

躍的に発展していくと思われる。ミトコンドリア機能障害に起因した疾患は数多くあり、近い将来マイトファジー研究がこうした疾患治療に貢献できるのではないかと我々は考えている。

- 1) Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., & Youle, R.J. (2008) *J. Cell Biol.*, **183**, 795–803.
- 2) Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 458–467.
- 3) Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., & Klionsky, D.J. (2008) *Nature*, **451**, 1069–1075.
- 4) Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., Dunn, W.A., Jr., Levine, B., van der Klei, I., & Seglen, P.O. (2007) *Autophagy*, **3**, 413–416.
- 5) Shintani, T., Huang, W.P., Stromhaug, P.E., & Klionsky, D.J. (2002) *Dev. Cell*, **3**, 825–837.
- 6) Farre, J.C., Manjithaya, R., Mathewson, R.D., & Subramani, S. (2008) *Dev. Cell*, **14**, 365–376.
- 7) Clark, S.L., Jr. (1957) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 349–362.
- 8) Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992) *J. Cell Biol.*, **119**, 301–311.
- 9) Kanki, T. & Klionsky, D.J. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 32386–32393.
- 10) Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 87–97.
- 11) Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., & Klionsky, D.J. (2009) *Dev. Cell*, **17**, 98–109.
- 12) Kanki, T., Wang, K., Baba, M., Bartholomew, C.R., Lynch-Day, M.A., Du, Z., Geng, J., Mao, K., Yang, Z., Yen, W.L., & Klionsky, D.J. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4730–4738.
- 13) Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F.M., di Rago, J. P., & Martinou, J.C. (2005) *Cell Death Differ.*, **12**, 1613–1621.
- 14) Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R.J., & Schweyen, R.J. (2007) *Cell Death Differ.*, **14**, 1647–1656.
- 15) Deffieu, M., Bhatia-Kissova, I., Salin, B., Galinier, A., Manon, S., & Camougrand, N. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 14828–14837.
- 16) Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M.R., & Youle, R.J. (2010) *PLoS Biol.*, **8**, e1000298.

廣田 有子¹, 青木 義政², 神吉 智丈²

¹九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野,

²九州大学病院検査部

Mitophagy: selective degradation of mitochondria by autophagy

Yuko Hirota, Yoshimasa Aoki and Tomotake Kanki (Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

構造変化を介した GPI アンカーによるタンパク質の細胞内輸送・局在制御

1. はじめに

GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカーは真核細胞で進化的に保存された構造を持つ糖脂質であり、翻訳後修飾としてタンパク質に結合し、タンパク質を細胞膜にアンカーする役割を持つ。GPI アンカーによるタンパク質の細胞内輸送・局在の制御を理解するために、まず GPI アンカーの生合成、構造変化について概略する (図 1, 図 2)。GPI アンカーは小胞体で約 10 ステップを経てホスファチジルイノシトール (PI) に *N*-アセチルグルコサミン (後でグルコサミンに変化する), 脂肪酸 (主にパルミチン酸), 三つのマンノース, 三つのエタノールアミンリン酸が順次結合し, 小胞体内腔側で完成型の GPI アンカーとなる。

