

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

(2001年12月25日、文部科学省においてプレスリリース)

※発色団
ある特定の波長の光を
吸収するのに必要な構造単位。
GFPは、この発色団を
自ら形成することができるため、
遺伝子工学的な蛍光標識物質として多用されている。

●
監修：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

当研究所は、生きた細胞内における現象を詳細に観察できる新しい蛍光タンパク質の開発に成功した。脳科学総合研究センター 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、永井健治研究員らの研究グループによる研究成果。発光クラゲに由来する緑色蛍光タンパク質(GFP: Green Fluorescent Protein)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する手段として、細胞生物学などの研究分野では非常に多用されている。しかしながら、従来のGFPは、発色の効率が低く、発光するまでの速度が遅いなどの技術的制約があった。研究グループが新しく開発した改変GFPは、より速く、明るく蛍光を発することができ、特にほ乳類の生体内温度(37℃)で顕著に効果が出る。本技術を活用することにより、脳機能の解明、発生過程や疾病などのメカニズムの理解につながると期待される。

●
外界の刺激を受けて、細胞では分化、移動、分裂などの現象が起こる。そのメカニズム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1個で詳細に観察する必要がある。1960年代に発見されたGFPは、他のタンパク質の遺伝子に融合させて細胞内に導入すると、細胞内の任意の場所に蛍光を発することができるため、生きた細胞内において特定の構造体や機能分子を蛍光ラベルするのに威力を発揮してきた。しかし、従来のGFPは、発色団[※]の形成効率が低く、タンパク質として存在していても光る能力のない未熟なGFPができてしまうことがあった。また、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も指摘さ

れており、光る能力が向上した新しい改変GFPの登場が望まれていた。

●
研究グループは、改変GFPに様々なアミノ酸置換をランダムに導入し、発色団の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た。特に、発色団形成過程で最も重要と思われる酸化反応に注目して探索した結果、46番目のフェニルアラニンをロイシンに置換すると、その反応がほ乳類の最適培養条件である37℃で飛躍的に促進されることが分かった。さらに、GFPの成熟効率を高める置換も同定。これらのアミノ酸置換を導入して作製した世界で最も明るい改変GFPを、“金星”にちなんで“Venus”と命名した。

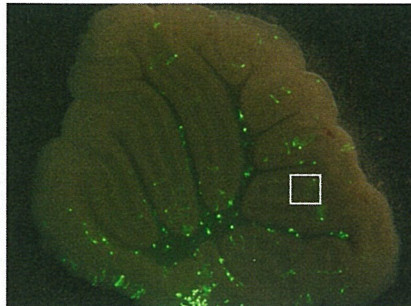
●
Venusは、従来のGFPと比較して、大腸菌内で30~100倍、ほ乳類の細胞内で3~100倍の明るさを達成し、通常の装置でも十分検出可能な蛍光を提供できる。またGFP遺伝子を導入してから蛍光を発するまでの時間が、半日ないし1日程度から数時間以内に短縮された。これらの特長を

持つVenusを用いると、神経芽細胞株PC12を用いた神経伝達物質の放出実験の観察が可能となる。PC12の分泌顆粒をVenusで蛍光ラベルすると、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でき、従来は困難であった、脱分極や細胞刺激によって起こる顆粒分泌の素過程の実時間観察が可能になる。さらに、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った。

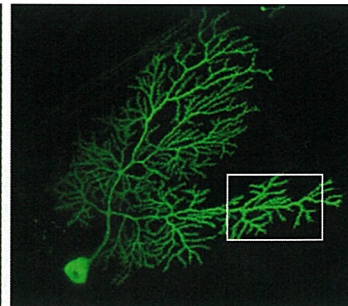
●
Venusは、蛍光を発するまでの速度が非常に速く、生体内で目的とする遺伝子の発現を忠実に反映し可視化できる“遺伝子の「レポーター」”としての役割が期待できる。また、必要最小限の分量で細胞内の生理的条件を保ったまま、より定量的な蛍光観察ができるため、細胞内現象、特にシグナル伝達への理解と共に、脳機能の解明、発生過程や疾病などのメカニズムの解明にも大きな手がかりを与えることが期待される。

マウス小脳中のプルキンエ細胞におけるカルシウムイメージング

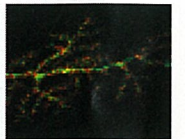
A マウス小脳スライス



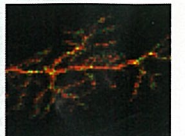
B プルキンエ細胞



C 脱分極前



D 脱分極後



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

高濃度カリウムに浸すと脱分極が起こり、カルシウム流入が起こる。赤いほどカルシウム濃度が高くなったことを示す。(写真C、D)

*BはA中の白い囲みを拡大したもの。C、DはB中の白い囲みを拡大したもの。