

2001年12月29日
独立行政法人 理化学研究所

生きた細胞を詳細に観察できる新しい蛍光タンパク質を開発

- とらえられなかった細胞内現象を可視化 -

理化学研究所（小林俊一理事長）は、生きた細胞内における現象を詳細に観察することができる新しい蛍光タンパク質の開発に成功しました。理研脳科学総合研究センター（伊藤正男所長）細胞機能探索技術開発チームの宮脇敦史チームリーダー、永井健治研究員（現・科学技術振興事業団さきがけ研究 21 研究員）らの研究グループによる研究成果です。

細胞生物学、分子生物学などの研究分野では、生きた細胞内で特定の場所や機能タンパク質を蛍光標識して観察することが非常に重要です。蛍光標識に使用される物質の中でも、発光クラゲに由来する緑色蛍光タンパク質（GFP : Green Fluorescent Protein）は、自ら発色団^{*1}を形成することができるために、遺伝子発現のレポーターやタンパク質の標識として多用されてきました。しかし、発光の効率（発色団形成効率）が低く、発光するまでの速度が遅いなどの技術的制約があるため、これらを克服できる新しい改変 GFP の誕生が望まれていました。

新しく開発した改変 GFP は、より早く・明るく蛍光を発することができ、その効果は、殊にほ乳類の生体内温度（37℃）で顕著です。この改変 GFP を使用することによって、従来生きた細胞内で見ることができなかった現象を、蛍光観察することが可能になりました。本技術を活用することによって、脳機能研究の解明に大きく貢献するほか、広くは発生過程や疾病などのメカニズムの理解にもつながります。

本研究成果は、米国の科学雑誌「Nature Biotechnology」2002年1月号に掲載されます。

1. 背景

外界の刺激を受けて、細胞内では特定の反応経路にそって、細胞の分化、移動、分裂などの現象が現れます。こうした細胞内のシグナル伝達にかかわる機能分子は、生化学的、あるいは遺伝学的に数多く同定されています。しかしシグナル伝達系などを包括的に理解するためには、細胞内の事象を生きた細胞一個一個において観察することが必要です。そのためには、目的とする遺伝子や細胞内の部位にさまざまな物質で蛍光標識を行い、観察が可能となるようにデザインすることが求められます。

蛍光標識物質の1つである緑色蛍光タンパク質（GFP）は、1960年代に下村脩博士によってオワンクラゲ^{*2}から発見されました。1992年には GFP 遺伝子が単離され、自ら発色団を形成して発光するタンパク質であることが明らかになりました。それ以前は、あるタンパク質を蛍光ラベル（標識）する際、そのタンパク質を精製し、化学修飾法によって蛍光物質を付加させたり、蛍光ラベルしたタンパク質を生きた細胞内へ注入するという煩雑な作業が必要でした。この点、GFP は、他のタンパク質の遺伝子に融合させて細胞に導入すると、細胞内の任意の場所に蛍光をつくり出すことができるため、生きた細胞において特定の構造体、あるいは機能分子を

蛍光ラベルするのに威力を発揮し、現在非常に多くの研究場面で用いられています。

しかし、従来の GFP は発色団を形成する効率が低く、タンパク質として存在していても光る能力のない GFP、すなわち未成熟な GFP ができてしまうことが多々ありました。明るさを求めて過剰にタンパク質融合 GFP を細胞内に導入すると、今度は過剰なタンパク質が細胞に毒性をもたらすという状況に陥ります。また、発色団が形成される速度が遅いため、遺伝子が導入されてから GFP の蛍光が検出されるまでの時間が長いなどの問題点がありました。研究の現場では、細胞内小器官など局所的な部分で起こる微妙な蛍光変化を観察する必要性が求められており、非常に多くの研究者が光る能力（発色団形成効率）が向上した改変 GFP を求めています。

