

# 刺胞動物と蛍光タンパク質

宮脇 敦史

理化学研究所

脳科学総合研究センター

Fluorescent proteins found in cnidarian animals

A. Miyawaki

## 1. *Aequorea* GFP

昨今の細胞生物学、分子生物学の分野で大活躍する GFP (Green Fluorescent Protein) と言えば *Aequorea* GFP, すなわちヒドロ虫類に属する *Aequorea victoria* (オワンクラゲ) に由来するものを指すことが多い。*Aequorea* GFP は、オワンクラゲにおいて化学発光タンパク質、Aequorin (エクオリン) の青色の光 (極大 470 nm) を緑色の光 (極大 508 nm) にシフトするタンパク質として、1962 年、下村 脩博士らによって発見された (Shimomura *et al.* 1962)。このように、生物発光には化学発光タンパク質の本来の短波長光を放射するかわりに、その励起エネルギーを蛍光タンパク質 (GFP) に移動させ、より長波長の光を放射するしくみがみられる。エクオリンは、アポエクオリンと、酸素分子と、発光基質であるセレンテラジンから構成される。この化学発光タンパク質複合体にカルシウムイオンが結合すると、タンパク質部分 (アポエクオリン) の高次構造変化に伴いセレンテラジンが酸化反応を受けてセレンテラミドに変わる。セレンテラミドは発色団として働く。これとアポエクオリンとの複合体が青色発光タンパク質である。試験管内で、カルシウム添加によるエクオリンからの青色発光を観察することができる。しかしクラゲの発光器官では、青色発光タンパク質の励起状態のエネルギーが GFP に移動するため、海の中で観察される光は緑色である。エクオリンと *Aequorea* GFP との間で起こるエネルギー移動の効率は極端に高いが、その詳細な機構はまだよくわかっていない。発光の長波長シフトは、恐らく光をより遠くまで飛ばすのに効果的であろうと推察される。いささか深い暗い海中で、クラゲは緑色の光を使って求愛したり、敵をひるませたり、獲物を誘ったりするのである。

*Aequorea* GFP が重宝される理由は、それが自己完結的に蛍光活性を獲得できる点にある。生体中存在する蛍光タンパク質と言っても、例えば、ラン藻、紅藻、クリプト藻の光合成色素、フィコビリタンパク質は強い長波長の蛍光を発するが、そこではタンパク質部分のシステイン残基にチオエーテル結合を介して結合するテトラピロール化合物 (非タンパク質性分子) が発色団として働いている。一方、*Aequorea* GFP の発色団は、ペプチドに由来し (すなわち非タンパク質性の発光素や補因子などはない)、また発色団生成にオワンクラゲ特有の酵素系が必要ないため、ただ *Aequorea* GFP の遺伝子を導入することで蛍光をさまざまな細胞のさまざまな部位に創り出せるのである。*Aequorea* GFP の遺伝子 (cDNA) は 1992 年に Prascher らによってクローニングされ (Prasher *et al.* 1992)、1994 年に光る線虫や大腸菌が報告され (Chalfie *et al.* 1994; Inoue and Tsuji 1994)、その機能的異所性発現が証明された。

## 2. *Aequorea* GFP 発色団形成の反応機構と Can 構造

図 1 に *Aequorea* GFP の一次構造 (アミノ酸配列) を示す。238 個のアミノ酸から成るタンパク質の 65 ~ 67 番目のアミノ酸から成るトリペプチド (セリン、チロシン、グリシン) から、発色団 p-hydroxybenzylideneimidazolinone が形成される (図 2)。“p-hydroxybenzyl” が構造式左側の六員環 (フェノール) に、“imidazolinone” が右側の五員環の部分に、それぞれが相当し、両方が “idene” によって結ばれていると容易に察しがつく。蛋白質全体が 3 次元的に折りたたまれた (図 2-A 図 2-B) あと、セリン (65) のカルボニル基とグリシン (67)

