Green Fluorescent Protein を用いた 新しいプローブの開発

理化学研究所脳科学総合研究センター先端技術開発センター
細胞機能探索技術開発チーム 宮脇敦史

The green fluorescent protein (GFP) of the jelly fish *Aequorea victoria* is a spontaneous fluorescent protein that can be incorporated into other proteins by genetic fusion. One of our approaches is to use two GFPs of different colors to permit fluorescence resonance energy transfer (FRET), which is highly sensitive to the relative orientation and distance between the two fluorophores and alters the ratio of their emission intensities. For example, cameleons are genetically-encoded fluorescent indicators for calcium. I describe here potentially unique features of GFP-based FRET, which would allow us to make probes for many intracellular signaling events that are currently assayed by grinding millions of cells.

GFP / FRET / cameleon / calmodulin / β -can

1. はじめに：有機蛍光プローブ概説

蛍光の特性をうまく生かして細胞内の事象を調べる探索子、いわゆる蛍光プローブにはどんなものがあるのだろうか。例えば Molecular Probes 社のカタログ、“Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals” (第6版) をひもといて、目次を眺めてみよう。Probes for cytoskeletons, organelles, phospholipids, cell-viability, cell proliferation, receptors, ion channels, signal transduction, reactive oxygen species, pH, membrane potential, ions such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ ... と多種多様である。これらのほとんどは有機蛍光性分子（有機化合物）である。

蛍光プローブは大きく2つのグループに分けられる。溶媒の極性やpHなどの環境条件に依存して蛍光の性質が敏感に変わる微小環境プローブと、そうでない非微小環境プローブである。微小環境プローブの一例として、ANS (1-アニリノナフタレン-8-スルホン酸) が有名である。水溶液中では弱い蛍光を発するが、有機溶媒中、あるいは血清アルブミンの疎水領域に吸着されると、非常に強い蛍光を発する（量子収率が200倍近くまで増大する）。いわゆる hydrophobic probe の1つで

あり、これまでタンパク質の高次構造の変化や、高分子間相互作用の解析に大きく貢献してきた。一方、蛍光の偏光解消によって分子の回転運動を調べたり、蛍光のエネルギー移動によって2分子間の距離、配向を調べる際には、プローブは環境変化に対して無関心でなければならない。よって非微小環境プローブを用いる必要がある。

ただし、有機蛍光分子を概観するのに、上記のような2元的な分類が必ずしも妥当とは言い難い。蛍光団（発色団）がほとんど裸の状態にあるため、完全な非微小環境プローブは存在しえない。要するに程度問題に帰着する。また、微小環境プローブは環境変化に対する特異性の問題を抱えている。だいたいそういうプローブは多感で、ある環境変化に敏感なものは少なからず他の環境変化にも感じやすいものである。蛍光の特性の変化を、観測対象のどういう変化に帰因できるのかが曖昧になることが多い。さて次章からは、以上のような事柄を、いよいよ green fluorescent protein (GFP) を用いたプローブにスポットライトを当てて考察していこう。

2. GFP と蛍光エネルギー移動 (FRET)

GFP は、自ら発色団を形成して蛍光を発するタンバ

Green Fluorescent Protein-based Probes

Atsushi MIYAWAKI

Laboratory for Cell Function and Dynamics, Brain Science Institute, RIKEN

図1 改変GFPの吸収(励起)スペクトル(X)と、発光スペクトル(M)

(a) BFP(破線)とGFP(実線). (b) CFP(破線)とYFP(実線). 縦軸は相対的スペクトル強度.

ク質である. 1992年, その遺伝子がオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) から単離され, その後今日に至るまで爆発的な勢いで, ことに細胞生物学への応用が達成されてきた¹⁾. また, アミノ酸置換により GFP (緑) から, BFP (青), CFP (シアン, 青緑), YFP (黄) などの改変GFPが作製されている (図1). 異なる色の改変GFPを使って蛍光のエネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) を実現すれば, 生きた細胞内でタンパク質-タンパク質相互作用や, タンパク質の構造変化をリアルタイムに観察することができる. 先述したように, FRETは分子間の距離, および配向に関する情報を与えてくれるからだ. FRETとは, エネルギー供与体 (donor) の蛍光スペクトルと, エネルギー受容体 (acceptor) の吸収スペクトルに重なりがある場合, この2つの分子間の距離が小さく, また両分子の双極子モーメントが適切な方向関係にあると, donorからの発光が起こらないうちに, その励起エネルギーがacceptorを励起してしまう確率が高くなる現象をいう²⁾. acceptorが蛍光分子であれば, acceptor固有の蛍光が検出される. FRETの効率は, donor-acceptor間距離(r)と, donorの発光モーメントとacceptorの吸収

