

# 光るタバコモザイクウイルス

渡辺雄一郎

植物ウイルスのひとつであるタバコモザイクウイルスの研究と、クラゲがもつグリーン蛍光蛋白質 (GFP) とが結びついて“光るウイルス”が作製され、興味ある知見が蓄積しつつある。GFPの発光には基質を加える必要がなく、外から光をあてるだけで蛍光が発せられる。この性質を利用して生物に損傷を与えることなしに外から内側の蛋白質の様子を見て記録できるようになった。

**Key words** 【植物ウイルス】【グリーン蛍光蛋白質】【タグ蛋白質】

はじめに *Aequoria victoria* (オワンクラゲ) という発光クラゲがもつグリーン蛍光蛋白質 (GFP) が、最近分子生物学の分野での解析に多用されるようになった。GFPの発光には基質、補酵素のような物質は必要ない。光をあてるだけで簡単にその発現をみることができる。本稿では筆者が行なっている植物ウイルスの研究での GFP の応用例，“光るタバコモザイクウイルス”を示すとともに、現在までに体験したこの蛋白質を使用するうえで優れている点や限界，注意点，問題点などを紹介したい。

## I. グリーン蛍光蛋白質はどのようにして光るのか

GFPの遺伝子は *A. victoria* から単離された。全 238 アミノ酸からなる蛋白質で分子量も 26.9 K と比較的小さい<sup>1)</sup>。

生化学的研究によって、N 末端から 65~67 番目のアミノ酸残基であるセリン-チロシン-グリシンという部分が発光団として同定されている<sup>2)</sup>。この 3 つのアミノ酸残基部分で自発的に環化反応が起こり、発色団が生

まれる<sup>2)</sup>。この反応は酸素の存在下、約 4 時間で進行するという<sup>3)</sup>。この近傍の芳香環をもつアミノ酸をうまく利用して光ることのできる蛋白質ということがわかった。

この GFP 遺伝子を組み込んだ大腸菌に長波長の紫外線をあてると、強い緑色の光を発する。発光に必要な自己反応はオワンクラゲ以外の生物でも期待どおり進行し、励起光をあてさえすれば発現した GFP は異種の生物でも発光するのである\*1。従来用いられてきたマーカー遺伝子はいずれも反応に基質が必要で、経費と反応までの処理時間がかかる\*2。それに対して GFP はすぐに、経費をかけずに検出が可能という非常に有利な点をもっている。

## II. 変異型の GFP

多くの研究者が使用しやすく改変したいろいろな変異 GFP を作製している。目的に応じてこれらを参考にするのがいいであろう。

Yuichiro Watanabe, 帝京大学理工学部バイオサイエンス学科 (〒 320 宇都宮市豊郷台 1-1) [Department of Biosciences, Teikyo University, Toyosato-dai, Utsunomiya 320, Japan]

