

蛍光検出基礎知識 ~ Green Fluorescent Proteins (GFP)とは

Keyword : GFP、蛍光レポータータンパク質、GFP融合タンパク質、AvGFP

はじめに

バイオサイエンスの世界で利用される蛍光色素は多種あります。その中で近年、急速に応用範囲が広がったのがGreen Fluorescent Proteins (GFP)です。

GFPは一般的な無機蛍光物質と異なりタンパク質であるため、遺伝子の形で生きた細胞や生物に導入することができます。そのため、従来の蛍光物質ではできなかったさまざまなアプリケーションでの応用が可能です。今回はGFPに関してその由来を含めてご紹介させていただきます。

GFPの由来

紀元1世紀頃にローマの自然歴史学者大プリニウス (Gaius Plinius Secundus, 23 ~ 79年 ; 『博物誌』の著者) が、クラゲ (*Plumo Marinus*) が分泌する粘性の高い物質を杖につけると夜道を照らす松明の代わりになると報告しています。

それから約2000年を経て、現代の分子生物学者がクラゲの発光の原因となるGreen Fluorescence Protein (GFP) の遺伝子をクローニングすることに成功しました (1)。

GFPはクラゲやサンゴなど、刺胞動物門 (トゲをもつ水生無脊

椎動物) に属する生物達が進化の過程で発達させ深海の暗闇で生息するために産生してきた遺伝子です。

これらの生物から単離されたGFPは類似したアミノ酸あるいはDNA配列を共有していることから、共通の祖先から受け継いだタンパク質が進化したと考えられています。

近年、GFPは生細胞の内部構造・機能の研究ツールとして活用されるようになってきました。GFPにより化学的な染色をせずに生細胞内のタンパク質を可視化できるため、GFP技術の出現は細胞生物学を大きく変えつつあります。

