

GFP 研究の歴史を紐解く ～下村, Chalfie, Tsien 博士の偉業～

理化学研究所 脳科学総合研究センター 宮脇 敦史
科学技術振興機構 ERATO

1. はじめに

2008年10月8日、スウェーデン王立科学アカデミーは、2008年のノーベル化学賞を、下村 脩博士(ボストン大学名誉教授, 図1右)、Martin Chalfie博士(コロンビア大学教授), Roger Y. Tsien博士(カリフォルニア大学サンディエゴ校教授)の3人に贈ることを発表した。受賞理由は「緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) の発見、発現、そして開発」である。今やポストゲノムサイエンスに必需のツールとして世界中で使用されている GFP であるが、その歴史は波乱に富んでいる。3氏のノーベル賞受賞を称える意味でも、ここでその半世紀にわたる GFP の歴史を紐解いてみたい。

2. GFP をめぐる半世紀の歴史

1960年代：イクオリンと GFP の発見

1961年の夏より、下村博士は、バンクーバー島南端に近い小島にある、ワシントン大学フライデーハーバー研究所で、オワンクラゲ発光の研究を開始した。当時オワンクラゲの傘の外縁、すなわち発光器官が緑色の光を放つことは知られていたが、それがどんなメカニズムによるのかわかっていなかった。

下村博士はまず発光物質の抽出に取り組んだ。海面に漂うオワンクラゲを長い柄のついた網で棧橋からすくいあげ(図1左・中)、傘の外縁をはさみで紐状に細く切り取る作業を繰り返した。発光物質の不安定性に苦しんだが、やがて、発光現象がカルシウ

ムイオンに依存して起こること、したがって発光物質を抽出する際にカルシウムイオンをキレートする必要のあることを見出した。その結果、カルシウム感受性発光タンパク質「イクオリン」の精製に成功し、カルシウム依存性発光現象のメカニズムを解明した。イクオリンは、アポイクオリン(タンパク質部分)と、酸素分子および発光基質であるセレンテラジンから構成される。この化学発光タンパク質複合体にカルシウムイオンが結合すると、アポイクオリンの高次構造変化に伴い、セレンテラジンが酸化反応を受けて、セレンテラミドに変わる。セレンテラミドとアポイクオリンとの複合体が青色発光タンパク質であり、試験管内でカルシウムを添加すれば、イクオリンから青色発光を観察することができるのだ(図2)。

ところがオワンクラゲが海の中で発する光は緑色である。この色の相違は何によるのか? 下村博士は次にこの問題に取り組んだ。結果、イクオリンに寄り添う緑色のタンパク質を発見・精製することに成功。1962年に発表した論文の中で、博士はそのタンパク質を「溶液にすると太陽光では緑がかって見え、タングステン光では黄色、紫外線を当てると輝くような強い緑の蛍光を発する」と記載している¹⁾。この緑色のタンパク質は、その後1969年に緑色蛍光タンパク質(GFP)と改名された。GFPはオワンクラゲ発光器官において、イクオリンの青色の光(極大470nm)を緑色の光(極大508nm)にシフトさせる役目を担っている(図2)。イクオリンの励起状態

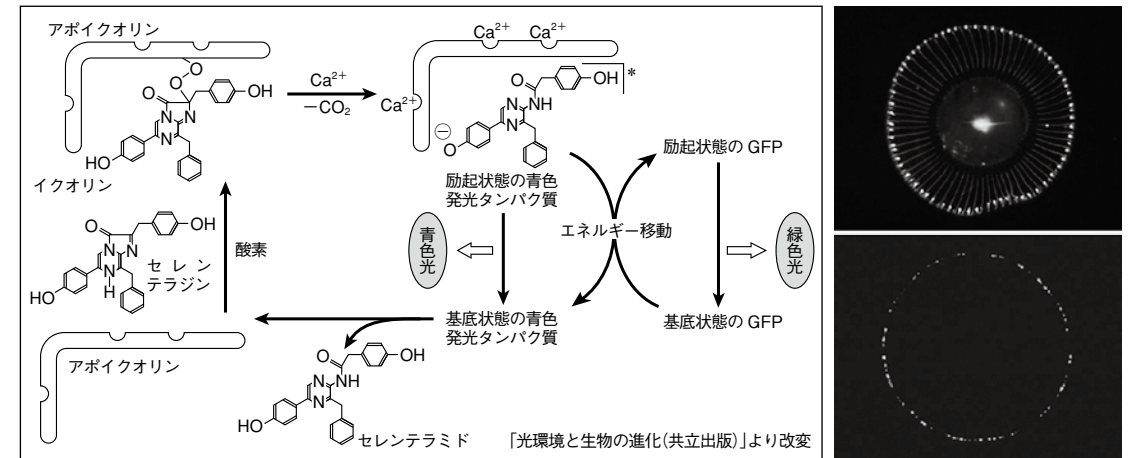


図2 イクオリンの分子構造と GFP による発光メカニズム。写真はオワンクラゲの発光(下村脩博士提供)。(上)オワンクラゲ、(下)オワンクラゲの暗室での発光を撮影したもの。海水に塩化カルシウムを加えて発光(緑色)を誘導。

