

GFP (Green Fluorescent Protein 緑色蛍光蛋白質)

GFP とは？

GFP とはオワンクラゲから単離された緑色の蛍光を発する蛋白質である (Fig. 1)。野生型 GFP は、395 nm の光で励起され、509 nm の光を蛍光として発する。分子質量は 27 kDa、等電点は 5.6 である。

GFP はなぜ光るのか？

ペプチド鎖の一部が「蛍光団」と呼ばれる構造を形成しており、この構造がある特定の波長 (395 nm) の光を受けると共鳴し、エネルギーを吸収する (励起される)。励起された分子は、基底状態 (元のエネルギー状態) に戻る際、いくらか長い波長 (509 nm = 緑色) の光としてエネルギーを放出する。この光が蛍光である。

GFP の利用方法は？

解析したい蛋白質に融合して発現させる事で、その蛋白質の細胞内での空間的あるいは時間的な局在を知る。他には、蛍光蛋白質同士が近づくと蛍光に変化が起こる事を利用して、生体分子間相互作用を検出する方法などもある。

GFP がよく使われるのは？

GFP の蛍光団はアミノ酸残基のみから成り (Fig. 2)、その形成も自発的に起こり、補因子を必要としない (蛋白質が単独で光る) ため、汎用性が高い (例えばホタルの発光を担うルシフェラーゼは、ATP を用いてルシフェリンを酸化することで光を出している)。また、蛍光団形成に関与するアミノ酸残基を変異させる事で、蛍光強度の強くなった蛋白質 (EGFP)、異なる色の蛍光を発する蛋白質 (YFP, BFP, RFP)、励起波長と蛍光波長の差が大きくなった蛋白質 (Keima) などが作製されている。また、良く似た蛍光タンパク質として、ある波長を当てると蛍光の色が変わる蛋白質 (Kaede) や、ある二つの波長で蛍光のオンとオフを切り替える事のできる蛋白質 (Dronpa) なども報告されている。

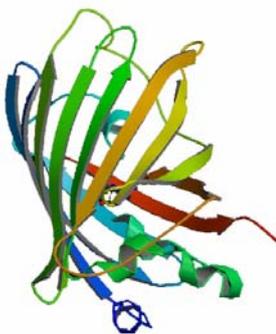


Fig. 1: GFP の立体構造
(O'Brien *et al.*, 2003)

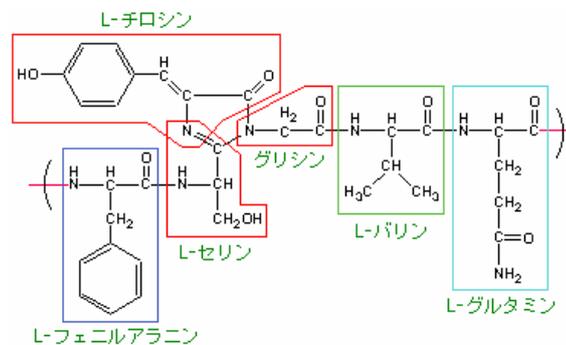


Fig. 2: GFP の蛍光団

(<http://www.ecosci.jp/chem10/gfp.html> より抜粋)

Cytochrome c (シトクロム c)

シトクロムは、一部の嫌気性生物を除くほぼ全ての生物に存在する酸化還元蛋白質（電子を受け渡しできる蛋白質）。立体構造を Fig. 1 に示した。ヘム（Fig. 2: 鉄とポルフィリン環の錯体）を含み、ヘム鉄が II 型と III 型を変換する事で電子の授受を行う。ヘムが吸収を持つため赤色に見える。吸収スペクトルの違う多くのシトクロムが知られている。シトクロム c は、ミトコンドリア内膜に存在し、電子伝達系において複合体 III から複合体 IV への受け渡し役となる。今回精製するのは、ウシ心臓由来のシトクロム c です。

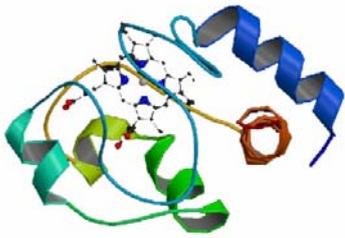


Fig. 1: ウシ心臓由来シトクロム c の立体構造
(Mirkin *et al.*, 2005)

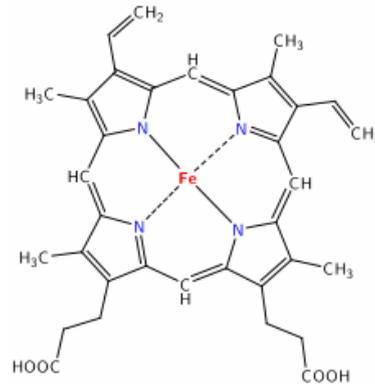


Fig. 2: ヘム (b) の構造

GFP とシトクロム c の等電点: アミノ酸配列から各 pH 条件において GFP とシトクロム c がどの程度電荷を帯びているかを計算したものを、それぞれ Fig. 1 と Fig. 2 に示した。横軸が pH、縦軸が電荷である。縦軸（電荷）がゼロになる時の横軸（pH）の値が（計算上の）等電点と呼ばれる。この値よりも高い pH 領域ではタンパク質は負の電荷を帯びており、低い pH 領域では正の電荷を帯びていると予想される。今回は、pH 8.0 の条件で精製しました。

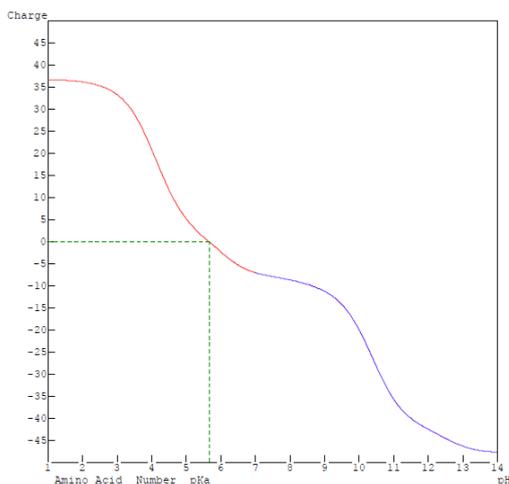


Fig. 1: GFP の等電点

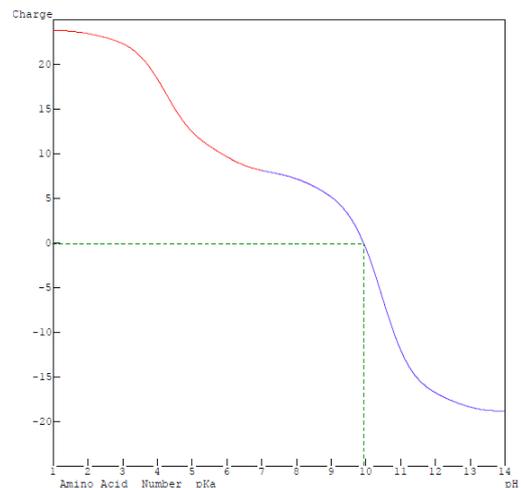


Fig. 2: Cytochrome c の等電点