

平成 31 年 3 月 18 日  
岡 山 大 学

## 大腸菌に緑色蛍光タンパク質（GFP）をつくらせると、 わずかな違いをもつ 2 種類の GFP ができることを発見

### ◆発表のポイント

- ・ 緑色蛍光タンパク質（GFP）は、遺伝子を導入することでさまざまな細胞につくらせることができ、生体分子の観察や分析の手段として生命科学研究に幅広く用いられています。
- ・ 大腸菌で GFP を作らせると、性質と化学構造がわずかに異なる 2 種類の GFP ができることを発見しました。
- ・ GFP を用いる生命科学研究において、重要な基盤情報となります。

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（薬）の中谷隆寛さん（17 年まで大学院生）、安井典久准教授、山下敦子教授と薬学部の田村一晟さん（薬学科 5 年生）のグループは、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein, GFP）を大腸菌につくらせると、性質がわずかに異なる 2 種類の GFP ができ、両者の違いは、質量がわずか 1 グラムの 6 兆分の 1 のさらに 1000 億分の 1 ( $1.66 \times 10^{-27}$  kg, 1Da) だけ異なる GFP の化学構造にあることを明らかにしました。

これらの研究成果は 3 月 18 日英国時間午前 10 時（日本時間同日午後 7 時）、英国の国際学術誌「*Scientific Reports*」に掲載されます。

GFP は、その遺伝子をさまざまな生物に導入すると、それらの生体内で GFP がつくられ蛍光観察できることから、生命科学研究に幅広く利用されています。研究グループは、大腸菌で GFP をつくらせると、表面荷電がわずかに異なり、電気泳動などの生化学的方法で分離される 2 種類の GFP ができることを発見しました。詳しい解析により、それらの GFP は質量でわずか 1 Da の違いしかなく、違いの原因として、GFP タンパク質の最後に位置する 238 番目のアミノ酸残基が遺伝情報どおりのリシンのものと、通常タンパク質を構成するアミノ酸には含まれない 6-ヒドロキシノルロイシンのものがあることを明らかにしました。これらの違いは大腸菌でつくらせたときに生じたものと考えられます。

GFP を細胞でつくらせる実験は、さまざまな生命科学研究で行われています。本研究成果は、それらの実験を行うときに GFP が示しうる性質として把握しておくべき基盤情報となります。

### ◆研究者からのひとこと

この論文は、研究室第 1 期生で、とびきり実験が上手かった中谷さんが、わずかに違う 2 種類の GFP を見事に分離して解析、両者の違いを明らかにし、現所属生でやはり実験が上手い田村さんが、重要な詰めの実験である GFP の蛍光分析を行ってまとめた研究成果です。（山下）



中谷さん



田村さん



## PRESS RELEASE

### ■発表内容

#### <現状>

GFP は、2008 年のノーベル化学賞を受賞した故下村脩博士が、1962 年にオワンクラゲから発見した蛍光タンパク質で、クラゲの発光器官が光を発するしくみを担うタンパク質です。1994 年には、下村博士と同時受賞したマーティン・チャルフィー博士が、大腸菌も含めたさまざまな生物に GFP の遺伝子を導入すると、それらの生体内で GFP がつくられ、蛍光を発することを発見しました。以来、研究対象のタンパク質と GFP を融合させ、さまざまな細胞でつくらせることで、対象タンパク質の細胞の中での居場所を蛍光で観察したり、対象タンパク質の性質を蛍光で検出して分析するなど、GFP は生命科学研究に幅広く利用されています。

通常、細胞に遺伝子を導入すると、DNA に保存されている遺伝情報が mRNA に転写され、さらにタンパク質に翻訳される、という順序でタンパク質がつけられます（このことは「セントラルドグマ」と呼ばれています）。さらに、タンパク質が作られてから、何らかの反応が起こって、タンパク質の化学構造が変化することがあり、このような現象は「翻訳後修飾」と呼ばれています。GFP は、四半世紀に渡り、さまざまな研究対象タンパク質の「蛍光ラベル」として生命科学研究に利用されてきましたが、その GFP 自体に変化があるかどうかについては、あまり調べられていませんでした。

#### <研究成果の内容>

研究グループは、大腸菌に GFP<sub>uv</sub> という翻訳されやすい GFP 遺伝子を導入してタンパク質をつくらせ、できた GFP を分子の大きさの違いで分離できる電気泳動法で分析すると、泳動度が異なる 2 種類の分子種ができていたことを発見しました。それらの GFP 分子種を、分子の表面荷電の違いで分離できる陰イオン交換クロマトグラフィー法で単離し分析すると、表面荷電の指標となる等電点の値が、1 種は 5.76、もう 1 種は 5.64 と、わずかに異なっていることがわかりました。

