

長崎大学附属図書館 注記

長崎大学薬学部
地域薬剤師卒後教育研修センター
第3回 公開講演会

日時：平成19年10月20日（土）

場所：長崎大学 中部講堂

演者：下村 脩 博士

カルシウム発光蛋白質イクオリン

と緑色蛍光蛋白質GFPの発見

とその生命科学への貢献

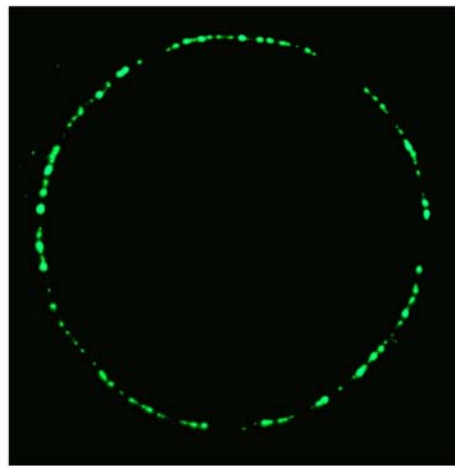
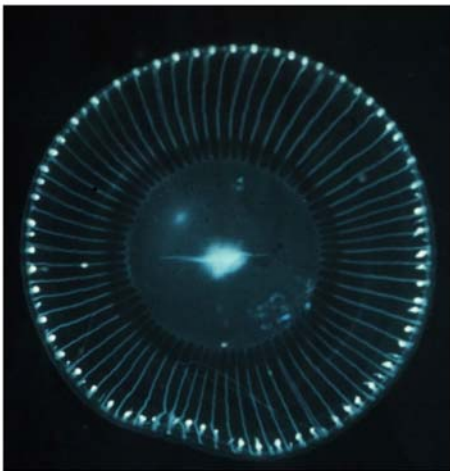
オワンクラゲ *Aequorea aequorea*



