

本研究成果は論文掲載先である Proceedings of the National Academy of Sciences から、以下の通り報道解禁設定があります。

TV・ラジオ・WEB ……10月24日(火)午前4時(日本時間)
新聞 ……10月24日(火)夕刊(日本時間)

2023年10月19日

分野: 生命科学・医学系

キーワード: 蛍光蛋白質、蛋白質工学、X線結晶構造解析、生体イメージング

緑色蛍光蛋白質を赤色に

～生物・医学研究を進展させる生体深部観察が可能に～

【研究成果のポイント】

- ◆ 天然の明るい緑色蛍光蛋白質(GFP)から赤色蛍光蛋白質(RFP)をつくることに成功。また、赤色蛍光発色団形成に重要なアミノ酸、蛍光蛋白質内部のアミノ酸配置特定に成功。
- ◆ 蛍光蛋白質は現代の生物・医学研究で不可欠なツール。
- ◆ 赤色光は生体深部観察に適するが、天然赤色蛍光蛋白質(RFP)を改変した既存のRFPは暗い
- ◆ 生物・医学研究を大きく進展させる生体深部観察が可能な高性能RFPの作成に期待

❖ 概要

大阪大学大学院理学研究科の今田勝巳教授、大学院生の大坪史歩さん(博士前期課程)、京都大学大学院生命科学研究所の今村博臣准教授らの研究グループは、緑色蛍光蛋白質(GFP)を改変して赤色蛍光蛋白質(RFP)を人工的に創り出すことに世界で初めて成功しました。

蛍光蛋白質は、現代の生物・医学研究で欠くことのできないツールですが、組織や臓器といった厚い試料や長時間の観察に必要な赤色の蛍光蛋白質は、天然RFPから作った明るさが不十分なものしかありませんでした。

今回、研究グループはアザミサンゴ^{*1}の GFP(AG)に着目し、赤い光(600 nm 以上)を発する蛍光蛋白質では最大級の量子効率^{*2}を持つRFPにつくりかえることに成功しました。また、立体構造も明らかにし、赤色蛍光発色団形成に重要なアミノ酸とその立体配置を明らかにしました。これにより生体深部のイメージングに適した高性能RFPの開発が期待されます。

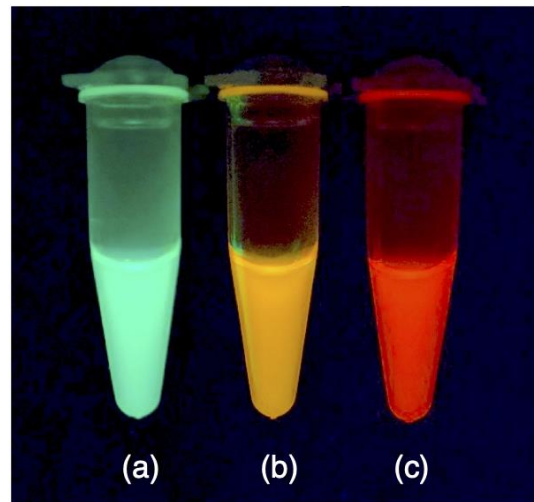


図1 精製した蛍光蛋白質の蛍光

- (a) アザミサンゴ由来GFP
- (b) AR0.1
- (c) AR1.0

本研究成果は米国科学誌「米国アカデミー紀要(Proceedings of the National Academy of Sciences)」の電子版で2023年10月23日の週に(米国東部時間)公開されます。報道解禁は10月24日(火)午前4時(日本時間)です。

Press Release

❖ 研究の背景

蛍光蛋白質は、特定の蛋白質の発現・分布・相互作用といった生体内の様々な情報を生きたまま得るためのマーカーやセンサーとして使われており、現代の生物・医学研究では不可欠なツールです。最初に発見された蛍光蛋白質は、下村脩博士(2008 年ノーベル化学賞受賞)がオワンクラゲから見つけた緑色蛍光蛋白質(GFP)です。その後、様々な生物から類縁の蛍光蛋白質が発見され、これらを改変して紫色から黄色の様々な蛍光蛋白質が開発されました。

