



正しい知識が捏造を防ぐ

データを正確に解釈するための 6つのポイント

No. 2

蛍光顕微鏡データの誤った解釈

水島 昇・鈴木邦律

はじめに

光学顕微鏡による観察は、電子顕微鏡のような高度な訓練を必要としないこともあり、生命科学領域において頻用されている研究手法のひとつである。近年の光学系やCCDカメラなど検出装置の改良によって、顕微鏡画像を高分解能かつ高感度で得ることが可能になってきた。また、解析アルゴリズムや解析ソフトウェアの使い勝手の改善によって、得られた画像を見た目にも美しく処理することも容易になってきた。さらに、抗体染色法や各種の蛍光プローブの開発により、目的に応じてさまざまな染色法を選択することができるようになった。とくに、蛍光顕微鏡法は標的蛋白質の局在を電子顕微鏡に近い解像度で解析することができるので、多くの研究者に親しまれる方法となっている。したがって、この蛍光顕微鏡法によって得られた画像データの解釈に関する注意点も広く知られるべきであろう。デジタルデータ画像の処理については、本シリーズ第1回「Photoshopによるゲル画像の調整」(2008年12月号掲載)にてくわしく解説されていることがそのままあてはまるので、ここでは、画像が取得されるまでの過程を中心に述べ

る。蛍光顕微鏡画像の取得と解釈については注意点やコツが無数にあるはずだが、今回は、普通の蛍光顕微鏡(共焦点顕微鏡を含む)で普通に観察をした場合にだれもが注意すべき、きわめて日常的なことに話をとどめることにする。

間接蛍光抗体法により得られた画像の評価

ウェスタンブロット法と間接蛍光抗体法による細胞(または、組織)の染色は、どちらも抗体を用いて染色するという点では同じであるが、得られる情報は大きく異なっている。1次元ウェスタンブロット法では、細胞レベルでの空間情報が得られない代わりに分子量の情報が得られる。一方、顕微鏡観察法では、分子量の情報が得られない代わりに空間情報が得られる。抗体染色に成功して思いどおりの蛍光画像を取得できたらずば一安心であるが、いつまでも喜んでばかりもいられない。お茶でも飲んで心を鎮めたあとには、得られた画像が妥当なものであるかどうかを冷静に判断しなければならないのだ(とくに、使用実績の少ない抗体を使用した場合や、実験手法に習熟していない場合)。

一般に“ウェスタンブロット法に適した抗体”といえは、最低でも“予想される分子量付近にバンドが得られる抗体”であろう。ウェスタンブロット法により検出される種々の蛋白質は、最初から1次元の電気泳動で分子量を基準に分離されているので、標的とする蛋白質以外の場所にいくらか強い“ノンスペ*”のシグナルがあったとしても、データの解釈に不都合は生じない。しかしながら、間接蛍光抗体法により得られた画像を解釈する際の判断基準は、ウェスタンブロット法の場合とは異なるので注意が必要である。ウ