2. 新たに開発した改変 GFP について

研究チームでは、オワンクラゲ由来の改変 GFP（約 240 アミノ酸）に、ランダムにさまざまなアミノ酸置換を導入し、発色団形成効率などに対して効果を持つアミノ酸置換を探し出しました。特に、GFP の発色団形成にかかわる反応の中で最も重要と思われる酸化反応に注目。46 番目のフェニルアラニンをロイシンに置換すると、その発色団形成反応が、ほ乳類細胞の最適培養条件である 37°C で飛躍的に促進されることが分かりました。さらに、タンパク質のフォールディング^{*3}の効率を高めるアミノ酸置換も同定し、それらが GFP タンパク質の成熟を高めることを明らかにしました。

これらのアミノ酸置換を導入して作製した、世界でもっとも明るい改変 GFP を、“金星”にちなんで“Venus（ヴィーナス）”と命名しました。Venus は成熟の効率が非常に高いため、少量で効果的に蛍光を発することができます。従来の改変 GFP と比較して、大腸菌内で 30~100 倍、ほ乳類の細胞内で 3~100 倍の明るさを達成し、通常の装置でも十分検出可能な蛍光を提供できます。したがって、細胞内に毒性をもたらすことなく、より効率のよい蛍光観察が可能になりました。また、GFP 遺伝子を導入してから蛍光が出現するまでの時間が、半日~1 日程度から数時間以内に短縮されました。これによって、従来不可能とされていた、調製したばかりの脳のスライスを迅速に蛍光ラベルして観察することが可能となります。

3. Venus で得られた成果

作製した Venus がいかに実用的な明るさを発揮できるのか、その威力を神経芽細胞株 PC12 を用いた実験で証明しました。PC12 細胞は、神経伝達物質の放出に関する研究においては非常によいモデルとなってきました。しかし従来は、電気生理学的手法やアイソトープによるラベルが必要であったため、その放出量や放出過程の解析は大変困難なものでした。この PC12 における分泌顆粒を Venus で蛍光ラベルしたところ、ほぼ 100% の分泌顆粒が正確に、これまでに比べて 10 倍以上の明るさでラベルされていることが確認できました。この結果、脱分極や細胞刺激によって起こる顆粒分泌の素過程を、実時間で観察することが可能になりました。また、細胞からの分泌量を培養液に放出される蛍光で定量することもできるようになりました。

4. 今後への期待

現在、遺伝子の発現を生体内で可視化することが非常に重要とされています。Venus はタンパク質が作られてから蛍光を発するまでの時間が非常に早く、目的とする遺伝子の活性化を忠実に反映する、“遺伝子の「レポーター」”^{※4}としての役割が期待できます。

さらに、今まで市販の改変 GFP を使っても明るい蛍光が得られず、断念せざるを得なかった蛍光観察実験は非常に多くありました。これらの実験の中には、市販の GFP を Venus に置きかえただけで目的のシグナルが十分に得られ、研究プロジェクトが再スタートした例が多々あります。必要最小限の分量で細胞内の生理的条件を保ったまま、より定量的で信頼性の高い蛍光観察ができるため、Venus は今後世界中の研究室で活躍するものと考えられます。今回のような蛍光タンパク質の改善・改良は、細胞内現象を生きた状態でとらえる強力な技術の革新をもたらし、細胞内現象、特にシグナル伝達への理解がより一層深まるとともに、発生過程、脳機能の解明や疾病などのメカニズムの解明にも大きな手がかりを与えることが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム

チームリーダー

宮脇 敦史

Fax : 048-467-5924

脳科学総合研究センター

脳科学研究推進部

田中 朗彦

Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

嶋田 庸嗣

仁尾 明日香

Tel : 048-467-9271 / Fax : 048-462-4715

<補足説明>

※1 発色団

ある特定の色の光を吸収するのに必要な構造単位。GFP に関して発色団形成効率とは、たとえば 100 個の GFP タンパク質のうち何個が発色団を形成して光ることができるか、を意味する。この効率は GFP タンパク質を設置する細胞内部位、融合する相手のタンパク質などによって様々である。