モーメントとの相対的角度 (配向因子, κ^2) に依存する. ところでフルオレセインやローダミン等の有機蛍光分子は, 分子量が小さく, 長いスパーサーを介してタンパク質に付加されることが多い. こういう場合, 蛍光分子は速い回転運動をしており, donorの発光モーメントおよびacceptorの吸収モーメントはあらゆる方向に等方的に分布すると仮定し, 配向因子を無視することができる. するとFRET効率はdonor-acceptor間距離の6乗に反比例することになる³⁾. 50%のFRET効率を与える距離を R_0 (Förster distance) と呼び, donor-acceptorのペアに固有の値である.

3. GFP-based FRET

GFPを用いたFRET (GFP-based FRET) で何かしら面白い蛍光プローブを創ってみたいというのが, 数年前の筆者の夢であった. FRETを行って細胞内のタンパク質の挙動をリアルタイムに観察しようとする際, 有機蛍光分子の利用 (通常のFRET)⁴⁾ と比べて, GFPの利用 (GFP-based FRET) の長所, 短所は何なのか. 我々はいかにその長所を活用し, また短所を回避すべきか. 当時は始終そんなことを自問自答していた.

GFP利用がもたらす利点, GFP-based FRETの長所として次の3つが挙げられる.

長所1) タンパク質の精製, 化学修飾, 細胞内注入といった煩わしい過程をスキップできる. もちろん外来タンパク質の発現が可能な場合に限られるが, 近年の, 遺伝子導入技術の目覚ましい進歩を目の当たりにしていると, 楽観的にならざるを得ない. ジーンガン (遺伝子銃) 等の機器や, 各種ウイルスベクター系の開発, 形質転換動植物の作製…等の技術革新を鑑みるに, GFP利用の制約は今後ますます小さくなるものと思いたい.

この長所1) は, GFP-based FRETに限らず, 広くGFP技術の簡便性を表しているが, 次の2点は, 定量的なFRETを効率良く実現するために重要である.

長所2) 化学修飾法によるタンパク質の蛍光ラベルは不確定性要素を伴う. タンパク質1分子あたり何個の有機蛍光分子がどの部位に付加されているかは, ある程度コントロールできるものの厳密にはわからない. 一方GFPとの融合タンパク質では, うまくデザインすれば, その分子的均一性, およびホストタンパク質とGFPとのシンプルなストイキオメトリー (量比) が, 遺伝子情報として規定できる.

長所3) 総じてGFPは, 有機蛍光分子よりも環境変化に対して鈍感である (非微小環境プローブ). したがってFRETのdonor, acceptorとしてふさわしいと考えられる.

4. GFP の3次元構造

数年前にもどって、筆者はあるリガンドの結合に依存して起こるタンパク質の構造変化に興味をもっていた。そのタンパク質のN, C末端にdonor (BFP), acceptor (GFP) を融合して、BFPからGFPへのFRETを測ることでリガンドの結合をモニターしよう、さらにはリガンドの指示薬を作製しようと企てていたのである。配向因子を無視した上で、BFPの発光スペクトルとGFPの吸収スペクトルの重なりから、BFP-GFPペアの R_0 は約4 nmと計算されていた。コンピューター上でさまざまなタンパク質の3次元構造を眺めながら、どうdonor, acceptor GFPを融合すべきか頭を捻っていた。当時はまだGFPの3次元構造がわかっておらず、そういったキメラタンパク質のデザインに苦心した。そんなある日突然、ボスのTsien博士がある宿題を突きつけてきた。GFPが1.3 mg/mlの密度をもった球状のタンパク質 (26 kD) で、その発色団がタンパク質の中心に位置すると仮定して、donor, acceptor のGFPの発色団が接近できる最短距離はいくらか、という算数の問題だった。GFPの半径 r は次の式から求められる。

$$1.3 \text{ (mg/ml)} \times 4/3\pi r^3 = 26 \times 10^3 \times 1.661 \times 10^{-27} \text{ (kg)}$$

早速 $r=2 \text{ nm}$ と算出したが、このとき、これは由々しき問題かもしれないと危惧した。たとえBFPとGFPが接触したとしても、二つの発色団は4 nmの距離で隔てら

