系について概説する。マルチカラーイメージングを実現する方法は、以下の3つに分類できる。1. 単一の励起波長で励起し、複数の蛍光波長で蛍光を検出する、2. 複数の励起波長で励起し、単一の蛍光波長で蛍光を検出する、3. 複数の励起波長で励起し、複数の蛍光波長で蛍光を検出する。それぞれに現在どのような光学系が可能か、その特徴を議論する。

1. 単一の励起波長で励起し、複数の蛍光波長で蛍光を検出する場合、一つの方法は、複数の吸収フィルターを収めたフィルターチェンジャー (フィルターホイール) を検出器の直前に設置し、順次必要な吸収フィルターに切り替えていく方法である。もう一つは、浜松ホトニクスW-Viewに代表される光学系である。ダイクロイックミラーで2つの蛍光を分離し、各々の蛍光像をCCDカメラ上に隣り合わせに結像させる。この場合1つのCCDに2つの蛍光像を映じているため視野は半分となるが、2つのCCDカメラにそれぞれを結像する方法もある (Optical InsightsのDual-Cam)。また、現在3つのダイクロイックミラーを用いて4つの像に分離するシステムがある (Optical InsightsのQuad-View)。フォトマルチプライヤー (PMT) で検出するレーザー走査型の蛍光顕微鏡であれば、複数のPMTを用いて同様の観察系を実現できる。短波長で多色の励起が可能のためquantum dotがこの光学系には適当である。また、RFPの励起スペクトルが短波長側に伸びていることを利用して、GFPとRFPを青色の励起光で同時に励起するなどの利用方法が考えられるが、GFPの蛍光がRFPの検出チャンネルに若干漏れこんでしまい、これが問題となる場合もある。このような蛍光のかぶりの問題については後述する。FRETはこれらの光学系で検出する。

2. 複数の励起波長で励起し、単一の蛍光波長で蛍光を検出する場合、励起フィルターチェンジャーを用いる方法、光源からグレーティングにより半値幅10~20 nm程度に分光した励起光をとりだす高速波長切り替え装置 (浜松ホトニクス) を用いる方法がある。fluoresceinやGFPなど青色励起で緑色蛍光を発する蛍光分子と、fura-2やSapphireに代表されるUV励起で緑色蛍光を発するものの組合せが挙げられる。先述したfura-2とKMGの両方の蛍光観察は、fluoresceinベースであるKMGと (480 nm)、UV励起のレシオメトリックな蛍光指示薬であるFura-2とで (340 nm, 380 nm)、高速波長切り替え装置により励起波長を切り替えることによって両者の観察を実現している¹³⁾。fura-2とGFP-PHDの例も、複数励起、単一蛍光検出の方法である¹⁴⁾。

3. 複数の励起波長で励起し、複数の蛍光波長を検出する場合、蛍光分子の選択はより自由度を増す。しかし従来の光学系では、励起光の波長がダイクロイックミラーの透過域に及ぶと、ダイクロイックミラーを透過した励起光が顕微鏡内を反射し、検出器がそれを検出してしまう (迷光)。このため励起光として選択可能な波長はダイクロイックミラーの反射域に限られていた。Sawanoらはダイクロイックミラーを透過した励起光を逃がす工夫をし、ダイクロイックミラーの透過域の波長で励起を行えることを示した¹⁹⁾。励起・吸収のフィルターチェンジャーを用いて、細胞内各部に局在させたSapphire・CFP・YFP・RFPの観察、fura-2・GFP・RFPの融合タンパク質を用いたカルシウムイオンとPKCシグナルのタイムラプスなどを実現している。最近の各社顕微鏡には標準的にこのような迷光防止処置が行われている。ただし、

Fig.2 (A) Sequentially acquired timelapse images of HeLa cells coexpressing CFP-actin, YFP-tubulin, and untagged RFP. The sampling interval was 15 sec. (B) Excitation and emission wavelengths for (A). Gray vertical bars and boxes are excitation and emission wavelengths, respectively. Scale bar, 5 μ m.