※2 オワンクラゲ

発光クラゲの一種。扁平な“おわん型”の傘を持ち、縁には 100 本の触手がある。刺

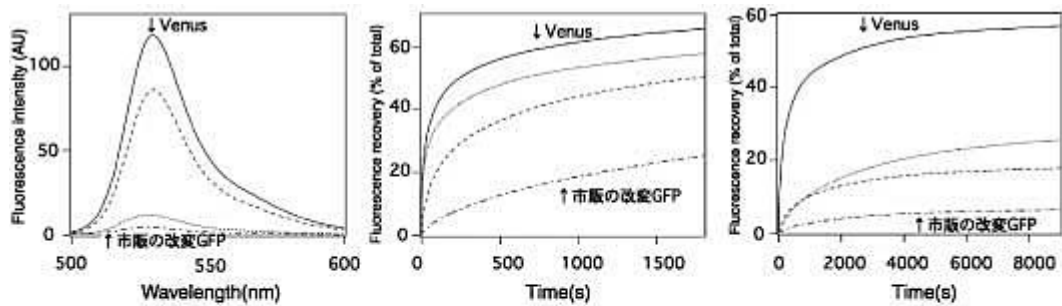
激を与えると傘の縁や生殖腺が青緑色に光る。その発光器官から、1960年代に下村脩博士によって GFP が発見、精製された。

※3 フォールディング

ペプチド鎖からタンパク質が 3 次元的に折りたたまれる過程。GFP タンパク質が発色団を形成して成熟するためには、まずフォールディングすることが必要。

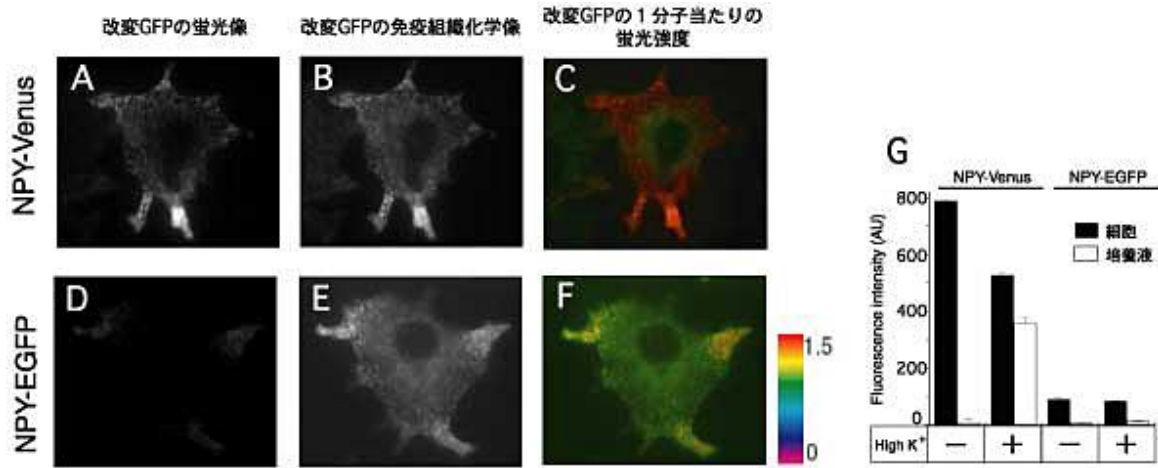
※4 遺伝子のレポーター

遺伝子の発現量、特に転写量を知らせるタンパク質。その遺伝子を、注目する遺伝子の発現（転写）調節領域に連結させて用いる。



- A : 37℃培養下の大腸菌に発現させた改変GFPの蛍光スペクトルとの比較
(Venusは528nmに蛍光ピークを持ち、市販の改変GFPに比べて約30倍の蛍光強度を示した)
- B : 改変GFPを変性状態から再びフォールディングさせた時の蛍光回復の時間経過
(Venusは市販のGFPに比べて約15倍高いフォールディング速度定数 [Kfold] を示した)
- C : 改変GFPを還元・変性状態から再び酸化・フォールディングさせた時の蛍光回復の時間経過
(Venusは市販のGFPに比べて約3倍高い酸化速度定数 [Kox] を示した)

