

偶然の発見からの研究展開

— 生体成分を対象とした分析技術の開発 —

情報工学研究院生命情報工学研究系 教授 末田 慎二



はじめに

遺伝情報を担うDNAに書き込まれている主要な情報は、タンパク質の設計図です。タンパク質は、生体内で様々な活動を担っている立役者で、生命現象の全容を解明するには、生体内に存在するすべてのタンパク質の機能を解明する必要があります。ただし、タンパク質の性状は極めて多様であるため、それらを対象とした研究も一筋縄ではいかず、世界中で日々、新しい技術が開発され続けています。

私の研究室では、偶然に発見したある特殊な酵素反応を要素技術とし

て活用して、タンパク質等を対象とした独自の分析技術の開発を行っています。私が利用している酵素反応は、ビオチンというビタミンの一種を、特定のタンパク質に連結する反応で、ビオチン化酵素反応と呼ばれるものです。この酵素反応は私たちの体内でも起こっている、生物にとって必須の酵素反応の一つですが、私が研究で利用している反応は、極限環境下で生育する、ある特殊な微生物由来のビオチン化酵素反応です。

この酵素反応に関する研究は、元々酵素の反応機構の解明を目的とした、純粋な酵素化学に関するものでしたが、その研究過程で通常の酵素反応には見られない特殊な性質を見出しました。それは、酵素であるビオチンリガーゼ（BPL）が、その反応生成物であるビオチン化された基質タンパク質（BCCP）と非常に安定な複合体を形成するという性質です。酵素はその触媒反応をターン

オーバーさせ、一分子で無数の反応生成物を生み出すのが特徴ですが、この酵素反応の場合、一回で触媒反応が停止するということになりました。しかも生成した反応物を解離しないため、この酵素は実質、何も役割を果たしていないことになりました。この奇妙な酵素反応の生理学的な意味はまだ解明できていませんが、私はこの酵素反応系を利用して、様々なバイオアッセイ系の開発を行っています。ここではその中で、生細胞内でのタンパク質の蛍光ラベル化技術の開発について紹介いたします。

生細胞内でのタンパク質の蛍光ラベル化技術の開発

タンパク質の分析技術の中でも近年最も発展の著しいものとして生細胞内での蛍光イメージング技術が挙げられます。この蛍光イメージング技術の発展には、蛍光顕微鏡や画像解析技術の開発だけでなく、タンパク質の蛍光ラベル化技術の開発も大きく寄与しています。具体的には、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（GFP）に代表されるような、蛍光タンパク質を利用したラベル化

技術の開発により、生きた細胞の中でタンパク質を蛍光ラベル化することが可能となり、タンパク質の機能解析が大きく進展しました。

この蛍光タンパク質を利用したラベル化技術では、目的タンパク質と蛍光タンパク質の遺伝子を連結して細胞に導入し、それを細胞中で発現させるだけで、自発的に目的タンパク質に蛍光団が導入されます。この簡便性からこのラベル化技術は世界中で幅広く活用されていますが、いくつかの使用上の制限があります。そのうちの1つは、目的タンパク質が細胞内で発現すると同時に蛍光団が導入されるため、ラベル化のタイミングが制御できないという点です。

また、蛍光タンパク質には、緑色だけでなく様々な発光色を有する蛍光タンパク質が存在し、それらを利用した多重染色が可能なのですが、通常このラベル化法では、同一のタンパク質について一種類の蛍光タンパク質しか連結することができません。そこで、私の研究室ではこのような実用上の制限を克服するため、蛍光タンパク質を目的タンパク質に間接的に連結する技術の開発を行っています。

す(図1)。ここでは、目的タンパク質とBCCPの遺伝子を連結して細胞中に導入し、融合タンパク質として発現させます。一方で、蛍光タンパク質とBPLの遺伝子を連結して同じ細胞内に導入し、こちらも融合タンパク質(蛍光プロローブ)として発現させます。両融合タンパク質が細胞中で出会うと、ビオチン化反応が起こり、目的タンパク質に蛍光タンパク質が間接的に導入されるという戦略です。ここでは、蛍光プロローブを発現させるタイミングを制御することにより、目的タンパク質を任意のタイミングでラベル化することができます。また、途中から異なる蛍光タンパク質を連結した蛍光プロローブを発現させることにより、同一のタンパク質に対して複数の蛍光団でラベル化し、細胞内での詳細な動態観察を行うことが可能となります。