励起光は検出すべき蛍光光よりはるかに強い。励起フィルターと吸収フィルターの透過域の裾はある程度離すことが必要になる。

レーザー走査型の蛍光顕微鏡でも同様に、励起レーザーの波長と吸収フィルターを切り替えながら、順次蛍光を得ていくことができる。私達が試みたタイムラプスの例を示す (Fig. 2)。CFP-actinとYFP-tubulinとRFPを共発現させたHeLa細胞において、アルゴンレーザー (457 nm) と470-500 nmの吸収フィルターの組合せでCFPの蛍光を、同レーザー (514 nm) と530-550 nmの吸収フィルターでYFP、HeNeレーザー (543 nm) と570-610 nm吸収フィルターでRFPの蛍光を順次取得し、leading edgeのタイムラプス観察を行った^{4, 7)}。Fig. 2Bに示したスペクトルと励起・検出の波長により、選択的に励起と検出が行えていることが確認できる。

しかしレーザー走査型の蛍光顕微鏡であれば512×512ピクセルの画像1枚あたり1秒以上の取得時間を免れえない。取得されるCFP・YFP・RFPの3枚の蛍光像において、時間的なズレが生じる。たとえばチューブリンとアクチンの共局在を調べる場合、あるいは細胞の体積情報としてRFPのシグナルを利用してCFPやYFPのシグナルを除算する場合などには、このずれが大きいと蛍光像にズレが生じ、大きなアーティファクトを生む。落射型であれば、より検出時間はセーブできるケースもあるが、やはり全くの同時とはならない。一つの励起波長を用いる場合と比べ、おのずと出すことができる時間分解能が下がることになる。

完全同時の可視化を実現するのであれば、複数の励起光を同時に照射することになる。CFP-tubulinとOFP-actinを共発現させたHeLa細胞において、457 nmと543 nmのレーザーによる同時励起によって、微小管とアクチンの動態を完全同時に可視化した (Fig. 3)^{7, 8)}。この場合、単一の励起光で複数の蛍光波長で検出する場合と同様に、CFPの蛍光がOFPを検出するチャンネルに若干もれこむことに留意する (Fig. 3B)。蛍光のかぶりを受ける側の蛍光分子 (この場合OFP) が十分に明るく検出できない場合、不適当である。また厳密な定量には、後述する蛍光シグナルの分離手法が必要となる。

落射型の蛍光顕微鏡であれば、デュアルバンドパスの励起フィルターと、同様のマルチクロイックミラー (迷光対策が行われていればダイクロイックミラーやガラスリフレクター)、それにW-Viewなどの検出系を組合わせることで実現できる。しかしこの場合、レーザー光源を用いる場合と異なり、蛍光分子の明るさや導入具合に合わせて片方のレーザー強度を上げ下げするといった、励起強度の独立した調節は行うことができない。蛍光の検出器前に設置するW-Viewをちょうど逆にした光学系 (Mイルミネーター) を励起光源の前に設置することで、両励起光の自在な調節が実現できる²⁰⁾。

光学フィルターの切替えによる検出時間のズレ、蛍光のかぶりの二点の注意点に関して言及したが、マルチカラーイメージングを行う上で大きな問題となるのが、空間的なズレである。たとえばW-ViewやQuad-Viewの光学系では、1つのCCDカメラ上にミラーで角度をつけて

Fig.3 (A) Simultaneously acquired timelapse images of HeLa cells coexpressing CFP-tubulin, OFP-actin. The sampling interval was 7 sec. (B) Excitation and emission wavelengths for (A). Broken and solid lines are excitation and emission spectra of CFP and OFP, respectively. Gray vertical bars and boxes are excitation and emission wavelengths, respectively. A black area shows fluorescent leak of CFP to OFP detection channel. Scale bar, 5 μ m.