れることになる。4 nmというのはこのdonor-acceptorペアの R_0 に他ならない。GFP-based FRETでは、50%を超えるFRETを得ることは不可能なのか？ 一方、通常のFRETでは、有機蛍光分子が小さいが故に、donorとacceptorはその R_0 をはるかに下回る距離で接近し、高いFRET効率を実現できる。

Aequorea GFPの3次元構造を我々が観賞できるようになったのは1996年のことである。2つのグループが独立に、大腸菌に作らせたリコンビナントGFPを材料にして結晶構造を解明した^{5,6}。GFPの全体の構造は、11個の β -strandで編まれたバレル (樽) から成り、“ β -can” というニックネームが付けられている。その中を一本の α -helixが上下に貫いており、発色団はこのhelix上に形成される。図2に見られるように、GFPは長さ4.2 nm、直径2.4 nmの円筒状構造をとり、その中心に発色団を持つ。当初危惧したように、2つの発色団が十分に接近できない状況は否定できないが、両者の配向因子さえ良ければ大きなFRET効率を観察することができる (筆者、未発表データ)。また、発色団が外の溶媒からほとんど隔離される結果、確かにGFPは消光分子による影響を免れて安定な蛍光を保てることもこの結晶構造は示唆している。しかしながら、最近になって、GFPのpH感受性がクローズアップされてきた。総じてpHが低下するとGFPの蛍光は弱くなる。現存の改変GFPは、さまざまなpH感受性 (pK_a) を示している。そして、著しいpH感受性を示す改変GFPは、それ自身で

図2 改変GFP (S65T mutant) の結晶構造のステレオ像。形成された発色団がBall & Stickで示してある。

pH指示薬としても使えることが実証されている^{7), 8)}.

5. 新規カルシウム指示薬cameleon

図3は、トロント大学の伊倉光彦博士と共同で開発した、新規 Ca^{2+} 指示タンパク質、cameleonの分子構造モデルである。伊倉博士らが作製したハイブリッドタンパク質は、CaM（カルモジリン）とM13（標的ペプチド）が2つのグリシン残基で連結されており、 Ca^{2+} に依存した可逆的構造変化を示す⁹⁾。すなわちCaMが Ca^{2+} によって活性化されるとM13を包み込み、complex formを形成する。一方、 Ca^{2+} がないとM13はCaMから突き出され、全体としてextended formをとる。

さて、問題はdonor（BFP）とacceptor（GFP）をこのハイブリッドタンパク質（CaM-M13）にどのように融合させるか、どのようなリンカーを用いるか、である。CaM-M13の構造変化を最大限にBFPとGFPの相対的位置関係の変化に変換すべく、筆者は固いリンカー使用を試みた。そうしてキメラタンパク質全体の中でグニャグニャ動く支点が唯一、CaMとM13との間の連結部位（2つのグリシン残基）となるようにデザインした。具体的には、まずBFPのC末端から11個のアミノ酸を除去した。BFPのみならず一般にGFPのC末端はふらふらしていて、X線結晶構造解析ではその位置が決定されない。この部分を除去しないと、BFPとCaMがブラブラの状態でつながることになり、実際にFRETは Ca^{2+} の有無で大きく変化しなかった（筆者、未発表データ）。また、リンカー部位にグリシン残基を導入しないよう努めた。

ところが、固いリンカーの使用によって、他のタンパク質を融合させることが負荷となって起こるGFPのミスフォールディング、発色団形成効率の低下、という問題に直面することとなった。その他にも、大腸菌の可溶性画分に回収されるキメラタンパク質量の低下、キメラタンパク質の分解など考慮すべき点が多かった。GFP-based FRETの長所²⁾で、キメラタンパク質の分子の均一性を指摘したが、“うまくデザインすれば”と断ったのにはこのような理由があったのである。とにかくこうした淘汰を経て Ca^{2+} 指示タンパク質cameleonは誕生した（cameleon-1）¹⁰⁾⁻¹²⁾。 Ca^{2+} に依存する、BFPからGFPへのFRET効率の増大が得られるため、donorを特異的に励起し、donorとacceptorからの蛍光の比をとれば、それが絶対的 Ca^{2+} 濃度に対応づけられる。ただしBFPとGFPの、両発色団間の距離の変化と、両双極子モーメントの相対的角度の変化と、どちらがより大きくFRETの変化に寄与しているかは、現時点ではわからない。

