

## 生体物質の高感度センサーの開発 ～生体物質依存的に蛍光を発する新規蛍光タンパク質の探索～

伊藤 太二 (管理栄養学科・教授)・近藤 奈々絵 (管理栄養学科・准教授)  
大村 正史 (管理栄養学科・教授)・河内 公恵 (管理栄養学科・教授)  
廣田 耕志 (東京都立大学・教授)

### 概要

蛍光タンパク質は、ある範囲の波長の光を照射すると励起され、蛍光を発するタンパク質のことである。緑色蛍光タンパク質 **GFP** は、1960年代に下村脩によって発見された(2008年ノーベル化学賞)。現在では、**GFP** のアミノ酸配列を変異させたり、様々な人工アミノ酸を組み込むことで、数々の人工蛍光タンパク質が開発されている。これまでは、脊椎動物に由来する蛍光タンパク質は知られていなかったが、最近、鹿児島大学の研究グループが、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) から緑色蛍光タンパク質を単離した<sup>(1)</sup>。そして、理化学研究所の研究グループは、そのタンパク質 **UnaG** がビリルビン依存的に緑色蛍光を発することを見出し、**UnaG** がビリルビンの高感度計測に応用できることを示した<sup>(2)</sup>。しかしながら、ビリルビンを結合して蛍光を発する **UnaG** のような、生体物質依存的に蛍光を発するセンサータンパク質は、これまでほとんど知られていない。そこで本研究では、食材等から種々の励起・蛍光特性をもつ蛍光タンパク質を単離・同定し、これらを活用して様々な生体物質の高感度センサーとして応用することを目的とした。本研究ではまず、魚介類の筋肉に焦点を当て、蛍光実体顕微鏡を用いてこれらに由来する食材の蛍光特性を解析したところ、蛍光強度の違いは見られたものの、解析したタイ、カレイ、ブリ、サバ、サケ、ウナギ、イカのいずれにおいても青色励起による緑色蛍光が観察された。さらに、カレイとサバについては斑点状の緑色蛍光も観察されたため、緑色励起による赤色蛍光を解析したところ、極めて蛍光強度の強い赤色蛍光が斑点状に観察された。次に、上述した **UnaG** がウナギ筋肉で果たす機能を解明するために、本研究ではウナギ筋肉から筋管細胞を単離し緑色蛍光を検出する実験系を確立した。さらに、ウナギ筋肉と同等の緑色蛍光強度をもつサバの筋肉に焦点を当て、サバの筋肉中の緑色蛍光物質の抽出と硫酸沈殿による分画を行った。魚介類の筋肉中に含まれる蛍光物質が筋肉の代謝に果たす役割についてはほとんど不明であるが、本研究をもとに、ウナギ以外の魚類をふくめ今後その全貌を解明していきたい。

### 緒言

可視光、つまり肉眼で見える光は通常、その波長が380～780nmの範囲にある。これは虹の全色を含み380nm付近の紫色から、780nm付近の赤色までとなっている。蛍光とは、ある物体が、ある波長の光を吸収し、それとは違う波長の光を放出する物理的な性質のことをさす。ある分子がある波長の光を吸収し、それとは違う波長の光(すなわち蛍光)を発する場合、この分子のことを蛍光物質と呼ぶ。通常、蛍光物質が放出する波長は、吸収

した光よりも低エネルギーであり、例えば、青色光を吸収して緑色光を発する、または緑色光を吸収して赤色光を発する、ということである。ほとんどの蛍光物質は、通常、ある範囲の波長を吸収および放出する。従って、蛍光物質の励起および蛍光の全スペクトルを解析し最大励起波長および最大蛍光波長について考えることが重要である。

蛍光タンパク質は、ある範囲の波長の光を照射すると励起され、蛍光を発するタンパク質のことである。その先駆けである緑色蛍光タンパク質 **GFP** は、1960年代に下村脩によって発見された（2008年ノーベル化学賞）。**GFP** の分子量は約27kDaであり、238のアミノ酸から構成されている。その三次元構造は、1996年に X線結晶構造解析法で解明された。11個のβシート単位がらせん状に組織化し、発色団を包む形で円筒構造をとっている。現在では、**GFP** のアミノ酸配列を変異させたり、様々な人工アミノ酸を組み込むことで、数々の人工蛍光タンパク質が開発されている。これまでは、脊椎動物に由来する蛍光タンパク質は知られていなかったが、最近、鹿児島大学の研究グループがニホンウナギ (*Anguilla japonica*) から緑色蛍光タンパク質を単離した<sup>(1)</sup>。そして、理化学研究所の研究グループは、そのタンパク質 **UnaG** がビリルビン依存的に緑色蛍光を発することを見出し、**UnaG** がビリルビンの高感度計測に応用できることを示した<sup>(2)</sup>。しかしながら、ビリルビンを結合して蛍光を発する **UnaG** のような、生体物質依存的に蛍光を発するセンサータンパク質は、これまでほとんど知られていない。そこで、本研究では、食材等から、種々の励起・蛍光特性をもつ蛍光タンパク質を単離・同定し、これらを活用して様々な生体物質の高感度センサーとして応用することを目的とした。本研究では特に、魚介類の筋肉に焦点を当て、蛍光実体顕微鏡を用いてこれらに由来する食材の蛍光特性と各々の組織における発現分布を解析した。そしてウナギについては筋管細胞を単離して細胞内の **UnaG** の発現を倒立型蛍光顕微鏡を用いて解析した。さらにサバ等の特定の魚類について極めて強い強度の緑色蛍光と赤色蛍光が観察され蛍光物質の単離を試みたので報告する。

