

光る蛋白質を見てみよう！

序

私たちの体の中には、蛋白質や DNA, RNA などの「生体高分子」と呼ばれる様々な分子が存在しています。生命は、多数の生体高分子がそれぞれ特有の機能(化学反応)を発揮することで、複雑なシステムを生み、日々の活動を行っています。生体高分子の中でも、蛋白質はその複雑な性質と重要性から、特に注目されており、世界中で様々な研究が行われています。

今回は、発光クラゲから見つかった、紫外線を当てると発光する緑色蛍光蛋白質を取り上げます。この蛋白質の単離・精製をする実験と、光る性質を観察し、発光のメカニズムについて考察してみましょう。この実験で、蛋白質科学の面白さの一端に触れていただければと思います。

蛋白質ってなに？

蛋白質と聞いて、皆さんは最初に何を思い浮かべるでしょう？ 食べると体に良いもの？ 確かに、蛋白質は、炭水化物、脂質とともに三大栄養素の一つであると言われています。しかしながら、蛋白質は自然科学の研究(生命科学・化学・薬学)の観点からは、単に体に良い食料品という位置づけではなく、生体分子としての、その性質の面白さ、重要性に大きな注目が集まっています。なぜなら、蛋白質は、地球上の生命のほとんどすべてを構成している成分であり、生命にとって不可欠な分子であるからです。人間も例外ではなく、さまざまな蛋白質が体のさまざまな部分を構成することによって、我々は複雑な活動を営むことが出来ています。図1は、代表的な蛋白質の例を一部だけ載せています。図1に示すように、髪の毛、目のレンズ、筋肉、酸素供給など非常に多くの役割を多様な蛋白質が担うことにより人間の体が成り立っているのです。したがって、蛋白質という分子を理解することは、分子のレベルから人間や生命全体を理解することになります。そして、ガンや糖尿病などに有効な薬の開発、医療への応用などにもつながっていくため、蛋白質研究は現在も世界的に非常に活発で競争の激しい研究分野の1つとなっています。国も日本の国家プロジェクトと位置付けて膨大な研究費を投じてこれを後押ししてきました。

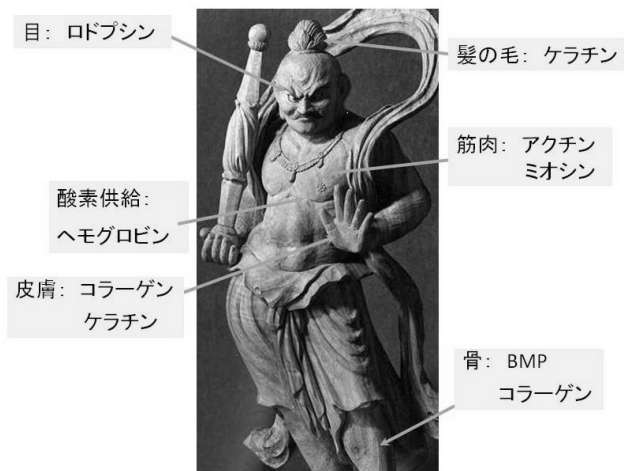


図 1. 人間を構成する蛋白質の一例

ところで、蛋白質はなぜこのように多くの種類を持ち、全く異なる様々な性質を持つのでしょうか？蛋白質は、序論で述べたように、アミノ酸が一直線につながって出来ています。蛋白質を形成するアミノ酸は20種類あり、大きさ、電気的性質、水への溶解易さなど、それぞれ性質が大きく異なるため、特徴の異なるアミノ酸を組み合わせることにより、ここからできる蛋白質の性質も大きく変えることができます。アミノ酸の種類は20種もあるので、例えば、アミノ酸が3つ連結した蛋白質だけでも、約 $20^3 = 8000$ 通りの組み合わせが考えられます。さらに蛋白質は、アミノ酸がただ繋がっているだけでなく、3次元空間で折りたたまれて、特有の「三次構造＝立体構造＝高次構造」を形成しています。

そのため蛋白質の種類は数千万種類と言われ、身体をつくる役割を果たすだけでなく、生体内の情報のやりとりや、栄養の貯蔵・輸送、さらには蛍光を示すものなど、その機能は多種多様です。

GFP ってなに？

GFP (Green Fluorescent Protein, 緑色蛍光蛋白質) は、オワンクラゲがもっているアミノ酸が239個繋がった蛋白質です。1960年代に発見され、この発見によって2008年に下村脩さんがノーベル化学賞を受賞したことで有名になりました。

GFP は紫外線を照射することによって緑色の蛍光を示すことから、蛋白質に付加することで、外部から目的の蛋白質の細胞内局在を明らかにするツールとして、よく用いられています。