Noboru Mizushima¹, Kuninori Suzuki²

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 細胞生理学分野

²基礎生物学研究所 分子細胞生物学研究部門

E-mail : nmizu.phy2@tmd.ac.jp

kuninori@nibb.ac.jp

URL : <http://www.tmd.ac.jp/med/phy2/phy2-J.html>

<http://www.nibb.ac.jp/~enehen/>

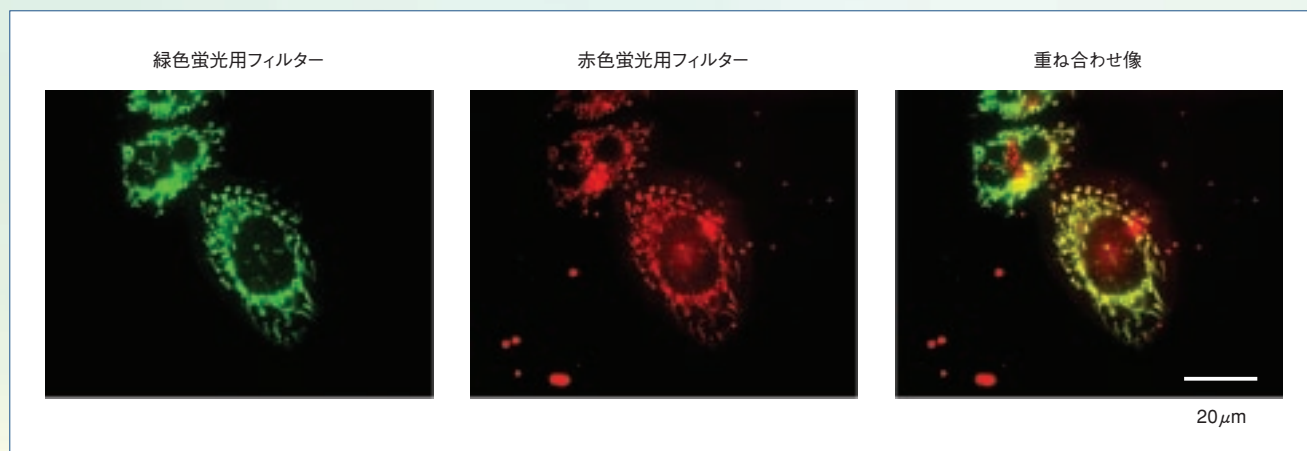


図1 いわゆる“蛍光漏れ”により誤って共局在と解釈されるケース

mit-GFP (ミトコンドリア局在化シグナルを付加した GFP) のみを発現する HeLa 細胞を観察したもの。露光時間は、緑色蛍光用フィルターの場が 5 ミリ秒、赤色蛍光用フィルターの場が 2000 ミリ秒。それぞれ、適度にコントラストを調整してある。また、ここでは、説明するうえでわかりやすいよう単染色の画像に緑色と赤色とをつけているが、これはのちに述べるように、本来は必要ないものである。

ウェスタンブロットにはよい抗体が細胞染色にはまったく使えないこともよくあり、その逆もある。“使えない”だけならまだしも、まったく関係のない抗原を染めてしまうことすらある。ウェスタンブロットによって強い“ノンスペ”のバンドがみられる場合は、とくにその可能性が高い。したがって、抗体などプローブの特異性を顕微鏡データのみから判断することは非常に困難である。自作の抗体によって染色される構造が目的の蛋白質の局在を示していると結論するには、多くの対照実験が必要である。厳密なことをいえば、ノックアウトやノックダウンなどによって消えるシグナルが、本来、調べるべき対象である。いくらウェスタンブロットでシングルバンドであっても油断できない。このことは、つねに気にとめておく必要がある。

蛍光の漏れに注意

さて、使用した抗体や蛍光プローブが確かに目的の構造を染色していることが確認されたとする。つぎに頻繁にトラブルが発生する可能性のある実験は、多重蛍光標識法(2種類の異なるプローブを用いて同時にそれらの関係を解析する方法)による共局在の検出であろう。ギリギリの勝負をするような高度な実験は意外に単染色のデータが多く、反対に、この多重標識は比較的初心者の行なう実験などでよくお目にかかる。

くお目にかかる。

まずは、ひとつの例を提示したい。図1では、緑色の蛍光像と赤色の蛍光像とが非常によく一致している。しかし、この細胞はミトコンドリア局在化シグナルを付加した GFP (mit-GFP) のみを発現させたものである。赤色で見える蛍光は、赤色蛍光用フィルターの検出域に漏れ込んできた微弱な GFP の蛍光を、強引に増幅して表示したものである。

蛍光物質から発せられる蛍光の波長はある程度の広がりをもつので、その蛍光物質用のフィルター以外の蛍光用フィルターを使った場合でも、蛍光が検出されてしまう場合がある。たとえば、強い緑色と弱い赤色の二重染色像を観察する場合、GFP などによる緑色蛍光には緑色蛍光用のフィルターを、赤色蛍光には赤色蛍光用のフィルターを用いる。緑色蛍光用フィルターによる観察でも赤色蛍光の漏れ込みは生じるが、もともと弱い赤色蛍光が少々漏れ込んだところで緑色蛍光の像にはほとんど影響しない。しかし、赤色蛍光用フィルターを用いた観察にあたって弱い赤色蛍光を検出するため露光時間を延ばすなどして感度を上げると、強い緑色蛍光の漏れ込みを検出し、あたかも赤色蛍光であるかのようにとらえてしまう可能性がある。図1では、緑色蛍光用フィルターでの露光時間は5 ミリ秒であるのに対して、赤色蛍光用フィルターでの露光時間は2000 ミリ秒