## 方法

### 1. 蛍光実体顕微鏡を用いた種々の魚介類の筋肉における蛍光特性および各々の組織における発現分布の解析

オリンパス製実体顕微鏡 **SZX7** に落射蛍光ユニット **SZX-RFL2** を装着し、青色励起-緑色蛍光検出のために **SZX-MGFPA** ミラーユニット（励起 **BP460-490** / ダイクロイック **DM505** / 蛍光 **BA510-550**）を用いた。倍率は0.8Xおよび5.6Xで観察を行った。蛍光画像の取得には3眼鏡筒に取り付けた **Photometrics** 社製 **Prime 4.2M pixel sCMOS** モノクロカメラを用いた。魚類として、タイ、カレイ、ブリ、サバ、サケ、ウナギ、軟体動物であるイカを用いて観察を行った。さらにカレイとサバについては、緑色励起-赤色蛍光検出も行い、**SZX2-MRFP** ミラーユニット（励起 **BP545-580** / ダイクロイック **DM600** / 蛍光 **BA610IF**）を用い、倍率、蛍光画像の取得等は青色励起-緑色蛍光検出の場合と同様に解析した。

### 2. ウナギの骨格筋由来筋管細胞の単離と培養

筋管細胞は、主に **Rosenblatt** らが記載した方法等<sup>(3,4)</sup>に従って単離した。ウナギの骨格筋を含めて約3cm幅の輪切りにした。骨格筋を皮膚と骨から分離し、表面細菌を除去する



ために0.06%次亜塩素酸ナトリウム（オーヤラックス（株））で滅菌し、滅菌したペトリ皿中の25 mLの滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS; Thermofisher scientific）で3回洗浄し、清浄な台の上で薄いメス刃とピンセットで小さなスライスに刻んだ。小さなスライスを、40 mLの滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で3回（各工程について、600rpmで2分間遠心分離し、上清を除去した）洗浄し、50mLチューブ中に30mg コラゲナーゼ（和光）を含有する15mLのDMEM（使用前に0.22umろ過した; Thermofisher scientific）中で、ローテーターを用いて100rpmで2時間、30℃でインキュベートした。コラゲナーゼによる消化後、単離した筋管細胞を、10%ウマ血清（熱不活化済）、0.5%FBS（熱不活化済）、250ug/mlのストレプトマイシン、250IU/mlのペニシリン、50 ug/mlのゲンタマイシン硫酸塩、20 ug/mlのファンギゾンを含む10mLのDMEM（図5と図6での観察の際には、抗生物質を除いたDMEMで洗浄した）を用いて、滅菌したペトリ皿中のナイロンガーゼの単層上で洗浄した。ガーゼ上の筋管細胞を6 cmのプラスチック細胞培養皿に移し、5 mLピペットで4 mLの同じ培地中に穏やかに懸濁し、32℃および5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。

### 3. 倒立型蛍光顕微鏡を用いたウナギ筋肉由来筋管細胞中の緑色蛍光の観察

Nikon製倒立型顕微鏡TS-100Fに落射蛍光ユニットを装着した倒立型蛍光顕微鏡を用いて青色励起-緑色蛍光を検出した。接眼レンズ10X、対物レンズ40Xにて筋管細胞中のUnaGと考えられる緑色蛍光を観察した。