6. cameleonの進化

cameleonは、その後以下の3段階の進化を経験した。

1) cameleon-1 → cameleon-2

Clontech社が売り出したEGFP（efficient GFP）は、発色団形成を促進する変異をもち、さらに哺乳類細胞での翻訳効率を高めるコドンが使われている。cameleon-2は、BFP、GFPの代わりにEBFP、EGFPをもつ。cameleon-1をcameleon-2に切り換えて初めて、HeLa細胞での Ca^{2+} イメージングが可能になった。

図3 (yellow) cameleonがカルシウムイオンを感知するメカニズム

2) *cameleon-2* → *yellow cameleon-2*

cameleon-2 は短波長励起型 Ca^{2+} 指示薬である。donor の EBFP を紫外光で励起するからである。ところが紫外光照射に伴う細胞のダメージ、指示薬 (EBFP) のブリーチング、自家蛍光 (NADH, NADPH) の検出による背景光の増大、および caged 化合物の併用不可などの問題点が無視できなくなった。一方、ECFP, EYFP もまたそれぞれ donor, acceptor として FRET を実現するよいペアになることがわかった。そこで EBFP, EGFP の代わりに ECFP, EYFP を組みこんで長波長励起型 *cameleon* を作製し、*yellow cameleon-2* と名付けた。

3) *yellow cameleon-2* → *yellow cameleon-2.1*

最近になって、EYFP の中性領域における pH 感受性が明らかになった。細胞外刺激によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ だけでなく、pH もまた変化する状況では、正確な Ca^{2+} イメージングができない。EYFP の発色団の近傍に、2 つのアミノ酸置換を加えると (EYFP-V68L/Q69K)、低 pH に対してある程度抵抗性を示すことを筆者は発見し、これを EYFP の代わりに取り入れて、pH 変化に感受性を示さない *yellow cameleon-2.1* を作製した¹³⁾。現在最も進化した *cameleon* であり、さらにここから派生して、異なる Ca^{2+} 親和性を有する *yellow cameleon-3.1*, *yellow cameleon-4.1* などが生まれた。

さて、ECFP-EYFP-V68L/Q69K ペアの R_0 は 5 nm と計算される。EBFP-EGFP ペア ($R_0 = 4$ nm) よりも高い効率の FRET を起こすことができる。分子間 FRET を用いてタンパク質-タンパク質相互作用を検出するには、ECFP-EYFP-V68L/Q69K ペアの方がはるかに有利である。タンパク質が解離した状態では大抵の場合 FRET 効率 = 0 % と見なして良いから、会合状態での FRET 効率が高い程、より大きな FRET 変化が得られることになるからだ。一方、分子内 FRET の場合は、基底レベルでの FRET 量も上昇するため、事情は多少込み入ってくる。というわけで、EBFP-EGFP ペアを ECFP-EYFP-V68L/Q69K ペアに切り換えるにあたり、 Ca^{2+} に依存するより大きな FRET の変化を求めて、M13 と acceptor との間のリンカーの長さおよびアミノ酸組成を改めて最適化する必要があった。

7. GFP-based FRET の pH 感受性

FRET は donor から acceptor へのエネルギーの受け渡しである。donor の量子収率 (quantum yield)、acceptor の吸光度 (absorbance) は FRET 効率を決定する重要なファクターである。アメリカンフットボールでたとえるなら、パスの成功率がクォーターバックの throwing ability とレシーバーの catching ability によることに

似ていると思う。pH 変化に動かない FRET を得るには、donor の量子収率と acceptor の吸光度が pH に対して抵抗性をもつことが必要である。FRET を起こす donor, acceptor として、EBFP-EGFP, ECFP-EYFP-V68L/Q69K の 2 つのペアがある。筆者はこれら 4 つの改変 GFP の量子収率、吸光度の pH 感受性を体系的に調べてみた。あいにく EBFP, ECFP は pH 感受性の量子収率を、かたや EGFP, EYFP-V68L/Q69K は pH 感受性の吸光度をもつことがわかった。現時点で GFP-based FRET は、どちらのペアを用いても、多かれ少なかれ pH 変化によって影響を受けるという事実を我々は認識しなければなら