* ノンスペ: このよび方は、多くの場合、不適切に使用されている。“ノンスペ”とよばれているもののほとんどは、“自分の期待するものとは異なる、別の抗原に対する特異的反応”をさす。

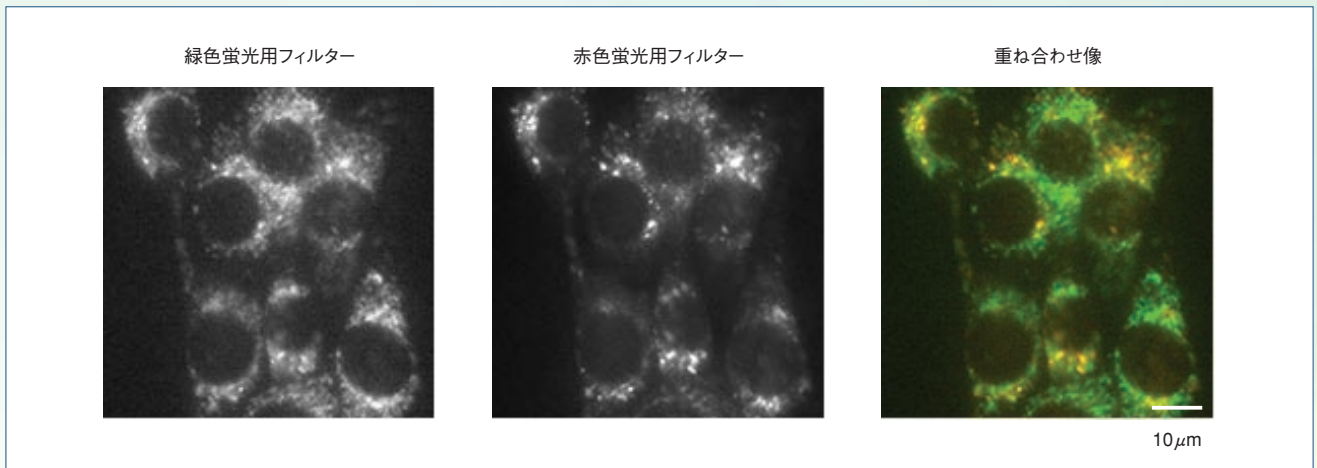


図2 NIH-3T3細胞の自家蛍光

固定したNIH-3T3細胞を、何も染色せずに緑色蛍光用フィルターと赤色蛍光用フィルターで画像取得したもの。検出された蛍光はすべて、細胞のもっている自家蛍光である。

である。このような極端な画像取得は通常は行なわないと思うかもしれないが、後述する“自動露光”“自動コントラスト”を行なう設定にしておくと、このような極端な処理が知らないうちに行なわれてしまうことがある。ふだん、顕微鏡をあまり使い慣れていない人が共通機器室の顕微鏡で画像を取得して“ばっちり共局在していました！”と言ったら、顕微鏡の設定を確認してみる必要があるかもしれない。

これを防ぐには、観察する2種類の蛍光が同じ程度の強度になるよう染色を工夫することと、なによりも、単染色のみの対照試料を用意することがもっとも重要である。また、離れた波長をもつ蛍光色素の組合せ(FITCとCy5の組合せのように、漏れ込みがまず起らないもの)を用いることや、使用する蛍光フィルターを再検討することも有効である。2種類の抗体を使用した場合には、それぞれの抗体について染色パターン(局在と蛍光強度)に微妙な違いが生じるのがつねであり、共染色像のパターンが画像の細かな部分まで一致することはごくまれである。そう考えると、図1の中央の細胞のように、重ね合わせた際に完全な共局在が示されるような像に関しては疑いの眼差しをむけるべきであろう。強拡大により細かな局在をよくよく観察することによって、これが蛍光の漏れであるかどうかをある程度まで推定することもできる。

自家蛍光にも注意

図2は、また別の例である。ここでは完全ではないもの

の、緑色のシグナルと赤色のシグナルの大部分が共局在しているように見える。しかし、実はこれらは、なんの染色もしていないただのNIH-3T3細胞を緑色蛍光用のフィルターと赤色蛍光用のフィルターとで画像取得したもの、つまり、陰性対照である。あえてコントラストを強くしてシグナルを浮き出させるとこのようになる(後述の、「自動コントラスト設定に注意しよう」の項を参照)。皮肉にも、染色を完全に失敗するとこのような見事な結果がでることにもなる。これらの写真では、細胞のもっているなんらかの自家蛍光物質(リボフスチンなど)が検出されているものと考えられる。自家蛍光物質は通常、広範囲の波長の蛍光を発する(つまり、異なるフィルターでもほぼ同じ像が検出される)ので、判別は可能である。

