

緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いた 細胞内pH環境の可視化

古 園 さおり

真核細胞のオルガネラや小胞は独自のpH環境を維持しており、その局所的なpH環境が小器官の機能にとってしばしば重要である。分泌タンパク質の翻訳後修飾やホルモン前駆体のプロセッシングは、pH依存的に起こる。またリソソーム内での消化には、酸性pHが必要である。このようなオルガネラの機能に重要な局所的pH環境、およびその変化を捉えようとする試みは、これまでpH感受性の蛍光プローブなどを用いて行われてきた。しかし、プローブを細胞へ取り込ませるための処理が必要であったり、特定のオルガネラへ局在させることが困難であるなどの問題点があった。近年、タンパク質の細胞内局在や細胞内輸送の研究に多く利用されている緑色蛍光タンパク質(GFP)¹⁾およびその変異体を利用して、細胞が生きた状態のままで細胞内小器官の局所的pHや細胞活動に伴うpH変動を可視化、定量する試みが始まっている。

細胞内pH測定にGFPを用いる利点は、蛍光プローブを用いる従来の方法と比較して、GFPは蛍光発生のための基質や補欠因子を必要としない、すなわち、外来性遺伝子として発現させるだけで蛍光プローブとして利用できる。観察のために特別な処理をしなくてよい点が挙げられる。また、*gfp* 遺伝子を適当な局在性シグナルに融合することにより、特定部位における局所的なpH変化を捉えることが可能である。

野生型GFPは、395 nmと475 nmの2つの励起波長ピークを持つ。これは、発光に関与するchromophoreを形成しているTyr66がプロトン化された状態と脱プロトン化された状態にそれぞれ対応している。²⁾野生型GFPでは、pH 5.5-10の範囲において励起波長スペクトルはあまり変化しない。しかし、chromophore周辺のアミノ酸残基に変異を持つ一部のGFP変異体では、生理的条件に近いpH範囲内で、395 nmで励起させた時の蛍光強度の増加と475 nm励起での蛍光強度の低下が対応して変化する。つまり、395 nmと475 nmで励起させた時の蛍光強度比を調べることで、pHを計測することが可能である。

Llopisら³⁾は、EGFPやEYFPなどの変異体は上記のようなpH応答性を持つことに注目して、これらにオルガネラ局在性シグナルを連結することにより、ミトコンドリアやゴルジ体の局所的pHの計測に成功している。

Miesenbockら⁴⁾は、すでに明らかとなっているGFP結晶構造を基に、Tyr66のプロトン化に関連することが予想されるアミノ酸残基に注目して変異導入を行い、独自にpH応答性GFP(pHluorin)を開発した。彼らはpHlu-

理化学研究所微生物学研究室(研究員)

〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1

TEL. 048-467-9545 FAX. 048-462-4672

E-mail: kosono@postman.riken.go.jp

1996年 大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了、
博士(工学)

現在の興味: 細胞の相移行におけるイオン環境調節の役割

orinを用いて、神経伝達に伴うシナプス小胞分泌の可視化を試みた。まず、pHluorinをシナプトブレビンを介してシナプス小胞膜内部に局在させる。pHluorinを410 nmで励起したときの蛍光強度と470 nmで励起したときの蛍光強度の比の値(R410/470)は酸性pHにおいて小さくなる。シナプス小胞内は酸性(pH 5.6付近)であるためR410/470比は小さいが、刺激を与えて脱分極を起こすとこの値は増加する。これは、シナプス部位で神経伝達物質の開口放出が起こり、小胞内環境が細胞外環境と均一化したことによりpHが上昇したことを意味する。続いてkiss & runモデル⁵⁾によるシナプス小胞のシナプス前膜からの解離、v-ATPaseによる小胞内へのプロトン輸送により、R410/470比は再び減少することが観察された。

一方細菌は、真核生物のようなオルガネラ構造を持たない。しかし、pHは最も重要な細胞内環境因子のひとつであり、pH環境の変動によって分子間相互作用やタンパク質活性が受ける影響は小さくないと思われる。細菌の菌体内pH環境調節には、Na⁺/H⁺ antiporterやH⁺-ATPaseなどのトランスポーターが主な役割を果たしている。Kosonoら⁶⁾は、枯草菌のNa⁺/H⁺ antiporter (Sha)の機能が孢子形成開始期に限定して必要であることを報告している。栄養増殖期から分化状態への移行には遺伝子発現変化を伴うが、そのために多くの分子が複雑なネットワークを形成して作用していることは容易に想像できる。したがって上記に述べた細胞相移行期においては、菌体内のpHもしくはNa⁺レベルの調節がより厳密に必要とされるのかもしれない。

細菌細胞のコンパートメントの中のpHは果たして均一なのであろうか? また、菌体内pHのホメオスタシスは動的に変動していないだろうか? pH応答性GFP変異体を用いれば、このような問いに明確に答えることができるのではないだろうか。今後の研究の伸展が期待される。

1) Tsien, R. Y.: *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509 (1998).

2) Brejc, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2306 (1997).

3) Llopis, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6803 (1998).

4) Miesenbock, G. *et al.*: *Nature*, **394**, 192 (1998).

5) Stevens, C. F. and Williams, J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12828 (2000).

6) Kosono, S. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **182**, 898 (2000).