

## 緑を赤へ

### — 緑色蛍光蛋白質を赤色に変えることに成功 —

#### 概要

京都大学大学院生命科学研究科の今村博臣准教授、大阪大学大学院理学研究科の今田勝巳教授、大坪史歩同大学院生らの研究グループは、緑色蛍光蛋白質（GFP）を改変して赤色蛍光蛋白質（RFP）を人工的に創り出すことに世界で初めて成功しました。蛍光蛋白質は、現代の生物・医学研究で欠くことのできないツールですが、組織や臓器といった厚い試料や長時間の観察に必要な赤色の蛍光蛋白質は、天然 RFP から作った明るさが不十分なものしかありませんでした。今回、研究グループはアザミサンゴの GFP (AG)に着目し、赤い光（600 nm 以上）を発する蛍光蛋白質では最大級の量子効率を持つ RFP につくりかえることに成功しました。また、立体構造も明らかにし、赤色蛍光発色団形成に重要なアミノ酸とその立体配置を明らかにしました。これにより生体深部のイメージングに適した高性能 RFP の開発が期待されます。

本研究成果は米国科学誌「米国アカデミー紀要（*PNAS*）」の電子版で 2023 年 10 月 23 日 15:00 時（米国東部時間）に公開されます。



アミノ酸変異を導入していくことで、アザミサンゴの緑色蛍光蛋白質（左端）を、緑色と赤色の両方の蛍光を発するように改変し（中央の2つ）、最終的には完全な赤色蛍光蛋白質（右端）を創り出した。  
（写真：今村博臣）

## 1. 背景

蛍光蛋白質は、特定の蛋白質の発現・分布・相互作用といった生体内の様々な情報を生きたまま得るためのマーカーやセンサーとして使われており、現代の生物・医学研究では不可欠なツールです。最初に発見された蛍光蛋白質は、下村脩博士(2008年ノーベル化学賞受賞)がオワンクラゲから見つけた緑色蛍光蛋白質(GFP)です。その後、様々な生物から類縁の蛍光蛋白質が発見され、これらを改変して紫色から黄色の様々な蛍光タンパク質が開発されました。

蛍光色の中でも、赤色光のような長波長の光は生体内での透過性が高く細胞毒性も低いいため、多くの細胞が集まった組織や臓器といった厚い試料の観察や長時間の観察に適しています。しかし、天然の蛍光タンパク質の多くは緑色で、赤色の蛍光蛋白質(RFP)はごく一部の生物からしか見つかりません。また、天然のRFPは蛍光が弱い上にアミノ酸配列がどれも似通っており、改変してもあまり明るいものができません。

蛍光を出す発色団は、蛍光タンパク質内部で3つのアミノ酸が自己触媒反応を起こして自発的にできあがります。RFPの発色団の化学構造(図1右)は、GFPやGFPを改変した蛍光蛋白質の発色団の構造(図1左)と大きな違いがあります。RFPはGFPから進化してできたと考えられていますが、天然のRFPはGFPと進化的に大きく離れていてアミノ酸配列の違いが大きく、赤色の発色団の形成にはどのような環境が必要で、どのアミノ酸残基が重要なかわかっていませんでした(図2)。そのため、これまで明るいGFPを改変してRFPにする試みがなされてきたものの、誰も成功しませんでした。

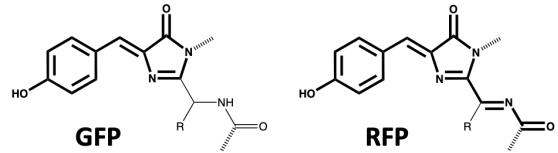


図1 蛍光蛋白質の発色団の構造

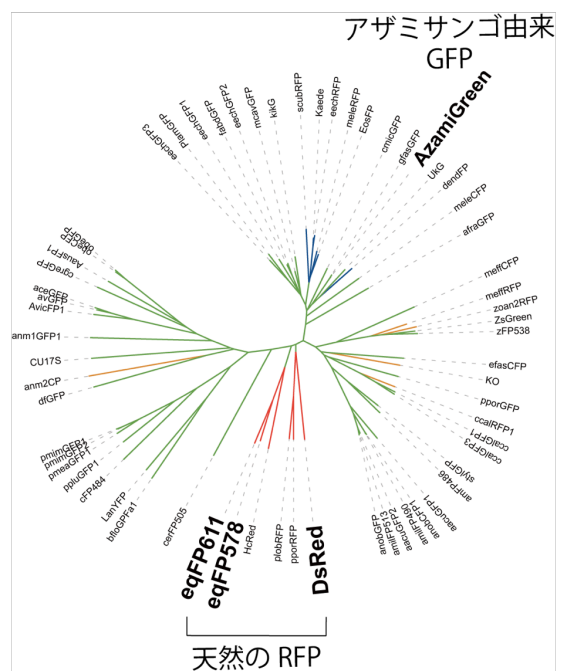


図2 天然の蛍光蛋白質の系統樹

## 2. 研究手法・成果

共同研究グループは、天然のRFPに比較的アミノ酸配列に近いアザミサング由来のGFP(AG)に着目し、天然のRFPに高く保存されているがAGには保存されていない35か所のアミノ酸残基に注目しました。AGのこの35か所のアミノ酸を天然RFPのアミノ酸に変えると緑色に加えて弱い赤色蛍光を発することを見出しました。そこで、この変異蛋白質を蛋白質工学的手法を用いて試験管内で進化させ、最終的にAGに29か所の変異を導入することで、赤い光(600nm以上)を発する蛍光蛋白質では最大級の量子効率を持つRFP、AR1.0の作成に成功しました(図3)。