### 4. サバ筋肉からの蛍光物質の抽出とNative PAGEによる分画

サバの切り身70g程度を細切れにした。フードプロセッサーを氷で予め冷やしておき、そこに切り身を入れ、冷却した20 mM Na phosphate (pH 7.4) -1mM EDTA bufferを300mL加え、30秒間すりつぶした。50mLチューブ4本に上澄みを取り、4℃、6,000xg、20min遠心した。上清を別のチューブに移しこれを粗抽出液とした。粗抽出液40mLを、50mLチューブ2本にとり氷上で保存した。これらに対して、硫酸アンモニウム（以下、硫安と略記）を12.4gずつ加えてよく溶かし50%硫安溶液として、氷上で5分間静置した。これを4℃、6,000xg、20min遠心し、上清を新しい50mLチューブに移し沈殿は、そのまま氷上で保存した。上清の入ったチューブ2本に対して、硫酸アンモニウムをそれぞれ5.48g加えてよく溶かし70%硫安溶液として、氷上で5分間静置した。これを4℃、6,000xg、20min遠心し、上清を新しい50mLチューブに移し沈殿は、そのまま氷上で保存した。上清の入ったチューブ2本に対して、硫酸アンモニウムをそれぞれ6.12g加えてよく溶かし90%硫安溶液として、氷上で5分間静置した。これを4℃、6,000xg、20min遠心し、上清を新しい50mLチューブに移し沈殿は、そのまま氷上で保存した。50%硫安での沈殿、70%硫安での沈殿、90%硫安での沈殿それぞれに対して、冷却した20mM Na phosphate (pH 7.4) -1mM EDTA bufferを1mLずつ加えて沈殿を溶解し、氷上で保存した。溶解したそれぞれの溶液130uLを、あらかじめ準備した「Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 0.5mL」（Thermo Fisher Scientific）に加えて4℃、1,500xg、2 min遠心し、硫酸アンモニウムを脱塩した。これらの脱塩した溶液3種類と粗抽出液をそれぞれ10uLずつ、マイクロチューブにとり、これらにNative PAGE サンプルバッファー（アプロサイ

エンス)を10 uL ずつ加え、よく混合し Native PAGE のウェルに、20uL ずつ注入し電気泳動した。電気泳動後、青色 LED トランスイルミネーターを用いて、波長470nm の青色光を照射し、バンドの有無を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究は、法令等に基づく手続きが必要な研究(患者から提供を受けた試料の使用、個人情報に伴うアンケート調査・インタビュー調査、ヒトゲノム研究、動物実験)には該当しない。

## 結果

1. 蛍光実体顕微鏡を用いた種々の魚介類の筋肉における蛍光特性および各々の組織における発現分布の解析

タイ、カレイ、ブリ、サバ、サケ、イカ、ウナギについて、図1に倍率0.8Xで明視野観察した結果と青色励起(図中にBlue ex.と表示)による緑色蛍光を観察した結果を、図2に倍率5.6Xで明視野観察した結果と青色励起(図中にBlue ex.と表示)による緑色蛍光を観察した結果を、それぞれ示す。ウナギにおいて観察された緑色蛍光はこれまでに報告されているUnaGによるものと考えられた。タイ、カレイ、ブリ、サバ、サケ、イカについてはいずれも蛍光強度の違いは

