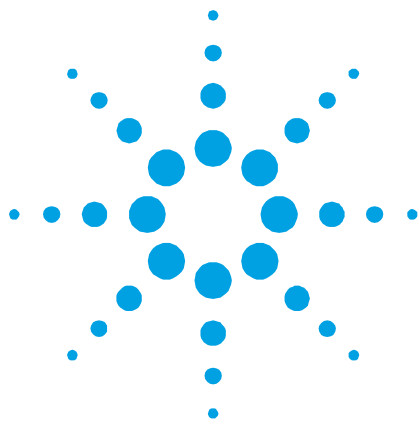




グリーン蛍光タンパク質 (GFP) の 細胞質発現および出芽酵母中の誘導体： Agilent Cary Eclipse を用いた 生体分析

アプリケーションノート

著者

Paul Gavin# and Mark
Prescott#, Ph.D

Daren J. Fyfe, Ph.D*

#Department of Biochemistry and
Molecular Biology,
Monash University, Clayton
campus

Victoria 3800, Australia

* Technical assistance:
Agilent Technologies, Inc.
Mulgrave, Victoria 3170,
Australia

はじめに

Chalfie らによって 1994 年に分離されて以来、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) は、生体内での細胞的な事象の非侵襲的モニタリングを行うための強力なツールとして普及しています。GFP は、蛍光クラゲであるオワンクラゲから分離された 238 アミノ酸タンパク質です。それ自体は $30 \times 40 \text{ \AA}$ の大きさで、有効な β -バレル構造を有しており、内部トリペプチド蛍光色素分子を遮蔽しています (図 1)。

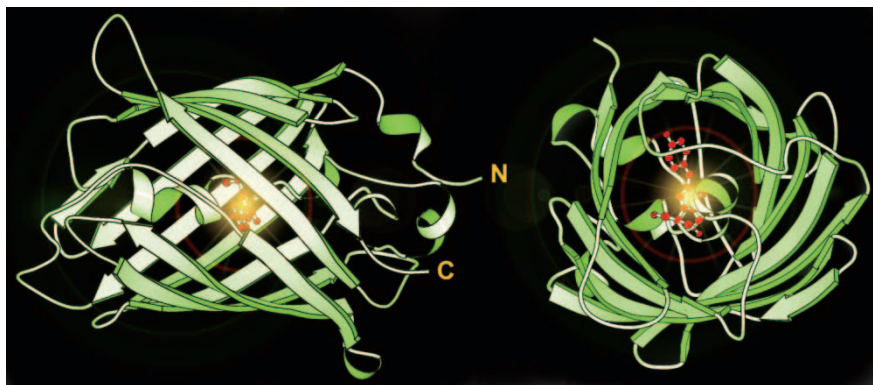


図 1. グリーン蛍光タンパク質の図。赤色はトリペプチド蛍光色素分子

GFP 蛍光色素分子は、395 nm (ピーク励起) あるいは 475 nm の光で励起された状態で 509 nm の緑色の蛍光を放射します。蛍光顕微鏡、蛍光活性化細胞分類装置および蛍光光度計のような種々の装置を用いてこの光を検出することができます。



Agilent Technologies

GFP は、今日の生命科学者にとって非常に魅力的なツールになっています。これは、タンパク質が他の基質あるいは共同因子がなくても成熟するからです。これにより、生命有機体および細胞系の配列で GFP が発現し、自己触媒的な成熟および蛍光信号の生成が可能になります。つまり、GFP では細胞で蛍光マーカーを生成することが可能になります。

これによって、細胞が殺傷され、生体内研究では通常実施できない従来型の蛍光イメージング手法が不要になります。GFP を利用すれば、ありのままの細胞現象と無傷細胞および生命体についてのリアルタイム研究が可能になり、生理学的モデルにおける生物学的メカニズムをさらに深く理解できるようになります。