Aeq + Lumi

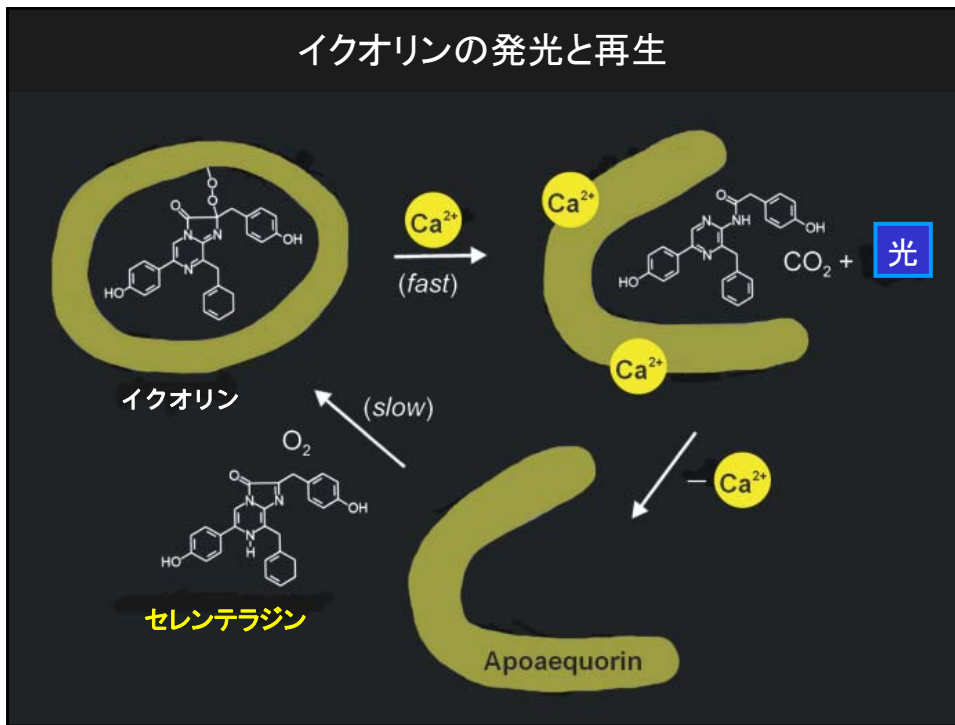
日光下

暗室中



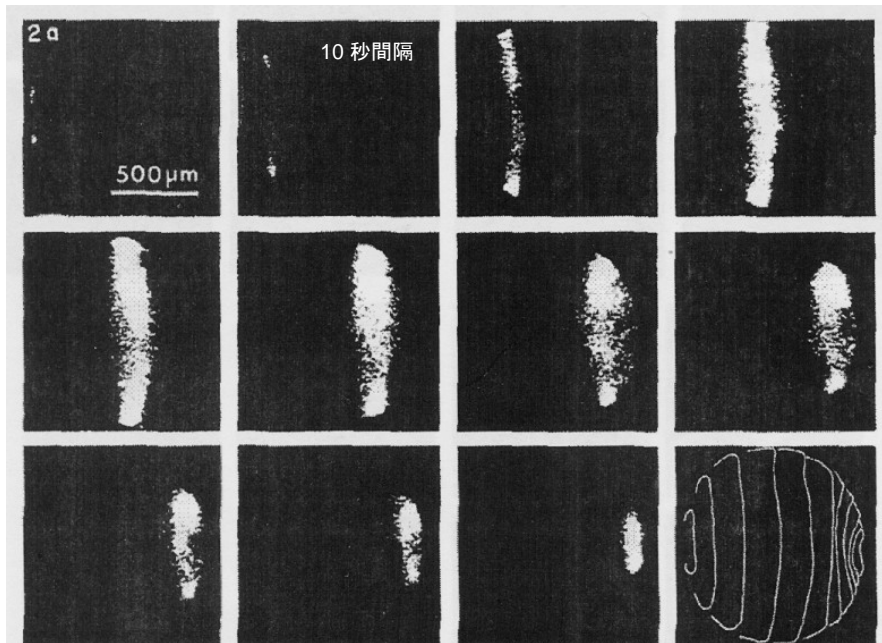
Aequorea aequorea

イクオリンの発光と再生



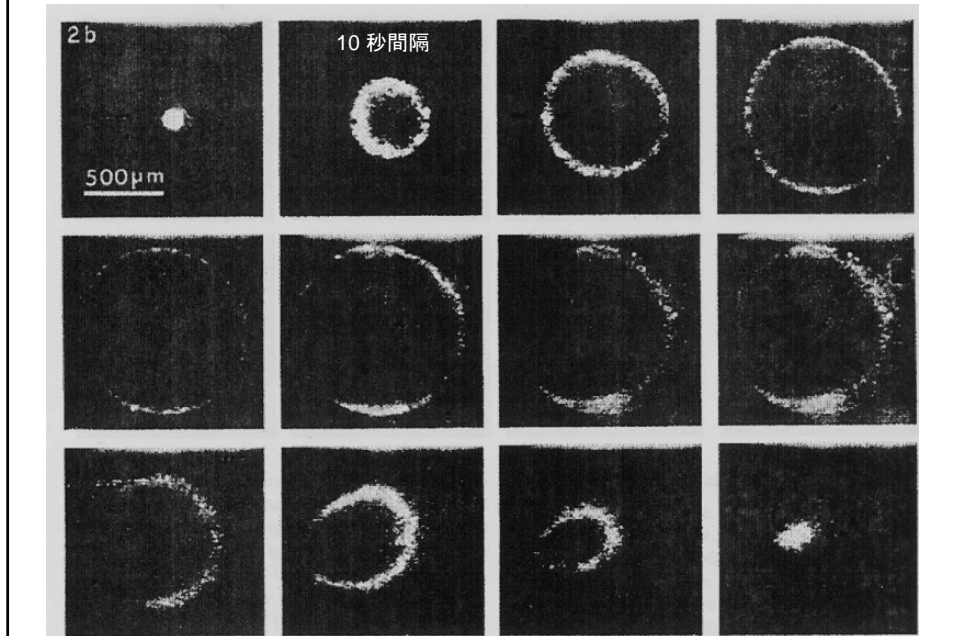
メダカ卵の受精 (1)

Gilkey *et al.*, J. Cell Biol. 76, 448 (1978)