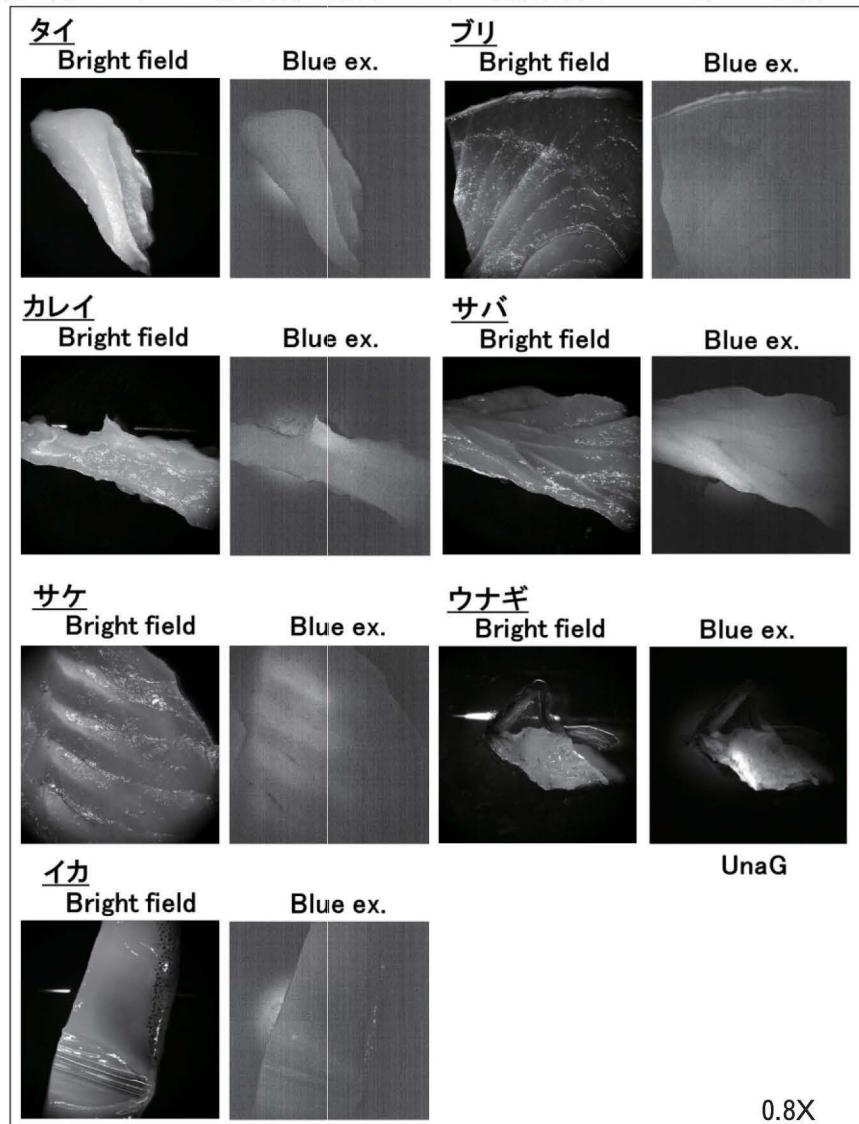
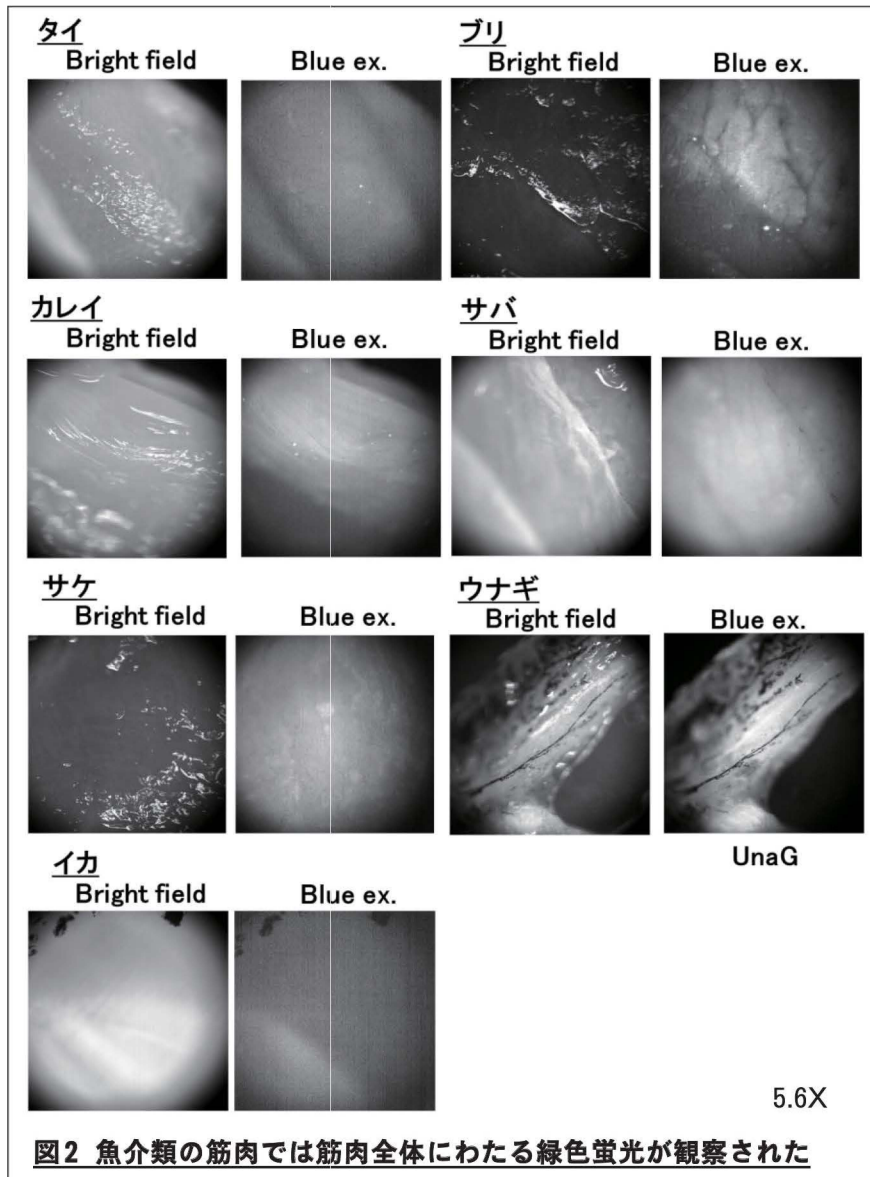


図1 魚介類の筋肉では筋肉全体にわたる緑色蛍光が観察された



あるものの、筋肉全体にわたる緑色蛍光が観察された(図1および図2)。血管部分については蛍光は観察されなかった。特にサバにおいて、ウナギと同程度の強い蛍光強度で緑色蛍光が観察された。さらにカレイとサバでは蛍光強度は弱いながらも、緑色蛍光が斑点状に観察されたことから、最大励起波長が青色域でない別の蛍光物質も存在している可能性が考えられた。そこで、カレイとサバについては、さらに緑色励起(図中に Green ex.と表示)による赤色蛍光も観察した。図3は倍率 0.8X、図4は倍率 5.6Xの結果をそれぞれ