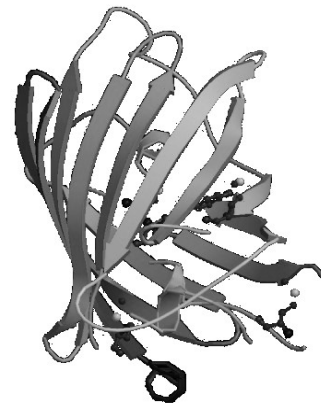
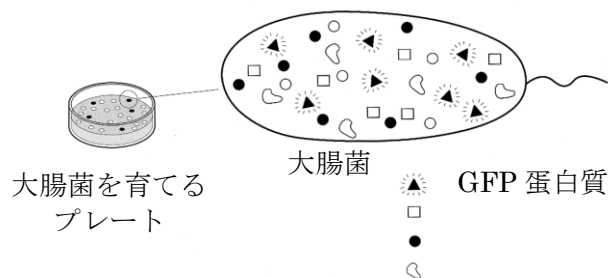


図2. GFPの立体構造

実験内容

1. 大腸菌を育てよう.

大腸菌に GFP をコードする遺伝子を導入し、大腸菌内で GFP を発現させます。大腸菌の培養には時間がかかるため、今回は事前に大腸菌を培養しておきます。さらに GFP が発現するための鍵となる「アラビノース」という物質が入っているプレートと入っていないプレートで、GFP の発現量に違いがあるかも確認します。

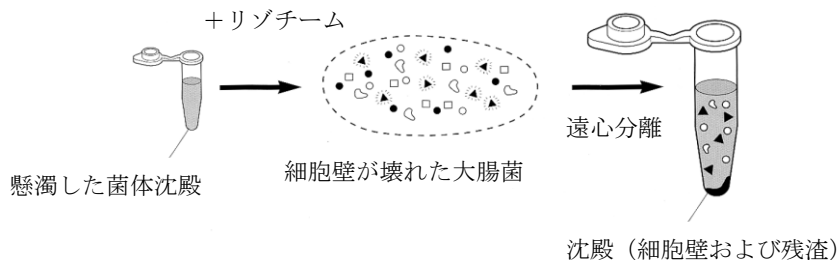


2. 蛋白質を取り出してみよう.

GFP を発現している大腸菌が含まれた培養液を、遠心分離し、大腸菌細胞と液体培地を分離します。その後沈殿を、リゾチームという多糖分子を分解する酵素を加えた液体で懸濁し、大腸菌の細胞壁と細胞質膜を壊します。こうすることで大腸菌細胞内から、蛋白質をとりだします。

3. 蛋白質を精製してみよう.

懸濁液をさらに遠心分離し、溶解した大腸菌細胞の大きな粒子と、GFP などの小さな蛋白質を分離します。



その後 GFP の含まれている上清を、クロマトグラフィーによって精製します。GFP は疎水性（水を嫌う性質）をもっているため、同じ疎水性を有する物質に吸着させます。他の大腸菌由来の蛋白質はほとんどが親水性あるいは GFP より弱い疎水性を有しているため、分子周辺の条件を変えることで GFP から分離することができます。GFP は溶液中の塩濃度を変化させることで、疎水性の物質

から脱離させることができます。

4. 蛋白質が光るか確認しよう。

クロマトグラフィーによって GFP が精製されたかどうかを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認します。界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下では蛋白質が陰性に荷電し、電気を流すことによって陽極方向に蛋白質が移動します。分子ふるい効果によって分子量の小さいものほど長く泳動されるため、蛋白質の分子量の違いによって、GFP が単離・精製できたかを確認できます。

その後 GFP を含んでいる溶液に紫外線を照射し、GFP が蛍光を示すかを確認します。さらに、GFP を含んだ溶液に塩酸を加えて、蛍光の変化についても確認します。

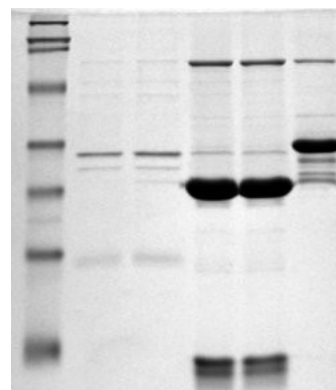


図 3. 電気泳動図の例

5. 蛋白質の立体構造をグラフィクスで見よう。

蛋白質は、非常に小さいため、通常は最新鋭の顕微鏡を用いても、その立体的な形（立体構造）を直接観測することはできません。そこで、X 線を用いる方法（X 線結晶構造解析法）や強力な磁石を用いる方法（NMR（核磁気共鳴法））などによって間接的に観測されており、これまでの研究によってここから解明された蛋白質のデータが蛋白質構造データベース（PDB）に蓄積されています。今回は PyMol というプログラムを用いて、PDB 内にある GFP のデータを読み込み、GFP の 3 次元構造をコンピューター画面上で見てください。また、GFP 以外の様々な蛋白質についても構造を表示して、その違いを比較して見ましょう。