*Tobacco Shining Mosaic Virus*

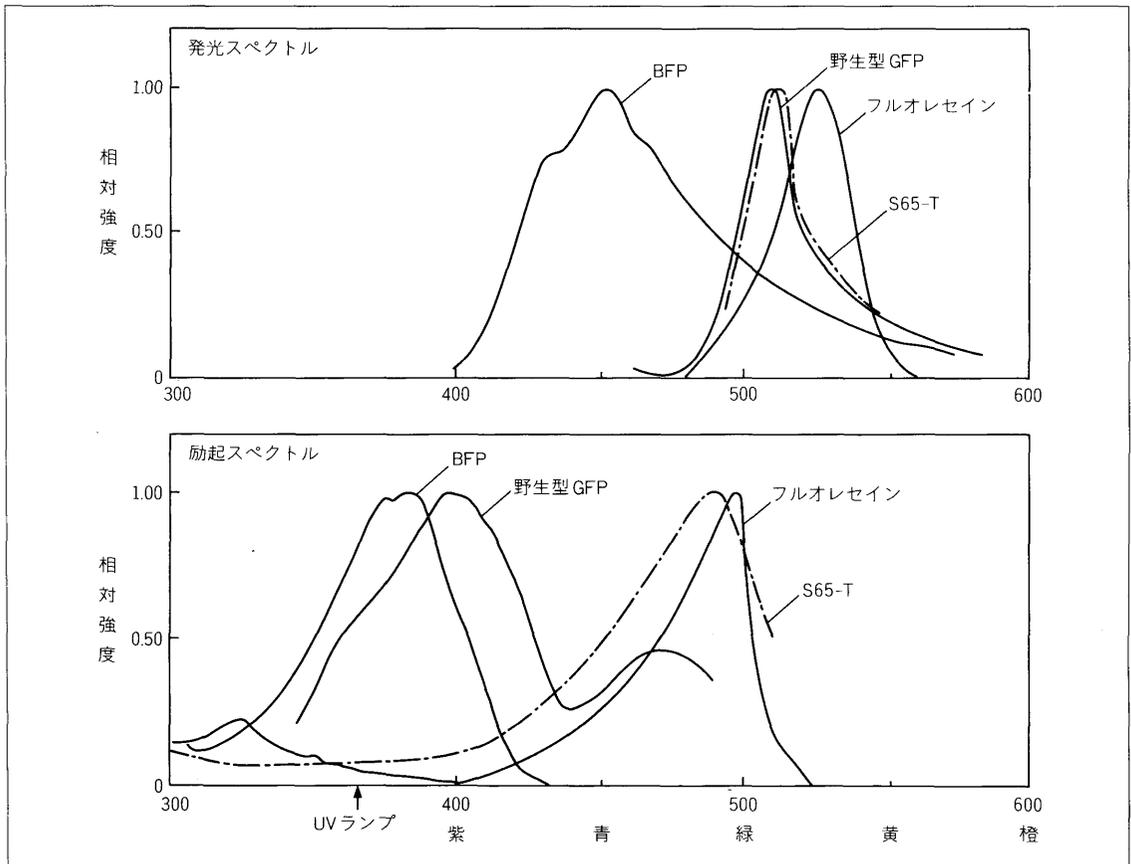


図1 野生型および変異型の GFP の励起および発光スペクトル  
最大値を 1.00 として相対値を表示してある。

1. 蛍光の特性と関連した変異 GFP

Tsien らはクローニングされた GFP の cDNA に変異を導入し、蛍光の特性が変化した変異型グリーン蛍光蛋白質の cDNA クローンを選抜した。応用価値のある変異体として以下のようなものがとれた。

チロシン 66 が別の芳香環をもったアミノ酸ヒスチジンとなると、蛍光蛋白質は青い発光をするようになった。GFP ならぬ BFP (ブルー蛍光蛋白質) ができたことになる<sup>3)</sup>。

セリン 65 をトレオニンに変化させた S65-T (スーパー GFP) は、野生型に比べて 4~6 倍蛍光の強度が強く

なった<sup>4)</sup>。発色団を形成するための自己環化反応が野生型 GFP で 4 時間かかるといわれるのに対し、S65-T の変異 GFP は 30 分で終わるとい<sup>4)</sup>。

野生型および変異型の GFP の励起スペクトルと発光スペクトルを図 1 に示す。GFP 蛋白質内の 1 つのアミノ酸をほかのアミノ酸に変化させただけで蛍光に関する特性が大きく変化することがわかる。ただし、それぞれの変異体についての最大値を 1.00 とした相対値で表示してあるので注意してほしい。たとえば、BFP の発光強度は野生型の GFP に比べて弱い<sup>3)</sup>ので、GFP と並べて比較するなどの使用は発光強度が強い型がさら

\*1 現在では酵母にはじまり、線虫、ショウジョウバエ、シロイヌナズナ、哺乳類細胞で GFP の発現による蛍光の発光が確かめられている。  
\*2 たとえば、ホタルの発光蛋白質ルシフェラーゼを利用するとルシフェリン、ATP といった基質が必要で、生物体内で発光させるにはルシフェリンをその生物体内に入れてやる必要がある。