のエネルギーが無放射的に GFP に移動するため、実際のクラゲの発光器官から放射される光は緑色となるのだ(図2写真)。

このように、今から半世紀ほど前に、下村博士はイクオリンと GFP を発見・精製し、オワンクラゲ発光のメカニズムの枠組みを鮮やかに解き明かした。ところで面白い逸話がある。1979年に発表した GFP 発色団の構造(後に正しいことが証明された)は、GFP の分解産物の分光データをもとに下村博士が予測したものである。GFP 発色団を含む分解産物を調べていて、博士は見覚えのある分光データに遭遇した。1950年代後半に名古屋大学でウミホタルのルシフェリンのモデル化合物を化学合成していたが、そのときのおよそ20年前に解析した)分光データによく似たものが現われたのだ。それで一気阿成に予測が可能になったらしい。NMR や HPLC を使うことなく、博士がどうしてその構造に辿りつけたのか、まわりの研究者は不思議に思ったようだ。

1990年前後：GFP 技術の黎明^{りようめい}

Chalfie 博士は線虫遺伝学の権威である。線虫の触覚反応に関わる遺伝子を数多く単離し、ずいぶん昔から、この透明な動物の中で遺伝子の発現やタンパク質の局在を蛍光で可視化することを夢見ていたようだ。1989年はじめにあったあるセミナーで GFP の存在を知った Chalfie 博士は、そんな夢の実現を目指して Douglas Prasher 博士とちょっと“ちぐはぐ”な共同研究を開始することになる。すぐに Prasher 博士はオワンクラゲから GFP 遺伝子の単離を完了し、コロンビア大学の Chalfie 博士に電話をかけた。しかし不運なことに、有給休暇をとってユタ大学に赴いていた Chalfie 博士につながらない。

Prasher 博士ははっきり Chalfie 博士が引退したものと勘違いした。1992年の9月のある日、GFP 遺伝子が単離されたことを知らないまま、Chalfie 博士は大学院生と GFP で線虫を光らせる夢を実現する計画を練っていた。GFP の最新情報を集めようと文献検索をしたとたん、Prasher 博士の GFP クローニングの論文²⁾が眼に飛び込んできた。すぐさま Prasher 博士に連絡をとり、GFP 遺伝子を送ってもらうことになる。

Prasher 博士の論文発表後、“オワンクラゲ以外の生き物で GFP を光らせる”試みは他のいくつかの研究室でも行われていたが、いずれも成功していなかった。実際のところ、そういう試みに対して懐疑的な見解が多かった。たとえば、藻類が産生するフィコビリタンパク質は強い蛍光を発するが、この遺伝子を他の生き物に導入しても蛍光は生まれえない。フィコビリタンパク質に藻類が固有に合成するテトラピロール化合物が付加され、発色団としてはたっているからである。同様の筋合いで、GFP が発色団を作るためにはオワンクラゲ固有の因子が必要なのだろう、とそれまでの蛍光タンパク質を多少でも知る研究者は考えていた。しかし、オワンクラゲは“有職者”の予想に反して人類に好意的であった。ただ Prasher 博士が単離した GFP 遺伝子の端には余分な配列が付いていて、それが発現を妨げていたのだ。Chalfie 博士らはその配列を除くことで、光る大腸菌、そして線虫を作ることに成功した。GFP が自己完結的に発色団を作ることが見事に証明されたのである。顕微鏡下で輝く大腸菌や線虫を眼前にして、Chalfie 博士は GFP の無限の可能性を頭に巡らせたことであろう。そうして、クラゲにそして自然に対する感謝の念を新たにしたことであろう。



図1 (左)フライデーハーバー研究所の棧橋、(中)研究所の講義室に付む長い柄のついた網、(右)下村脩博士。2004年夏、フライデーハーバー研究所のコテージにて。右端に10万匹のクラゲから精製された GFP 溶液の入ったボトルが写っている。