示す。図1や図2で弱い斑点状の緑色蛍光を示した箇所は緑色励起によって極めて蛍光強度の強い赤色蛍光として観察された。従って、これらの斑点状に検出された蛍光物質は青色域よりも緑色域においてより効果的に励起されたと考えられた。さらに、こうした斑点状の蛍光はカレイとサバではそれらの筋肉中にランダムに観察され、特定の組織には依存していないと考えられる (data not shown) ことから、寄生虫等、何らかの感染によるものである可能性が考えられた。現在、これらの魚類に高頻度で感染が報告されているアニサキスに焦点を当て、アニサキスの生存個体と死滅個体における緑色蛍光と赤色蛍光について観察を行っており、死滅個体で赤色蛍光強度が極めて増大することを見出している (data not shown)。

## 2. 倒立型蛍光顕微鏡を用いたウナギ筋肉由来筋管細胞中の緑色蛍光の観察

ウナギ筋肉中にほぼ均一に分布すると考えられる UnaG は、ビリルビンと結合することで緑色蛍光を発することが報告されている。そしてビリルビンはビタミンC等の抗酸化剤と比べ極めて強い抗酸化作用をもち、虚血再灌流障害を軽減する効果も報告されている。そこで、ウナギの筋肉における酸化ストレスに対する UnaG (ビリルビン結合型の Holo-UnaG)

の機能を解析するために、ウナギの筋肉から筋管細胞を筋繊維の状態で単離する条件検討を行った(図5)。その結果、ウナギの筋管細胞は複数が融合した筋繊維として骨格筋から単離され、サルコメアと核が観察された(図5)。筋繊維の直径は様々なものが単離された。次に、これらに青色光を照射して励起し緑色蛍光を観察した(図6(図中の配置は図5と対応している))。その結果、ウナギの筋管細胞から構成される筋繊維は青色光で励起され、全体がほぼ均一に緑色蛍光を発した。筋繊維の直径が細いものほど緑色蛍光の強度が強く、直径が大きくなると緑色蛍光強度が減弱する傾向が見られた。現在、単離した筋管細胞に対して、C-Pace

