



北海道大学  
HOKKAIDO UNIVERSITY



NATIONAL INSTITUTE FOR PHYSIOLOGICAL SCIENCES

平成21年 4月 3日

北海道大学・総務部広報課  
Tel : 011-706-2610

自然科学研究機構・生理学研究  
所・広報展開推進室  
Tel : 0564-55-7722/7723

## 世界最短波長の蛍光を発する 群青色蛍光タンパク質（シリウス）の開発に成功！

北海道大学電子科学研究所ナノシステム生理学研究分野の永井健治教授らは既存の蛍光タンパク質の中で最も波長の短い蛍光を発する群青色蛍光タンパク質を開発しました。

1990年代に緑色蛍光タンパク質（GFP）の遺伝子がクローニングされて以来、遺伝子改変により数多くの蛍光色変異体が開発されてきました。とりわけ緑よりも長波長の黄、橙、赤色の蛍光を発する蛍光タンパク質は数多く開発され、生命科学研究の様々な解析に貢献してきました。一方、短波長の青や紫色の蛍光を発する蛍光タンパク質は未だに種類が少なく、多くの研究者から長年その開発が求められていました。

本研究グループは蛍光タンパク質の発色団<sup>\*1</sup>とそれを取り巻くアミノ酸に変異を導入することで、紫と青色の間色である群青色の蛍光を発するタンパク質 **Sirius(シリウス)** の開発に成功しました。これにより、**15年ぶりに蛍光タンパク質の最短波長発光記録が更新**されました。Siriusは従来の蛍光タンパク質とは異なり、如何なる pH 条件下でも安定した蛍光を発する特徴を有し、これまで困難であった酸性環境下にある細胞内小器官内でのタンパク質動態の観察を可能にしました。また、Siriusを用いた Dual FRET<sup>\*2</sup>により、同一細胞内での複数の生理現象を可視化することも実現しました。

本研究は、北海道大学大学院理学院生命理学専攻修士課程の友杉亘君、ならびに自然科学研究機構生理学研究部の計画共同研究プログラムに基づく根本知己准教授らとの共同研究で行われました。

本研究成果は、米国科学誌『Nature Methods』の電子版で2009年4月6日（米国東部時間）に公開されます。

### 1. 背景

2008年のノーベル化学賞の受賞対象となった緑色蛍光タンパク質（GFP, Green Fluorescent Protein）は、1960年代に下村脩博士によってオワンクラゲから発見されました。さらに30年が経過して1990年代に GFP の遺伝子が単離され、生きた細胞にその遺伝子を導入するだけで蛍光を作り出すことができることが明らかになって以来、生物学研究における重要なツールとして、多くの研究者に利用されてきました。

現在までに、GFPを構成するアミノ酸の一部を他のアミノ酸に置換した GFP の蛍光色変異体が数多く開発され、また、サンゴやイソギンチャクなど、オワンクラゲ以外のたくさんの生物種から新しい蛍光タンパク質が発見されてきました。その結果、今では様々な蛍光色を発する蛍光タンパク質が存在しています。その中でも、とりわけ長波長の蛍光を発す

る蛍光タンパク質は2008年のノーベル化学賞を受賞したロジャー・ツェン博士によって数多く開発され、生命科学研究に大きく貢献してきました。一方、短波長の青色の蛍光を発する蛍光タンパク質は未だに種類が少なく、多くの研究者から長年その開発が求められていました。

## 2. 研究手法と成果

研究グループはシアン色の蛍光を発する GFP の変異体に着目し、発色団<sup>\*1</sup>を形成するアミノ酸の一つである、66番目のトリプトファンをフェニルアラニンに置換しました。この変異体では全く蛍光が観察されませんでした。蛍光の明るさが改善されることが期待される場所にアミノ酸の置換を導入したところ、紫外光を吸収し、群青色の光を発する蛍光タンパク質を得ることができました(図1)。さらに、このタンパク質全体にランダムにアミノ酸変異を導入することによって、蛍光の明るさを元の80倍まで改善させることに成功しました。この明るさを改善した群青色蛍光タンパク質を、恒星の中で最も明るい青色の星にちなんで“Sirius (シリウス)”と命名しました。

