

Q&A

第2回

質問・コメントとそれに対する回答

蛍光顕微鏡データの誤った解釈 (2009年2月号掲載)

鈴木邦律 (基礎生物学研究所)・水島 昇 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)



蛍光フィルターを換えても同じようなシグナルが見られるようであれば自家蛍光を疑うとのことですが、どのような組織や細胞、あるいは、細胞内構造体が自家蛍光を発しやすいのか、多くの例を教えてください。また、実際の自家蛍光の輝度はどの程度なのでしょう。たとえば、用いるレンズにより異なると思いますが、CCDカメラでなく肉眼で目視したときにもわかるくらいははっきりと光っているのでしょうか？ また、それはフィルターセットによらず同じくらいの輝度なのでしょうか？



本文中でもふれましたが、数カ月齢以降のマウスなどの神経細胞や心筋細胞に蓄積するリポフスチンは目で見えるほど強い自家蛍光を発します。一般的な傾向としては、組織の自家蛍光は強く、培養細胞の自家蛍光は目で見えない程度に弱い場合が多いです。また、生物種によっても自家蛍光の強度やパターンは変わってきます。出

芽酵母の場合は、リソソームに相当する液胞とよばれるオルガネラの自家蛍光が比較的強く、培地によっては目で見えるほどになります。また、培養の状態によってはミトコンドリアの自家蛍光が見えることもあります。自家蛍光にももちろん波長特性があるので、観察するフィルターセットによって輝度は変動します。たまたま同じ程度の輝度になることもあるでしょうが、同じになると考える理由はありません。

Q 一過的発現系を用いて蛍光蛋白質との融合蛋白質により細胞内局在を観察していたところ、構造上あまり変化を生じないと思われるアミノ酸置換をくわえた際に、発現量を問わず輝点が観察されるようになりました。この輝点が凝集体形成によるものなのかどうかを判断する方法はありますか。

Q 共凝集や単独の凝集により正しくないシグナルが観察されてしまうとのことですが、それらが真の局在でないとは、どのようにしたら結論づけられるのでしょうか？たとえば、生化学的な分画やウェスタンブロットなどにより、毎回、確認すべきなのでしょうか？

A 観察された輝点が凝集体かどうかを判断するにはいくつかの指標があります。まず、間接蛍光抗体法により一般的な凝集体のマーカー蛋白質（ユビキチンなど）と共染色されるかどうかを形態的に確認する方法があります。免疫電子顕微鏡法が可能であれば、染色された構造体の微細形態を観察することも直接的な方法です。また、低速遠心で沈殿を形成するようになるなど、生化学的に凝集体を形成していることを確認するのもいいでしょう。ただし、蛋白質によっては凝集体に局在すること自体が真の機能である場合もあるので、顕微鏡観察の結果だけにたよるのではなく、多方面からの解析を総合して判断することになります。

Q ウェスタンブロットでは目的の蛋白質以外にもバンドが生じるが、立体構造などの影響により免疫染色は可能、という抗体も原理的にはありうると思います。そのような抗体で免疫染色を行なうことについて、どのように考えたらいいのでしょうか？

A ウェスタンブロットには不向きでも細胞染色には有用な抗体というのは、原理的にはありえますし、実際に存在します。そのほか、ウェスタンブロットには不向きだけれども、免疫沈降には有効な抗体も存在します。販売されている抗体のカタログをみると使用可能な用途が記載されていることから、解析に応じて使用する最適な抗体を選ぶ重要性がうかがえます。どのような解析を行なうにせよ、対照実験さえしっかりしていれば誤りをさけることができます。

Q 蛍光免疫染色したサンプルの蛍光強度を比較してサンプル間の抗原の量比を推定しようとする場合、サンプル間の染色条件の微妙な違いによる染色度合いの差が気になります。こうした場合に有効な対照のとり方がありましたら教えてください。

