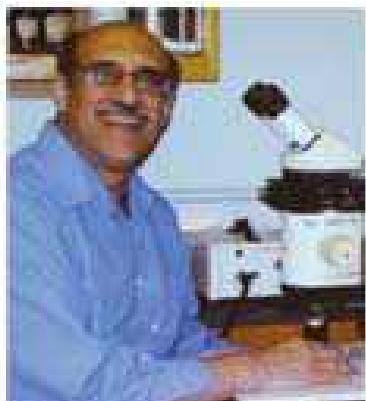


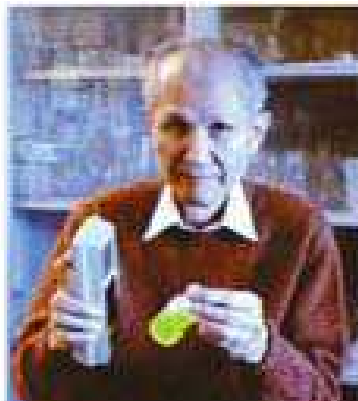
『生物学や医学に利用できる蛍光タンパク：GFP・RFP』

Glowing Proteins with Promising Biological and Medical Application

“ ChemMatters, 2008 年 12 月号：リンダ・ザジャック著 ” より



マーチン・チャルフィー博士



下村 脩博士



ロジャー・チェン博士

一匹のマウスが未だ顕微鏡下で麻醉にかかっている。数秒おきにマウスの血管内を移動する明るく光る癌細胞のイメージをカメラで撮影している。カリフォルニア大学サンディエゴ校の医学部外科学科教授であるロバート・ホフマンが癌細胞の広がるイメージを研究している。癌細胞は赤く光り、一方細胞核は緑に光っている。ある癌細胞は転がりながらまたあるものは血管壁に沿って這うように進み、またあるものは血流の中をぶつかりあいながら漂流している。

ホフマンはこれまで 12 年間にわたって生きたマウスの中で増殖する癌細胞を科学者が見ることができるイメージング技術を開発してきた。この技術のお蔭で、世界中の科学者は、癌細胞が動物の体内の何処に行こうがそれを追跡できるようになった。これを可能にしたのが蛍光タンパクと呼ばれるタンパク分子である。蛍光タンパクを使って、細胞内の種々のタンパクや細胞自身を光らせることによって、細胞内で起こっていることを科学者が目で見えるようになり、またピールスと腫瘍がどのような動きをしているかをより良く理解できるようになった。こうして蛍光タンパクは生物学と医学に革命をもたらした。蛍光タンパクの利用のこのような成功が、今年のノーベル化学賞に繋がり、GFP の発見者で米国在住の日本人下村脩博士、およびアメリカ人のマーチン・チャルフィー博士とロジャー・チェン博士に授与されることとなった。

このタンパクが発見される前には、細胞内で起こっていることを見る技術は殆ど存在しなかった。タンパクの分子は非常に小さいので、電子顕微鏡でも目で見えることはできない。しかし、これらのタンパクを蛍光タンパクで標識することによって、タンパクの所在を追跡することができる。更に、現在色々な色の蛍光タンパクがあり、タンパクを違った色で標識して研究することができる。

ここでは、このタンパクを発見し、このタンパクがどのように働くかを理解し、ついにノーベル賞を勝ち取った科学者や、またその他の科学者が癌やアルツハイマー病やクロイツフェルト・ジャコブ病のような病気を研究する独創的な方法をどのようにして見出したかについての経緯について話したい。

緑色蛍光タンパクの発見

全てはマサチューセッツ州にあるウッズホール海洋生物研究所の上席研究員であった下村脩とプリンストン大学の科学者であったフランク・ジョンソンが、何故オワンクラゲが暗がりでも光るのかを研究しようと決心した時に始まった。