に作製されないと無理であろう。

野生型 GFP では波長 395 nm に最大吸収, 475 nm に別の吸収極大が存在する<sup>3)</sup>。すなわち色でいうと紫外線～紫色の光, または緑がかった青の光を照射すれば蛍光が得られる。実験室で用いられる長波長の紫外線ランプ<sup>3)</sup>を GFP の発現の簡便な検出に用いることができる。野生型 GFP の発光スペクトルは 508 nm が最大波長, 緑色の蛍光を発することを示す。

図 1 には蛍光色素の代表であるフルオレセイン<sup>4)</sup>のデータをあわせて表わしている。励起スペクトルでは GFP の 475 nm の吸収極大部分と, 発光スペクトルの極大の部分で重なっている。よって GFP が発現している生物試料を観測, 記録しようとする場合, とりあえず従来のフルオレセインでラベルされた試料を観察記録するのと同様の条件が使用可能である。

## 2. 発現に関連した変異 GFP

Cambridge の Haseloff は植物(シロイヌナズナ)の系でこの GFP 遺伝子を発現させようとした際に, GFP 塩基配列内で(クラゲでは起きない)スプライシングが起きる可能性に気がついた。このスプライシングを抑えることで高等植物での GFP 産物の発現が容易になると考え, 翻訳されるアミノ酸を変えない範囲内で遺伝子の塩基配列に改変を施した。実際にこの改変 GFP 遺伝子を用いてシロイヌナズナの系で発現を達成したという<sup>5)</sup>。

静岡県立大学の丹羽らは GFP の配列を植物のコドン使用頻度に合わせた形に改変して, 植物細胞内に導入した際の翻訳効率が約 20 倍になったことを報告している。改変の際に S65-T を作らせるようにしたので, 一過的な発現をさせる場合, 野生型 GFP の導入に比べて, 翻訳量 20 倍×発光強度 5 倍=約 100 倍の検出が可能になったという。

フロリダ大学の Zolotukhin らは GFP の配列を“ヒトの”コドン使用頻度に合わせて 80 個以上のコドンを変えた S65-T を作製した。野生型に比べて合成量の増加も加え 45 倍の蛍光の検出ができたという。

## III. 応用——光るモザイクウイルスの紹介

現在では GFP 遺伝子は市販されている<sup>5)</sup>。それを実験のスタートに使うのが手軽であろう。実際には実験系, 遺伝子の塩基配列に合わせて使用しやすい制限酵素の認識部位を含む形のプライマーをデザインし, 高忠実度の PCR によって GFP の塩基配列を増幅すれば容易に目的のクローニングができ使用できるであろう。抗 GFP ポリクローナル抗体も同様に市販されはじめたので, さらに使用環境は整ってきた。

### 1. 発現マーカー遺伝子としての応用例

タバコモザイクウイルス (TMV) とよばれる植物ウイルスは感染した植物細胞内でそのウイルス粒子を構成するコート蛋白質を大量に合成する。筆者らはコート蛋白質のかわりに GFP を導入した TMV を植物細胞内に感染させた。その結果, 作製したウイルス ( $\Delta$ C-GFP-TMV と名づけた)<sup>6)</sup>の増殖に伴って GFP が発現した<sup>5)</sup>。紫外線をあてた際に出る緑色の蛍光をたよりに, 植物体上ウイルスが広がった部分を, 固定などの操作で植物を殺したりせずに判断することが可能となった。図 2 では植物体でウイルスが茎, 維管束組織を經由して, ほかの組織へと移行する様子, 図 3 では茎の切片上のどの組織にウイルスが存在して移行しているかが蛍光で確認できる。繁雑な免疫化学的手法を用いることなしに容易に観察ができるのである。組織を殺す必要もないので 1 つの細胞, 組織, 個体を種々の時間で追うことも可能である。可視的に, 非常にアトラクティブに実験結果, 内容を一般の人にもわかりやすく説明できるであろう。他の分野でも応用しだいで教育的効果も期待できる。

### 2. タグ(目印)蛋白質としての応用例

TMV は感染植物内で移行蛋白質という遺伝子産物を合成する。この蛋白質は原形質連絡という植物のとなりあった細胞どうしをつなぐ構造に局在して, ウイルスの細胞から細胞への移行を助ける機能をもつ。