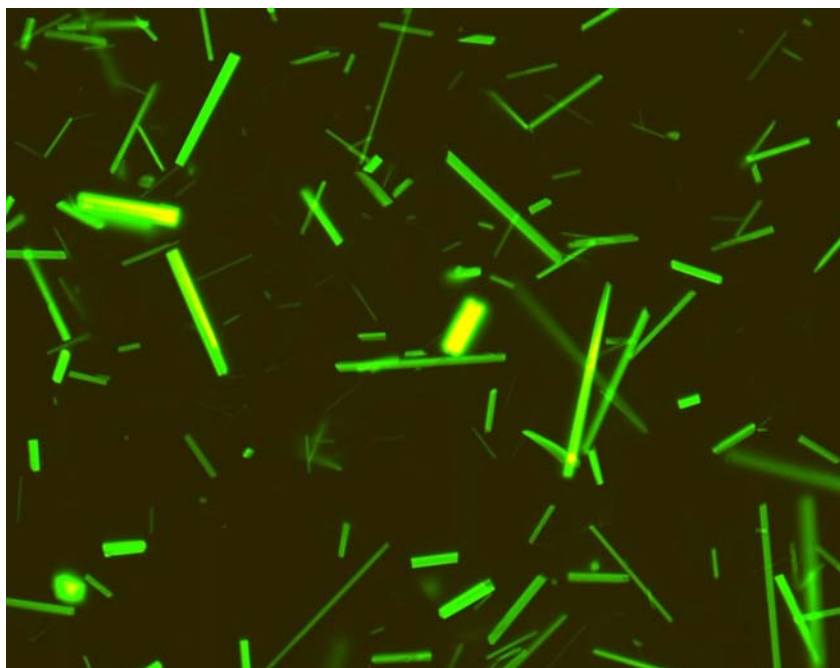
メダカ卵の受精 (2)

カルシウム 波の移動

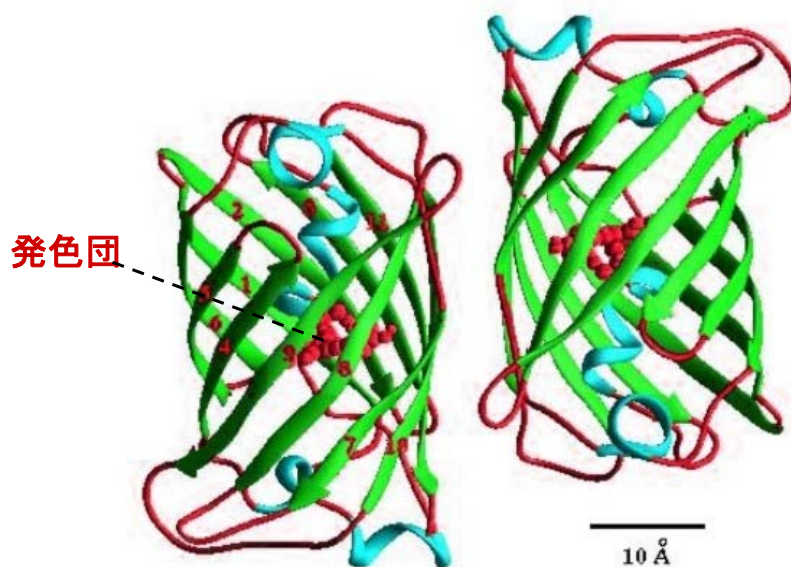


GFPの結晶

Photo by Dr. Shinya Inoue



GFP分子のX-線構造 (Yang et al., 1996)