このような違いが生まれる原因の一つとしてよく見られるのが、つくられたタンパク質の一部が酵素で分解され切れているケースです。そこで、そのようなことが起こっているかどうか、タンパク質の質量を精密に調べる質量分析を行いました。すると、2 種類の GFP の質量の違いはわずか 1 Da、つまり 1 グラムの 6 兆分の 1 のさらに 1000 億分の 1 ( $1.66 \times 10^{-27}$  kg) しかないことがわかりました。このわずかな違いは、もっと大きな質量変化が予想されるタンパク質分解では説明できません。そこでさらに分析したところ、これら 2 種類の GFP は、タンパク質の最後に位置する 238 番目のアミノ酸残基が、遺伝情報どおりのリシンのものと、通常タンパク質を構成するアミノ酸には含まれない 6-ヒドロキシノルロイシンのものであることが明らかになりました。つまり、前者はセントラルドグマどおりのもので、後者はそこからさらに翻訳後修飾が起こったものと考えられます。

2 種類の GFP は、他の性質には目立った違いは見られませんでした。例えば、GFP 全体の立体構造や、蛍光を発する発色団付近の構造には違いがないことを、大型放射光施設 SPring-8 を用いた X 線結晶構造解析で確認しました。両者の蛍光特性にもほとんど違いはありませんでした。

なお、クラゲの発光器官内にある GFP を調べたところ、ほとんどが遺伝情報通りのリシンを持つものでした。このことから、上述した翻訳後修飾は、GFP を大腸菌でつくらせたことによって生じ

## PRESS RELEASE

たものと考えられます。

**<社会的な意義>**

GFP を細胞でつくらせる実験は、さまざまな生命科学研究で行われています。これまで GFP そのものの翻訳後修飾の報告はありませんでしたが、本研究により、細胞に遺伝子を導入して GFP をつくらせた場合、条件によっては、今回見つかったような翻訳後修飾が起こりうるということがわかりました。このことは、GFP を研究の道具として利用するときに、GFP 自体が変化している可能性を考慮に入れる必要があることを示しています。本研究成果は、GFP を用いる生命科学研究における重要な基盤情報となります。

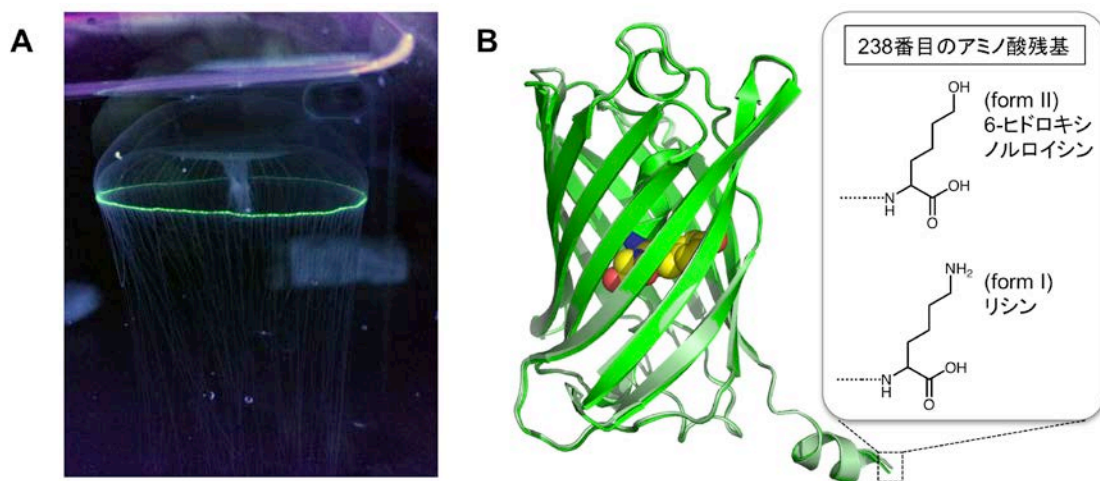


図. (A) オワンクラゲ。緑色に光っているところが発光器官。(写真は京都水族館提供) (B) 2種類の GFP の立体構造。238 番目のアミノ酸残基としてリシンを持つもの (form I, 緑色) と 6-ヒドロキシノルロイシンを持つもの (form II, 薄緑色) の 2 つの構造を重ね合わせて表示している。中央にある黄色の部分が発光を発する発色団である。

**■論文情報**

論文名 : Specific modification at the C-terminal lysine residue of the green fluorescent protein variant, GFPuv, expressed in *Escherichia coli*

掲載紙 : *Scientific Reports*

著者 : Takahiro Nakatani, Norihisa Yasui, Issei Tamura, Atsuko Yamashita

DOI : 10.1038/s41598-019-41309-8

URL : <https://www.nature.com/articles/s41598-019-41309-8>

**■研究資金**

本研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金 (17H03644、25891017、15H05370) の支援を受けて実施しました。



<お問い合わせ>

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

准教授 安井 典久

教授 山下 敦子

(電話番号・FAX) 086-251-7974 (山下)

(メール) nyasui@okayama-u.ac.jp (安井)

a\_yama@cc.okayama-u.ac.jp (山下)



岡山大学は、国連の「持続可能な開発目標 (SDGs)」を支援しています。