では、図3に示す例はどうであろうか？ 2つの細胞に多くのドット様の構造体が観察されるが、左側の細胞では共局在率が低く、右側の細胞では共局在率が高いように見える。これはどのように解釈すべきであろうか？ 2種類のドット様構造体が共局在する細胞としない細胞があるというように判断するかもしれない。実は、これはあるGFP融合蛋白質のみを一過性発現させた(単色対照の)細胞を、GFP用フィルターとCy5用フィルターとでそれぞれ画像取得したものである。左側の細胞ではトランスフェクションに成功しているためGFPに特異的なシグナルが検出されており、右側の細胞ではトランスフェクションに失敗している。右側の細胞で見えているものは自家蛍光である。もちろん、左側の細胞にも自家蛍光はあるのだが、発現させたGFP融

合蛋白質の蛍光が自家蛍光に比べ十分に強いので、一見、わかりにくくなっているだけである。多重蛍光標識の際には、誤った解釈を防止するためにも、このような単色対照は必須である。

凝集していないか？

これまで述べた例は顕微鏡の検出系に関連したものであったが、つぎに、観察試料を作製する際に注意すべきことを議論しよう。GFPの発見とその生物学への応用に対し2008年ノーベル化学賞が授与されたことに象徴されるように、ある蛋白質の細胞内局在を知りたい場合、GFPとの融合蛋白質を作製して蛍光顕微鏡により観察することは、現在では日常的に行なわれている作業である。融合蛋白質を発現するプラスミドをつくって細胞にトランスフェクションすれば簡単に局在を観察できる、はずである。しかしながら、しばしば、細胞内に“ボテッ”あるいは“グチャッ”と凝集しているGFP融合蛋白質の写真を見ることがある。特定の蛋白質を高発現させると細胞内で凝集してしまうことがしばしばあるのである。GFP融合蛋白質などのように非生理的な蛋白質であればなおさらである。また、分泌蛋白質を高発現させると小胞体にとどまってしまうなど、GFPを融合させた蛋白質が本来とは違う局在を示すこともある。これらの意図せぬ局在は、GFP融合蛋白質を高発現させたときの細胞内局在を反映していることはまちがいないわけだが、もちろん、本来、解析したい目的とは異なっている。GFP融合蛋白質の発現量が相対的に低い細胞では本来の局

在パターンを反映していることがよくあるので、蛍光の明るい細胞だけにとらわれず、蛍光の暗い細胞での局在様式も観察して比較検討してみるのがよい。また、間接蛍光抗体法を併用して、両者の局在パターンが一致するようなら、より信頼性が向上するだろう。

GFP融合蛋白質を高発現させることによる凝集体の形成は顕微鏡観察をするうえでもっとも注意すべき問題のひとつであることを述べた。さらに、2つのマーカー蛋白質が共凝集することによって生物学的に誤った解釈が生じる可能性をあげたい。図4は、オートファゴソームマーカーであるGFP-LC3融合蛋白質と、凝集体を形成することで知られているポリグルタミン蛋白質との共局在を観察した実験である。両者は見事に重なっており、一見、ポリグルタミン蛋白質の凝集体がオートファゴソームに取り囲まれたもののように見える。しかし、事実是这样ではない。なぜなら、この細胞はオートファゴソームをつくることのできないAtg5ノックアウトマウスに由来する線維芽細胞だからである¹⁾。両者は単に“共凝集”していたにすぎないのである。このような例は、ポリグルタミン蛋白質のような有名な易凝集性蛋白質にかぎらず、さまざまなコンストラクトで観察される。実は、GFP-LC3融合蛋白質は単独でも凝集体を形成しうる。そのような凝集体がほかの蛋白質を巻き込んで共凝集体を形成することもしばしばあり、それがあたかも生理的な共局在のように見えてしまう場合がある。困ったことに、このような場合は“共免疫沈降”されてしまうことさえあるので、注意しないと研究がどんどん誤った方向へと進んでしまう。