Sirius の吸収極大は355nm、蛍光極大は424nmであり、青色蛍光タンパク質 BFP の380nmおよび450nmよりも、さらに短波長側に移行しています。これは、1994年に BFP が報告されてから、実に15年振りに蛍光の最短波長記録を更新したことになります。蛍光色のバリエーションが増えることにより、従来では不可能だった細胞内の複数の部位やタンパク質を同時にかつ鮮明に可視化できるようになりました(図2)。

このような波長特性に加え、Sirius は、光で励起した際に、非常に褪色しにくい(BFP比で約60倍安定)という特性を持っています。さらにSiriusの驚くべき特徴は、pH感受性が皆無ということです。一般的に使われている蛍光タンパク質EGFPは、生理的条件であるpH7を下回る環境下では、急激に蛍光の明るさが減衰してしまいます。一方でSiriusは、強酸性下(pH3以下)においても、蛍光の明るさが全く変わらない蛍光タンパク質であることが分かりました。これらのSiriusの特徴を活かしたバイオイメージングの試みとして、Siriusを発現させた細菌をアメーバ細胞に餌として与え、酸性条件下で起こる食作用を2光子励起顕微鏡で捉えることを行いました(図3)。その結果、EGFPのようなpHに感受性をもつ従来の蛍光タンパク質では可視化が不可能であった細菌がアメーバに捉えられる瞬間から、食胞の中で完全に消化される一連の過程を観察することに世界で初めて成功しました。

また、Siriusの蛍光スペクトルは、シアン色の蛍光を発するCFPの吸収スペクトルと大きく重なることから、SiriusからCFPにFRET(蛍光エネルギー共鳴移動)<sup>\*2</sup>が効果的に起こることが分かりました。このSiriusとCFPのFRETペアと、Siriusと同じ紫外光で励起されて緑色の蛍光を発するuvGFPと赤色の蛍光を発するDsRedのFRETペアを併用することで、1つの励起波長で、4色の蛍光を観察する(1波長励起4波長測光)Dual FRETを試みました。その結果、HeLa細胞<sup>\*3</sup>のプログラム細胞死の過程で起こるカルシウムイオン濃度の動態と、カスパーゼ3の活性化を同時に可視化することに成功しました(図4)。従来のFRETによる生理機能観察では1つの現象しか捉えられなかったのに対し、研究グループが開発したDual FRET法では2つの生理現象を同時に捉えることが可能になり、複数の生理現象間の連関を生きた細胞を用いて解析する道を開きました。

### 3. 今後の期待

現在まで、エンドソームやファゴソーム、リソソーム等のような、酸性に保たれている細胞内小器官の中で起こっている一連の現象を、生きた細胞の中で、リアルタイムに観察することは非常に困難でした。pHに感受性の無いSiriusは、このような酸性条件下での定量的な観察に非常に有効なツールであり、今までブラックボックスであったイベントの解明に大きく役立つことが期待されます。

また、細胞内での複数のシグナル伝達が、どのようなタイミングで伝わっているのかということを実時間で調べることも、本研究で確立されたDual FRET法を用いることによって可能になり、シグナル間クロストークの包括的理解に貢献するでしょう。

この他にも研究グループが現在進めているSiriusのX線結晶構造解析によって、耐褪色性やpH非感受性、蛍光量子収率の増加に寄与する構造要因が解き明かされ、それらの知見をこれまで開発されている蛍光タンパク質の改変に応用することで、バイオイメージングに最も相応しい安定した光を放ち続ける蛍光タンパク質の各色ラインナップが開発できる可能性があります。

さらに、Siriusは太陽光の紫外線の約90%を占めると言われるUV-Aの波長の光を最も多く吸収し、これを生体組織に無害な可視光の蛍光に変換することから、紫外線による肌へのダメージを防ぐ、全く新しい日焼け止めとして用いることができるかもしれません。この他、群青色に発光する絹糸や園芸植物などの開発など様々な産業応用が期待されます。