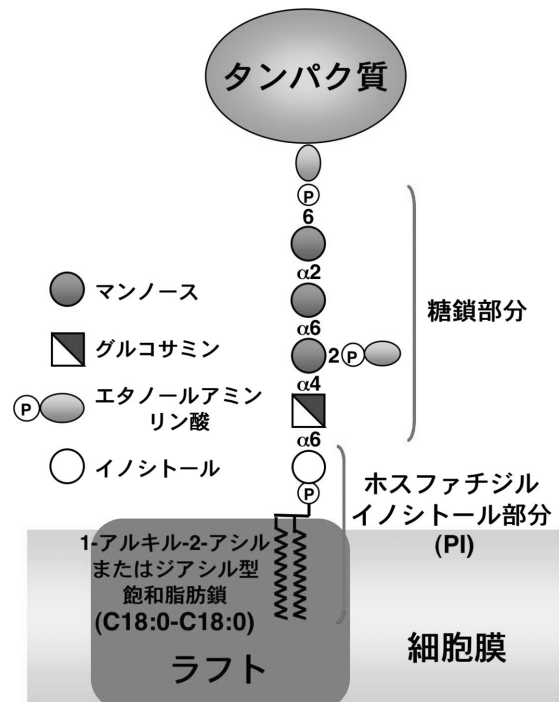


図 1 細胞表面の GPI アンカー型タンパク質の基本構造
細胞表面の GPI アンカー型タンパク質は、輸送過程に受けた構造変化の結果、2本の飽和脂肪鎖を持ちラフトに親和性を持つようになる。また真ん中のマンノースに結合していたエタノールアミンリン酸の除去は小胞体の出口への効率的なソーティングに必要である。