対象タンパク質に融合させた GFP の最初のアプリケーションは、遺伝子発現とタンパク質局在化です。これは、細胞器官、細胞骨格および分泌経路を明らかにするために用いられました (Gerdes と Kaether の報告²)。それ以来、GFP およびその誘導体についての種々のアプリケーションが急速に開発されました。発色団と周辺のアミノ酸の突然変異研究により、変化する励起および発光スペクトルに関する新しい GFP が生成されました。これには、青色 (BFP)、シアン (CFP) および黄色 (YFP) 蛍光タンパク質などがあり、そのすべてに高度な成熟速度および蛍光強度という特性があります³。色スペクトルは、Matz らがエクオリン GFP に対して 30 % 配列相同性を有したディスクコーラルサンゴ (DsRed) から赤色蛍光タンパク質を分離したことによって、近年、急速に進展しました。

このスペクトルが異なる幅広い蛍光タンパク質では、複数の細胞的事象の同時研究に対応する識別しやすいマーカーが提供され、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたタンパク質間相互作用の研究などの先進的なアプリケーションも可能になります。

GFP ファミリーの蛍光特性は、スペクトル形状、強度および光退色の感受性が変化します。したがって、それぞれの実験モデルで分析を行う前に GFP および誘導体についての検出と測定の手順を最適化することが重要になります。

ここでの実験では、Agilent Cary Eclipse 蛍光分光光度計を用いて、生きた酵母細胞 (出芽酵母) の細胞質ゾル中で発現した GFP を検出し、特性を明らかにすることを目的としています。

装置

- Agilent Cary Eclipse 蛍光分光光度計
- ペルチェ温調マルチセルホルダー (電磁気攪拌器付属)
- 温度制御器
- 温度プローブ
- 磁気スターラー
- クォーツキュベット (4)

酵母株

この研究では、酵母 *S.セレビシエ* の YRD15 (*MAT α* , *his3*, *ura3*, *leu2*, *p+*) を親株に用いました。GFP 誘導体 (緑色、青色、シアン、黄色) と赤色蛍光タンパク質 (DsRED) をコード化している遺伝子については、酵母発現プラスミド pAS1N にクローン化し、前述したように酵母株の YRD15 に転換しました⁵。

転換細胞を必要に応じて選択マーカーで酵母の最少培地 (アミノ酸なしでの 0.75 % 最少培地、2 % ブドウ糖、1.5 % 寒天) に沈着させ、3~5 日間、28 °C で成長させました。

手順

汚染媒体を除去するために酵母細胞を 1ml MilliQ 水で 2 回洗浄し、MilliQ で再懸濁して、650 nm で 0.55 Abs の最終吸光度を得ました。Cary Eclipse 蛍光分光光度計のサンプルコンパートメントに設置したマルチセルホルダーの使い捨て蛍光キュベット (Sarstedt) 中に細胞懸濁液 (2 ml) を入れました。キュベットの温度を 25 °C に設定しました。

「Scan」アプリケーションを用いて、細胞懸濁液をそれぞれの特定の蛍光タンパク質に適した波長の光で励起しました (蛍光タンパク質についての最大励起/発光の広範囲なリストについては、Clontech のウェブサイト³を参照)。GFP、BFP、CFP、YFP および DsRed について発光スキャンを記録しました。DsRed のスキャンのパラメータ設定を図 2 に示します。

