

# GFP (Green Fluorescent Protein) アプリケーション

Now part of  
GE Healthcare

GE imagination at work

Key word : タンパク質間相互作用、発現解析

## はじめに

Green Fluorescent Proteins (GFP) はタンパク質の局在、結合、遺伝子発現の研究などにレポーター分子として広く用いられています。遺伝子組換え技術により、GFPをコードした配列を他のタンパク質の配列に挿入してGFP融合タンパク質を作製します。目的タンパク質にGFPを融合することにより、*in vivo*では、そのタンパク質がどのような細胞種特異性をもつのか、あるいは細胞内のどこに局在するのか、などを調べることができます。また、*in vitro*では、タンパク質間相互作用などの研究に応用が可能です。さらに、遺伝子発現解析においてはGFPを特定のプロモーターや転写制御配列の下流（影響下）で発現させることによって、これらの制御因子が転写活性に与える影響のモニターに利用できます。GFPはレポーター分子として他に基質や補助因子を加えず検出できるだけでなく、多くの細胞種や生物種において発現できるという利点があります。GFPから放出される蛍光は非常に安定しており、一般的な蛍光スキャナーなどで直接検出できます。

GFPに関しては、milestone前号「蛍光検出の基礎知識」をご参照ください。

## 構造上、スペクトル上の特性

GFPは北西アメリカ太平洋沿岸水域に生息する発光クラゲ *Aequorea victoria* 由来のタンパク質です (1)。 *Aequorea victoria* の場合、Ca<sup>2+</sup>活性のある感光タンパク質エクオリンが得た光エネルギーがGFPへ伝達されることで発光（蛍光の放出）が起こります (2)。GFPは238個のアミノ酸からなり、その分子量は27 kDaです。6個のアミノ酸からなるペプチドが蛍光の発生に関連する発色団を構成しています。GFP遺伝子は、cDNAクローニングと配列解析が終了しているので、遺伝子工学的に改変を行うことが可能です (3)。

野生型GFPの最大励起波長は395 nm（第二励起波長は475 nm）、放射（蛍光）波長は508 nmで、明るい緑色光を発します。もともとは紫外線で励起してGFP発現細胞から蛍光を放射させ、蛍光顕微鏡やフローサイトメーター（FACS）で検出していました。本報では、GFPの検出と定量に弊社の蛍光イメージングシステムFluorImagerおよびStormを使用して発現解析やタンパク質間相互作用の解析を行った例をご紹介します。

## 改良型GFP

野生型GFPはレポーター遺伝子としての使用には至適化されていません。蛍光顕微鏡やFACSで一般的な青色光（たとえば488 nmアルゴンレーザーなど）により励起された場合、野生型GFPの蛍光強度は十分ではありません。しかも、蛍光タンパク質が合成されてから蛍光が発せられるまでに時間差があり、また、GFP発色団の複雑な光異性化は蛍光を減衰させる原因になります。さらに、野生型GFPは一般に高等真核生物中では発現効率が低いという問題もあります (4)。こうした制限をなくすため、数多くの改良型GFPが開発されてきました (3)。

改良型GFPとして、488 nmで励起された場合非常に強い蛍光を発し、真核生物での発現効率が高いとされるDNA配列を選択的に使用した遺伝子組換え体がいくつかあります。蛍光強度および発現効率が向上したGFPは、多くの画像解析システムでより高感度での検出が可能になります。

FluorImagerおよびStormシステムを用いて、精製した野生型GFP、EGFP、GFP-S65、GFPuvの電気泳動パターンを検出し、これらのシステムでの検出限界を測定しました（表1）。GFP-S65、EGFP、GFPuvの画像解析には、FluorImager（励起光488 nm）が最適であり、ポリアクリルアミドゲルにおいて1バンドあたり約0.3 ngまでの検出が可能でした。また、改良型のGFP-S65とEGFPはStormの青色蛍光モードを用いた場合に検出感度が最も高いことが示されました。ただし、これら2種についてのStormの検出限界は8 ng程度です。野生型GFPの場合、Stormでの検出感度は約15 ngという結果でした。FluorImagerシステムを用いた場合には他の試験対象変異型よりも野生型GFPでの感度が低く、1バンドあたり2 ngが検出されました。各GFPの検出直線性は1.5 ~ 3オーダーでした。

表1. GFPと改良型GFPのスペクトルとコドン最適化特性

	Peak Excit (nm)	Peak Emission (nm)	Codon Optimization
野生型GFP	395/470	509/540	None
Red-Shifted*:			
EGFP	488	507	Human
GFP-S65T	488	511	
GFPuv	395	509	<i>E.coli</i>