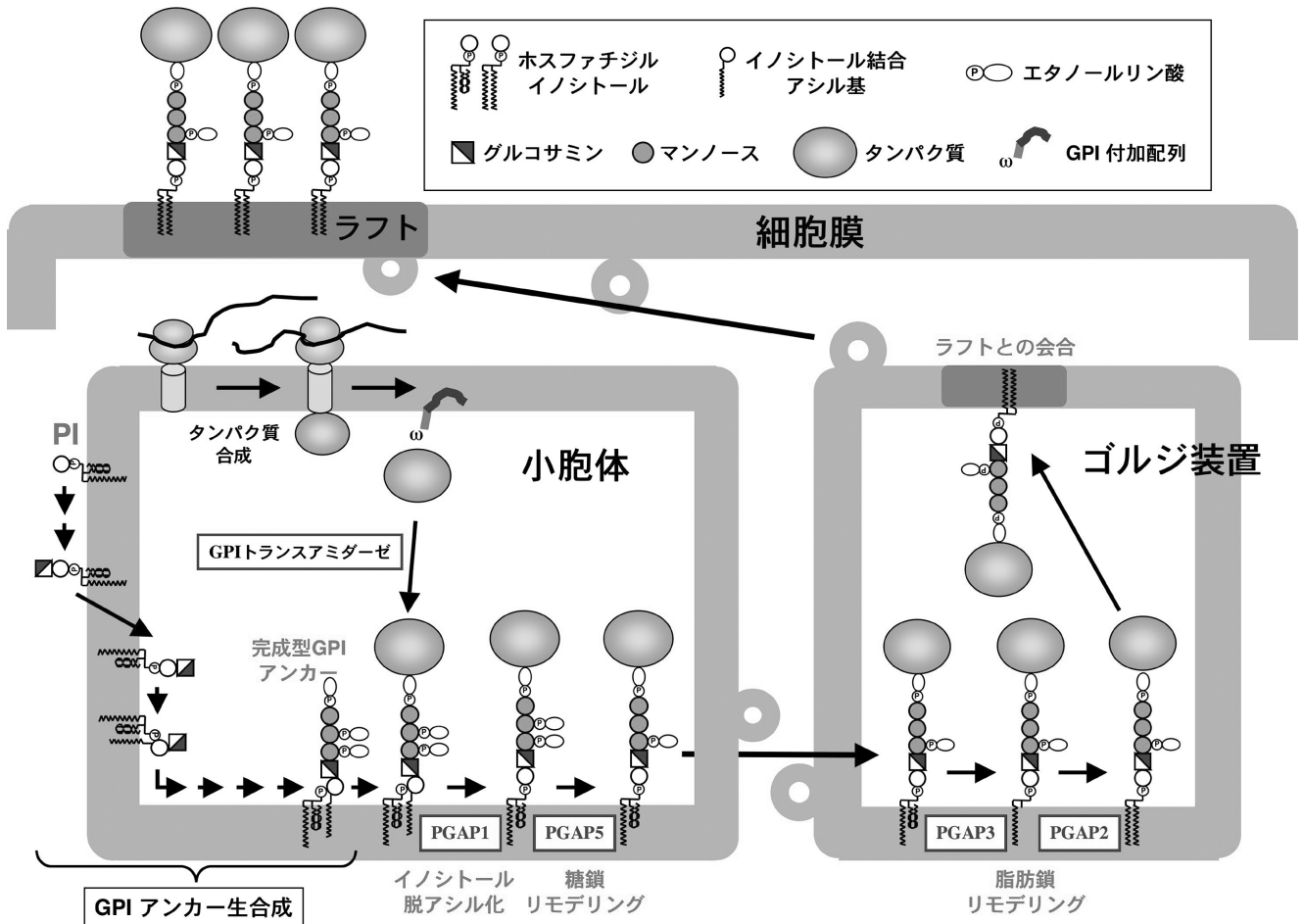


図2 GPIアンカー型タンパク質の合成・構造変化並びに輸送

小胞体において GPI トランスアミダーゼの働きで GPI アンカーがタンパク質に結合し GPI アンカー型タンパク質が完成する。この後、GPI アンカー部分は、1) PGAP1 によるイノシトール脱アシル化反応、2) PGAP5 による二つ目のエタノールアミンリン酸の除去、3) PGAP3 と PGAP2 による不飽和脂肪鎖の飽和脂肪鎖への置換、によって構造変化が、1)、2) は小胞体内腔で、3) はゴルジ装置内腔で起こる。その後、GPI アンカー型タンパク質はラフトと会合し細胞表面に輸送発現される。

一方、タンパク質も分泌型タンパク質前駆体として独立に合成される。GPI アンカーが結合するタンパク質は GPI 付加配列をそのカルボキシ末端に持つ¹⁾。この配列は、GPI トランスアミダーゼと呼ばれる GPI 転移酵素複合体によって切断除去され、タンパク質の切断点のオメガサイトと呼ばれるアミノ酸が GPI アンカーの末端のエタノールアミンリン酸に結合する。この時点で GPI アンカー型タンパク質が完成するが、重要な点は、この後 GPI アンカー部分は更なる構造変化を受け、その変化が GPI アンカー型タンパク質の正常な輸送・局在に必要なことである。この構造変化に関与する遺伝子群を PGAP (post GPI-attachment to proteins) 遺伝子群と呼んでいる。具体的には、1) PGAP1 によりイノシトールに付加してい

た脂肪酸 (主にパルミチン酸) が除去される²⁾、2) PGAP5 により二つ目のマンノースに結合していたエタノールアミンリン酸が除去される³⁾、3) PGAP3 と PGAP2 により、PI 部分の *sn-2* 位に結合している不飽和脂肪酸が飽和脂肪酸 (主にステアリン酸) に置換される^{4,5)}、という三つの構造変化が、1)、2) は小胞体内腔で、3) はゴルジ装置内腔で起こる。その後、GPI アンカー型タンパク質は細胞表面に輸送発現され、ラフトと呼ばれる特殊なマイクロドメインに集積することはよく知られている。本ミニレビューでは、この GPI アンカーの構造変化とタンパク質輸送・局在の関係をメインに、最近の知見を含め主に哺乳類細胞について解説する。

2. タンパク質の発現・ソーティングにおける GPI アンカーの必要性

GPI アンカーの生合成欠損で、GPI アンカー型タンパク質の細胞表面への発現が消失する。そのため、造血幹細胞で GPI アンカーが後天的に欠損すると発作性夜間血色素尿症に、また先天的に部分欠損すると先天性 GPI アンカー欠損症となる⁶⁻⁸⁾。疾患については他の総説に譲るが、より詳細な解析から GPI アンカーはタンパク質の小胞体からの輸送に必要であるということが明らかになった。小胞体でタンパク質が翻訳後修飾として GPI アンカーを結合することから考えると驚くべきことではないかもしれないが、このことは、GPI アンカーが小胞輸送へのソーティングシグナルとして機能しているかも知れないというアイデアをもたらした。しかし、GPI アンカーの欠損によって正常に GPI 付加配列が切断されずその疎水性性質のため品質管理機構によって小胞体に保持され最終的に分解されてしまう事例^{9,10)}や、前駆体タンパク質の GPI 付加配列が GPI トランスアミダーゼによって切断されるが GPI アンカーの欠損によって膜に繫留されずに分泌タンパク質となって細胞外に分泌される事例も報告されている^{8,11)}。現時点では、GPI アンカーの付加の有無が積極的にソーティングシグナルとして機能しているかどうかという結論は出ていないが、次章に述べるように、GPI アンカーの構造変化は小胞体の出口へのソーティング効率に影響を与えることから、やはりソーティングシグナルとして機能していると言ってよさそうである。