ない。一方、donor の吸光度、acceptor の量子収率はそれ程重要ではない。この 2 つのパラメーターが pH に感受性を示しても、実質的な FRET 効率はあまり影響を受けない。GFP-based FRET の将来を展望するに、EGFP は pH に無関心な量子収率を有するので、望ましい donor となり得るだろう。pH 抵抗性の吸光度をもった red fluorescent protein (RFP) などができれば、EGFP と併せて理想的な FRET ペアとなる。筆者の夢見る red *cameleon* の作製も可能となるにちがいない。

8. GFP-based FRET 効率の簡便的 *in vitro* 定量法

Ca^{2+} に依存して起こる *yellow cameleon-2.1* の蛍光スペクトル変化を図 4 に示した。 Ca^{2+} の有無で、EYFP-V68L/Q69K (528 nm) と ECFP (476 nm) のピーク比が、2.5 倍程度変化することがわかる。測定の最後にサンプルをトリプシンで処理し、ECFP と EYFP-V68L/Q69K とを完全に引き離し、FRET = 0 % の状態でのスペクトルをとると、ほとんど ECFP 単独の場合と同じスペクトルが得られる。この際、ECFP の蛍光が増大することが、トリプシン処理前に FRET が起こっていたことを裏付ける証拠となる。FRET により励起エネルギーを分け与えていた相手 (EYFP-V68L/Q69K, acceptor) が急に消滅した結果、ECFP (donor) の自分自身の蛍光量が増えることになる。およそすべての GFP がタンパク質分解酵素に対して抵抗であるからこそできる技である。キュベット内に donor GFP, acceptor GFP の両者を含むサンプルにおいて、FRET が起こっているかを調べる上で、このトリプシン処理は、簡便かつ定量的方法である。一般に FRET の効率 (E) は次式で表される。

$$E = 1 - F_{\text{da}}/F_{\text{d}}$$

F_{da} : acceptor がある時の donor の蛍光強度

F_{d} : acceptor がいない時の donor の蛍光強度

図4 yellow-cameleon-2.1 の *in vitro* における蛍光スペクトル。
カルシウム存在下 (破線)、カルシウム非存在下 (実線)、およびトリプシン処理後 (点線)。励起波長は432 nm。ECFP、EYFP-V68L/Q69Kのそれぞれの蛍光のピーク波長 (476, 528 nm) を下に示した。

EYFP-V68L/Q69Kは476 nmにて何ら蛍光を示さない
ので、この波長での蛍光はもっぱらECFP由来と言え
る。したがって図4のa, b, cがそれぞれ F_d , F_{da} ($-Ca^{2+}$), F_{da} ($+Ca^{2+}$) に相当する。この場合、yellow
cameleon-2.1のcomplex form, extended formにおける
FRET効率は、54%, 25%と計算できる。

9. おわりに 微小環境プローブとしてのGFP

以上では、敢えてGFPを非微小環境プローブと見なし、GFP-based FRETに絞って議論してきた。しかしながら、さまざまな改変GFPの物理化学的特性を研究するうちに、いくつかの改変GFPが微小環境プローブとして細胞生物学に応用できることがわかってきた。紙面の都合上詳述は避けるが、たとえば2波長励起1波長測光型⁷⁾、あるいは1波長励起1波長測光型⁸⁾のpH指示タンパク質が報告されている。また β -can構造にメスを入れて、環境の変化に敏感な改変GFPを積極的に創りだすことが試みられている。今後GFP-based FRETと並んで、GFPを用いたプローブ創製の1モードになると期待したい。

文 献

- 1) Tsien, R. Y. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544.
- 2) 木下一彦, 御橋廣真 編 (1983) 蛍光測定——生物学への応用, 学会出版センター.
- 3) Stryer, L. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819-846.
- 4) Adams, S. R. *et al.* (1991) *Nature* **349**, 694-697.
- 5) Ormo, M. *et al.* (1996) *Science* **273**, 1392-1395.
- 6) Yang, F. *et al.* (1996) *Nat. Biotechnol.* **14**, 1246-1251.
- 7) Miesenböck, G. *et al.* (1998) *Nature* **394**, 192-195.
- 8) Llopis, J. *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6803-6808.
- 9) Porumb, T. *et al.* (1994) *Protein Eng.* **7**, 109-115.
- 10) Miyawaki, A. *et al.* (1997) *Nature* **388**, 882-887.
- 11) 宮脇敦史 (1998) 細胞工学 **17**, 584-596.
- 12) 宮脇敦史 (1998) 蛋白質 核酸 酵素 **43**, 1931-1938.
- 13) Miyawaki, A. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2135-2140.