蛍光色の中でも、赤色光のような長波長の光は生体内での透過性が高く細胞毒性も低いため、多くの細胞が集まった組織や臓器といった厚い試料の観察や長時間の観察に適しています。しかし、天然の蛍光蛋白質の多くは緑色で、赤色の蛍光蛋白質(RFP)はごく一部の生物からしか見つかっていません。また、天然の RFP は蛍光が弱い上にアミノ酸配列がどれも似通っており、改変してもあまり明るいものができません。

蛍光を出す発色団は、蛍光蛋白質内部で3つのアミノ酸が自己触媒反応を起こして自発的にできあがります。RFP の発色団の化学構造(図2右)は、GFP や GFP を改変した蛍光蛋白質の発色団の構造(図2左)と大きな違いがあります。RFP は GFP から進化してきたと考えられていますが、天然の RFP は GFP と進化的に大きく離れていてアミノ酸配列の違いが大きく、赤色の発色団の形成にはどのような環境が必要で、どのアミノ酸残基が重要なかわかっていませんでした(図3)。そのため、これまで明るい GFP を改変して RFP にする試みがなされてきたものの、誰も成功していませんでした。

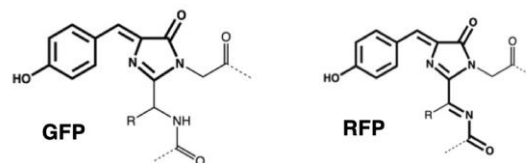


図2 蛍光蛋白質の発色団の構造

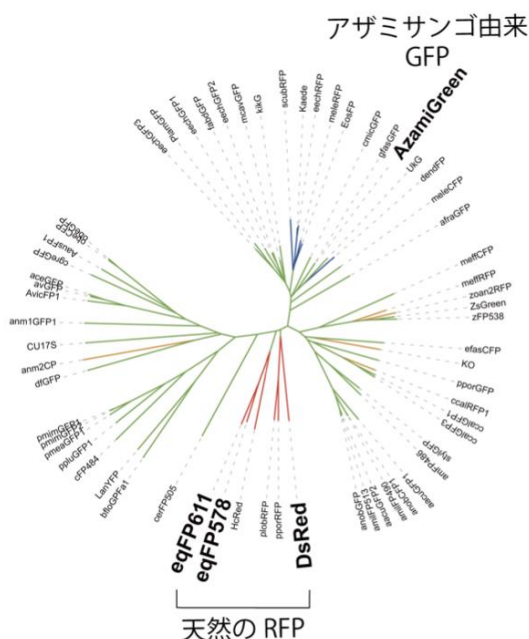


図3 天然の蛍光蛋白質の系統樹

❖ 研究の内容

共同研究グループは、天然の RFP に比較的アミノ酸配列が近いアザミサンゴ由来の GFP (AG) に着目し、天然の RFP に高く保存されているが GFP には保存されていない 35 か所のアミノ酸残基に注目しました。AG のこの 35 か所のアミノ酸を天然 RFP のアミノ酸に変えると緑色に加えて弱い赤色蛍光を発することを見出しました。そこで、この変異蛋白質を蛋白質工学的的手法^{※3}を用いて試験管内で進化させ、最終的に AG に 29 か所の変異を導入することで、赤い光(600 nm 以上)を発する蛍光蛋白質では最大級の量子効率を持つ RFP、AR1.0 の作成に成功しました。

続いて、研究グループは 29 か所の変異をそれぞれ一つずつ元の AG のアミノ酸に戻すことで、赤色発色団の形成に重要なアミノ酸を特定。さらに、大型放射光施設 SPring-8 を用いた X 線結晶構造解析により AG と AR1.0 の立体構造を詳しく調べ、構造の違いから赤色発色団形成に必要な蛍光蛋白質内部のアミノ酸