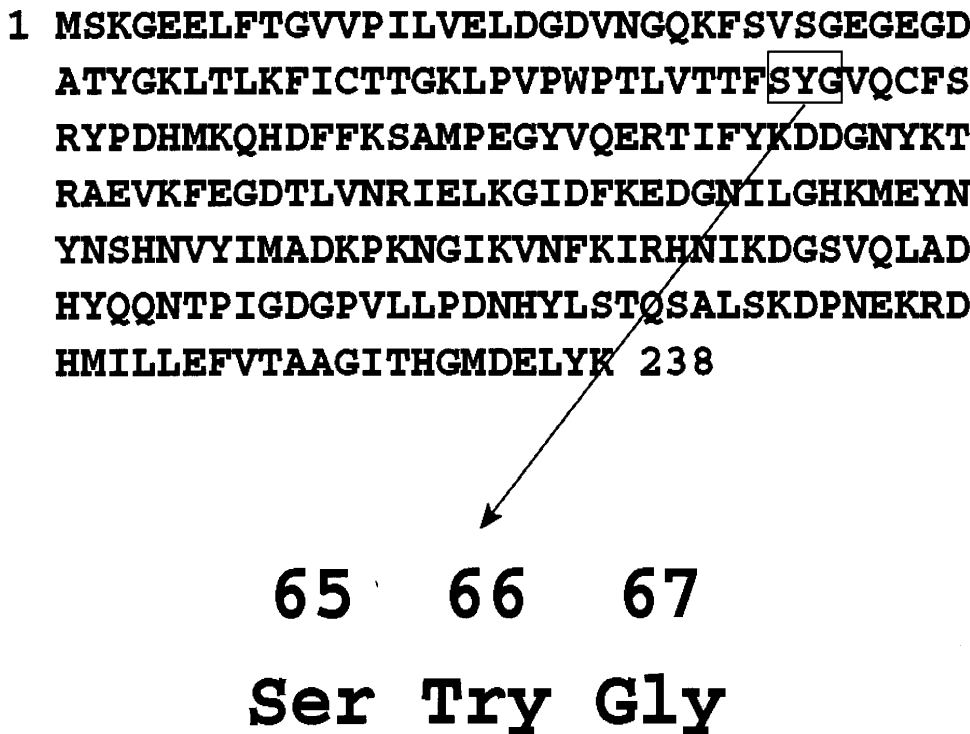


図1. *Aequorea* GFPのアミノ酸配列。  
 発色団を形成する3つのアミノ酸セリン(S)、チロシン(Y)、グリシン(G)を太字で表した。

のアミド基とが反応し環化が起こる(図 2-B 図 2-C)。引き続き、脱水により imidazolinone ができあがる(図 2-C 図 2-D)。環化および脱水反応は速やかに進むと考えられている( $t_{1/2} \sim 3\text{min}$ )。この段階ではまだ六員環と五員環の電子はつながっていない。最後に分子状酸素による酸化を経て、チロシン(66)の  $\pi$  結合が脱水素化され、p-hydroxybenzylideneimidazolinone ができる(図 2-D 図 2-E)。六員環と五員環とをつなげるように共役二重結合が拡がり、電子が大きく非局在化された構造となる。*Aequorea* GFP の発色団形成において律速になるのは、この酸化反応である( $t_{1/2} \sim 19 \sim 83\text{min}$ )。トリペプチドの環化反応が起こるためには、最後のアミノ酸がグリシンであることが必要であることがはっきりしてきた。

1996 年、2 つのグループが独立に、大腸菌に作らせた *Aequorea* GFP を材料にして結晶構造を解明した(Ormo *et al.* 1996; Yang *et al.* 1996)(図 3)。11 個の鎖で編まれたバレル(樽)と、その中を

上下に貫く 1 本のヘリックス。“can”というのが、この構造のニックネームである。先述の発色団は、このヘリックス状に形成され、can のほぼ中央で固定された状態にある。発色団は外の溶媒からほとんど隔離される結果、GFP は消光分子による影響を免れて安定な蛍光を保てる。これも、*Aequorea* GFP が細胞生物学者に好まれる理由の一つである。