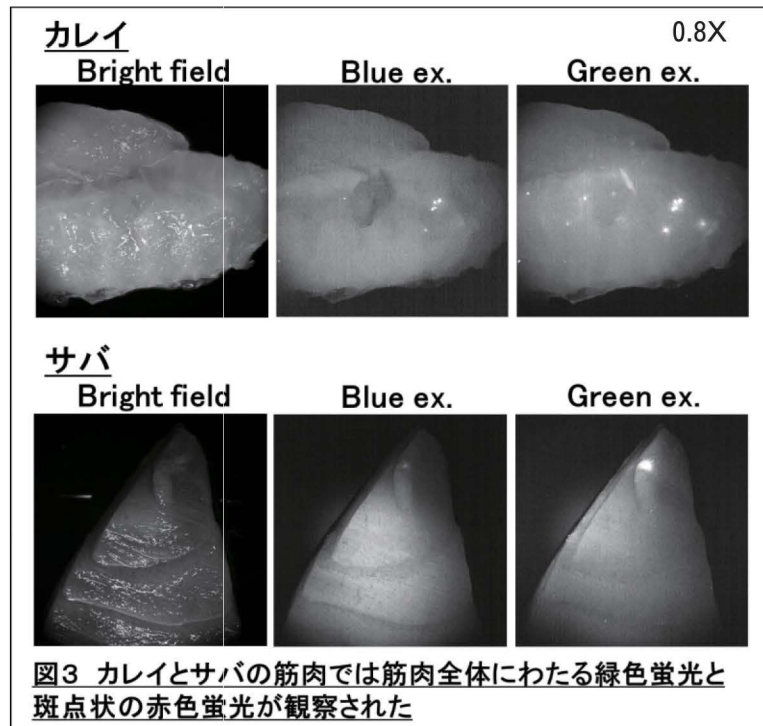


図3 カレイとサバの筋肉では筋肉全体にわたる緑色蛍光と斑点状の赤色蛍光が観察された

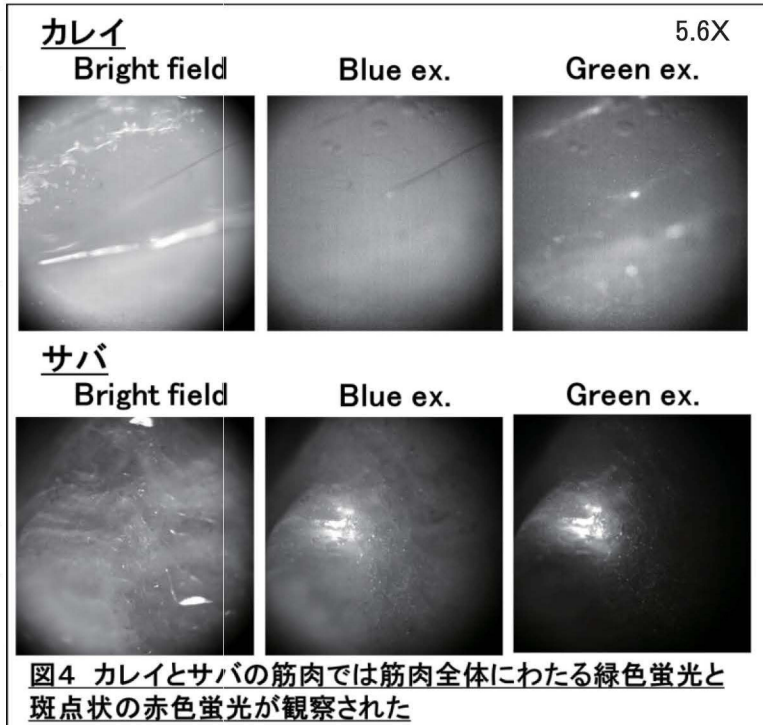


図4 カレイとサバの筋肉では筋肉全体にわたる緑色蛍光と斑点状の赤色蛍光が観察された

に緑色蛍光を発した。筋繊維の直径が細いものほど緑色蛍光の強度が強く、直径が大きくなると緑色蛍光強度が減弱する傾向が見られた。現在、単離した筋管細胞に対して、C-Pace

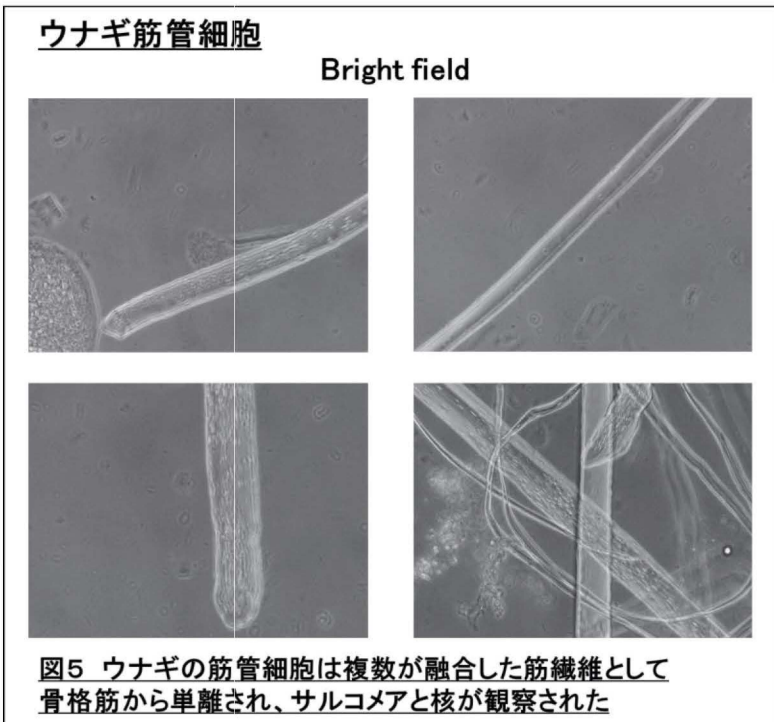


(電気刺激培養装置；IonOptix)を用いて電気刺激を様々な強度で負荷しつつ培養し緑色蛍光の強度を解析するとともに、酸化剤添加における緑色蛍光強度変化についても解析を行っている。

### 3. サバ筋肉からの蛍光物質の抽出と Native PAGE による解析

1での解析の結果、サバにおいてウナギと同程度の極めて強い蛍光強度の緑色蛍光が観察されたことから、ウナギからの **UnaG** 抽出、精製のプロトコールに従って、サバの筋肉からのタンパク質抽出を行った。さらにこの粗抽出液を50%硫安、70%硫安、90%硫安にて順に沈殿させ分画した。硫安による沈殿は抽出バッファーで再溶解しゲルろ過によって硫安を脱塩した。こうして得られた粗抽出液、50%硫安沈殿脱塩溶液、70%硫安沈殿脱塩溶液、90%硫安沈殿脱塩溶液に青色光を照射し励起したところ、粗抽出液と50%硫安沈殿脱塩溶液で極めて強い強度の緑色蛍光が観察され、サバ筋肉中の緑色蛍光物質は50%硫安で沈殿することが明らかとなった(図7)。上記と同様の実験条件でウナギ筋肉の抽出液を解析すると、ウナギの緑色蛍光物質(**UnaG**を含む)は粗抽出液と90%硫安で沈殿するが、50%硫安では沈殿しない(data not shown)ことから、サバ筋肉中の緑色蛍光物質は**UnaG**とは異なる物質であると推測された。**UnaG**はウナギに保存されているが他の生物では保存されていない。そしてイワアナゴ(*Kaupichthys hyoproroides*)類において**UnaG**と相同性を示す緑色蛍光タンパク質が報告されているのみである。従ってサバ筋肉中で見出された緑色蛍光物質は未知の蛍光タンパク質である可能性が考えられた。そこで、上記のサンプルをNative PAGEによってタンパク質を変性させずに電気泳動を行った(図8)。その結果、粗抽出液と50%硫安沈殿脱塩溶液を含めいずれの溶液を電気泳動した場合にも蛍光活性を持つ