セルベースアッセイのツール

GFP遺伝子は、事実上、全てのcDNAに対して、または特定のDNA応答因子に対して、遺伝子工学的な手法により融合させることができます。

選択した細胞種もしくは生物種に対して、GFP融合タンパク質をコードするDNAを取込ませることにより、生細胞内でレポータータンパク質を発現させます。

GFPは蛍光物質であるため、励起光が当たらない状態ではシグナル (蛍光) を発することはなく、青色光で励起された場合に

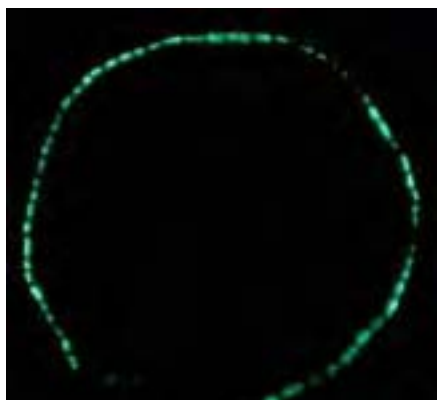


図 1. オワンクラゲ *Aequorea victoria* の体表に存在する GFP

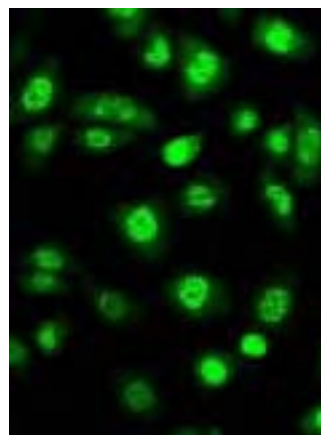


図 2. ヒト培養細胞の核に取り込まれた GFP 画像はIN Cell Analyzerにより検出したもの。



図 3. *Aequorea victoria*
白色光を当てて撮影したもの。

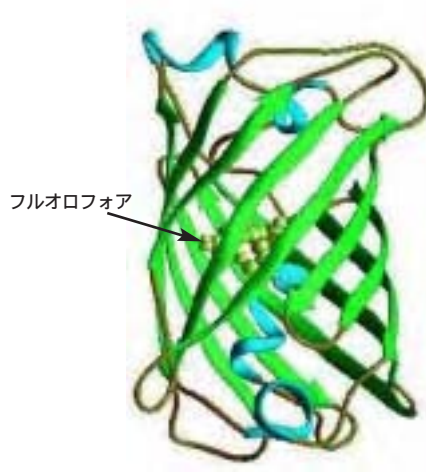


図 4. GFPの三次構造
中央のフルオロフォアを黄色で表示しました。

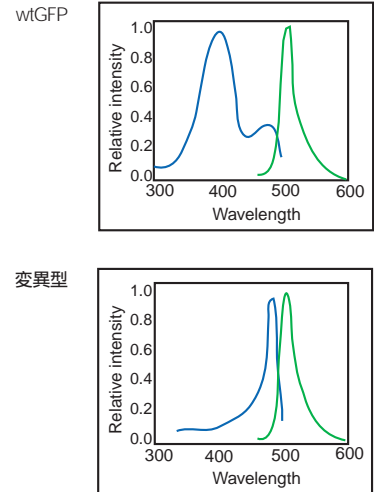


図 5. wtGFPの変異
wtGFPのアミノ酸残基の置換により、スペクトルが変化し、輝度や三次構造に影響が見られることがわかっています。

のみ蛍光を発します。そこでレポータータンパク質として利用することが可能です。

つまり、細胞内でのタンパク質の分布や動態、機能を解明する場合や、化学物質が細胞内環境にどのような影響を与えるかを検証する目的で利用することができます。

GFPファミリーのうち、汎用性が高く、最も研究が進んでいるのが北太平洋沿岸水域に生息するオワンクラゲ (*Aequorea victoria*; Av) に由来するGFPです。AvGFPは初めて精製、クローニングされた自家発光タンパク質であり、生細胞系アッセイに適したタンパク質の一つです。

GFPはいずれも3つのアミノ酸からなる内在性のフルオロフォアを共通して持っています。AvGFPの場合、238個のアミノ酸からなる非常に安定したタンパク質であり、フルオロフォアは3個のアミノ酸側鎖 (Ser65、Tyr66、Gly67) から構成されています (図4)。AvGFPは化学物質や温度による変性に耐性があり、励起により放出される蛍光スペクトルは広いpH範囲で安定しています。

この蛍光物質は蛍光を発する際に基質や補因子を必要としないという画期的な長所をもつため、補因子、基質、化学色素を加えずに生細胞アッセイを行うことが可能になります (2)。

研究に用いられるGFPは、主なアミノ酸残基、特に中央のフルオロフォアの周辺部位を置換することで改良されてきました。

たとえば、あるアミノ酸を置換して37 でのタンパク質の高次構造形成を改善することにより、温度耐性が強化された変異体もあります。また、タンパク質の放射スペクトルや励起スペクトルを調整し、色を変えたり輝度を改善したものもあります。弊社が開発したtriGFPは野生型AvGFPのスペクトルを長波長側にシフトさせた改良種で、37 の哺乳類の細胞内でより輝度の高い蛍光を放出するよう至適化されています (図5)。2つのアミノ酸の置換により (Phe-64をLeuに、Ser-175をGlyに置換) wtGFP (野生型GFP) と比べてフォールディング特性と光安定性が改善されています。triGFPはGlu-222がGlyに置換されて最大励起波長が375 nmから481 nmに変化したため、ほとんどの蛍光検出システムに対応します。

このほかにも、現在ではさまざまなバリエーションを持った変異型のGFPが開発されています。また、CFP、YFPなど異なる波長域をもつレポータータンパク質もあり、これらを組み合わせたアプリケーションも数多く見られるようになりました。

GFPの可能性

GFPは、基質や補助因子を必要とせず、励起光を照射することで蛍光を発するため、生細胞内で発現させリアルタイムで動態を観察することができます。

たとえば、シグナル伝達はわずかな分子群で緻密に制御されていますが、細胞抽出物などではフィードバックや制御作用が正

常に機能せず、目的分子の挙動が生体内での動態と必ずしも一致しない可能性があります。また、生体内で起こる現象の多くは短期的であり、固定された死細胞による実験には限界があります。GFPをはじめとするレポータータンパク質であれば、こうした問題点を解決し、シグナル伝達の解明や発現解析を通じて、創薬研究等さまざまな分野に活用していくことが可能です。

参考文献

1. Prasher, D.C. *et al.*, *Gene* **111**, 229-233 (1992).
2. Tsien, R. Y., *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544 (1998).