複数の蛍光像を結んでいるため、両者の像が完全には重ならない。後述するような計算機的手法を用いる際にはこれが精度を下げる原因となる。吸収のフィルターチェンジャーを用いる場合には蛍光像はよく重なるが同時検出はできない。レーザー走査型の蛍光顕微鏡であれば、レーザーが走査する各ピクセルの蛍光シグナルをPMTで順次検出していくため、蛍光像における空間的なズレは基本的に生じない。最近ではNikon C1siがグレーティングにより分光した蛍光を32個のPMTにより同時検出することができる。400-750 nmの間から320 nmに及ぶ波長の蛍光をカバーする。落射型蛍光顕微鏡のシステムにおいて、蛍光像のズレを生じずに、複数の蛍光を同時に取得できる光学系は、浜松ホトニクスASHURAシステムに代表されるカラー3CCDカメラである。複数の励起光を用いる際には、吸収のマルチバンドパスフィルターを通し、励起光を避けて検出する。

以上に挙げた光学系に関するいくつかの留意点をFig. 4にまとめた。励起の光学系に関しては、励起波長の選択自由度と同時性の2点、蛍光の検出に関しては、蛍光波長の選択自由度、同時性、空間的なズレが生じないかどうかの3点から分類した。○は落射型の蛍光顕微鏡、◆はPMTで検出するレーザー走査型の蛍光顕微鏡における光学系を示す。CCDカメラで蛍光像を取得するニポウディスク (spinning disk) の共焦点顕微鏡などは○の光学系に相当する。

4. 数値計算を利用した蛍光シグナルの分離

前節でふれたとおり、一度に用いる蛍光分子の種類が多い、同時励起が必要で別々に蛍光を検出できないなどの理由で、光学系のみでは蛍光シグナルの分離ができない場合がある。この問題に対し、光学的に検出される蛍光シグナルを各色の蛍光シグナルの線形な加算であるとして、線形計算により分離する計算機的手法 (linear

Excitation optical systems

Detection optical systems

Fig.4 Classification map of optical systems for multicolor imaging on several features.

unmixing) が試みられている²¹⁾。

最もシンプルな例としてCFPとGFPの蛍光を分離した例を挙げる。Sahaiらは、重度複合免疫不全 (SCID) マウスの乳房脂肪体にCFPと細胞膜局在のGFPを発現した細胞による腫瘍をつくり、二光子励起レーザー走査顕微鏡を用いてこれらの蛍光像を取得した²²⁾。2色の蛍光であれば、2つの蛍光の検出チャンネルに対し、各々がどれだけ蛍光が漏れこむかの比率を前もって知ることで、蛍光シグナルの分離ができる。465-495 nmのチャンネルに検出

Fig.5 (A) Schematic drawing of principle of linear unmixing of mixed fluorescent signals. (B) Example of fluorescent images for spectral matrix A to separate signals of CFP, GFP, YFP, and RFP.

されるCFPの蛍光と、500-530 nmの検出チャンネルに漏れこむCFPの蛍光の比率を元に (GFPの蛍光は500-530 nmのチャンネルでのみ検出され、465-495 nmのチャンネルに漏れこまない)、500-530 nmのチャンネルの蛍光画像からCFPの分を減算処理することによってGFPのみの蛍光像を得ている。

同様の原理を、任意の n 個の蛍光シグナルを分離する場合に拡張する。ある i 番目の蛍光分子がある検出条件 (励起波長と検出する蛍光波長の組合せ) j において示す蛍光の割合を A_{ij} とする。蛍光シグナルの混ざったサンプルを観察したとき、検出条件 j のときに検出される混ざった蛍光シグナル b_j は、そこに i 番目の分子の蛍光シグナルが x_i 混ざっているとすると、

$$\sum_{i=1}^n A_{ij} x_i = b_j$$

と表される。この式が検出条件の n 本だけ存在するので、Fig. 5Aのように行列式で表現できる。つまり、前もって n 個の蛍光分子に対して n 個の検出条件で蛍光シグナルを取得して n 行 n 列の行列 A を完成させておけば、行列演算によって含まれている各蛍光成分 x を一意に同定できる。この計算手法を用いて、培養細胞における4色の蛍光タンパク質のシグナル分離を試みた。