3. 新生タンパク質の小胞体からの輸送における GPI アンカーの構造変化の役割

我々は、小胞体から細胞表面への GPI アンカー型タンパク質の輸送を経時的に定量化するシステムを考案した(図3)^{3,12)}。レポータータンパク質は図に示してあるように温度感受性タンパク質 VSV-G, FLAG タグ, 蛍光タンパク質 GFP および GPI 付加配列からなり、ドキシサイクリンで誘導発現できるようにハムスター CHO 細胞に組み込んである。非許容温度 40 度で発現誘導をかけると生合成されたレポータータンパク質はミスフォールディングのため小胞体に留められ蓄積する。その後、許容温度 32 度にシフトすることでレポータータンパク質が速やかに正しい立体構造をとり、小胞体からの同調した輸送が開始される。一定時間後、細胞表面に到達した GPI アンカー型レポータータンパク質の発現量は FLAG タグに対する抗体

で染色しセルソーターで計測することで定量化される。このレポーター細胞を変異原で処理し輸送の遅れを指標に C19 変異細胞が樹立され、発現クローニング法でその原因遺伝子 *PGAP5* が同定された³⁾。またこのシステムを用いることで *PGAP1* 欠損細胞でも同様に GPI アンカー型レポータータンパク質の輸送が遅れていることが確認された(未発表データ)。PGAP1 ならびに PGAP5 が小胞体で GPI アンカーの構造変化に関与することから類推されるように、いずれの欠損細胞においてもタンパク質の輸送の遅れは GPI アンカー型に特異的で、膜型タンパク質には異常は見られず、さらに輸送の遅れの一因が小胞体からの小胞輸送の開始の遅れによることが明らかになった。さらに顕微鏡下の局在解析により、PGAP5 欠損細胞ではレポータータンパク質が許容温度下で正しいフォールディングをとった後の小胞体の出口 (ER exit site) へのソーティングが障害されていることが判明した³⁾。PGAP1 や PGAP5 の欠損でタンパク質部分は影響を受けないので、これらの事実は GPI アンカーの構造変化がソーティングシグナルとして機能していることを示していると考えられる。それでは GPI アンカーはどのようにソーティングに関わっているのでしょうか？ そもそも GPI アンカー特異的なソーティングというものが存在するのであるでしょうか？ これらの疑問に対して酵母から得られた知見は興味深い。酵母では、GPI アンカー型タンパク質が、他のタンパク質と異なった小胞で小胞体からゴルジ装置に輸送されると報告されている¹³⁾。更に、Emp24p-Erv25p 複合体(哺乳類の p23-p24 複合体に相当)は、GPI アンカータンパク質 Gas1p と複合体を形成することやその欠損で Gas1p の輸送が特異的に遅れることから、GPI アンカー型タンパク質の特異的な小胞輸送のマシナリーの一部、おそらくは GPI アンカー型タンパク質の積荷レセプターとして機能していることが提唱されている¹⁴⁾。我々も哺乳類細胞においても、p23-p24 複合体は GPI アンカー型タンパク質と複合体を作り、そのノックダウンで GPI アンカー型タンパク質の輸送が遅れることを報告した¹⁵⁾。更に、COPII 小胞の構成要素の一つで Sec23 と複合体を形成し様々な積荷タンパク質のレセプターとして機能している Sec24 の 4 種類のアイソフォームのうち特定のアイソフォームが p23-p24 複合体に結合することで小胞体からの輸送開始を促進していることも報告された¹⁶⁾。これらのことは、哺乳類細胞においても GPI アンカーを認識して特異的な輸送小胞に濃縮する機構が存在するというを示唆している。我々が報告した PGAP5 の欠損で起こる GPI アンカーの構造異常で小胞体