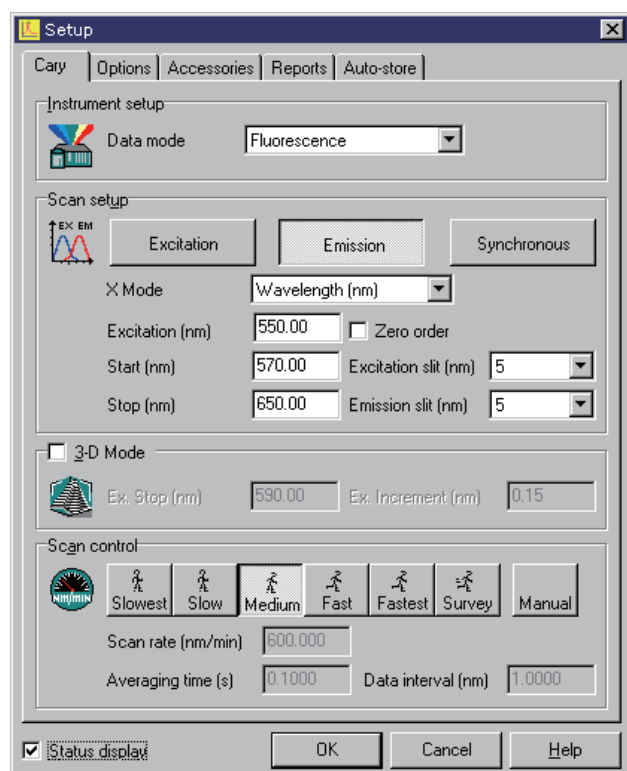


図 2. 550 nm (ピーク励起 558 nm) の励起に続いて DsRed 発光スペクトル (最大発光 583 nm) を検出するための装置パラメータ

結果

それぞれの蛍光タンパク質についての発光スペクトルを図 3 に示します。

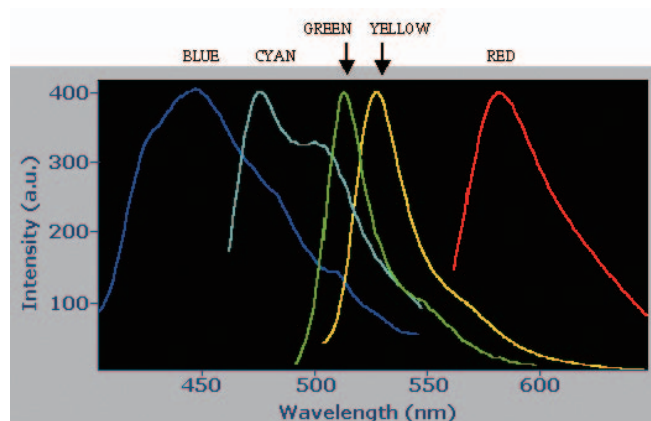


図 3. 蛍光タンパク質の全スペクトルについての発光および強度

考察

酵母細胞の細胞質ゾル中で発現したすべての蛍光タンパク質のスペクトルが容易に記録され、予想される特性に一致しました。主に、Agilent Cary Eclipse の励起および蛍光モノクロメータの両方に取り付けられた内部フィルタにより、細胞自己蛍光および散乱で生じたノイズはごくわずかでした。きわめて低い蛍光強度の蛍光タンパク質、または高いエネルギーの UV 光 (BFP など) で励起した蛍光タンパク質を用いたときには、自己蛍光 (対象サンプルまたは媒体のいずれか) を減らすことが最も重要です。UV 光は、細胞環境の多くの成分からの強い蛍光応答を引き起こします。特に、わずかなタンパク質の相互作用が観測されたときには、UV 光を最小限に抑えて、ターゲット蛍光タンパク質からの励起のマスキングを防ぐ必要があります⁶。

結論

マルチセルおよび温度制御アクセサリを備えた Agilent Cary Eclipse は、全細胞中で発現した異なる蛍光タンパク質を測定し、特性を明らかにするための簡単で高速かつ再現性の高いアクセサリを提供します。異なる GFP を用いて細胞中で対象タンパク質に明確に標識をつけて、複数波長読取機能によって相互作用を同時にモニタリングすることができます。自動励起が可能になり、生体中で 6 つまでの異なる蛍光プローブで発光を読み取ることができます。

参考文献

1. Chalfie M, et al (1994) Science, 263; 802
2. Gerdes, H-H and Kaether, C. Green fluorescent protein: applications in cell biology, FEBS Letters, 389, 44-47, (1996).
3. Clontech Web Site: www.clontech.com
4. Matz, M. V., et al (1999) Nature Biotech. 17, 969-973.
5. Prescott, M., et al (1994), Biochem. Biophys. Res. Commun. 207, 943-949.
6. Lakowicz, J.R. (1999) Ch. 16: Protein Fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edn. Kluwer Academic/Plenum Press, New York.

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2001, 2012
Published December 18, 2012
Publication Number SI-A-1831JAJP



Agilent Technologies