\* 野生型GFPのスペクトルを長波長側にシフトさせた改良型です。変異型GFPはBD Biosciences Clontechの製品です。

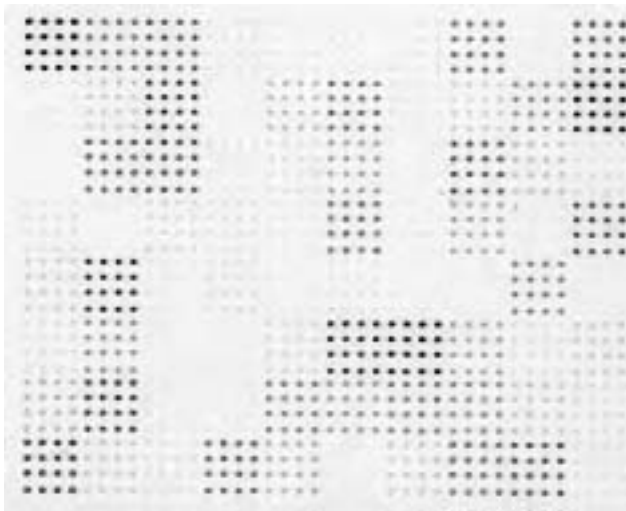


図1. 酵母菌コロニーにおける GFP レポーターの検出

GFPで形質転換した酵母菌コロニーをアガープレートにスポットし、37℃で静置、培養しました。アガープレートをマイクロプレートトレイにセットし、PMT575 V、解像度100 μmの設定にてFluorImager SIでスキャンしました。本画像はJohn Phillips、Matt Ashby両博士 (Acacia Biosciences、カリフォルニア州リッチモンド) よりご提供いただきました。

### FluorImagerおよびStormシステムによる GFP 検出 酵母菌および細菌類における遺伝子発現のモニタリング

FluorImager SIを使用して、GFPで形質転換した酵母菌細胞を用いて短期的な遺伝子発現解析を行いました。GFP組換えコロニーをアガープレートにスポットして培養後、アガープレートを励起光488 nmでスキャンしてGFPの発現を検出できました (図1)。FluorImagerによりGFPの発現したコロニーを確認することができます。この手法は簡易的に行うスクリーニングに用いることが可能です。(ただし発現部位等を厳密に特定することができないため、詳細な発現確認には、より高解像度に撮られた顕微画像で確認する必要があります。)

GFP発現ベクターにより形質転換した大腸菌細胞の解析には、Storm 860の青色蛍光モードを用いました。融合タンパク質の検出後、細胞ライセートをSDS-PAGEにより分析しました。GFPの変性による蛍光の減衰を避けるために、SDS-PAGE前に行う熱処理は温度を低めに設定しました。この結果、GFP融合タンパク質はわずか2 μl程度の細胞ライセートから検出可能であることが示されました (図2)。

### タンパク質間相互作用

GFP融合タンパク質をプローブとして使用する場合、GFPは、目的タンパク質の特性に影響する独立した部位として機能します。したがって、GFPとその変異体はタンパク

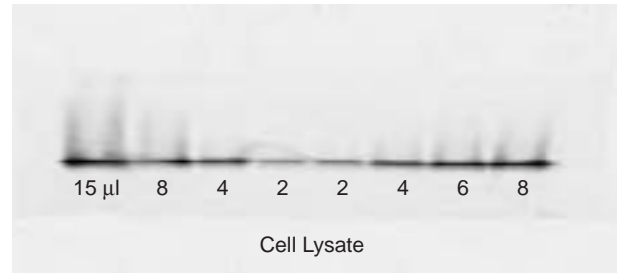


図2. 大腸菌における GFP の検出限界

PBAD-GFP用のベクター GFPuv変異株 (Maxygen社) をクローニングし、大腸菌で過剰に発現させました。大腸菌細胞を5 mg/ml リソゾームと25 mM EDTAで室温にて10分間放置し、その後35 mM塩化マグネシウムに溶解した100 mg/ml DNaseで室温にて15分間処理しました。2 ~ 15 μlのライセートを45℃で3分間熱処理し、10% SDSポリアクリルアミドゲルにて泳動しました。FluorImager 860は、PMT1,000 V、解像度200 μmに設定し、blue-fluorescenceド (450+30 nm) でゲルをスキャンしました。本画像はWai-Mun Huang博士 (ユタ州立大学) よりご提供いただきました。

質間相互作用の*in vivo*および*in vitro*機能解析に有用なツールです。リボヌクレアーゼAのS-ペプチドおよびS-タンパク質断片間の相互作用を証明するためにGFPを用いたという例もあります (5)。S15 DNAと6個のヒスチジン残基をコードした配列を、S65T ~ GFP変異体 (最大励起波長は488 nm) cDNAの5'末端および3'末端にそれぞれ融合し、S15 ~ GFP(S65T) ~ His<sub>6</sub>融合タンパク質を作製しました。精製したS15ペプチド ~ GFP(S65T) ~ His<sub>6</sub>とさまざまな濃度のS-タンパク質をインキュベートした後、非変性条件下でポリアクリルアミドゲルに添加、泳動し、遊離のコンポーネントから複合体を分離する蛍光ゲルシフトアッセイを行いました (図3)。FluorImager SIシステムの488 nm励起光源を用いてスキャンしました。