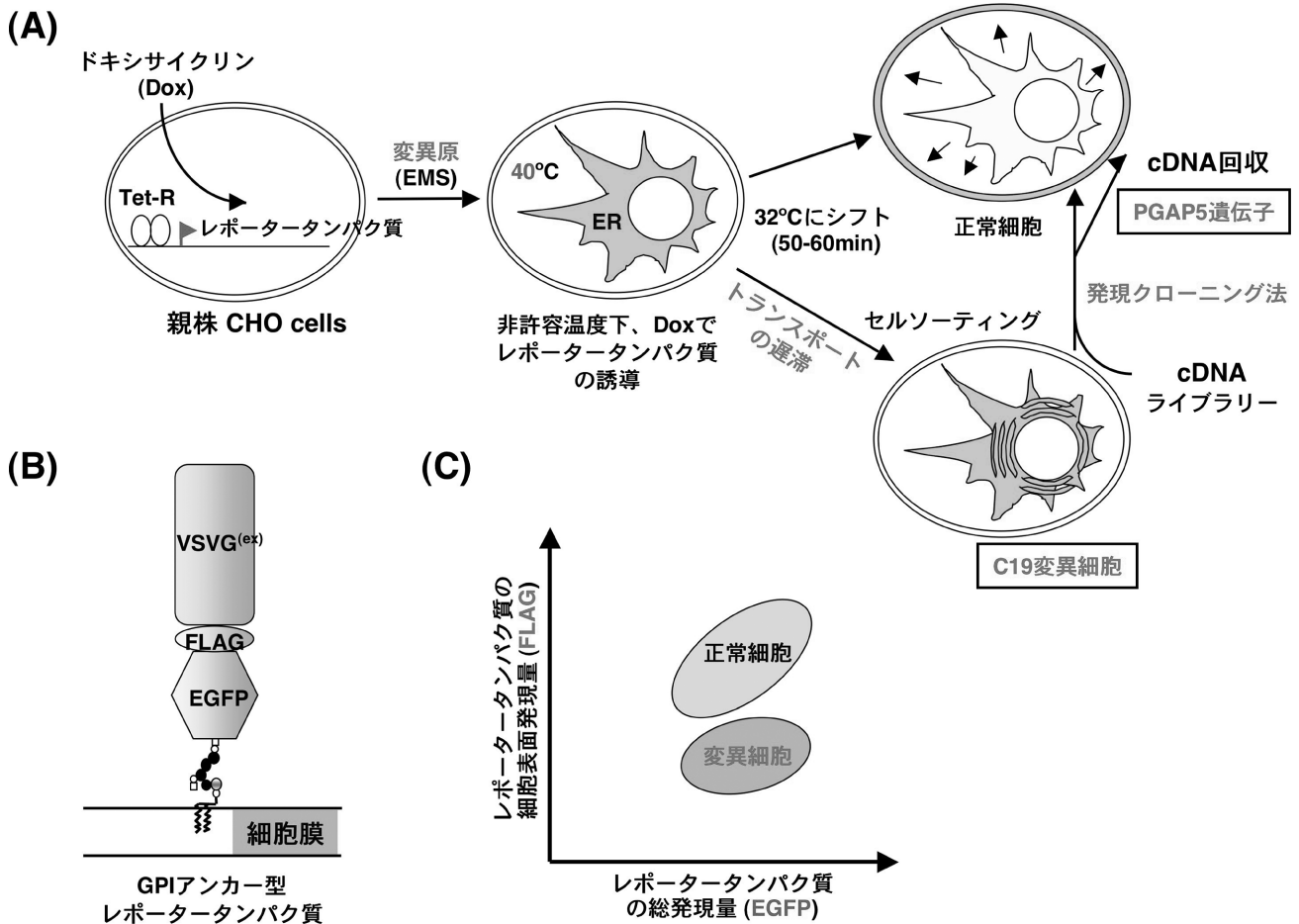


図3 トランスポートアッセイシステム

(A) ドキシサイクリンで誘導発現できるレポータータンパク質が組み込まれたhamster CHO細胞をレポーター細胞として樹立。非許容温度40度で発現誘導をかけレポータータンパク質を小胞体に蓄積させた後、許容温度32度にシフトすることでレポータータンパク質の同期した小胞体からの輸送が開始される。一定時間後、細胞表面に到達したレポータータンパク質の発現量はセルソーターで解析される。(B) レポータータンパク質の構成。(C) 輸送の遅れを示す変異細胞のFACS解析上での分布を正常細胞と併せ示してある。