ジョンソンが参加する前は、下村は既に小さな卵型をしたウミホタルと呼ばれる甲殻類が生物発光と呼ばれるプロセスで発光することを見出していた。そして生物発光とは化学反

応の結果として生物による光の放出である。オステラコッド(貝虫亜綱の甲殻動物)では、ルシフェリンという化学物質に酸素(O₂)を付加する化学反応によって生物発光が起こる。この反応はルシフェラーゼという酵素によって触媒され、酸化型のルシフェリンと炭酸ガスと光が発生する。

Luciferin + O₂ 酸化型 luciferin + CO₂ + light(光)

二人の科学者は、オワンクラゲがウミホタルと同じメカニズムで光るのかどうかに疑問を抱き、彼らはクラゲを集め、どんな化合物がクラゲを光らせているかを知るために、ワシントン州のフライデー港にあるフライデー港研究所へと旅立った。何週間も研究に没頭した後、下村はクラゲの生物発光の原因物質としてアクオリン(aequorin)と呼ばれる物質を同定した。

1962年、下村とジョンソンと共同研究者は、Ca⁺⁺(カルシウムイオン)の存在下に、アクオリンは、アポアクオリン(apoaquorin)とコレンテルアミド(coelenteramide)に分解して、光と炭酸ガスを出すことを証明した。

しかし、クラゲは緑の光を発し、青い光は出さない。彼らは別の分子が同時に関与しているものと考えた。数ヵ月後、彼らは緑色蛍光タンパク(GFP)と呼ばれるもう一つの分子を発見した。1974年になって、彼らはアクオリン(aequorin)によって作られる青い光は GFP によって直ちに吸収され、GFP は蛍光発光(ある分子が光を吸収し、違った色の光を出す時、蛍光発光という)と呼ばれるプロセスを経て緑の光を出すことを発見した。

細胞内のトレーサーとしての蛍光タンパクの利用：

1987年、マサチューセッツ州ウッズ・ホール海洋研究所の生化学助手のダグラス・ブラッシャーは、特定のタンパク質に GFP を付与することが出来るのではないかと考えた。若し研究者が癌細胞の光るのをみることが出来たら、彼らは癌が広がりつつあるかどうか分かる。ブラッシャーは GFP の遺伝子を探すことに決めた。彼は GFP 遺伝子を同定した後、人間を含む他の生物に GFP 遺伝子を導入しようと考えていた。これらのタンパクは青い光を当てると(クラゲの中で GFP がアクオリンからの青い光を吸収して緑の光を出すように)緑の光を放射した。その結果、GFP がタンパクを光らせ科学者は細胞内でのタンパクの動きを見ることができるようになった。1992年ブラッシャーは GFP の遺伝子を発見し、科学雑誌"Gene"に報告した。不幸にして彼は GFP が tracer として使えることを証明する前に研究資金が枯渇し、やむなく研究を中止した。

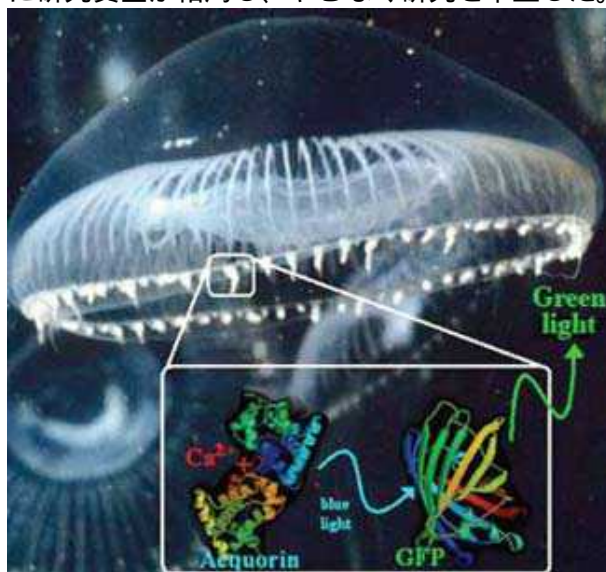


図 - 1： クラゲは傘の回りに光を発する器官を持っている。Ca イオンの存在下に、アクオリンが発した青い生物光が GFP に吸収され、GFP が蛍光を発する。

コロンビア大学の生物学者マーチン・チャルフィーはブラッシャーの論文を非常に興味を持って読んだ、GFP 遺伝子を譲って呉れるようにブラッシャーに電話した。チャルフィー