1994年：GFP技術の勃発

1994年2月、Chalfie博士らの画期的な研究の成果が『Science』誌に発表された³⁾。線虫の神経細胞がオワンクラゲGFPで光る様子が世界中の研究者を驚嘆させた。同年12月には、Tsien博士らによって、GFPの明るい変異体や異なる色の変異体の開発が報告された。1994年はオワンクラゲGFPが人類の手に落ちたことを宣布する記念すべき年となった。

翌年1995年の3月。サンフランシスコのパロアルトにあるホテル“Hyatt Richeys”。パステルカラーの壁がまぶしい会場で、GFPの応用技術に関する本格的なシンポジウムがはじめて開催された。タイトルは、“Fluorescent Proteins and Applications”。このシンポジウムの参加者は2つの“研究民族”によって構成されていた。ひとつはオワンクラゲなどの発光生物を研究してきた比較的古い民族。もうひとつは比較的新しい民族で、これからGFPを活用しようと思気込む発生学・細胞生物学の研究者集団である。シンポジウムにおいて、Chalfie博士とTsien博士はこの2つの研究領域を橋渡しする使命を帯び、それぞれ、“GFP in Worms and Flies”、“Mutagenesis and Improvement of GFP”という題で講演を行った。一方、下村博士はそのシンポジウムには参加しておらず、日本からの参加はわずかに2名、筆者と斉藤尚亮博士(神戸大学)であった。筆者は、同年1995年の秋から、Tsien博士の研究室(カリフォルニア大学サンディエゴ校)への留学が決定していた。同年夏の終わり、筆者はいよいよカリフォルニアに旅立つ直前に、GFPに関する総説を執筆した⁴⁾。その際に思い切って下村博士に連絡を取った。電話をかけて、オワンクラゲの写真を貸していただきたい懇請したところ、すぐにスライド数枚を送ってくださった。

1994年以降：GFPの進化

Tsien博士は、蛍光イメージングの創始者と呼ぶべき人物である。1980年代より、とくに細胞内カルシウムイメージング技術を開拓したことで有名である。quin-2, fura-2, indo-1, fluo-3などのカルシウム指示薬、およびこれらの細胞膜透過性体、またカルシウムに関連するcaged化合物などを開発してきた。fura-2, indo-1に関しては、いわゆるレシオイメージングを確立して、カルシウムの濃度を定量的に測定することを可能にした。カルシウム以外

にも、cAMP, pH, 膜電位などを検出する蛍光指示薬の開発を通して、細胞内現象の多角的理解に貢献してきた。Tsien博士の開発は指示薬のみならず、顕微鏡などの光学システムや解析ソフトまでに及ぶ。元々の専門は有機合成化学であるが、ひとつの学問領域に留まることなく学際的な研究を展開している。

そのTsien博士が、自然の傑作GFPに興味をもったのは言うまでもない。Prasher博士からもらった遺伝子を元に大腸菌に作らせたGFPを材料にして、このタンパク質の構造機能相関を明らかにした。GFPが共役二重構造すなわち発色団を作る機構や、発色団を取り巻く環境の物理化学を詳細に解析した。また、遺伝子変異(アミノ酸置換)を導入することで、数々の有用なGFP変異体を作製してきた。ランダムな変異導入を行って、明るさを向上させたS65T変異体(EGFP)や、色の異なる変異体であるBFP, CFPなどを作製することに成功した。さらに、GFPの結晶構造解析(オレゴン大学のRemington博士との共同研究)の途中のデータをもとにYFPをデザインして作り上げた。筆者は、1995年から1998年まで、Tsien博士の研究室でGFPの研究に携わる機会に恵まれ、発色団の π 電子の挙動から改変GFPの蛍光特性をシミュレーションする作業にも参加した。コンピュータを前にTsien博士と頭を捻りながら、筆者は彼がいかに電子の心を熟知しているかを改めて認識したものだ。

GFP改変体の多様性が増大したことによって、マルチカラーイメージング、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、蛍光相互相関分光法(FCCS)、二分子蛍光補完法(BiFC)などのポストゲノム技術が飛躍的に発展し、また、遺伝子でコードされたプローブ(純タンパク質性プローブ)が世界中の研究室で開発されるブームを生み出すこととなった。これと並行して、蛍光タンパク質の研究開発は、生物種における多様性も増していく。1999年以降は、生物発光を備えていない花虫類六放サンゴ類から次々と新規の蛍光タンパク質の遺伝子がクローニングされた。現在に至るまで、六放サンゴ類を中心に海洋動物からクローニングされた蛍光タンパク質は何十種類にもほり、“GFP-like protein”と呼ばれるファミリーを形成している。Tsien博士らによって蓄えられたオワンクラゲGFPに関する基本的知見は、GFP-like proteinの研究にも役立っている⁵⁾。