図3 真のシグナルにひそむ自家蛍光

GFPとULK2というオートファジー関連蛋白質との融合蛋白質を一過性に発現させた胎仔線維芽細胞を、GFP用フィルターとCy5用フィルターとで画像取得したもの。左側の細胞はトランスフェクションに成功しているため比較的明るい特異的なシグナルと暗めの自家蛍光シグナルが観察されているが、右側の細胞では自家蛍光シグナルのみが観察されている。

少し上級編：動きを忘れてはいないか？

間接蛍光抗体法では、細胞を薬剤で処理することにより細胞内で進行中の生理的なプロセスをそのままの状態で保存する、いわゆる、固定処理がほどこされるのが普通である。そうした“死んだ細胞”に対し、GFP 融合蛋白質を使用する利点は、細胞を生きたまま観察する、いわゆる“生細胞観察”が行なえる点にある。細胞固定や染色によるアーティファクトが入りにくいので安心なようにも思えるが、生

細胞観察ならではの注意点もある。このとき、細胞が“生きて動いている”ことを忘れてはならない。たとえば、GFP の蛍光像を取得してからつぎにRFP の蛍光像を取得しようとする場合、蛍光フィルターを交換してから画像を取得するので、得られた画像には数秒間のタイムラグが生じる。そのあいだに対象が動いてしまい、本来は完全に共局在しているものが微妙にずれていたり局在していなかったりするように見えることがある。

このような対象の動きの問題は、GFP 融合蛋白質だけを



図4 2つのマーカー蛋白質の共凝集により誤って共局在と解釈されるケース

Atg5 ノックアウトマウス由来の胎仔線維芽細胞に、GFP-LC3 融合蛋白質（オートファゴソームマーカー）とHA 付加ポリグルタミン蛋白質を共トランスフェクションした。固定後、ポリグルタミンを抗 HA 抗体と Cy5 標識 2 次抗体で染色し、GFP 用フィルターと Cy5 用フィルターとで画像取得した。オートファゴソームとポリグルタミン凝集体が共局在しているかのように見えるが、オートファジーに必須の蛋白質である Atg5 をノックアウトした細胞なのでオートファゴソームは形成されない。ここで見えているのは、GFP-LC3 融合蛋白質が単にポリグルタミン凝集体に巻き込まれてしまっているようすである。

[文献 1 より転載]

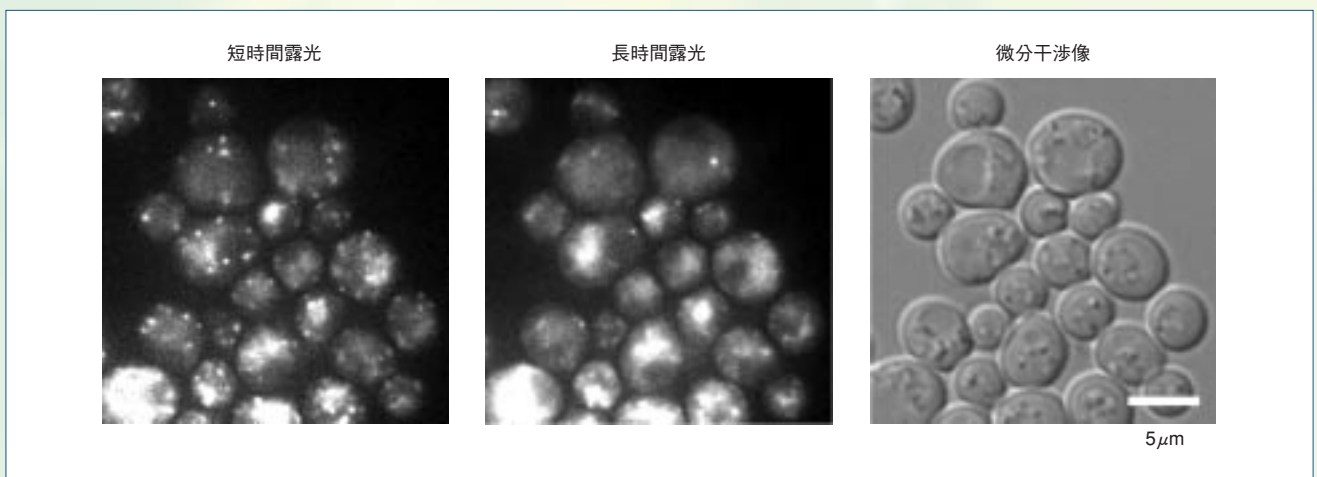


図5 長時間の露光により失われる情報

出芽酵母のオートファジー関連蛋白質に GFP を融合し、GFP 用フィルターを用いて生細胞観察したもの。短時間露光（400 ミリ秒）と長時間露光（5000 ミリ秒）の画像を比較している。短時間露光では細胞内をめまぐるしく移動している多数の輝点がとらえられている。長時間露光ではこのようなすばやい動きがとらえられず、逆に、輝点の数が減少しているように見える。