続いて、研究グループは29か所の変異をそれぞれ一つずつ元のAGのアミノ酸に戻すことで、赤色発色団の形成に重要なアミノ酸を特定。さらに、大型放射光施設SPring-8を用いたX線結晶構造解析によりAGとAR1.0の立体構造を詳しく調べ、構造の違いから赤色発色団形成に必要な蛍光蛋白質内部のアミノ酸配置を明

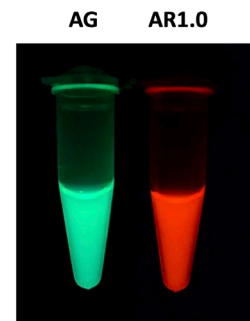


図3 改変前と改変後の蛍光蛋白質

らかにしました (図4)。

また、研究グループは AR1.0 を細胞内で使えるように単量化した mARs1 も作成し、GFP を赤く改変した蛍光蛋白質が細胞内でのイメージングに使えることを実証しました。

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究は、不可能と思われていた緑色の蛍光タンパク質を赤色に変えることが可能であることを実証しました。今回作成した AR1.0 は、明るい蛍光を発する GFP 並みの量子効率をもちますが励起光の吸収効率が悪いため、厚い試料の観察にはまだ明るさが十分とはいえません。一方で、今回の研究により赤色発色団を形成するために重要なアミノ酸や発色団周囲の環境が明らかになりました。本研究は、天然に広範に存在する GFP からの RFP の創成に道を開くもので、停滞していた明るく高性能な RFP の開発を一気に加速させる成果です。このような RFP を用いれば、生きたまま組織や臓器内といった生体深部をイメージングすることが容易になり、医学・生物学研究の進展に大きく寄与すると考えられます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学研究費補助金基盤研究 (B) (課題番号 20H03221) および科学研究費補助金学術変革領域研究 (B) (課題番号 20H05757) による支援のもとに行われました。また、本研究は京都大学と大阪大学が共同で行ったものです。本件は、大阪大学においても同時にリリースされます。

#### <用語解説>

##### ※1 アザミサンゴ

イシサンゴ目に属するサンゴ。ポリプの集まりがアザミの花のように見えることから名付けられた。中部、西部太平洋・インド洋に分布し、日本では沖縄や小笠原諸島で見られる。

##### ※2 量子効率

蛍光物質が吸収した励起光の光子数と蛍光として放出した光子数の比率。

##### ※3 蛋白質工学的手法

天然蛋白質のアミノ酸配列を改変したり設計したりして、有用なタンパク質を人工的に創り出す手法。

##### ※4 発色団

分子中の光を吸収する部分。光の吸収によって発色団の電子は基底状態から励起状態へと移行する。蛍光分子の発色団の場合は、励起状態から基底状態に戻る際に光を発する (蛍光)。発色団は、多くの場合、交互に単結合と二重結合が連なった共役二重結合によって構成されている。

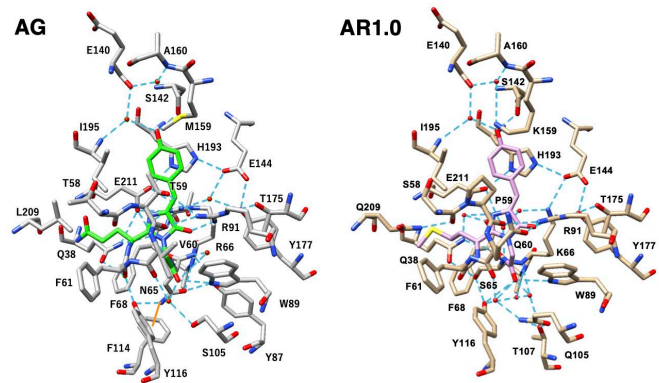


図4 発色団周辺の構造

### <研究者のコメント>

この研究を始めた当初は思ったように赤色の蛍光が現れずに苦悩しましたが、地道に検討を重ねることで最初の GFP 由来 RFP の開発へとつなげることができました。蛍光蛋白質はその実用面が強調されがちですが、その発色団形成の仕組みも興味深い研究対象です。本研究をきっかけに RFP 発色団形成の仕組みについての理解が深まることで、高性能な RFP を論理的に設計して開発できるようになるはずです。

### <論文タイトルと著者>

タイトル：Red fluorescent proteins engineered from green fluorescent proteins（緑色蛍光蛋白質から蛋白質工学的手法で創り出された赤色蛍光蛋白質）

著者：Hiromi Imamura<sup>1</sup>, Shiho Otsubo<sup>2</sup>, Mizuho Nishida<sup>1</sup>, Norihiro Takekawa<sup>2</sup>, Katsumi Imada<sup>2</sup>

所属：<sup>1</sup>京都大学大学院生命科学研究科, <sup>2</sup>大阪大学大学院理学研究科

掲載誌：米国アカデミー紀要 (*PNAS*) DOI : <https://doi.org/10.1073/pnas.2307687120>