バンドの検出は困難であった。この原因として、50%硫安で沈殿した蛍光物質がタンパク質でなく水溶液に可溶性物質である可能性と50%硫安で沈殿した蛍光物質はタンパク質であるが**UnaG**と同様に何らかのリガンドと結合して初めて蛍光活性を獲得する性質を持つ可能性などが考えられた。前者の可能性については例えば緑色蛍光活性をもつ物質としてビタミンB2およびその誘導体があげられるが、これらが50%硫安で沈殿するという報



告はなく、分子量も7000未満のため、本実験で使用したゲルろ過による脱塩カラムで除去されると考えられ、可能性は低い。現在他の候補物質の探索を行っている。そして、後者の可能性としては、Native PAGEで電気泳動する際にサバの未知の蛍光タンパク質と何らかのリガンドが解離し蛍光が消光している可能性等が考えられ、サバの未知の蛍光タンパク質が何らかのリガンドと結合して初めて緑色蛍光を発する可能性も今後追求したい。

### ウナギ筋管細胞

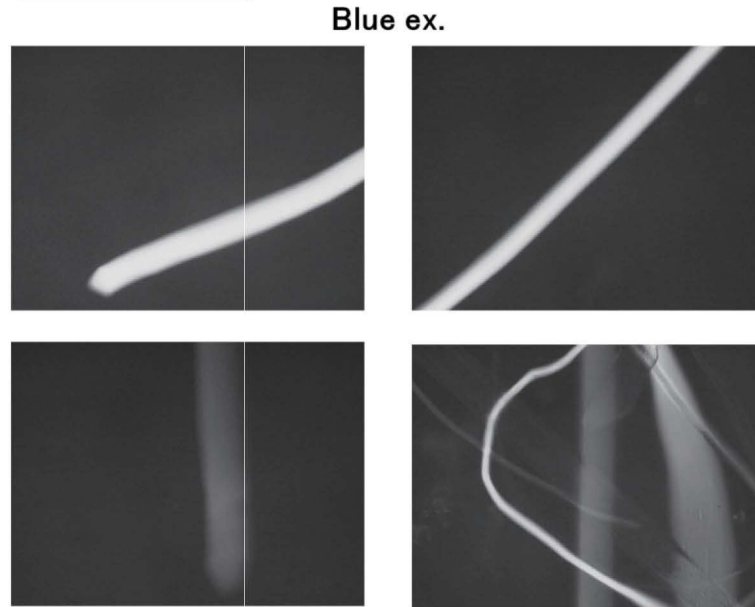


図6 ウナギの筋管細胞から構成される筋繊維は青色光で励起され、全体がほぼ均一に緑色蛍光を発した（図5と対応させて示す）

### 考察

本研究の結果から、魚介類の筋肉には緑色蛍光を示す多様な物質が含まれていること、さらには恐らく寄生虫等の感染により生じた物質による赤色蛍光が観察されることが明らかとなった。緑色蛍光物質に焦点を当てると、これらの中にはタンパク質でないものが多く存在する。その一例として、ビタミンB2およびその誘導体であるフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を挙げることで