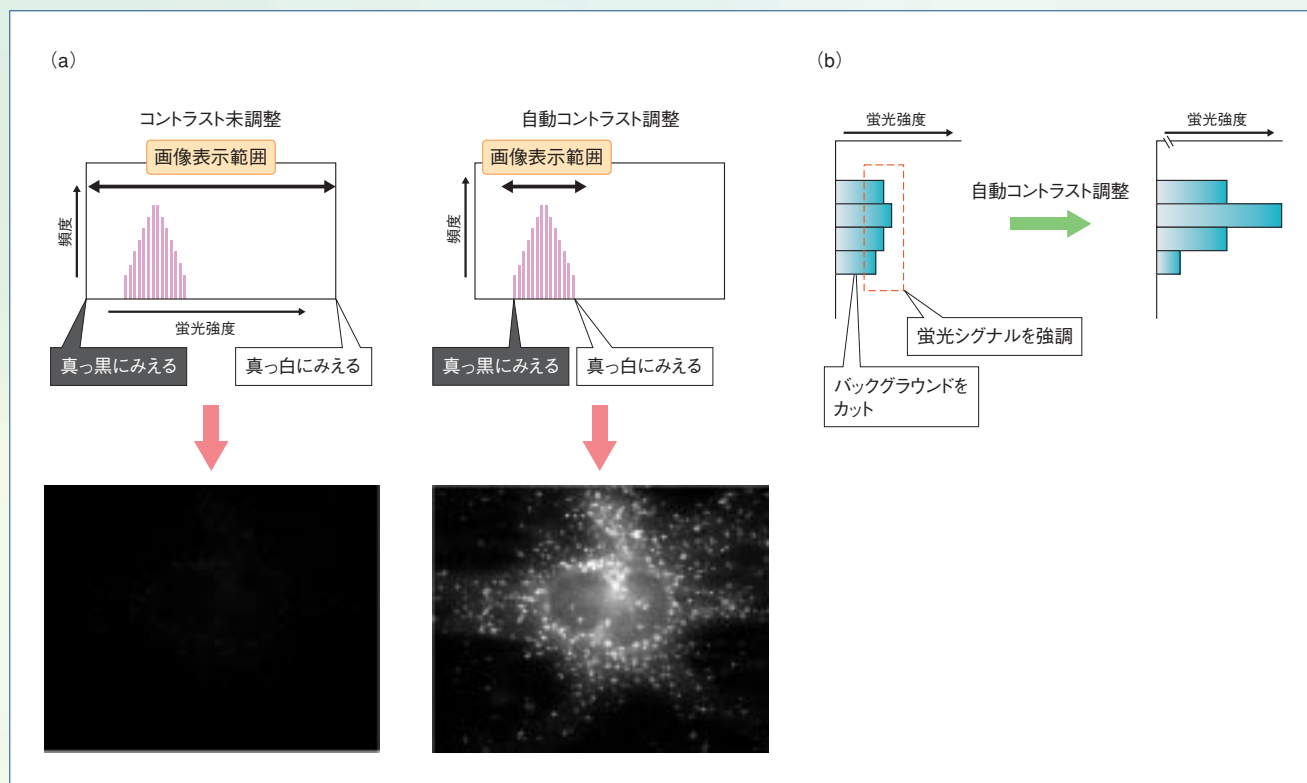


図6 “自動コントラスト調整”機能

(a) 自動コントラスト調整で行なわれていること。横軸に蛍光強度（実際にカメラがデータを取得できる範囲）、縦軸にそれぞれの面積（ピクセル数）をとったヒストグラムと、得られる画像を示した。一般的には、CCDカメラから得られた生データはダイナミックレンジが広いので、そのまま表示しようとすると、よほど蛍光が強くないかぎり相当にコントラストが低くなる（左）。自動コントラスト調整機能によって画像表示範囲が適度に調整されると、バックグラウンドは真っ暗でシグナルが飽和しない程度に明るく観察される（右）。