\*3 発する光の波長は 365 nm 近辺。

\*4 励起極大波長: 495 nm, 発光極大波長: 525 nm。

\*5 インターネットで最新情報が得られる。アドレスは <http://www.clontech.com/clontech/newprodhigh.html>。最近 Zolotukhin の作った GFP 遺伝子は Life Technologies から売られはじめた。

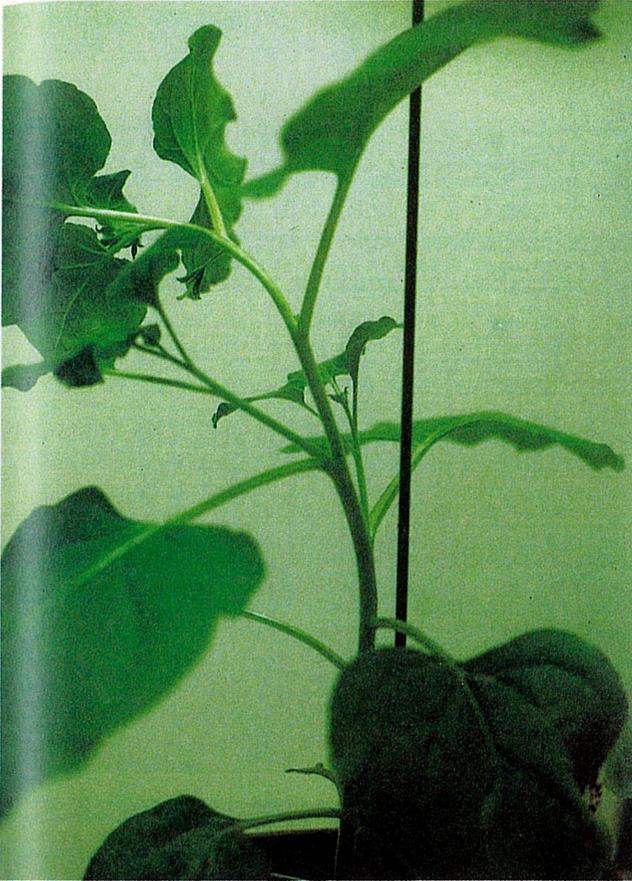


図 2 光るタバコモザイクウイルスの組織への感染の様子

$\Delta$ C-GFP-TMV を感染させたタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の通常の光のもとでの様子 (上) と紫外線をあてて GFP の発現によって浮び上がるウイルス感染の広がり様子 (下)。