### サバタンパク質抽出液

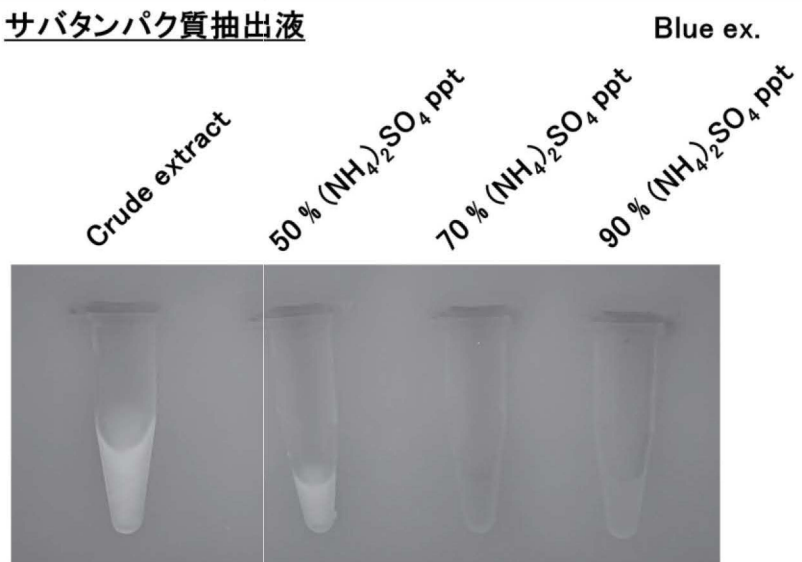
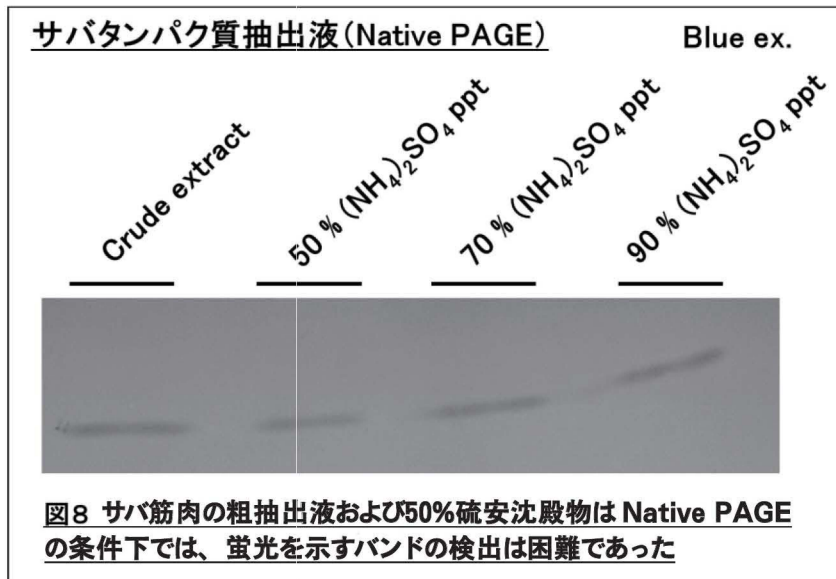


図7 サバ筋肉の粗抽出液は極めて強い強度の緑色蛍光を示し、これを硫酸沈殿により分画すると、50%硫酸にてその大部分が沈殿した



きる。これらは青色光によって励起され、緑色蛍光を発する性質を持ち、水溶液に可溶である。本研究で取り上げた様々な魚介類の筋肉中にもビタミン B2 およびその誘導体は含まれており、その含有量は日本食品標準成分表2015年版（七訂）によれば、魚介類の可食部100g 中に含まれるビタミン B2



の含有量としては、ウナギ0.48mg、タイ0.30mg、カレイ0.32mg、ブリ0.36mg、サバ0.31mg、サケ0.15mg、イカ0.05mg となっている。従って本研究で取り上げたすべての魚介類で検出された緑色蛍光はビタミン B2 とその誘導体も一部含んでいると考えられる。その中でもウナギとサバが他の解析した魚介類と比べて、極めて強い強度の緑色蛍光を発したことは興味深い。サバの筋肉については、ビタミン B2 およびその誘導体以外の緑色蛍光物質、または緑色蛍光タンパク質が存在し、さらに緑色蛍光を発するために何らかのリガンドが必要である可能性についても今後追求していきたい。現在、ゲルろ過クロマトグラフィー等電気泳動でない手法を用いて緑色蛍光活性を保ったまま精製度を高める実験を行っている。カレイやサバで検出された赤色蛍光についても極めて興味深い。こうした赤色蛍光はリポフスチンとよばれる脂質-タンパク質複合体によるものであることを示唆するデータが報告されているが、リポフスチンの分子構成については未知の部分も多い。そこで現在、アニサキスを凍結させ死滅させたのちタンパク質を抽出し赤色蛍光活性を持つバンドを切り出して質量分析する実験を進めている。赤色蛍光によりアニサキスの存在を明らかにできれば、食中毒のリスクを軽減する新たな手法の開発も期待される。一方、本研究で確立したウナギの筋管細胞単離と蛍光観察の手法を用いることで、ウナギ筋管細胞を題材として筋に対する電気刺激や酸化ストレスの強度の違いが緑色蛍光タンパク質 UnaG の緑色蛍光活性に与える影響を解析することが可能になった。魚介類の筋肉に含まれる蛍光物質が筋肉の代謝に果たす役割についてはほとんど不明であるが、本研究をもとに、ウナギ以外の魚類をふくめその謎を解明していきたい。

### 謝辞

本研究の実施にあたり、令和4年度 鎌倉女子大学学術研究所助成研究によって支援をいただきました。心より感謝いたします。

**参考資料・引用文献**

- 1) Hayashi S et al. A novel fluorescent protein purified from eel muscle. *Fish Sci.*, 75, 1461-1469 (2009)
- 2) Kumagai A et al. A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. *Cell*, 153, 1602-1611 (2013)
- 3) Alam N et al. Lipoprotein metabolism in a coculture system with eel skeletal muscle cells and hepatocytes. *Fish Sci.*, 70, 326-335 (2004)
- 4) Rosenblatt JD et al. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 31, 773-779 (1995)