(b) 自動コントラスト調整を棒グラフで考えたときのイメージ。自動コントラスト調整により得られた画像は、棒グラフの一部分（オレンジ色の点線で囲った部分）を切り取って引き延ばして表示したものに似ている。コントラスト調整した画像を8ビットのTIFF画像などに変換することがあるが、この処理は、棒グラフでいうと上下を切って表示することと同義であり、蛍光強度の情報が保存されていないことに留意してほしい。

使った単染色による観察の際にも生じうる。図5に示しているのは、対象となる構造体が短い露光時間ではよく見え、長い露光時間では見えなくなるという、逆説的なことが起こっている例である。これは、対象となっている小さな構造体が細胞内で速く動き回っているために起こっている。露光時間が短ければそれらの動きを止めて画像取得することになるが、じっくり見ようとして露光時間を長くすると露光しているあいだにも対象が動いてしまい画像がぼやけてしまう。この現象は、暗い部屋のなかでカメラ撮影をする場合、露光時間が増えることにより、ちょっとした体の動きでぼけた写真になってしまうのに似ている。このように、生細胞観察では観察時間（露光時間）によっても見え方がかわってしまう場合がある。

自動コントラスト設定に注意しよう

さて、話をまた一般的なレベルに戻したいと思う。顕微鏡写真は、コントラストを調整しないかぎりはまともな写真にならない場合がほとんどである。そのため、前述のように、画像取得ソフトウェアの“自動コントラスト調整”がつねにオンになっている場合も多いと考えられる。それ自体はいけなことではないが、この自動コントラスト調整がどのようなことを行なっているかを理解しておかないと、誤った解釈につながりうる。

よくある“自動コントラスト調整”機能は、見やすくするために画像のバックグラウンドを取り除き、蛍光シグナルをひき延ばして明るく表示する、という行為を自動的行なうものである（図6a）。こうすることでメリハリのあふ見やすい像となる。これを棒グラフで考えたときのイメージ

を、図6(b)に示した。

定性的に蛍光シグナルの局在パターンを解析するのであればあまり問題にならないかもしれないが、このような画像を用いて“明るさ”を比較する場合には注意が必要となる。たとえばウェスタンブロット法では、別々のメンブレンのあいだでバンドの濃さを比較することはあまりないが(というより、やるべきではないだろう)、顕微鏡観察では別々のプレパラートのあいだで蛍光強度を比較せざるをえない。その場合、自動コントラスト処理した画像を比較してはまったく意味がなく、自動コントラスト機能を使用しないで撮影をする必要がある。このことによって、画像間の明るさを直接に見た目で比較することができる。こうして得られた画像があまりに暗い場合は、手でコントラストを調整する。通常の画像処理ソフトウェアは、バックグラウンドを取り除く程度と蛍光シグナルを明るくする程度を数値で入力できる(もしくは、表示される)ようになっているので、比較する画像のコントラストの程度をまったく同じように調整できる。こうして得られた画像を用いれば、“見た目の明るさ”を比較することが可能である。

ただし、バックグラウンドのシグナルが差し引かれているかぎり、こうして表示された顕微鏡画像データでは“見た目の明るさ”は“実際の蛍光強度”と比例しないと思ったほうがよい。2倍の蛍光強度のものが2倍の明るさに見えることはほとんどないのである。もし、定量的な解析を行なうのであれば、本シリーズ第1回「Photoshopによるゲル画像の調整」で解説したウェスタンブロットの場合と同様に、実際の蛍光強度を測定するべきである。さらに、比較の前提条件として、露光時間など画像取得の条件はすべて同じにする必要があることはいうまでもない。また、観察時間もそろえるべきで、たとえば、肝心の試料は一所懸命に観察する一方で対照試料はサッと済ませてしまうと、蛍光の退色の程度に差がでてしまう。

その他の注意

細胞内に広く分布する構造体との共染色

小胞体、ミトコンドリア、リソソームなど、細胞内に広く(または、多数)分布する構造体とは、高い確率で偶然に共染色されやすい。とくに、解像度の低い不明瞭な画像では共染色が容易に観察される。このような共染色は必ずしも共局在を表わさない。ほんとうに共局在しているかどうかを解釈するには、十分な解像度の画像において細かい形態

まで一致していることを確認する必要がある。

できるだけグレースケールで提示しよう!

