

[最近のトピックス]

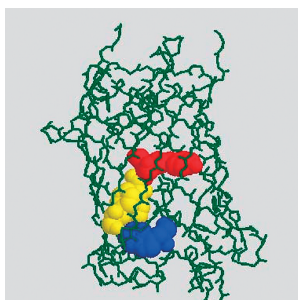
蛍光タンパク質の改変 —逆転の発想で欠点を利点に—

設楽 彰子

口腔生物学系生化学分野

蛍光タンパク質は多かれ少なかれプロトンに感受性を示し、酸性pHで蛍光が弱まる。そのため、ライブセルイメージングで蛍光強度を定量化し解析する場合、蛍光強度の変化がpHの変化に由来する可能性があることを常に念頭に置かねばならない。また、分泌顆粒やリソソームなどの酸性環境下では、蛍光強度が減少するため使いにくい。このようにpH感受性というのは、蛍光タンパク質のやっかいな特性のひとつである。

GFPに代表される蛍光タンパク質は、3つのアミノ酸からなる発色団とそれを囲むカゴのような形をしたβバレル構造からなる(右図)。蛍光色素は化学構造を変化させて色や特性を変えるが、約240個のアミノ



酸から構成される蛍光タンパク質はアミノ酸の置換により色や特性が変わる。フルオリンはそのようにして作られたGFP改変蛍光タンパク質のひとつである。このタンパク質は酸性下では蛍光をほとんど発しないが中性～アルカリ性では蛍光が増大するという特徴をもつ(最大約160倍)。pH感受性という本来問題となる蛍光タンパク質の特性も、pHによる蛍光変化が大きくなれば、逆にそれを利用してpHセンサーとして使うことができる。このような蛍光タンパク質型のpHセンサーは、ゴルジ装置やミトコンドリアなどの細胞小器官に特異的なタンパク質に結合することで、それらの小器官にのみ発現させることができる。これにより従来の蛍光色素型pHセンサーでは測定不能だった、細胞内小器官の中のpHの変化を測定することが可能となった(Matsuyama et al., Nat. Cell Biol., 2: 318–325, 2000)。

シナプス小胞膜にはプロトンポンプが存在し、その働きによって小胞内のpHは約5.6になっている。しかし、開口分泌の過程でシナプス小胞内腔が細胞外と連絡すると、小胞内のpHは細胞外液のpH7.4まで瞬時に変化す

る。このpH変化をフルオリンでとらえた場合、pH5.6から7.4の変化、すなわち開口分泌が起こると、フルオリンの蛍光は暗から明に大きく変化する。Miesenbockらはフルオリンを小胞膜タンパク質に結合させることで分泌顆粒内腔のpH変化をモニターし、個々の神経終末での神経伝達の様子を観察して分泌の様子を詳細に解析した(Miesenbock et al., Nature 394: 192–195, 1998)。

蛍光タンパク質にはpH感受性の他にも、光異性化や励起による活性酸素の発生など、ライブイメージングによる観察データを定量化する上で問題となる様々な性質がある。しかし、発想を変えればそのような特性はまったく新しい蛍光タンパク質の開発の可能性となりうる。我々がそのような改変蛍光タンパク質を開発するということはあまり現実的ではないが、様々な改変により生まれてきた蛍光タンパク質を「どのように使うか」を考えることはできる。現在、Evrogen, Amalgaam, Clontech, invitrogen等多くの企業から続々とおもしろい蛍光タンパク質が発売されているので、それらの自分なりの新しい使い方を考えてみるのも楽しいかもしれない。