の出口へのソーティングが影響されるという知見は、これまでのタンパク質側から見た知見の裏返しとも言え、非常に興味深く、真核生物で保存されているGPIアンカーの糖鎖部分の生理的意義の一端を初めて明らかにしたと言える。PGAP1欠損細胞に関しては、小胞体からの輸送の遅れは報告したが、詳細な解析はなされていない。PGAP5の欠損はPGAP1のイノシトール脱アシル化に影響を与えないが、PGAP1の機能がPGAP5の脱エタノールアミンリン酸反応に必要なかどうか、また生合成経路におけるPGAP1とPGAP5の反応ステップの正確な順番、そしてPGAP1やPGAP5の欠損でどうしてソーティング・輸送が遅れるのかというメカニズムについては現在解析中であ

る。GPIアンカー型タンパク質・PGAP5複合体におけるp23/p24の結合量はPGAP5欠損細胞では減少しており、やはりp23-p24複合体が関与しているのかもしれない。

4. GPIアンカー型タンパク質のゴルジ装置での脂肪鎖リモデリングとラフト会合

新生GPIアンカー型タンパク質は小胞体からゴルジ装置に運ばれるとそこで更なるGPIアンカー部分の構造変化をうける。それはPI脂質部分の不飽和脂肪鎖が飽和脂肪鎖に置換されることである^{4,5,17}。小胞体の大部分のGPIアンカーは、その生合成の基質であるフリーPI同様、PI部分のsn-2部位がアラキドン酸(C20:4)などの不飽和

脂肪酸鎖であるが、これがゴルジ装置で飽和脂肪酸のステアリン酸 (C18:0) に置換される。PGAP3 が *sn-2* の不飽和脂肪酸の除去に、PGAP2 がステアリン酸の付加に関与している。正常細胞では、2本の飽和脂肪酸鎖を持つ GPI アンカー型タンパク質を細胞表面に発現するが、PGAP3 欠損細胞では脂肪酸鎖モデリングの欠損のため *sn-2* にアラキドン酸などの不飽和脂肪酸鎖を有する GPI アンカー型タンパク質を発現する⁵⁾。細胞表面の GPI アンカー型タンパク質がラフトに集積するという性質は、この脂肪酸鎖モデリングによる。ラフトは立体構造的に直線的な飽和脂肪酸鎖を持つリン脂質またはスフィンゴ糖脂質とコレステロールらがコンパクトに集積し安定した Lo (liquid-ordered) 相を形成することで作られると考えられている。GPI アンカー型タンパク質がラフトに集積しやすい性質は2本の飽和脂肪酸鎖を持つことでラフトに親和性を持つためであり、PGAP3 欠損細胞における折れ曲がった不飽和脂肪酸鎖を有する GPI アンカー型タンパク質は当然 Lo 相には馴染めないと考えられる。事実、タンパク質がラフトに集積しやすいかどうかということは一般的には detergent-resistant membrane (DRM) に分画されるかどうかという実験に基づくが、PGAP3 欠損細胞での大部分の GPI アンカー型タンパク質は非 DRM に分画され、ラフトへの親和性が低下していることを示している。興味深いことに、PGAP3 欠損細胞では同時に細胞表面の GPI アンカー型タンパク質の発現量の低下が認められる。これは、GPI アンカー型タンパク質の安定性や細胞膜指向性の変化によるものかもしれない。GPI アンカー型タンパク質のラフトへ集積するという性質は、次章で述べるようにその局在・輸送やシグナル伝達の点からも重要であると考えられているが、その実験的解析の困難さから未だ曖昧な部分が多い。今後の更なる進展が待たれる。

5. GPI アンカー型タンパク質の極性輸送・ エンドサイトーシスとラフト会合

哺乳類細胞では新しく生成された GPI アンカー型タンパク質は上述の脂肪酸鎖モデリングを受けゴルジ装置で形成される脂質ラフトに会合し、その会合は細胞表面への輸送やそれ以降のトラフィッキング (主にエンドサイトーシス) の動態に大きく影響すると考えられている。アピカルソーティングは上皮細胞における GPI アンカー型タンパク質の輸送の特徴の一つであるが、ラフト形成を阻害するコレステロール除去によって極性輸送の障害が起こることからその指向性にはラフトとの会合が必要である。GPI ア