## 補足説明

### ※1 発色団

分子内に存在し、ある特定の光を吸収して励起されると、蛍光を発することのできる構造単位。一般に有機化合物中で二重結合と単結合の繰り返しからなる、 $\pi$ 電子共役系をもつ原子団からなる。オワンクラゲ由来の GFP においては、セリン、チロシン、グリシンの 3 つのアミノ酸が、自己触媒的に環化、脱水、酸化を行い、蛍光発色団を形成することが知られている。

### ※2 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)

エネルギー供与体 (ドナー) となる蛍光タンパク質の励起エネルギーが、エネルギー受容体 (アクセプター) となる別の蛍光タンパク質へ移動する現象のことを指す。FRET が生じるためにはドナーとアクセプターが 10nm 以内に接近しなければならない。また、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルの重なりが大きいほど FRET 効率が大きくなる。FRET をうまく利用することによって、カルシウムイオン等の生体分子の濃度変化や生体内に存在するタンパク質の構造変化・相互作用などを生きた細胞内でリアルタイムに観察することができる。

### ※3 HeLa 細胞

子宮頸ガン由来の上皮様細胞株。

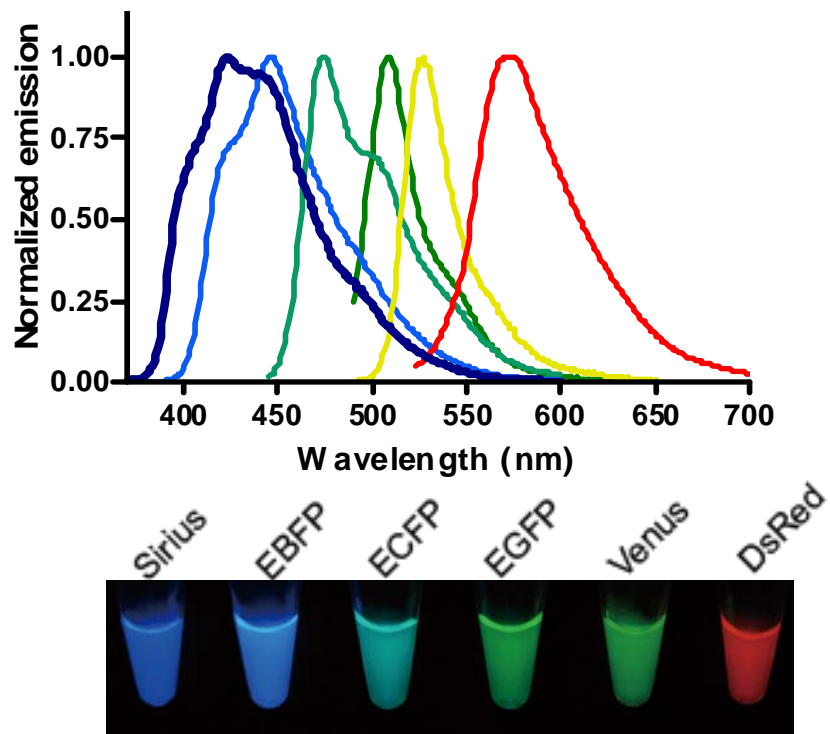


図1. GFPの変異体である群青色蛍光タンパク質 Sirius  
 既存の蛍光タンパク質と群青色蛍光タンパク質 Sirius の蛍光スペクトル(上図)。さらに、これらの蛍光タンパク質を精製し、励起した(下図)。左から、Sirius、EBFP、ECFP、EGFP、Venus、DsRed。Sirius が最も波長の短い蛍光を発する蛍光タンパク質であることが分かる。

