

WS I-3

Green Fluorescent Protein (GFP) を用いた
蛍光ラベリング法と蛍光レポーターアッセイ¹小川 英知 ²梅園 和彦(¹NAIST・バイオ・分子発生生物学講座、²京大・ウイルス研・情報高分子化学)

Green Fluorescent Protein(GFP)はオワンクラゲから単離された蛋白質であり、生体にとって毒性の少ない波長域(400nmから470nm)である励起光を照射することによって強い緑色の蛍光を発する。酵素活性に基づく従来のレポータータンパク質と異なり、GFPによる蛍光発光には励起光以外に何も必要としないことから、生きたままの細胞の蛍光ラベリングや、遺伝子組み換えを通じて目的とする蛋白質の細胞内局在を経時的に可視化できる分子マーカーとして急速に普及しつつある。

我々は、GFPを用いて動物培養細胞の蛍光ラベルを行うため、種々の条件を検討した。その結果、海水中に生息するクラゲ由来のGFPは細胞の培養温度である37℃では十分に発光できず、より低温に維持する必要があることを見いだした。そこで、この温度感受性を克服するGFP変異体の作製を試み、これに成功した。

次にGFPを用いた細胞内蛋白質の可視化を目的に、ホルモンと結合し細胞質から核へ移行するレセプター型転写因子、グルココルチコイドレセプター(GR)との融合タンパク質を構築し、細胞内の局在を蛍光観察した。GFPの蛍光は細胞を固定せずに検出できること、退色が少なく何度でも観察できることから、GR核移行の経路や時間的な変化を一細胞で追跡することができた。

さらにGFPの蛍光を指標として転写活性化能の定量的なアッセイ系を構築するために、GFPレポーター遺伝子を作製した。プロモーターにはホルモン誘導性のマウス乳ガンウイルスプロモーターを用いた。このレポーター遺伝子を細胞に導入し蛍光顕微鏡で観察すると、ホルモン濃度依存的な蛍光の増強が観察された。この系の利点は、非常に少数の細胞で転写制御の観察が可能になることである。また、この系の定量性を調べるために、同試料の細胞抽出液を調製し蛍光強度を測定した。その結果を従来用いられているレポータータンパク質であるルシフェラーゼと比較し、同等の検出感度を有することを確認した。