はバクテリアに GFP 遺伝子を挿入した。こうして、チャルフィーと共同研究者は GFP の輝きを顕微鏡で観察し、生きた生物に GFP 遺伝子を入れることが出来ることを証明した。チャルフィーは『私は狂喜した』と述べている。『一番最初の実験で光るバクテリアを手にした。GFP をバクテリアに入れることによって、我々は GFP を働かすためにクラゲから GFP 以外の物は何も必要ないことを証明した。』1994 年、カリフォルニア大学サンディエゴ校の薬学・化学・生物学の教授で同時にハワード・ヒューズ医学研究所の研究者であるロジャー・チェンは、GFP 遺伝子を改変して、より明るい変異型 GFP を作成した。更に彼は青や黄色やシアン色のような違う色を発する変異型 GFP を作り出した。これによって、研究者は細胞内の二つ以上のタンパクを違った色で標識して追跡することができるようになった。1998 年、ロシア科学アカデミーの分子生物学者セルゲイ・ルキアノフと共同研究者は、生物発光をしないサンゴから蛍光タンパクを発見した。先ずそれ自身が生物発光をして、さらにその光が蛍光に変換されるウミボタルやクラゲと違って、これらのサンゴは単に蛍光のみを発するのである。

また、これらの生物は、緑や黄色やシアン色や赤のような様々の色の蛍光を発する。『重要な発見は RFP と呼ばれる赤い蛍光を発するタンパク質の発見であった』また『このタンパクは生きた細胞や生きた動物の中を観察するための新しい可能性を拓いた。なぜなら赤い光は緑の光より深い所まで到達するからである。』とルキアノフは言っている。

ルキアノフは南カリフォルニアの沖でコペポードと呼ばれる生物発光をしない小さな甲殻類から新しい蛍光タンパクを発見した。奇妙なことに、彼らのよく発達した目のお蔭で、コペポードは、蛍光タンパクを見ることが出来る最初の既知の動物となった。

癌との闘い：

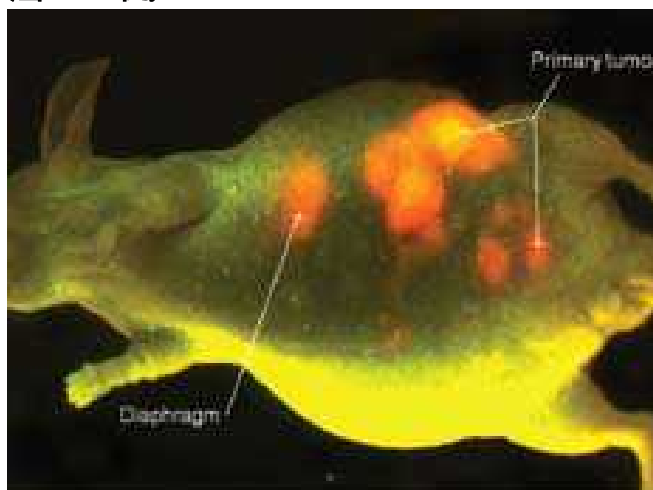


図 - 3 : RFP を発現した膵臓癌細胞がマウスの膵臓から他の臓器に広がっているのが分かる。

恐らく、GFPの最も重要な医学的応用は癌の研究に関するものであろう。マウスを使って癌細胞について研究しているカリフォルニア大学サンディエゴ校、医学部外科学科の教授であるロバート・ホフマンは、また同時に蛍光タンパクを使ったイメージング技術とイメージング装置の開発をしているアンチキャンサー社の創業者兼CEOである。アンチキャンサー社は蛍光タンパクを世界中で広く普及させるために、この装置を世界中の研究室に向けて販売している。