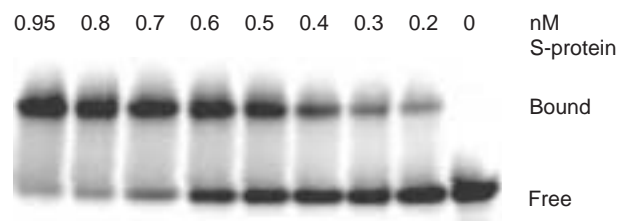


図3. GFPゲルシフトアッセイ

FluorImager SIを用いてS-タンパク質とS-15 ~ GFP(S65T) ~ His<sub>6</sub>間の相互作用を定量化しました。一定量 (1 mM) のS-15 ~ GFP(S65T) ~ His<sub>6</sub>とさまざまな量 (0 ~ 0.95 μM) のS-タンパク質を5%グリセロールを含む10 mM Tris塩酸 (pH7.5) 中で20℃にて20分間インキュベートしました。非変性条件下の6%ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、FluorImager SIでゲルをスキャンしました。本画像は、Sang-Hyun Park、Ronald Raines両氏 (ウィスコンシン州立大学マディソン校) よりご提供いただきました。

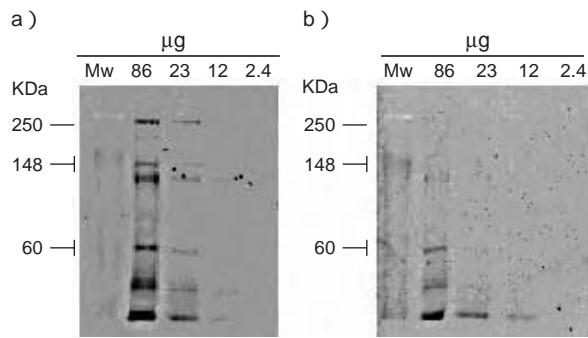


図4. GFPゲルオーバーレイアッセイ

GFP(S65T)-CaM (a) と GFP(S65T)-CLP (b) をプローブとして使用し、タンパク質間相互作用試験を行いました。2.4 ~ 86  $\mu$ g のラット脳シナプスタンパク質を調製し、2枚の6.5%ポリアクリルアミドゲルにて泳動しました。タンパク質をPVDFに転写した後、メンブレンを (a) (b) どちらか一方の GFP 融合タンパク質とインキュベートしました。メンブレンのスキャンには、PMT を 800V に設定した Storm 860 の青色蛍光モードを使用しました。本画像は Nandor Garamszegi 博士 (Mayo Clinic、ミネソタ州) よりご提供いただきました。

また、カルモジュリン (CaM) またはカルモジュリン様タンパク質 (CLM) と GFP ~ S65T 変異体との融合タンパク質を作製して "gel overlay" アッセイを行い、相互作用しているタンパク質をスクリーニングしました。図4はラット脳タンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲルに泳動しメンブレンに転写後 GFP 融合タンパク質と反応させた画像です。メンブレンは Storm 860 の青色蛍光モードでスキャンしました。GFP 蛍光が検出されている場所が、CaM または CLM が特定の標的タンパク質に結合している部位になります。

## まとめ

GFP は生細胞や生体内のプロセスをモニタリングする際に有用なツールです。

Storm 840 / 860 や FluorImager のどちらを用いても GFP の直接検出と定量は可能です。励起光源 488 nm の FluorImager および Storm の青色蛍光モードであれば、GFP や GFP 変異体を効率よく励起できます。なお、GFP を直接検出する代わりに市販の抗 GFP 抗体を利用した間接検出も可能です。GFP の直接検出で十分なシグナルを検出できなかった場合 (たとえばウェスタンブロッティングおよび免疫沈降など)、酵素が結合した抗 GFP 抗体を使用した間接検出によりシグナルを増幅させることもできます。

## 参考文献

1. Chalfie, M. *et al.*, *Science* 263: 802-805 (1994).
2. Inouye, S. and F.I. Tsuji, *FEBS letter* 341: 277-280 (1994).
3. Heim, R. *et al.*, *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 91:12501-12504 (1994).
4. Kain, S.R. *et al.*, *BioTechniques* 19, No. 4: 650-655 (1995).
5. Park, S-H and R.T. Raines, *Protein Science*. 6: 2344-2349 (1997).
6. Garamszegi, N. *et al.*, *BioTechniques*. 23: 864-872 (1997).

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370

e-mail : Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。