原爆で破壊された長崎医大



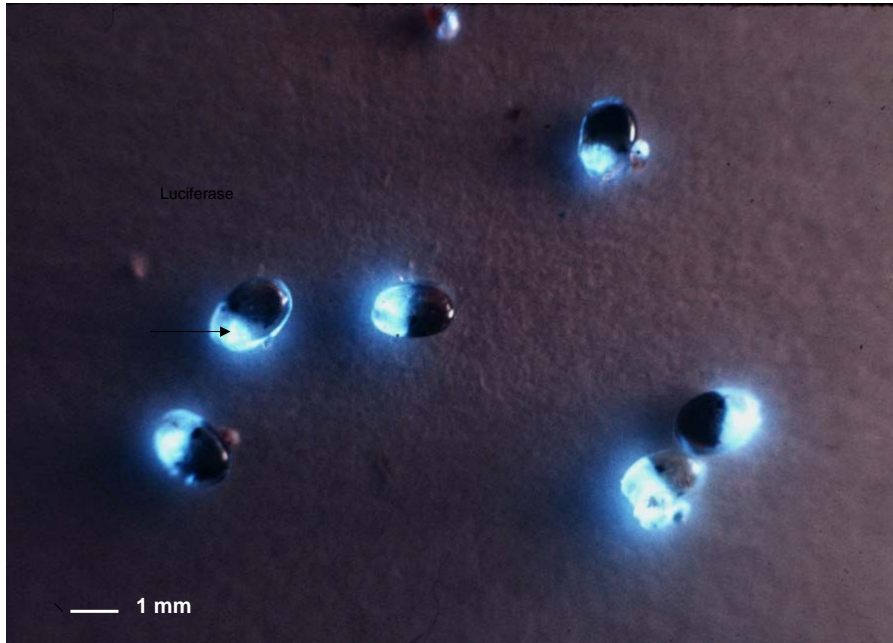
安永俊五教授 (1911-1959)
長崎大学薬学部



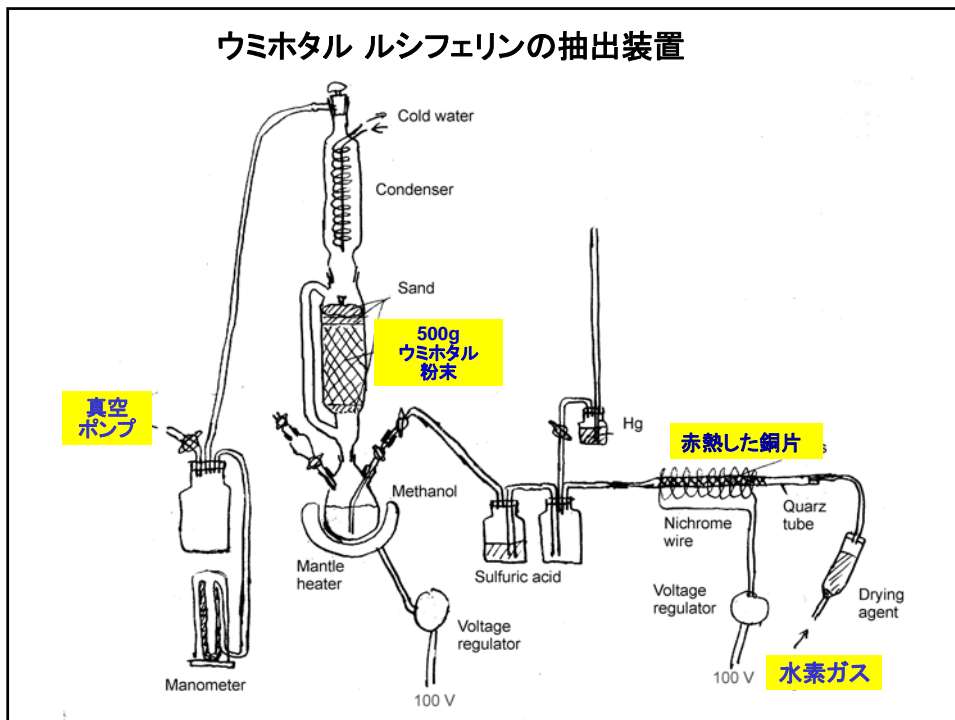
平田義正教授 (1915-2000)
名古屋大学理学部



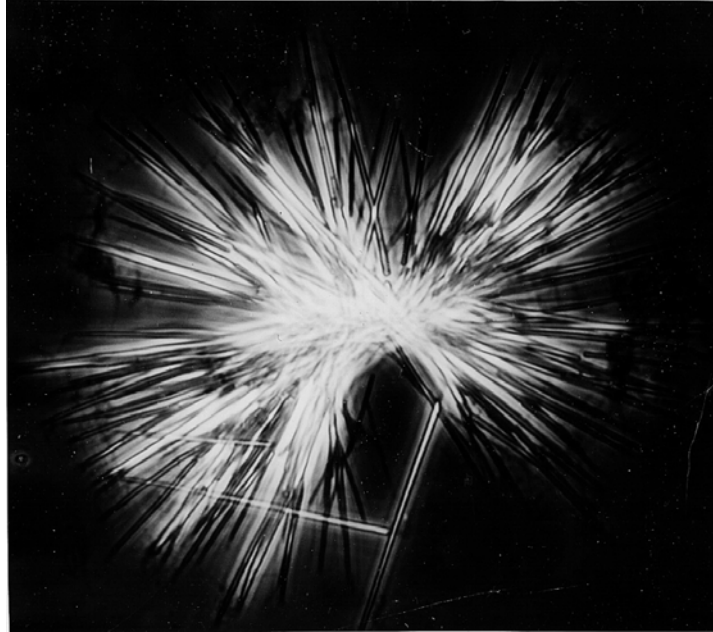
ウミホタル *Cypridina hilgendorffii*



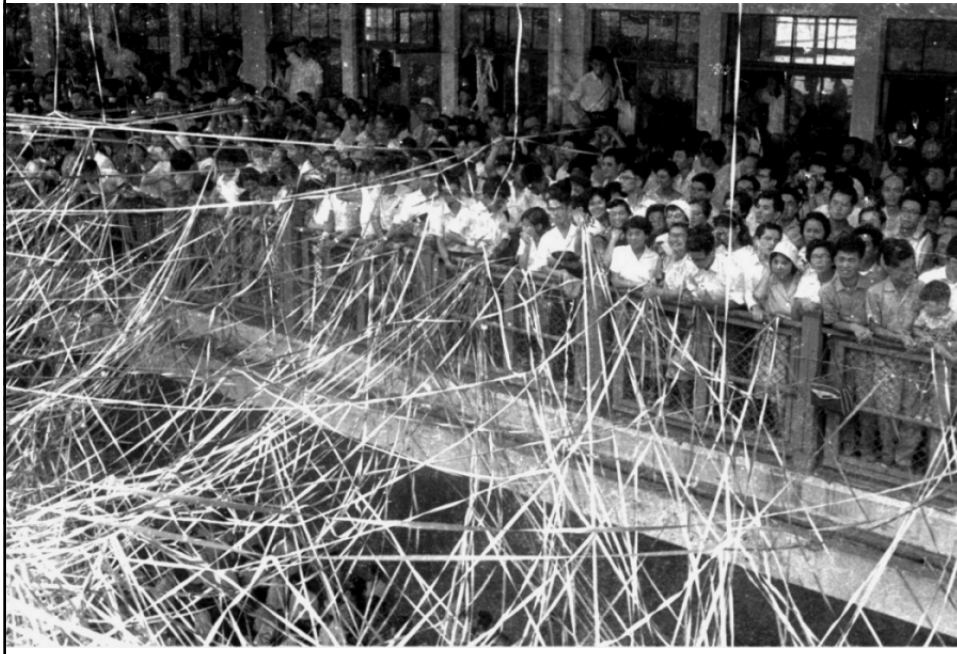