ンカー型タンパク質のエンドサイトーシスは、クラスリン/カベオリン非依存的、ダイナミン非依存的で、コレラ毒素 (糖脂質 GM1 がレセプター) と同様の経路を用いると考えられているが、そのマシナリーの詳細は依然不明な点が多い^{1,18)}。GPI アンカー型タンパク質は、エンドサイトーシス後、低分子 GTPase の CDC42 によって制御される GEEC (GPI-anchored-protein-enriched early endosomal compartments) と命名される特異的小胞で輸送され一般的なリサイクリングエンドソームに融合するという報告や、Fyn キナーゼによって制御され flotillin-1/2 で構成される小胞依存的にエンドサイトーシスが起こるなどの報告がなされている^{19,20)}。正常細胞では GPI アンカー型タンパク質のリサイクリング速度はトランスフェリンレセプターなどの他のタンパク質や蛍光標識した脂質に比べ3-4倍遅いが、コレステロールやスフィンゴ脂質を除去することで同等の早さになることが報告されている²¹⁾。これらの事実は、ラフトとの会合とトラフィッキングの密接な関係を裏付けており、GPI アンカーの構造変化がタンパク質のトラフィッキングにとって重要な役割を果たしていることが伺える。

6. おわりに

GPI アンカーの概念が確立されてから四半世紀が経ち、その生合成に関与する遺伝子の大部分が同定された。GPI アンカーのタンパク質翻訳後修飾としての役割についても多くの報告がなされるようになった。しかし、その必然性・生理的意義は、特に生体において、まだ十分に解明されたとは言えない。PGAP3 欠損細胞では脂肪酸鎖モデリングの欠損のためラフトに対する親和性が大きく低下した GPI アンカー型タンパク質が発現されるので、PGAP3 欠損細胞またはノックアウトマウスを用いることでそれらの解析にとって非常に強力なツールになると思われる。また、PGAP1 や PGAP5 欠損細胞をより詳細に解析することで GPI アンカー型タンパク質のソーティングメカニズムの研究が進むことが今後期待される。

- 1) Mayor, S. & Riezman, H. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 110-120.
- 2) Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y., & Kinoshita, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 14256-14263.
- 3) Fujita, M., Maeda, Y., Ra, M., Yamaguchi, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2009) *Cell*, 139, 352-365.
- 4) Tashima, Y., Taguchi, R., Murata, C., Ashida, H., Kinoshita, T., & Maeda, Y. (2006) *Mol. Biol. Cell*, 17, 1410-1420.
- 5) Maeda, Y., Tashima, Y., Houjou, T., Fujita, M., Yoko-o, T., Ji-