2004年：記念シンポジウムの開催

2004年8月から9月にかけて、フライデーハーバー研究所の100周年を記念して、シンポジウム“Calcium-Regulated Photoproteins and Green-Fluorescent Proteins”が開かれた(図3)。下村博士の業績を称えながら、生物発光や蛍光タンパク質などを話題に討論が繰り広げられた。下村博士もこのシンポジウムに参加されていた。筆者らは、先生夫妻のコテージを訪れる機会に恵まれ、10万匹のクラゲから精製したというGFPの溶液を見せていただいた(図1右)。街中にある記念館には、フライデーハーバークラゲに加えて、クラゲの発光器官を切り取る器械などの様々な関連機器が陳列されていた。このシンポジウムにはChalfie博士とTsien博士も参加していた。小ぢんまりとしたシンポジウムだったが、歴史に刻むべき内容を孕んでいた。



図3 GFPを主要テーマとする国際シンポジウムのバンフ。手前が2004年フライデーハーバー研究所100周年記念シンポジウムの冊子。表紙に下村博士。

2008年：ノーベル化学賞

冒頭でも述べたとおり、2008年、GFPの研究開発に多大な貢献をしてきた下村博士、Chalfie博士、Tsien博士の3氏にノーベル化学賞が贈られた。下村博士の受賞後の第一声は意味深長である。「なんで化学賞なのだろうって不思議に思います。受賞の対象はGFP。ちょっとピンとこない。医学生理学賞であれば理解できますが」。下村博士の興味は昔も今も生物発光にある。オワンクラゲの発光における主役はあくまでも化学発光タンパク質イクオリンである。博士はイクオリンを寵愛した。最近では、2000年にイクオリンの結晶構造を『Nature』誌に発表している⁶⁾。イクオリンの化学に対して、博士の専心と執心があったからだ。だからこそ、ノーベル化学賞受賞の栄に浴しながら、受賞対象にイクオリンが含まれないことに当惑したのでは、と筆者は思

う。一方、GFPはオワンクラゲの発光における脇役である。先述のとおり、イクオリンが放射するべき青い光を緑に波長変換するのがGFPの役目である。博士にとってのGFP研究は、その発色団構造を解いた時点(1979年)でピリオドが打たれたようだ。GFPの応用に関しては、世間が騒ぎだてるほどの興味はないという。1995年、1997年、そして1999年に開催された国際GFPシンポジウムのいずれにも下村博士は参加していないのがその証拠である。しかしそうはいっても、とくに医学生物学分野におけるGFPのめざましい成長ぶりには目を細めているようだ。GFPがノーベル賞の受賞対象となるのなら医学生理学、と思うのも納得がいく。

いずれにしても、受賞者3人の生涯の業績はGFPだけで説明できるものではない。言い換えれば、2008年ノーベル化学賞は、各人のGFP研究に優るとも劣らない別の研究業績、すなわち、下村博士の化学発光研究、Chalfie博士の遺伝学的触覚研究、Tsien博士の有機蛍光プローブ開発研究に関してはなんら語っていないのである。

3. おわりに

「自然を見て自然に学べ」

下村先生の若者に対するメッセージには、自然に体当たりすることの重要性が流れている。科学成果の事業化や実用化が叫ばれる時世に、およそ70年前に寺田寅彦が発した名言を噛みしめてみたい。以下は『寺田寅彦全集』の随筆「科学とあたま」から引用したくだりである。

—科学の歴史はある意味では錯覚と失策の歴史である。偉大なおろかなもの、頭の悪い能率の悪い仕事の歴史である—

われわれは、目先の利く科学を進める一方で、世間ずれのない科学、無邪気で一見愚直な科学をどこかで保護してゆかないといけないうのだと思う。

謝辞 貴重な写真を提供してくれた、下村脩氏、永井健治氏、水野秀昭氏、櫻井絃子氏に感謝したい。

参考文献

- 1) O.Shimomura et al.: J.Cell Comp. Physiol., 59,223(1962)
- 2) D.C.Prasher et al.: Gene, 111, 229(1992)
- 3) M.Chalfie et al.: Science, 263, 802(1994)
- 4) 宮脇敦史: 細胞工学(1995)
- 5) R.Y.Tsien: Annu. Rev. Biochem., 67, 509(1998)
- 6) J.F.Head et al.: Nature, 405, 372(2000)