ウミホタル ルシフェリンの抽出装置



ウミホタルルシフェリンの結晶, 1956



氷川丸最後の横浜出帆、1960年8月



氷川丸最後の横浜出帆、1960年8月



プリンストン大学ナツソーホール



ジョンソン教授 (Frank H. Johnson, 1908-1990)
Princeton University



グレイシャー国立公園の西側にて—1961年6月



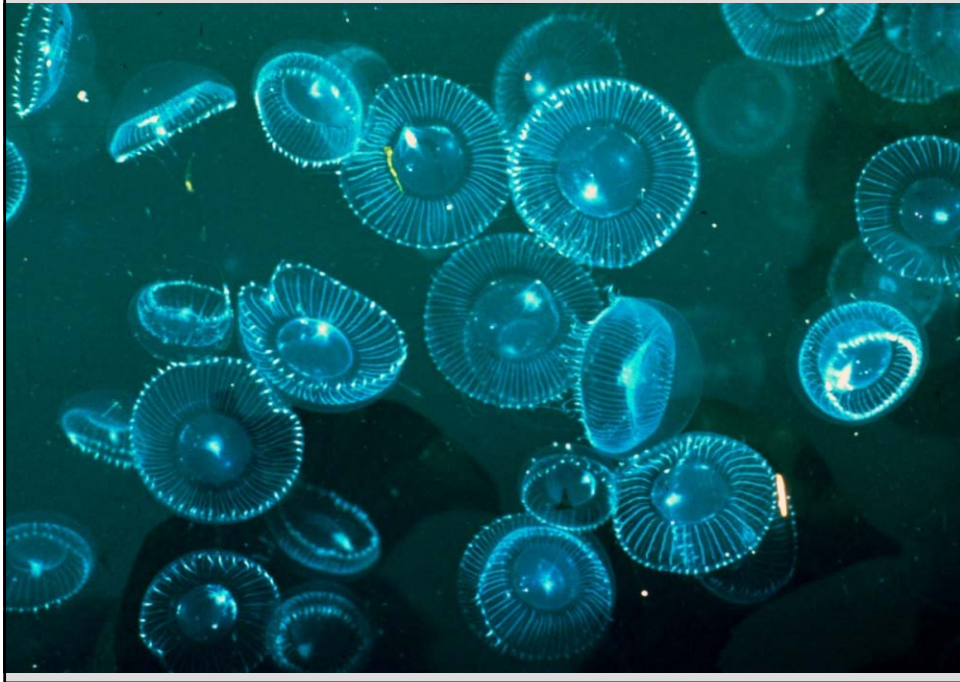
フライデーハーバー、1961年



フライデーハーバー臨海実験所(1961年)