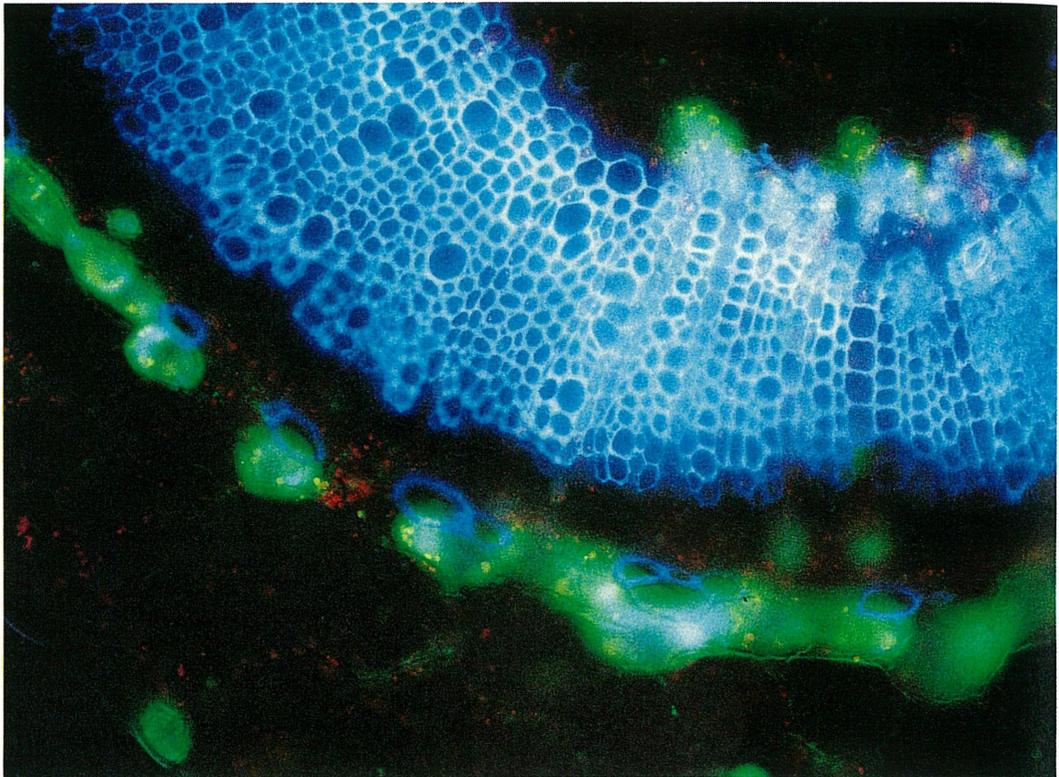


図 3 ΔC-GFP-TMV が感染した植物の茎の断面の蛍光顕微鏡観察写真（紫外光による励起）  
青く光るのが道管などのポリフェニル系の化合物を産出する組織。緑色に光る細胞がΔC-GFP-TMV の感染を受けていることがわかる。赤く光るのは葉緑体。右上の部分が生体の中心。[撮影：大場博樹]

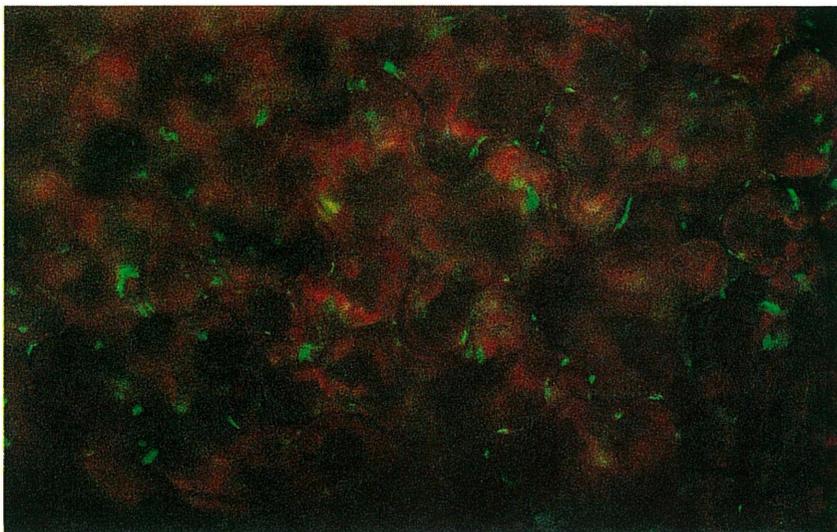


図 4 ΔMP-fus ウイルスの感染組織の蛍光顕微鏡観察  
ジグソーパズルのピースのように見えるのが1つ1つの表皮細胞の輪郭にあたる。その細胞壁の上にところどころ融合蛋白質である移行蛋白質-GFPの局在によるシグナルが認められる。[撮影：川上茂樹]

TMVの感染細胞内での移行蛋白質の合成量は少ない。その合成と植物の原形質連絡という構造への局在が証明されたのはごく最近である。

The Scripps Research InstituteのBeachyとPadgettはこの移行蛋白質の植物細胞内での挙動を解析する試みとして、GFP遺伝子を移行蛋白質遺伝子の3'側に連結し、移行蛋白質-GFPという融合蛋白質を発現するようなウイルス( $\Delta$ MP-fus)を作製した。その結果、作出された $\Delta$ MP-fusは野生型のTMVと同様に細胞間移行を行なえるウイルスとなった(投稿中)。融合蛋白質が正常に機能するのである(投稿中)。この蛋白質の細胞内の局在性の時間変化を、植物を殺さずに追うことが可能となったのである。