Aequorea victoria 由来の蛍光タンパク質を営利団体において使用する場合、ライセンスが必要となります。詳しくはバイオダイレクトラインまでお問合せください。

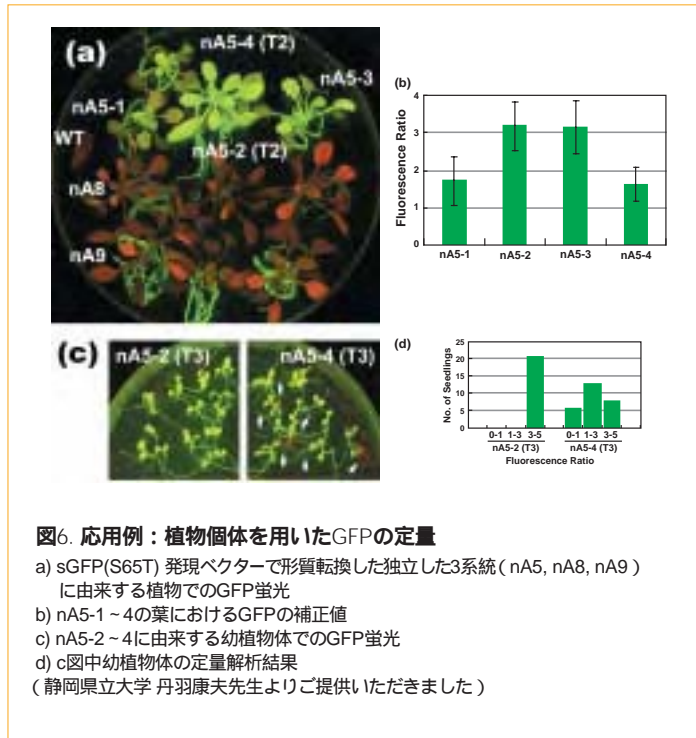
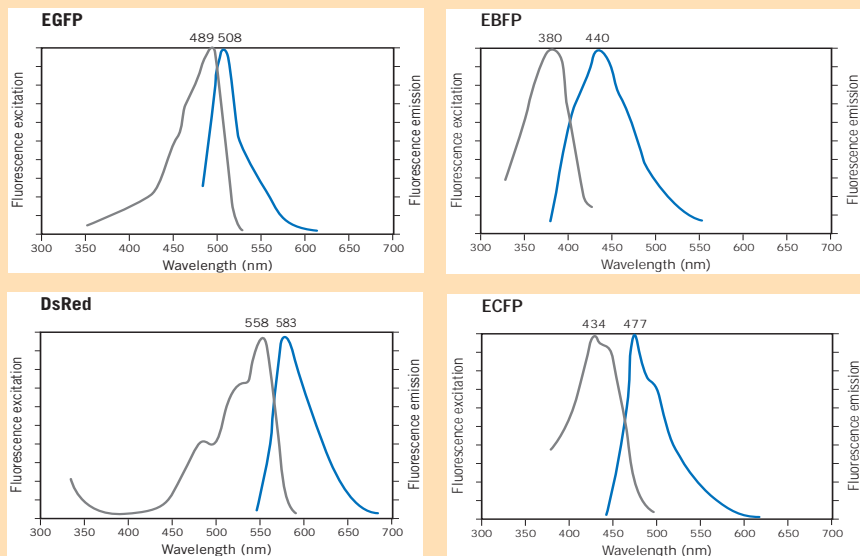


図7 レポータータンパク質の励起・蛍光スペクトル

GFP以外にもさまざまな波長のレポータータンパク質があります。これらの励起・蛍光波長は異なるため、組み合わせて使用することで多重染色のアプリケーションなどにも利用可能です。詳細はそれぞれの販売元にお問合せください。



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



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。