### 3. *Aequorea* GFP 以外の蛍光タンパク質

オワンクラゲと同様に、ヒドロ類のヤクチクラゲ(*Obelia*)、サンゴ虫類(八放サンゴ類)のウミシイタケ(*Renilla*)も GFP をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に基づく生物発光とカップルさせて保有している。そうして化学発光タンパク質が短波長の光を放射するかわりに GFP が緑色の光を放射する、といった蛍光のエネルギー移動がみられる。筆者は 1997 年頃、カリフォルニア大学サンディエゴ校スクリップス海洋研究所の友人に頼んで獲ってきてもらっていたウミシイタケを飼育していた。こぶし大のこの生き物は手で触れるとポリープの先端がパッパッと間欠的に光る。ポリープを選択的に集め、ここから mRNA を調整して cDNA library を作製したが、結局 *Renilla* GFP の遺伝子を釣ることはできなかった。1999 年 5 月、サンディエゴで開かれた第 2 回国際 GFP 学会で、米国プロルーム社は *Renilla*

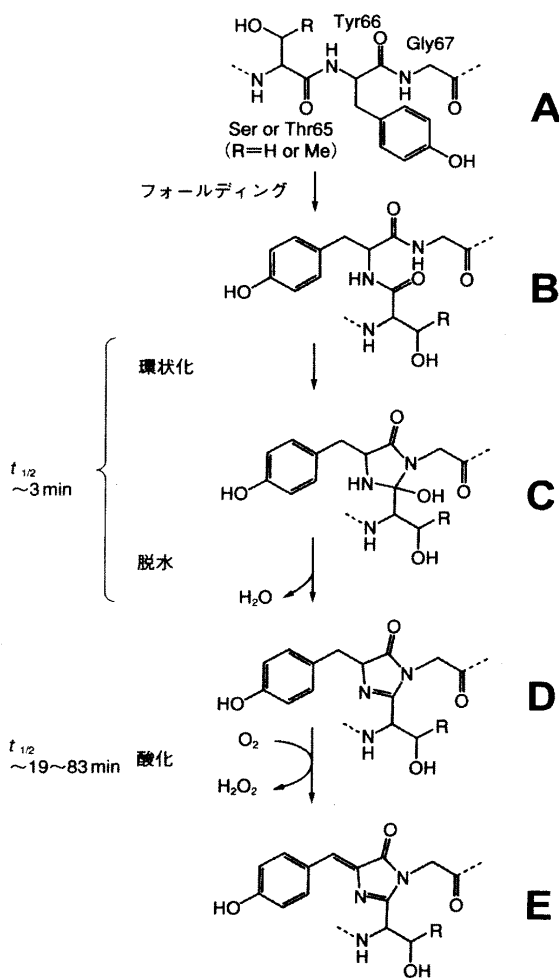


図2. Aequorea GFPの発色団の形成機構。

GFP 遺伝子のクローニングを発表した。伝え聞くとところによると、多勢のダイバーと分子生物学者を雇ったそうだ。現在 Renilla GFP の遺伝子は、米国 Stratagene 社から売られている。Obelia GFP 遺伝子クローニングの報告はまだ聞かない。

1999 年秋、ロシアのグループと CLONTECH 社が協同で 6 つの新しい蛍光タンパク質の遺伝子クローニングを報告した(Matz *et al.* 1999)。素材となった生物種は六放サンゴ類に属するイソギンチャク、スナギンチャクと、八放サンゴ類に属するハナツタであった。その中で、スナギンチャクに由来する蛍光タンパク質のうちのあるものが長波長域に吸収極大(558nm)、蛍光極大(582nm)を示す Red

Fluorescent Protein(RFP)であった。これらサンゴに由来する蛍光タンパク質も自ら、発色団を形成して蛍光を発することができる点で細胞生物学者、分子生物学者にとって好意的である。彼らの報告は、赤色の蛍光の創出が遺伝子操作でできるようになったという点で細胞生物学者に大きな期待を与えた。しかしながら、この論文は別の意味でよりセンセーショナルであった。論文のタイトルは“生物発光を有しない花虫類動物に見出された蛍光タンパク質”とある。すなわち、発光生物のみが蛍光タンパク質をもつというあまり根拠のない通念を打破した点に、この論文の価値がある。いったいこれら蛍光タンパク質は何のためにあるのであろうか。最近 Nature 誌に載った Salih ら(シドニー大学)の報告は、その素朴な疑問に対する回答を提示している (Salih *et al.* 2000)。