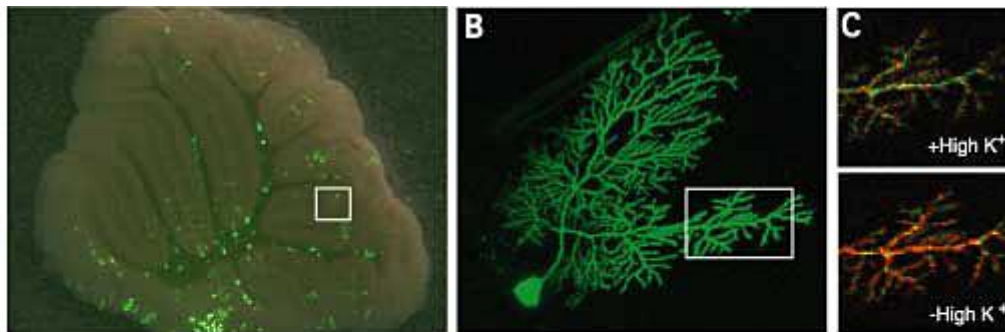
図1 市販の改変GFPとの蛍光特性比較



A-C:ニューロペプチド Y(NPY)-Venusを発現させたPC12細胞
D-F:ニューロペプチド Y(NPY)-市販の改変GFP (EGFP)を発現させたPC12細胞
・AとDはGFP観察用フィルターで同一時間露光 (100msec) した時の蛍光像。
・BとEは赤色の蛍光物質でラベルした抗GFP抗体を反応させて改変GFPの存在量を示したもの。
・CとFはA/B、D/Eつまり1分子当たりの蛍光強度を疑似カラー表示したもの。赤いほど1分子当たりの蛍光強度が大きいことを示す。

PC12細胞を高濃度カリウム溶液に浸すと、分泌顆粒中の蛍光ラベルされた分泌タンパク質が細胞外 (培養液中) に放出される。市販の改変GFPでは不可能であったこの分泌現象を、Venusによるラベルでは定量的に測定することが可能になった。

図2 VenusによるPC12細胞分泌顆粒の可視化 (左) と分泌量の定量 (右)



Venusを用いて作製したカルシウムイオン指示薬をマウス小脳スライスに遺伝子導入した。

市販のGFPで作製したものでは遺伝子を導入してから蛍光が観察できるまで半日~1日を要したが、Venusを用いると数時間で観察が可能となるため、新鮮な脳スライスの蛍光カルシウムイメージングが可能になる。
・Aはマウス小脳スライスの低倍率写真。蛍光像と暗視野像を重ね合わせたもの。
・BはA中の白い囲みを拡大したもの。プルキンエ細胞の共焦点蛍光画像。
・CとDはBの白い囲みを拡大したもの。脳スライスを高濃度カリウム溶液中に浸すと細胞膜で脱分極が起こり、カルシウム流入が起こる。Cが脱分極前、Dは脱分極後で、赤いほどカルシウムが濃度が高くなったことを示す。

図3 マウス小脳の新鮮スライス中のプルキンエ細胞におけるカルシウムイメージング

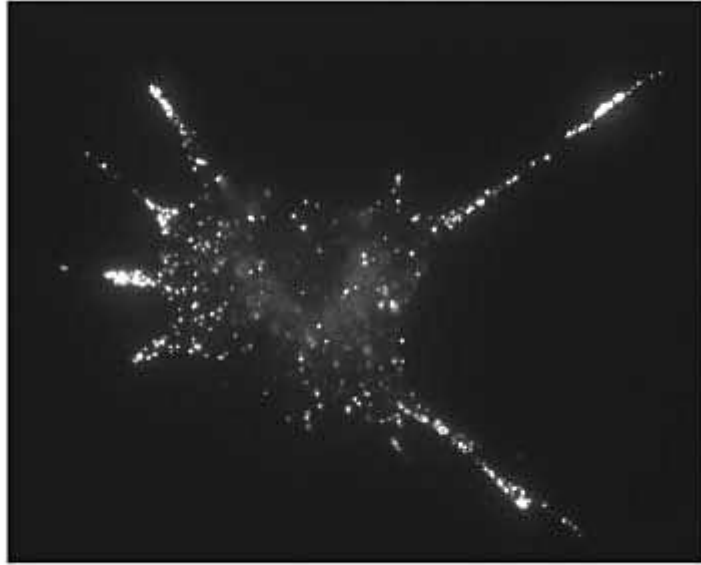


図4 ニューロペプチドY-Venus融合タンパク質によるPC12細胞分泌顆粒の蛍光ラベル