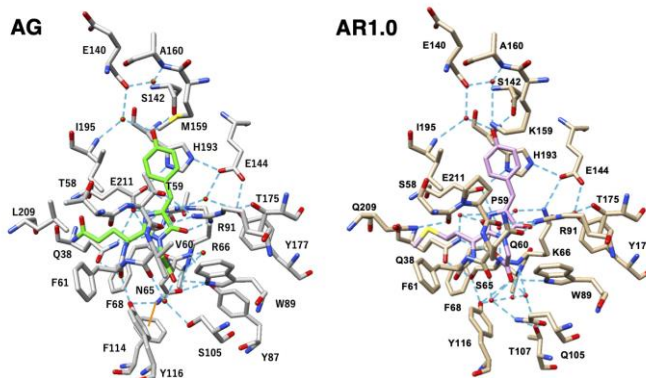


図4 発色団周辺の構造

Press Release

配置を明らかにしました(図4)。

また、研究グループは AR1.0 を細胞内で使えるように単量体化した mARs1 も作成し、GFP を赤く改変した蛍光蛋白質が細胞内でのイメージングに使えることを実証しました。

❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究は、不可能と思われていた緑色の蛍光蛋白質を赤色に変えることが可能であることを実証しました。今回作成した AR1.0 は、明るい蛍光を発する GFP 並みの量子効率をもちますが励起光の吸収効率が悪いいため、厚い試料の観察にはまだ明るさが十分とはいえません。一方で、今回の研究により赤色発色団を形成するために重要なアミノ酸や発色団周囲の環境が明らかになりました。

本研究は、天然に広範に存在する GFP からの RFP の創成に道を開くもので、停滞していた明るく高性能な RFP の開発を一気に加速させる成果です。このような RFP を用いれば、現在は難しい組織や臓器内といった生体深部のイメージングが生きたままで可能になり、医学・生物学研究の進展に大きく寄与すると考えられます。

❖ 特記事項

本研究成果は、2023 年 10 月 23 日の週に(米国東部時間)に米国科学誌「米国アカデミー紀要(Proceedings of the National Academy of Sciences)」(オンライン)に掲載されます。報道解禁は 10 月 24 日(火)午前 4 時(日本時間)です。

タイトル: “Red fluorescent proteins engineered from green fluorescent proteins”

著者名: Hiromi Imamura¹, Shiho Otsubo², Mizuho Nishida¹, Norihiro Takekawa², Katsumi Imada²

所属:¹ 京都大学大学院生命科学研究科, ² 大阪大学大学院理学研究科

DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2307687120>

なお、本研究は、科学研究費補助金基盤研究(B)(課題番号 20H03221)および科学研究費補助金学術変革領域研究(B)(課題番号 20H05757)による支援のもとに行われました。また、本研究は大阪大学と京都大学が共同で行ったものです。本件は、京都大学においても同時にリリースされます。

❖ 用語説明(用語の表記は、本文にある記載と完全一致させてください)

※1 アザミサンゴ

イシサンゴ目に属するサンゴ。ポリプの集まりがアザミの花のように見えることから名付けられた。中部、西部太平洋・インド洋に分布し、日本では沖縄や小笠原諸島で見られる。

※2 量子効率

蛍光物質が吸収した励起光の光子数と蛍光として放出した光子数の比率。

※3 蛋白質工学的手法

天然蛋白質のアミノ酸配列を改変したり設計したりして、有用なタンパク質を人工的に創り出す手法。

【今田教授のコメント】

明るい RFP を作る試みは、天然 RFP の改良ではできることはほぼやり尽くされて手詰まり感があり、一方で GFP から RFP をつくる試みも 10 年ほど前には諦められていたので、今回の共同研究の成果は大きなブレイクスルーです。赤色発色団ができるメカニズムの解明にも道が開けました。近いうちに、生体深部のイメージングを可能にできればと思います。

Press Release

❖ 参考 URL

今田勝巳 教授

研究者総覧 URL <http://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/e30e8c0967304cf3.html>

竹川宜宏 助教

研究者総覧 URL <http://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/99843e6da6c9b5d0.html>

❖ 本件に関する問い合わせ先

<研究に関すること>

大阪大学 大学院理学研究科 教授 今田 勝巳(いまだ かつみ)

TEL:06-6850-5455/5455

E-mail: kimada@chem.sci.osaka-u.ac.jp

<広報・報道に関すること>

大阪大学 理学研究科 庶務係

TEL:06-6850-5280

FAX:06-6850-5288

E-mail: ri-syomu@office.osaka-u.ac.jp