励起のレーザー波長と吸収フィルターの組合せを、457 nmと470-500 nm、488 nmと500-530 nm、514 nmと530-560 nm、514 nmと580-610 nmの4つの組合せに切り替え、CFP・GFP・YFP・RFPの蛍光シグナルが各検出条件でどのように検出されるか前もって取得しておく (Fig. 5B)⁴⁾。これを元に前述の行列 A を構成し、CFP、GFP-tubulin、YFP-actin、ミトコンドリア局在化シグナルを付

加したRFPの4つを共発現した細胞において、蛍光シグナルの分離を行った (Fig. 6A)。GFPとYFPのシグナルの混ざり、YFPとRFPの混ざり (図中a, b) が顕著だが、シグナル分離の数値計算によって解消されていることがわかる。単一の蛍光タンパク質のみを発現した細胞においても、上記のシグナル分離によってそれ以外の蛍光タンパク質を発現していないという結果が得られた (Fig. 6B)。

以上のような、複数の吸収フィルターの検出チャンネルを用いる方法の他、グレーティングにより分光した蛍光を順次画像として取得する装置を用いる方法がある。Tsuruiらは、マウスの胸腺の凍結切片において、Alexa488, 532, 546, 568, 594, Cy5, Cy5.5の7色の蛍光抗体染色を行い、スペクトル情報を取得して、これらの蛍光を分離している²³⁾。ここでは同定すべき蛍光分子の数よりも多くの情報から、特異値分解により、各蛍光シグナルの成分を算出している。各スペクトルの蛍光像に十分なS/Nが得られれば、蛍光分子の数と同じ数の検出チャンネルを用いる場合より高い精度が得られると思われる。しかし、このスペクトル情報を含んだ蛍光画像を取得するには数分かかる。

一方、Shirakawaらは、蛍光の検出に分光光度計を使い、導入した複数の蛍光指示薬や細胞の自家蛍光の各成分など、7色の蛍光を数値計算により分離、その時間的変化情報を取得できることを示した²⁴⁾。数値解析手法としてPARAFAC (parallel factor analysis) を用いて、スペクトルの先見情報なしでの蛍光シグナルの分離に成功している。時間分解能は2秒程度である。しかしこの場合、CCDカメラで蛍光像を取得せず、各ピクセルあたりの蛍光シグナルではなく、各細胞あたりの蛍光を得ることでシグナルを多く取得しているため、空間情報は失われ

Fig.6 Images of before and after linear unmixing of Fig. 5. (A) Cell coexpressing CFP, GFP-tubulin, YFP-actin, and RFP-mitochondria and (B) Cell expressing YFP. Scale bar, 5 μ m.

ている。生きているサンプルで、蛍光画像をタイムラプスで得るという条件下で、数値計算による蛍光シグナルの分離を用いたマルチカラーイメージングを行うのは、まだ容易とはいえない。最近では、スペクトル情報を含んだ蛍光画像を検出できるシステムに、ソフトウェアにスペクトル分離の機能が付属している場合が多い。しかし、数値計算手法、検出するチャンネルの数、画像取得にかかる時間、蛍光のS/Nなど、これらのバランスを観察対象に合わせて吟味する必要があるだろう。

5. まとめ

はじめにマルチカラーイメージングに用いられる蛍光分子のバリエーションの充実につれ、マルチカラーイメージングのための光学系を、落射型およびレーザー走査型の光学系に関して概説し、その特徴と問題点について議論した。また、私達が試みた、共焦点レーザー走査顕微鏡におけるマルチカラーイメージング例を、計算機的手法を援用した例とともに紹介した。簡便な利用と普及にはさらなる技術発展が求められるが、マルチカラーイメージングは、生きたサンプルにおいてシグナル分子の時間的空間的挙動を網羅的に検出可能なツールであり、生命をシステムとして理解する上でその有用性が期待できる。