A まず、細胞内局在を議論する必要がないのなら、ウェスタンブロットなどで抗原の量を比較するほうが簡便だと思います。あえて蛍光強度を用いて抗原量を比較する必要がある場合とは、ウェスタンブロットには使えないけれども免疫染色には使える抗体をもっている場合か、あるいは、抗原の細胞内局在が変化していると考えられる場合だと思います。そうした場合には、内部対照をとるのが一般的です。サンプル間の抗原量を比較するとのことですので、各サンプル間で抗原の発現量を意図的に変えているか、なんらかの遺伝子変異の影響により抗原の発現量が異なることが予測されているのでしょうか。そうすると、目的とする抗原と機能的に不関連な抗原を標的に、異なる色素を用いて蛍光抗体染色するのがいいと思われます。この蛍光強度を基準として輝度値を比較することにより、抗原の発現量や抗原の分布パターンを検討することができます。内部対照が使えない状態で輝度値を比較することは、サンプル間での染色状態や退色度合いの違いを排除できない危険性ははらんでいます。もちろん、染色状態がばらつかないような実験プロトコルを確立することによりある程度は回避はできますが、信頼性の高いデータにすることは困難です。



“自動コントラスト設定に注意しよう”のところに、定量的な解析を行なう場合、バックグラウンドシグナルを差し引くまえの蛍光強度を比較すべきである、と解釈できる記述がみられますが、特異的なシグナルはバックグラウンドシグナルのうえにのっているので、バックグラウンドシグナルを差し引かないと、サンプル間の蛍光強度の比が実際の特異的シグナル比よりも縮小してしまうのではないのでしょうか。



定量的な解析に関しては指摘のとおりです。本文中で使用している“バックグラウンド”という言葉が誤解をまねいたのかもしれませんが、本文中の“バックグラウンド”は、画像を自分好みの調子に調整するために設定する任意の値であり、定量的な解析でいう“ブランク”とか“Mock”の意味ではありません。蛍光強度を定量するためのバックグラウンドは、1次抗体を除いて染色処理した細胞を用いるのが一般的です。より正確を期するなら、さきに述べたように、内部対照を使用して定量化するとよいでしょう。



蛍光顕微鏡に冷却カラーCCDカメラを用いて画像を取得していますが、あえてグレースケールで画像を取得する、または、カラーで得た画像をグレースケールに変換することで得られる利点がありますか。



カラーカメラを使用してグレースケールで画像を取得する、また、得られたカラー画像をグレースケール画像に変換することには、画像を印刷したときに見やすく、かつ、印刷トラブルが起りにくいというメリットがあります。図が地味になるというデメリットはあるかもしれませんが、データの本質にはなんら変わりはありません。むしろ、画像取得に使用するカメラの違いを問題にすべきです。顕微鏡画像の取得には白黒カメラとカラーカメラが使われます。多重染色した細胞を観察する場合、白黒カメラはおのおのの蛍光波長に応じて適切な蛍光フィルターセットを使用し、ひとつの蛍光画像を取得するごとにフィルターセットを切り替えなければなりません。その際に、フィルターセットの切り替えにともなう位置ずれが生じる可能性があり、細胞内の微細な局在の違いを気にする場合には注意が必要になります。また、白黒カメラでは、蛍光蛋白質を用いて生細胞観察をする際、その動きに注意する必要があります。フィルターセットを交換しているあいだに蛍光蛋白質が移動してしまったら、もともと共局在している蛋白質どうしが異なる局在を示すという結果にもなりかねません。それでは、カラーカメラを常用すべきか、と問われると必ずしもそうではありません。カラーカメラにもいろいろな方式があるので一概にはいえませんが、一般的なデメリットとしては、白黒カメラよりも光学特性が低下する傾向があります。蛍光フィルターセットは多色の蛍光を同時に得られるものを使用するので、単波長用のフィルターセットに比べて波長の分離特性が悪くなり、本文中でもふれた、蛍光の漏れなどの問題が生じやすくなります。また、得られる画像も暗くなる可能性が高くなります。反面、複数の蛍光波長をまったく同時に取得するので、白黒カメラでみられたような位置ずれの問題が生じにくくなります。このように、白黒カメラとカラーカメラはどちらも万能ではなく、用途に応じて使い分けるのがもっとも賢明な選択といえます。