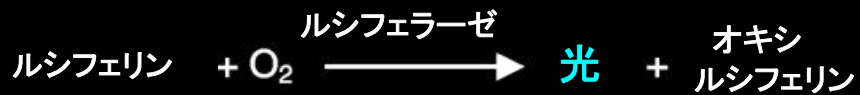
オワンクラゲ



オワンクラゲ



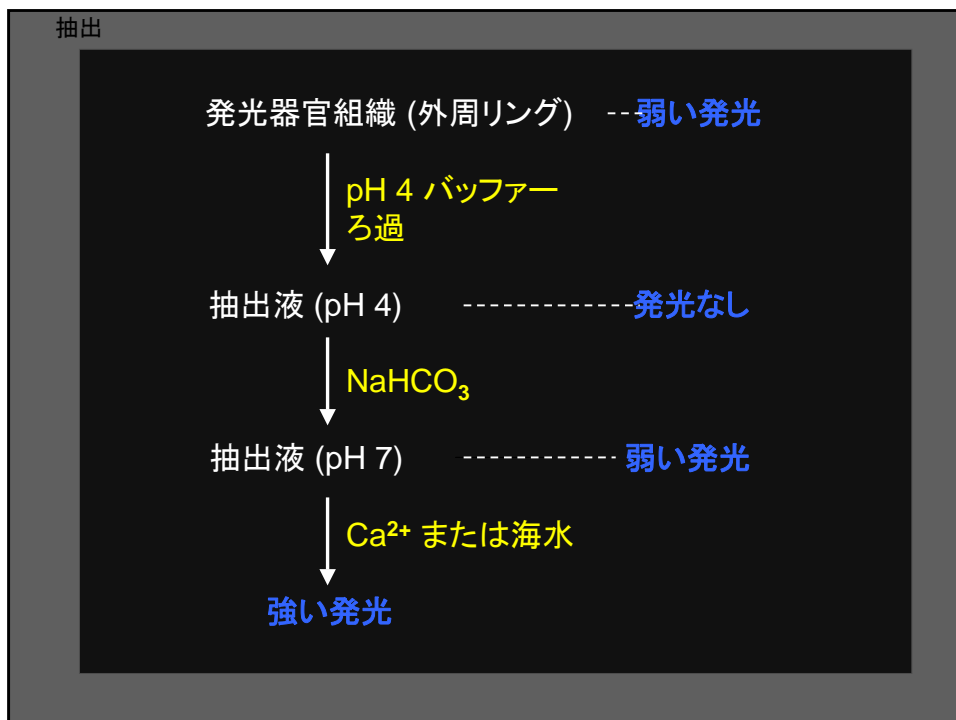
ルシフェリン - ルシフェラーゼ 反応



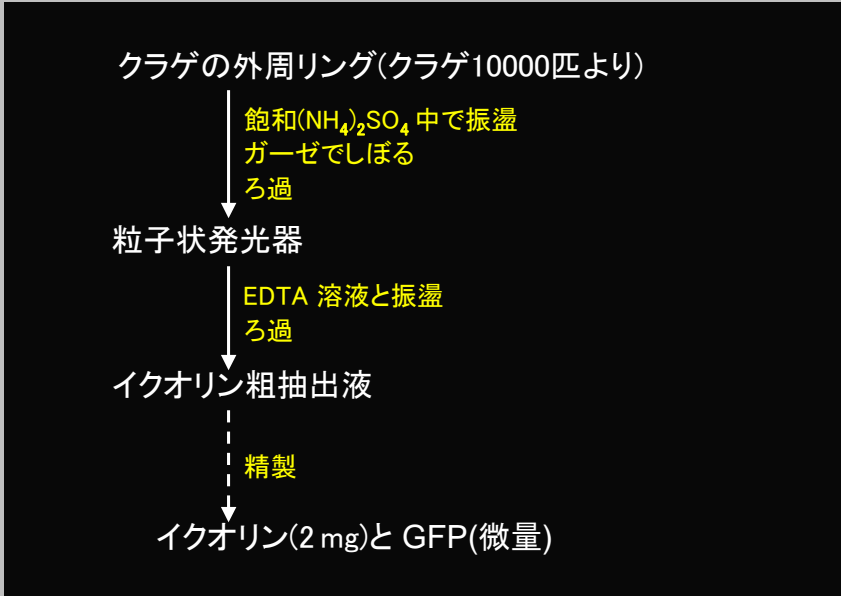
発光物質の抽出原理

発光すると発光物質は分解して無くなる。
したがって、発光物質を抽出する
ためには発光を可逆的に抑制する
方法を見つけねばならない。