移行蛋白質と連結したGFP部分の発現量は $\Delta$ C-GFP-TMVによるGFPの発現と比べて桁違いに少ない。しかし、注意深く調べると感染3日後から局部的に蛍光を発する部分が感染葉できちんと見つかる。その部分を蛍光顕微鏡<sup>\*6</sup>で観察すると、合成量が少なくても移行蛋白質の発現に由来して、蛍光が細胞壁部、特に原形質連絡と思われる細胞壁の一部に局在した様子が見いだされる(図4)。

GFP遺伝子が融合された蛋白質の機能を阻害する可能性、逆に融合によってGFP部分の発光が検出できなくなる可能性についてはまだ研究の途中である。ただ筆者の感触では、GFP遺伝子を融合させる場合に、もとの蛋白質遺伝子部分との間に、たとえばリンカー由来の余計なペプチド配列が入っているほうが、つけたGFP遺伝子部分からの蛍光発現が確認しやすい気がする。

#### IV. GFPの使用, 検出にあたっての注意点

##### 1. 固定操作

4%パラホルムアルデヒドを植物試料に処理したところ、GFPの発光は保持される。固定剤の蛍光への影響は、各研究対象のサンプルについて予備実験をして適

切な固定剤の種類、濃度、処理時間を決めるのが望ましい。

##### 2. 材料・植物の管理

生育が悪い植物に光るウイルスを感染させた際、その後何日も蛍光が認められない場合を経験した。そのような場合に植物の葉に何らかの微生物が共生(?)し、微生物が自家蛍光を出して観察の障害となることもあった。植物自体も、農薬などを噴霧すると観察の障害となる自家蛍光を出す物質を合成しだすこともある。

##### 3. 野生型GFPの細胞内での局在性

野生型GFPを単独で大量にプロトプラスト<sup>\*7</sup>内で発現させると、核膜、細胞膜が少し蛍光を発する。核(または核膜)と少し親和性があることを念頭において使用するべきである。融合蛋白質にした場合にはその影響はみられない。植物細胞、タバコの組織の場合、発現したあと、蛍光の持続からみるGFP蛋白質の安定性はわりと高いと思われる。前述の $\Delta$ C-GFP-TMVによって発現されたGFPは合成されてから2週間は蛍光を発する。

##### 4. GFPの植物, 生物への影響

GFPを発現するウイルスを感染させた際にかぎって、いくぶん植物が矮化する傾向を感じる。またGFPを発現する大腸菌の形態が伸長してくることは多少の害が生物にできる可能性を暗示する。

##### 5. 発現量と蛍光強度との関係

存在する酸素の効果で環化反応が起きるということがあってか、生物によって発現とそこから発する蛍光の強度が比例しないことがある。GFP遺伝子を導入した生物のおかれた温度に蛍光の強度が左右されるという知見もある<sup>\*9</sup>。まだ諸説ありで、現時点での蛍光の測

\*6 微分干渉の機能を兼ね備えたものが望ましい。通常の顕微鏡では散乱が起り、微細構造が確認できないものもあると思われる。  
 \*7 細胞壁をとり除いた植物の細胞。酵素処理などによって得られる。  
 \*8 このように記録はスキャンをしてAdobe Photoshopなどのソフトを用いて色補正をしないと、肉眼で観察する蛍光色とかけ離れたものとなる。  
 \*9 FujiのProviaでもKodakのEctachromeでも違いはない。ASA/ISOは400のものを使おう。  
 \*10 フィルターの種類は波長と透過率のデータをみて選ばばよい。たとえば、ケンコー社のP01フィルターは本来白黒写真用のフィルターであるが、この目的に適している。筆者はゼラチンフィルターとよばれるKodakのNo.58を用いている。いずれも見た目に緑色をしたフィルターである。

定による GFP の発現量の定量化, 比較は慎重に行なう必要がある。脊椎動物細胞での発現を試みる際の注意点については別の総説を参照されたい<sup>8,9)</sup>。