謝辞

プラスミドをご提供いただいたVanderbilt大学Dr. David W. Piston, 理化学研究所 宮脇敦史先生に感謝致し

ます。また、研究機器をお貸しいただいた医学部医化学教室 末松誠先生に感謝致します。本稿の一部は、文部科学省科学技術振興調整費「システム生物学者育成プログラム」および21世紀COE「システム生物学による生命現象の理解と制御」の一環として実施されました。

参考文献

- 1) A. Miyawaki, T. Nagai, and H. Mizuno: Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7: 557-562, 2003
- 2) A. B. Cubitt, L. A. Woollenweber, and R. Heim: Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Methods Cell Biol.*, 58: 19-30, 1999
- 3) B. J. Bevis and B. S. Glick: Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed), *Nat. Biotechnol.*, 20: 83-87, 2002
- 4) T. Nagai et al.: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications, *Nat. Biotechnol.*, 20: 87-90, 2002
- 5) R. E. Campbell et al.: A monomeric red fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 7877-7882, 2002
- 6) S. Karasawa et al.: A green-emitting fluorescent protein from *Galaxeidae* coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling, *J. Biol. Chem.*, 278: 34167-34171, 2003
- 7) M. A. Rizzo et al.: An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET, *Nat. Biotechnol.*, 22: 445-449, 2004
- 8) A. Miyawaki, T. Nagai, and H. Mizuno: Mechanisms of protein
- 9) S. Karasawa et al.: Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer, *Biochem. J.*, 381: 307-312, 2004

- 9) N. C. Shaner et al.: Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004
- 10) E. Galperin, V. V. Verkhusha, and A. Sorkin: Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells, *Nat. Methods.*, 1: 209-217, 2004
- 11) L. He et al.: Determination of tumor necrosis factor receptor-associated factor trimerization in living cells by CFP→YFP→mRFP FRET detected by flow cytometry, *Nucleic. Acids. Res.*, 33: e61, 2005
- 12) I. L. Medintz et al.: Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nat. Mater.*, 4: 435-446, 2005
- 13) T. Kubota et al.: Mitochondria are intracellular magnesium stores: investigation by simultaneous fluorescent imagings in PC12 cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1744: 19-28, 2005
- 14) K. Hirose et al.: Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns, *Science*, 284: 1527-1530, 1999
- 15) J. Nakai, M. Ohkura, and K. Imoto: A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.*, 19: 137-141, 2001
- 16) T. Nagai et al.: Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98: 3197-3202, 2001
- 17) Y. Kawai, M. Sato, and Y. Umezawa: Single color fluorescent indicators of protein phosphorylation for multicolor imaging of intracellular signal flow dynamics, *Anal. Chem.*, 76: 6144-6149, 2004
- 18) A. Miyawaki: Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling, *Dev. Cell*, 4: 295-305, 2003
- 19) A. Sawano et al.: Multicolor imaging of Ca^{2+} and protein kinase C signals using novel epifluorescence microscopy, *Biophys. J.*, 82:1076-1085, 2002
- 20) 宮脇敦史: 蛍光イメージング革命 第14回 Mイルミネーターとは?, *細胞工学*, 23: 1409-1413, 2004
- 21) T. Zimmermann, J. Rietdorf, and R. Pepperkok: Spectral imaging and its applications in live cell microscopy, *FEBS Lett.*, 546: 87-92, 2003
- 22) E. Sahai et al.: Simultaneous imaging of GFP, CFP and collagen in tumors *in vivo* using multiphoton microscopy, *BMC Biotechnol.*, 5: 14, 2005
- 23) H. Tsurui et al.: Seven-color fluorescence imaging of tissue samples based on Fourier spectroscopy and singular value decomposition, *J. Histochem. Cytochem.*, 48: 653-662, 2000
- 24) H. Shirakawa and S. Miyazaki: Blind spectral decomposition of single-cell fluorescence by parallel factor analysis, *Biophys. J.*, 86: 1739-1752, 2004

著者紹介

新野 祐介 (Yusuke Niino)

慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻博士課程, 2004年同修士課程(工学)修了。「蛍光タンパク質を用いたマルチカラーイメージングの技術開発」をテーマに研究を進めている。