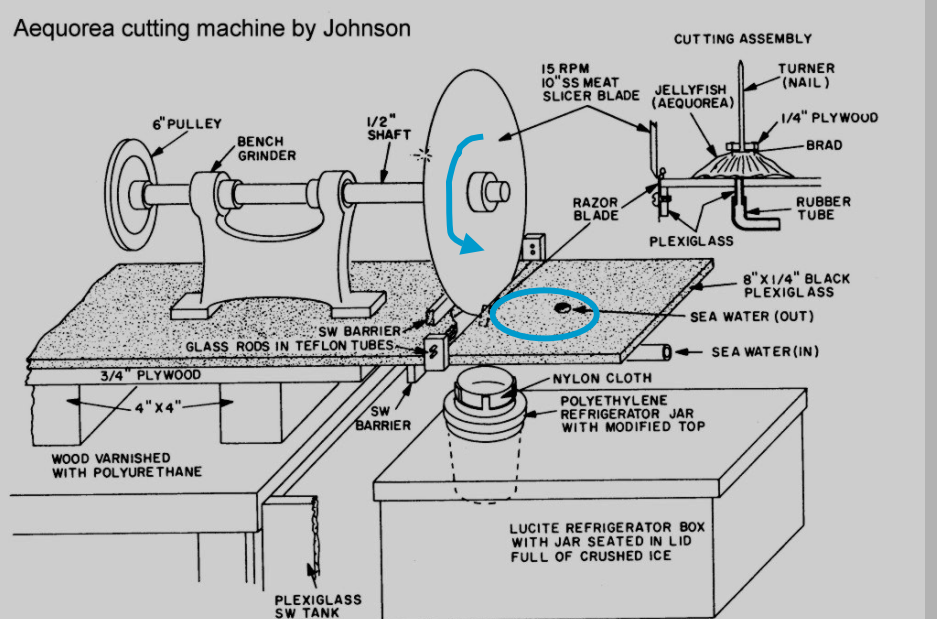
クラゲ中にたとえルシフェリンとルシフェラーゼが存在しなくても、発光には多分酵素か蛋白質が関与しているであろう。その酵素あるいは蛋白質の活性はpHで変り、強い酸性やアルカリ性では不可逆的に失活するであろう。不可逆的に失活する前に発光が可逆的に阻害されるpHが存在するかもしれない。



イクオリンとGFPの抽出と精製



クラゲのリング切り機 (made by Dr. Johnson)