白黒画像がもっともコントラストにすぐれ、かつ、プリントアウトによるトラブルが少ない。せっかくの投稿論文がレフェリーにまわっても、そのレフェリーが高性能のプリンターをもっているかどうかは保証されない。レフェリーがコンピューターのディスプレイでじっくりとみってくれることはないと思うべきである。たとえば、図1のように、白黒カメラで取得したGFP単色の画像を緑色で示すことに意味はなく、グレースケールで十分である。それどころか、とくに緑色は印刷時のトラブルが多いので、非常に不鮮明な画像になってしまうことがある。これは、顕微鏡で取得された画像がRGB形式であるのに対し、基本的な印刷はCMYK方式であるためである。二重染色の場合であっても、単色の画像はグレースケールで示し、重ね合わせ像にのみ赤色と緑色とを用いるようにするとよい(図2～図4で示した例を参照されたい)。最近では、色覚バリアフリーの観点から、重ね合わせの画像にはマゼンタ色(赤色と青色の混合色)と緑色とが使用される例も増えてきた。

おわりに

本稿では、取得された蛍光顕微鏡画像の妥当性をどう評価するかという問題に対し、さまざまな実例を引き合いにして解説を行なった。とかく人間というものは、“見えた”ということで安心してしまいう傾向があり、見えたものに対する検証をおろそかにしがちである。蛍光顕微鏡観察の経験を積むことによりそうした評価が直感的にできるようになってくるが、そうした人たちにとっても、微妙な判断を要求されるときはやはりきちんとした対照実験をするべきであろう。ましてや、蛍光顕微鏡観察に慣れないうちはなおさら慎重を期すべきである。これまでふれたように、染色された蛍光パターンが染色していない試料では見えないこと、そして、染色していない色では見えないことをまず検証することが重要である。また、GFP融合蛋白質を観察する際には、その発現量に十分に注意すべきである。融合蛋白質が過剰発現されると、予期せぬ局在を示したり凝集体を形成したりすることが往々にしてある。免疫染色に使用可能な抗体があれば、間接蛍光抗体法によるパターンとGFP融合蛋白質の蛍光パターンとを比較検討することにより、得られた画像が妥当なものかどうかを検証することができる。また、GFP融合蛋白質を発現した細胞を観察する

際には、融合蛋白質の発現量が多い細胞と少ない細胞（蛍光強度で判断できるだろう）をまんべんなく観察し、どの蛍光パターンが妥当なものであるかを総合的に判断する必要がある。

人間にとって“見える”ということはきわめてインパクトのある表現手段であり、顕微鏡が発明されて以来、光学顕微鏡を用いた形態的な観察は生物学の研究にとって欠くことのできない解析手段となってきた。生物試料は光学的に透明であることから、細胞を可視化するために種々の染色法が開発され、現在でも、ヘマトキシリン-エオジン染色法などは組織学的な研究には欠くことができない。これらの染色法は生物試料の形態を解析するために有効であるが、細胞内の特定の蛋白質の局在を可視化したいという欲求から、蛍光を用いた標識法が開発されてきた。これらの方法は、標的とする蛋白質しか見えない（細胞や組織の形態を把握するのがむずかしい）という欠点があるが、特定の蛋白質を可視化できるという利点はその欠点をおぎなっておりある。蛍光顕微鏡観察は、今後とも生物学の研究にとってきわめて有効な解析手段となっていくだろう。

本稿では、蛍光顕微鏡観察において初歩的と思われる注

意点をあげた。これらの注意点をあたりまえだと感じる読者も多いと思われるが、そのような方も、ぜひ、今後の新人教育の際にご利用いただけたらと思う。

本稿を執筆するにあたり、たいへん貴重な画像データ（ふつうは、このような失敗データは保存しておかないので）を提供いただきました石原直忠博士、原 太一博士、板倉英祐氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Kuma, A., Matsui, M., Mizushima, N.: *Autophagy*, 3, 323-328 (2007)

水島 昇

略歴：1996年 東京医科歯科大学大学院医学研究科 修了，2002年 基礎生物学研究所 助手，2004年 東京都臨床医学総合研究所 室長を経て，2006年より東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授。

鈴木邦律

略歴：1994年～1999年 浜松ホトニクス。2002年 総合研究大学院大学生命科学研究科 修了，日本学術振興会 特別研究員を経て，2004年より基礎生物学研究所 助手（現 助教）。