彼の技術のお蔭で、ホフマンと共同研究者は、癌細胞がどのように血管の中を移動し、病巣を作るためにどんなに急激に増殖したかを観察できる。また、科学者達は癌細胞が正常細胞にどのようにくっつくかを--癌細胞がどのように感染し、癌細胞自身をどのように免疫細胞から守るか--、癌細胞がどのようにDNAを交換するかを、これまでより詳しく観察した。ホフマンと共同研究者は、シクロフォスファミドと呼ばれる抗癌剤がマウス体内の癌細胞の成育を促進することを発見した、これは期待に反する結果であり、これまでの化学療法の一部は変更されるべきであることを示唆している。

この技術を使って、癌に対する新しい薬を発見できるものと期待されている。我々は癌細胞が動き、体内でどのように広がるかを見ることが出来るばかりではなく、抗癌剤が癌細胞や近隣の正常細胞にどのように影響するかを見ることが出来る。そのことが我々により効果的に癌細胞を狙い打ちするより良い薬の開発を可能にするのである。

植物の病気を防止する：

科学者は、蛍光タンパクを使って植物の病気を追跡することもできる。オクラホマ州立大学の植物ビールス学者ジェーンマリー・ヴァーコット ルビッツと共同研究者は、ビールスがどのようにして植物に感染するかを理解するために蛍光タンパクを使っている。ポテト・ビールス X と呼ばれるビールスがどのようにポテトに感染するかを観察することによって、他の穀物をビールスによる感染から守り、更に一般的にビールスがどのように動物や人間の病気を引き起こすかをより良く理解するための方法を見つけようとしている。ヴァーコット ルビッツと共同研究者は、ビールスの遺伝子と一緒に蛍光タンパクが発現するようにビールスの遺伝子に GFP 遺伝子付与した。それから、顕微鏡を使って植物の細胞内でビールスが動く時のビールスタンパクの動きを追跡した。

『蛍光タンパクは極めて有効である』とヴァーコット ルビッツは語っている。『これがビールスの植物への感染を引き起こしている間に、ビールスのタンパクがどのように動いているかを知る唯一の方法である。若し、我々が蛍光タンパクを使うことが出来なければ、我々はビールスが感染した後の植物細胞の様子しか見ることが出来ない。今や、我々は生きたままビールスが細胞に入った瞬間からどのようにして隣の細胞に感染するかの全てを見ることが出来る。』

この研究によって、ポテト・ビールス X が、細胞に侵入した後、小胞と呼ばれる小さな空洞を使ってタンパクを感染した細胞の表面に運び出すことが分かった。次いで、タンパクは感染した細胞と隣の細胞を繋いでいる小さなトンネルを通過して行き来する。これによって、隣の細胞もまたビールスに感染する。

ヴァーコット ルビッツと共同研究者は、小胞の内部がどうなっているのか、これらの小胞がどのようにして細胞表面に運ばれるのかを見極めようとしている。この情報は、科学者が小胞のビールスのタンパクを破壊する抗ビールス剤や小胞が感染した細胞から離れるのを防止する抗ビールス剤を開発するのに役立つであろう。

脳の病気の治療を助ける：

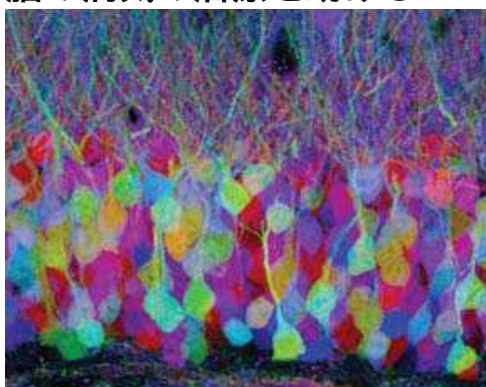


図-2：細胞が違った種類の蛍光タンパクを作り出す Brainbow mouse の脳の切片。

蛍光タンパクの有望な応用例として、脳の病気の解明への利用がある。蛍光タンパクを使うことによって、最近ハーバード大学の科学者は、脳細胞がどのように相互作用をしているかを理解する方法を開発した。