- gami, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1497–1506.
- 6) Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T., & Kinoshita, T. (1993) *Cell*, **73**, 703–711.
 - 7) Almeida, A.M., Murakami, Y., Layton, D.M., Hillmen, P., Sellick, G.S., Maeda, Y., Richards, S., Patterson, S., Kotsianidis, I., Mollica, L., Crawford, D.H., Baker, A., Ferguson, M., Roberts, I., Houlston, R., Kinoshita, T., & Karadimitris, A. (2006) *Nat. Med.*, **12**, 846–851.
 - 8) Krawitz, P.M., Schweiger, M.R., Rodelsperger, C., Marcellis, C., Kolsch, U., Meisel, C., Stephani, F., Kinoshita, T., Murakami, Y., Bauer, S., Isau, M., Fischer, A., Dahl, A., Kerick, M., Hecht, J., Kohler, S., Jager, M., Grunhagen, J., de Condor, B.J., Doelken, S., Brunner, H.G., Meinecke, P., Passarge, E., Thompson, M.D., Cole, D.E., Horn, D., Roscioli, T., Mundlos, S., & Robinson, P.N. (2010) *Nat. Genet.*, **42**, 827–829.
 - 9) Delahunty, M.D., Stafford, F.J., Yuan, L.C., Shaz, D., & Bonifacio, J.S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 12017–12027.
 - 10) Wilbourn, B., Nesbeth, D.N., Wainwright, L.J., & Field, M.C. (1998) *Biochem. J.*, **332**, 111–118.
 - 11) Nagamune, K., Acosta-Serrano, A., Uemura, H., Brun, R., Kunz-Renggli, C., Maeda, Y., Ferguson, M.A., & Kinoshita, T. (2004) *J. Exp. Med.*, **199**, 1445–1450.
 - 12) Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y., & Kinoshita, T. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 1135–1145.
 - 13) Muniz, M., Morsomme, P., & Riezman, H. (2001) *Cell*, **104**, 313–320.
 - 14) Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P., & Riezman, H. (2000) *J. Cell Biol.*, **148**, 925–930.
 - 15) Takida, S., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2008) *Biochem. J.*, **409**, 555–562.
 - 16) Bonnon, C., Wendeler, M.W., Paccaud, J.P., & Hauri, H.P. (2010) *J. Cell Sci.*, **123**, 1705–1715.
 - 17) Fujita, M., Umemura, M., Yoko-o, T., & Jigami, Y. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 5253–5264.
 - 18) Howes, M.T., Mayor, S., & Parton, R.G. (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 519–527.
 - 19) Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G., & Mayor, S. (2002) *Dev. Cell*, **2**, 411–423.
 - 20) Riento, K., Frick, M., Schafer, I., & Nichols, B.J. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 912–918.
 - 21) Chatterjee, S., Smith, E.R., Hanada, K., Stevens, V.L., & Mayor, S. (2001) *EMBO J.*, **20**, 1583–1592.

前田 裕輔

(大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野)

Regulation of intracellular protein transport and localization by GPI-anchor through its structural remodeling
Yusuke Maeda (Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

合成蛍光プローブと発現タンパク質を用いた新規タンパク質ラベル化システム

1. はじめに

タンパク質の蛍光標識は、生細胞内のタンパク質の局在を調べる強力な研究手法であり、今日の生命科学研究において欠かすことのできないものとなっている。その中核をなすものは2008年のノーベル賞受賞対象となった蛍光タンパク質である。蛍光タンパク質の生物応用が初めてなされた1990年代以降、蛍光強度、波長、ストークスシフト、フォトクロミズムなどの点において、様々な性質を有する蛍光タンパク質が開発されてきた¹⁾。この結果、蛍光タンパク質は、タンパク質の局在解析のためだけではなく、動態の時空間解析やタンパク質間相互作用、Ca²⁺のセンシング、リン酸化酵素などの活性の可視化など多岐にわたる応用がなされている^{1,2)}。言うまでもなくその有用性は、生命科学研究者に認められているものの、蛍光タンパク質には、いまだ解決されていない課題が存在する。例えば、蛍光タンパク質のサイズが27 kDaと比較的大きく、標的タンパク質に与える立体的影響が懸念されるが、現在のところサイズの大幅な軽減には成功していない。また、近赤外蛍光イメージングは、小動物や厚みのある組織の深部情報を得る優れた方法であるが、近赤外領域の700 nm以上に極大蛍光波長を持つ蛍光タンパク質は創製されていない。このため、これらの問題を解決するための蛍光タンパク質研究は現在も活発な領域といえる。一方、蛍光タンパク質とは別の新しいアプローチとして、合成蛍光プローブとそれに特異的に結合するタンパク質(タグタンパク質)を利用したタンパク質蛍光標識技術が開発され、注目を集めている。本稿では、この蛍光標識技術の原理と利点及び問題点について述べ、筆者らの取り組みについて紹介する。

2. タグタンパク質を利用したタンパク質標識法

タグタンパク質を利用した蛍光標識法では、遺伝子工学によりタグタンパク質を融合させた標的タンパク質を細胞内で発現させる。次に、タグタンパク質に特異的に結合する蛍光プローブにより、タグタンパク質を蛍光標識し、その結果、融合させた標的タンパク質を蛍光検出する(図1a)。ここで、重要な点は、蛍光プローブがタグタンパク質と特異的に反応し、その他の内在性のタンパク質とプロー