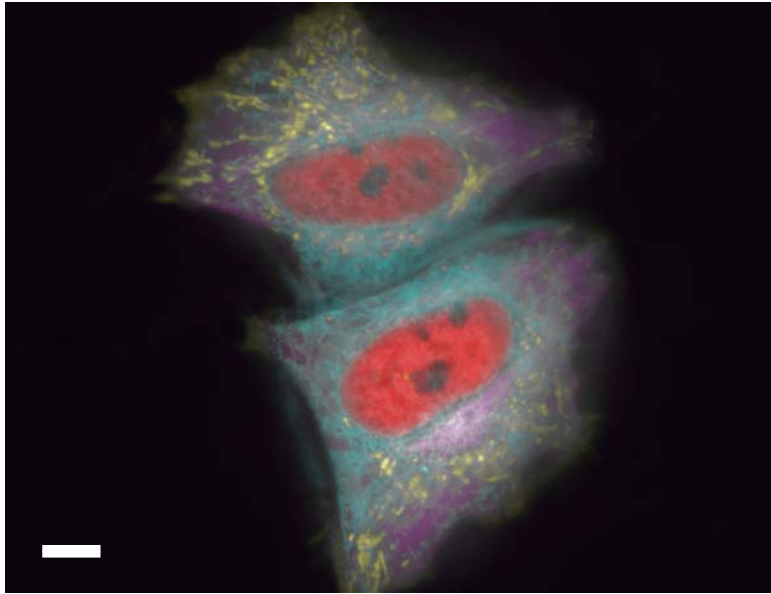
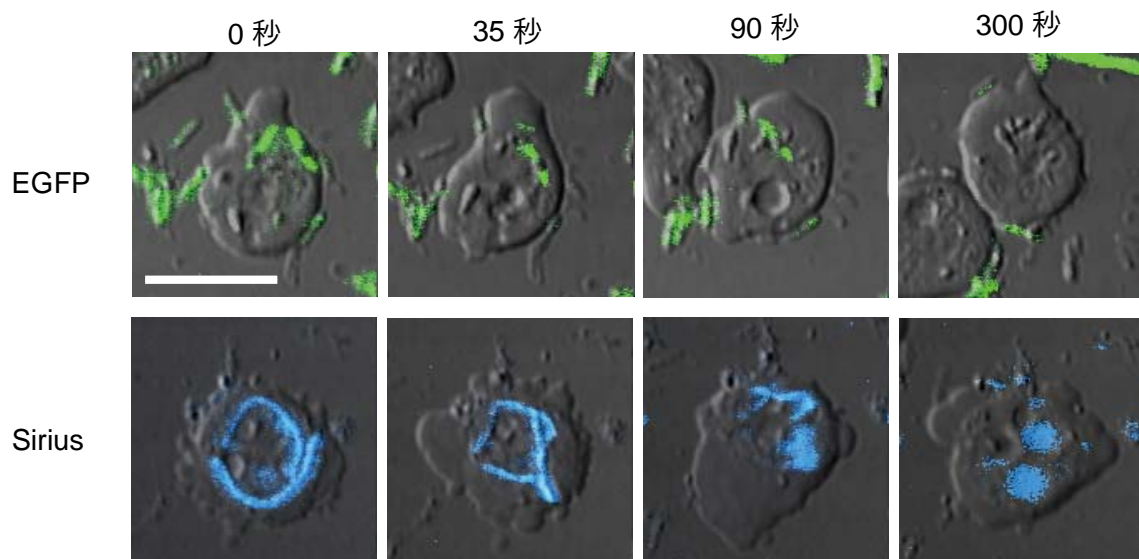
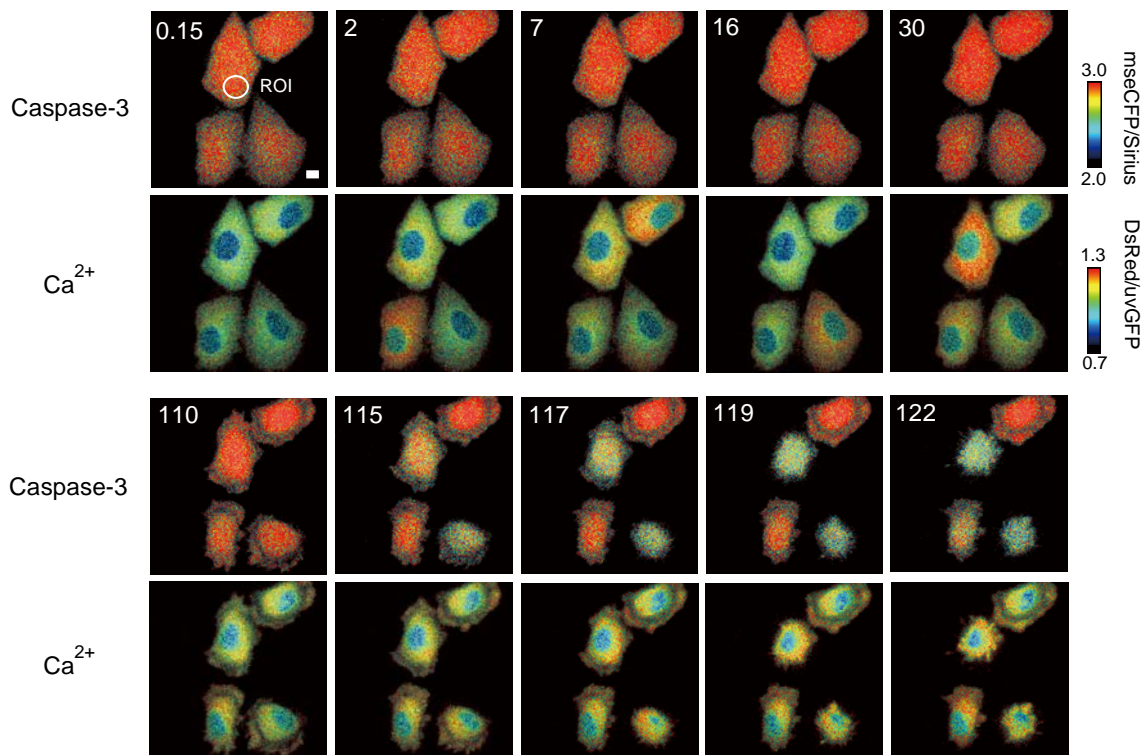