#### 4.サンゴと光

サンゴの垂直分布にとって重要な条件に光がある。サンゴの多様性は、海面から水深 20m までは水深とともに増加し、20m を越えると逆に減少する



図3. Aequorea GFPの結晶構造。発色団を黒で、ペプチド主鎖をグレーで示した。

ことがわかっている。やはり海面近くでは光や紫外線が強すぎてサンゴの成長が抑制されるのであろう。Salih らはオーストラリアの大堡礁を中心にサンプリングを行い、サンゴ(六放サンゴ類)における蛍光タンパク質の役割を調べた(Salih *et al.* 2000)。まず、浅い海で強い日光を浴びながら生息するサンゴに、蛍光タンパク質をもつもの(蛍光性サンゴ)が多いことがわかった。採集した蛍光性サンゴと非蛍光性サンゴに強い紫外光を照射すると、後者においてより顕著に光合成阻害が認められた。褐虫藻のクロロフィルが三重項励起状態に移行して、活性酸素による光合成器官の破壊が起こったものと考えられる。この結果から、蛍光タンパク質が褐虫藻を強い日光から保護することが示唆された。その保護機序としては、太陽光の強度を弱めること、太陽光に含まれる短波長成分を長波長にシフトすることが考えられる。実際、1998 年に大堡礁で起こったサンゴの大規模な白化現象においてサンプリングしたものを調査したところ、蛍光タンパク質を発現する個体ほど白化しない傾向が確かめられている(Salih *et al.* 2000)。サンゴの細胞において、蛍光タンパク質は色素顆粒の中に蓄積したり細胞質に浮かんでいたりするが、これらタンパク質の個体内分布は非常に興味深い。浅い海で強い日光に露されたサンゴ個体では、蛍光タンパク質は褐虫藻の集落より上方(触手や口盤など)に分布し、光合成器官にとって sun screen として働き、しかも日光の強度に対応して触手や口盤を伸び縮みさせ、蛍光タンパク質の密度を変化させて sun screen の度数を変えているのである(Salih *et al.* 2000)。一方、比較的深い海で日光の乏しい状態で生息するサンゴ個体に於いては、蛍光タンパク質は褐虫藻集落の直下に分布するらしい(Salih *et al.* 2000)。この場合は、蛍光タンパク質はその反射、散乱活性をも動員して、逃した太陽光を光合成器官に集めるように働く。

普段は蛍光タンパク質の細胞生物学的、分子生物

学的応用にあくせくしている我々であるが、サンゴが披露する、日光に関わる如才ない立ち回りには感嘆するばかりだ。ますます蛍光タンパク質に対する愛着が増大する次第である。現在筆者らは、阿嘉島臨海研究所と共同で蛍光性サンゴのサンプリングを行っている。蛍光タンパク質の遺伝子クローニングを通して、海洋動物の光との交わりについてもっと理解を深めたいと思う。たとえばサンゴが示す色彩変異(カラーバリエーション)の機序などにせまってみたい。更に、こうした分子レベルでの基礎的研究がサンゴ礁の保全にいつの日か貢献することを願いたい。

#### ●引用文献

- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263: 802-805.
- Inoue, S. and F. I. Tsuji 1994. *Aequorea* green-fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.*, 341:277-280.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zeraisky, M. L. Markelov and S. A. Lukyanov 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotech.*, 17: 969-973.
- Ormo, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington 1996. Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science*, 273: 1392-1395.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111: 229-233.
- Salih, A., A. Larkum, G. Cox, M. Kuhl and O. Hoegh-Guldberg 2000. Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature*, 408: 850-853.
- Shimomura O, F. H. Johnson, Y. Saiga 1962. Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59: 223-239.
- Yang, F., L. G. Moss, and G. N. Phillips, Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotech.*, 14: 1246-1251.