マサチューセッツ・ケンブリッジのハーバード大学のジェフ・リッチマン教授と共同研究者は、マウスの脳細胞の DNA に、夫々の細胞が充分光るだけのタンパクを作るように黄色やシアン色や赤色の蛍光タンパクの遺伝子を導入した。『若し、あなたが顕微鏡で脳の組織を見ると、それらは容易に見分けることができない細胞の薄っぺらなリング型のクッキーのように見える』『そこで我々は夫々の細胞を色で識別するために蛍光タンパクを使うこと

にした』とリッチマンは言っている。

科学者は、各々の細胞が夫々の蛍光色素タンパクを充分量作るように、黄色、シアン色および赤色の遺伝子をマウスの脳細胞の DNA に挿入した。夫々の細胞は、どれだけの量の黄色やシアン色や赤色のタンパクができるかによって違った色で輝いた。このようにして、科学者達は、脳内の細胞が 90 の違った色で輝くマウスを作り出すことに成功した(図-2)。

ブレインボウ・マウス(Brainbow mouse:脳内細胞が7色に輝くマウス)の明確に識別できる色彩は、研究者が個々の細胞を見分け、細胞同士がお互いにどのように結合しているかを解決するのに役立った。彼らは、健康なマウスと病気のマウスの脳のサンプルを比較することによって、アルツハイマー病患者やパーキンソン病患者のなかで何が起きているのかをより良く理解したいと望んでいる。

ニューヨークのイエシバ大学のアルバート・アインシュタイン・カレッジの科学者たちは、AIDS の原因である HIV ビールス感染者の 20% で起きている痴呆症の型について研究している。アインシュタイン モンテフィオレ・センターのハリス・ゴールドシュタインと共同研究者は、HIV と GFP 遺伝子をコードした免疫系を持ったマウスを繁殖させた。このマウスでは、HIV に感染した免疫細胞が同時に緑色に輝くということである。

マウスの中でのこれらの細胞の動きを追跡することによって、科学者はこれらの細胞が脳を通過したことを示し、同じように脳に感染したことを示した。免疫細胞が HIV に感染した時にはこれらの細胞は脳に到達できないので、この発見は予想外のことであった。この発見は、何故一部の HIV 患者が痴呆を発症するかという疑問に光を与え、HIV に感染した免疫細胞が脳に入り込むのを防御する薬の開発に繋がるものと期待されている。

世界中の研究室で、蛍光タンパクは明るく輝き、病に苦しんでいる人々に一筋の明るい希望を投げかけている。

参考文献

- Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.W.; Prasher D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **1994**, *263*, pp 802–804.
- Livet, J.; Weissman, T.; Kang, H.; Draft, R. W.; Lu, J.; Bennis, R.; Sanes, J.; Lichtman, J. W. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, **2007**, *450*, pp56–62.
- Chishima, T., Miyagi, Y.; Wang, X.; Yamaoka, H.; Shimada, H.; Moossa, A. R.; Hoffman, R. M. Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Research*, **1997**, *57*, pp 2042–2047.
- Stewart, C. N. Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends in Biotechnology* **2006**, *24*(4), pp 155–162.
- Pieribone, V.; Gruber, D. *Glow in the Dark: the Revolutionary Science of Biofluorescence*; Belknap Press of Harvard University Press: Cambridge, MA, 2005.
- Zimmer, M. *Glowing Genes: Revolution in Biotechnology*. Prometheus Books: New York, 2005.