図 2. Sirius を含む 4 つの蛍光タンパク質で 4 重染色した HeLa 細胞  
細胞の中の核に Sirius、小胞体に mseCFP、ミトコンドリアに Venus、  
微小管に mCherry を発現させ、それぞれ可視化した。右図はこれらの  
画像を重ね合わせたものである。4 重染色しても、それぞれの細胞小  
器官およびタンパク質を、明確に可視化することができた。



**図 3. Sirius を発現させたバクテリアをアメーバに餌として与えたときの一連の挙動の可視化**

比較対象として EGFP を発現させたバクテリアを餌としてアメーバに与えたところ、バクテリアが消化されるのとほぼ同時に、EGFP の蛍光が見られなくなった（上図）。一方、Sirius を発現させたバクテリアは、消化された後も蛍光を発し続けた（下図）。



**図 4. Dual FRET を用いることによる、自己細胞死する細胞内のカルシウムイオン濃度の動態と、カスパーゼ 3 の活性化の同時観察**  
 Sirius と GFP の間で起こる FRET の効率の変化により、カスパーゼ 3 の活性化を可視化した (上段)。細胞が赤色から青色になるほど、カスパーゼ 3 の活性化が起こっている。さらに、uvGFP と DsRed の FRET ペアを用いたカルシウムイオン濃度センサー (SapRC2: Mizuno et al., *Biochemistry*, 2001) も同時に発現させることにより、カルシウムイオン濃度を同時に可視化した (下段)。細胞が青色から赤色になるほど、カルシウムイオンの濃度が高くなっている。



(お問い合わせ先)

<研究に関すること>

永井 健治 (ながい たけはる)  
北海道大学電子科学研究所 教授  
〒001-0020 札幌市北区北 20 条西 10 丁目  
Tel : 011-706-9438 / Fax : 011-706-9443  
E-mail : tnagai@es.hokudai.ac.jp

<報道担当>

北海道大学 総務部 広報課  
菅原 暁子 (すがわら あきこ)  
〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目  
Tel : 011-706-2610 / Fax : 011-706-4870  
E-mail : kouhou@jimuhokudai.ac.jp

自然科学研究機構 生理学研究所 広報展開推進室  
小泉 周 (こいずみ あまね) 准教授  
〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中 3 8  
Tel : 0564-55-7722 / Fax : 0564-55-7721  
携帯 Tel : 090-9936-3794  
E-mail : public@nips.ac.jp

※この情報は、科学記者会、北海道教育庁記者クラブ加盟各社、岡崎市政記者会へ提供しています。