## 6. 記録の取り方

### A. フィルムの選定

カラーで記録する場合, ネガティブフィルムを用いて行なうと, 蛍光の発色が黄緑ではなく白または黄色として記録される<sup>8)</sup>。その点, リバーサルフィルム<sup>9)</sup>を用いて記録するのが肉眼でみた際の色とのずれが少ないので無難である。

### B. フィルターの選定

励起に用いた波長の光 (特に紫外線) を遮断し, 蛍光の緑色の光のみを記録するには, フィルターを用いて撮影するのがよい<sup>10)</sup>。蛍光顕微鏡を通して写真を撮る場合にはフルオレセイン (FITC) 標識の試料を観察し, 記録する際に用いるフィルターの組合せ, ダイクロイックミラーを用いることになる。変異体 S65-T は紹介したように, 青光による励起で非常に強い蛍光を出す, 紫外光での励起は非常に弱くなる<sup>4)</sup>。サンプルによっては青い光の励起で緑, 黄緑色の自家蛍光を発し, S65-T の発光によるものかどうかの判断がむずかしい場合がある。その点, 野生型の GFP は, 紫外光によってもシグナルが確認できるので (分光学でいう 2 点測光が可能), 使いやすい場合もある。

おわりに GFP 遺伝子の利用は使用の歴史が浅く, 使

する。定量性については問題を指摘する声をよく耳にする。しかし, 細胞学的分野での研究で細胞をいためずに分子の挙動を観察できるメリットは大きく, 技術の進歩もあいまって問題点は乗り越えられることが期待される。現在, 記録や検出に共焦点顕微鏡, CCD カメラなどを用いる方法も検討されており, いろいろな場面でいっそう応用され活躍するツールとなろう。

## 文 献

- 1) Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J.: *Gene*, **111**, 229-233 (1992)
- 2) Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., Ward, W. W.: *Biochem.*, **32**, 1212-1218 (1993)
- 3) Heim, R., Prasher, D. C., Tsien, R. Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12501-12504 (1994)
- 4) Heim, R., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y.: *Nature*, **373**, 663-664 (1995)
- 5) Haseloff, J., Amos, B.: *Trends Genet.*, **11**, 328-329 (1995)
- 6) Chen, J., Watanabe, Y., Okada, Y., Sako, N.: *Arch. Virol.*, 印刷中 (1996)
- 7) Ogawa, H., Inouye, S., Tsuji, F. I., Yasuda, K., Umesonno, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11899-11903 (1995)
- 8) Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., Tsien, R. Y.: *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 448-455 (1995)
- 9) 小川英知・井上 敏・Tsuji, F. I.・安田國雄・梅岡和彦: *実験医学*, **14**, 495-501 (1996)

## お知らせ

### がん重点ワークショップ EB ウイルスとヒトがん——最近の進展

日 時: 平成 8 年 5 月 10 日 (金) 13:00~11 日 (土) 12:00  
 会 場: 東京大学医科学研究所講堂 (1 号館 1 階)  
 内 容: EB ウイルス発がんの基礎研究  
 EB ウイルス関連胃がん  
 EB ウイルス関連リンパ性腫瘍  
 EB ウイルス関連がんの診断・治療  
 参加費: 無料  
 連絡先: 〒060 札幌市北区北 15 条西 7 丁目  
 北海道大学医学部癌研ウイルス部門 高田賢蔵  
 Tel.011-706-5071 FAX 011-717-1128

## お知らせ

### 第 12 回 胃炎研究会

日 時: 平成 8 年 11 月 30 日 (土) 13:00~18:00  
 会 場: 日本海運倶楽部 2 F 国際会議場 (〒102 東京都千代田区平河町 2-6-4/Tel.03-3264-1825)  
 主 題: ①胃炎の分類, ②ストレスと胃疾患  
 演題募集: 主題に適する演題について, 演題名, 所属, 氏名を含めて 400 字程度の抄録を下記宛お送りください。  
 申込締切: 平成 8 年 7 月 31 日 (水) 事務局必着  
 問合せ・演題申込先: 〒541 大阪市中央区道修町 2-2-8  
 住友製薬(株) 学術企画部「胃炎研究会」事務局  
 Tel.06-229-5687 FAX 06-233-2287