私たちはこのような蛍光ラベル化技術の有用性を実証するために、細胞骨格タンパク質を目的タンパク質として選りラベル化を行い、その細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察しました。図2Aに、アクチ

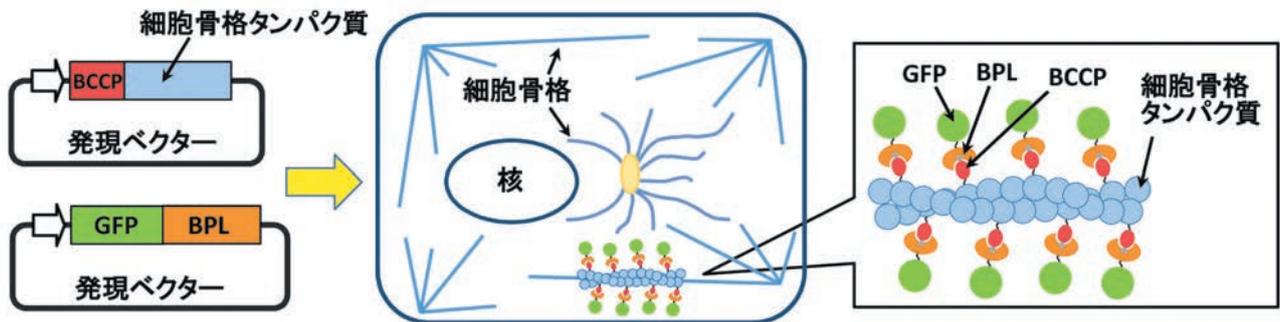


図1 ビオチン化酵素反応を利用した生細胞内でのタンパク質の蛍光ラベル化

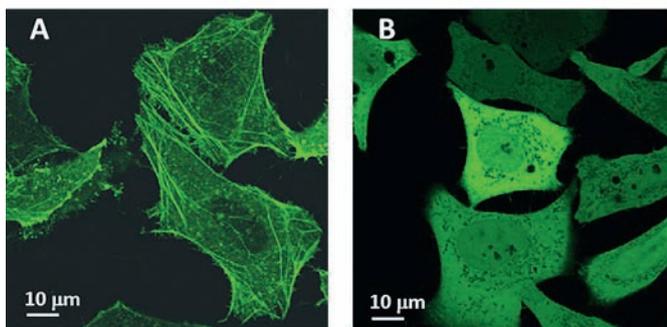


図2 GFP-BPLを利用したアクチンのラベル化(A) 及びそのコントロール(B)

ンという細胞骨格を構成するタンパク質にBCCPを連結した融合タンパク質と、GFPとBPLの融合タンパク質(GFP-BPL)を共発現させた細胞の観察結果を示します。細胞内から繊維状の構造体が観察され、これはアクチンが連結することによって形成されるアクチンフィラメントの構造が観察できていることを示しています。コントロールとして、GFP-BPLだけを発現させた細胞からはこのような繊維状の構造体は観察されませんので(図2B)、

図2Aの結果は、BPLとBCCP間の特異的な結合反応に基づいているものであることがわかります。またこの他にも同じく細胞骨格を形成するチューブリンというタンパク質をラベル化することにより、微小管を明瞭に観察することにも成功しています。現在、この技術を活用して特定のタンパク質を、発光波長の異なる蛍光プロローブを用いて段階的にラベル化し、その細胞内での動態を追跡する研究を進めています。

おわりに

本稿では、タンパク質の蛍光ラベル化技術について紹介いたしました。が、私たちは、同酵素反応系を利用して、他にも様々なバイオアッセイ系の開発を行っています。例えば固相基板上に抗体を固定化する独自の技術を開発し、高感度なイムノセンシング技術の開発を行っています。また、細胞間の連結技術を開発することも試みています。まだ解決すべき課題が多く残っていますが、これらの技術開発を今後も積極的に進めていきたいと考えています。