リング切り機試運転中のジョンソン夫妻,1968



クラゲ採集スタッフ、1974年



クラゲ採集中のジョンソン博士



家族そろってクラゲ採り



クラゲのリング切り



リングを切ったクラゲを海に捨てる



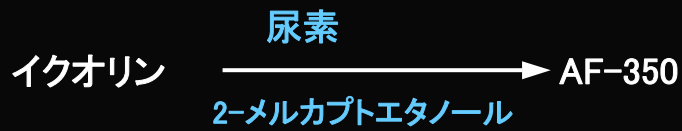
イクオリンの抽出



イクオリンの抽出



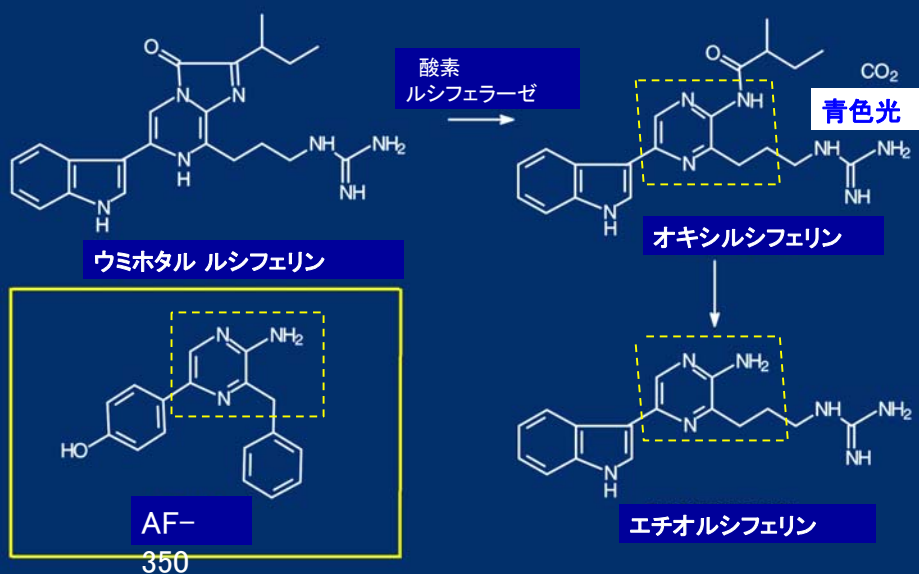
青色蛍光物質 AF-350

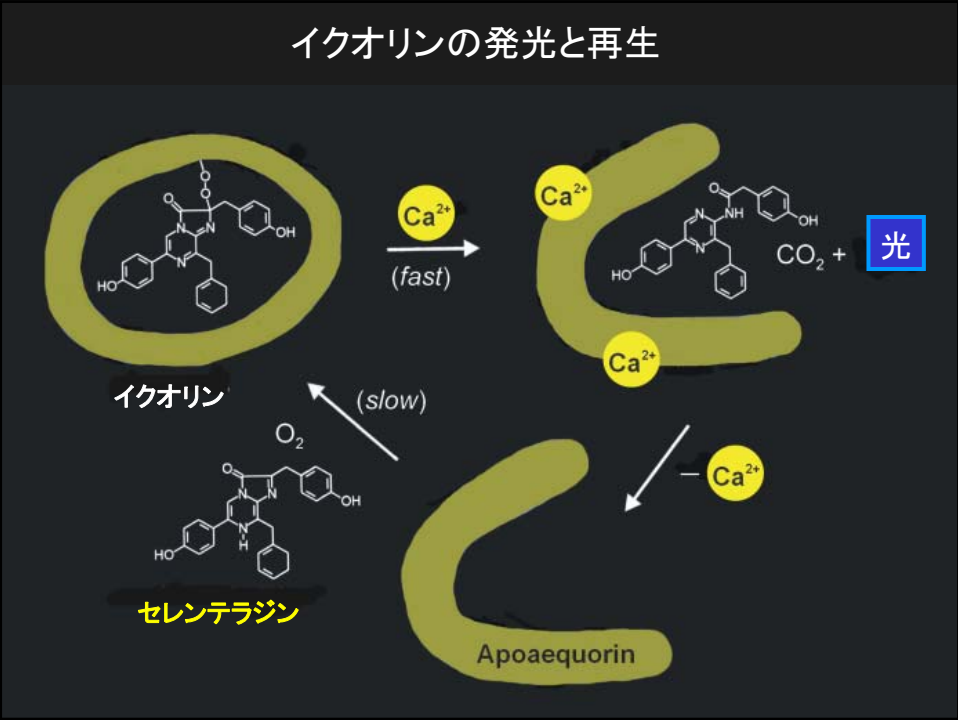
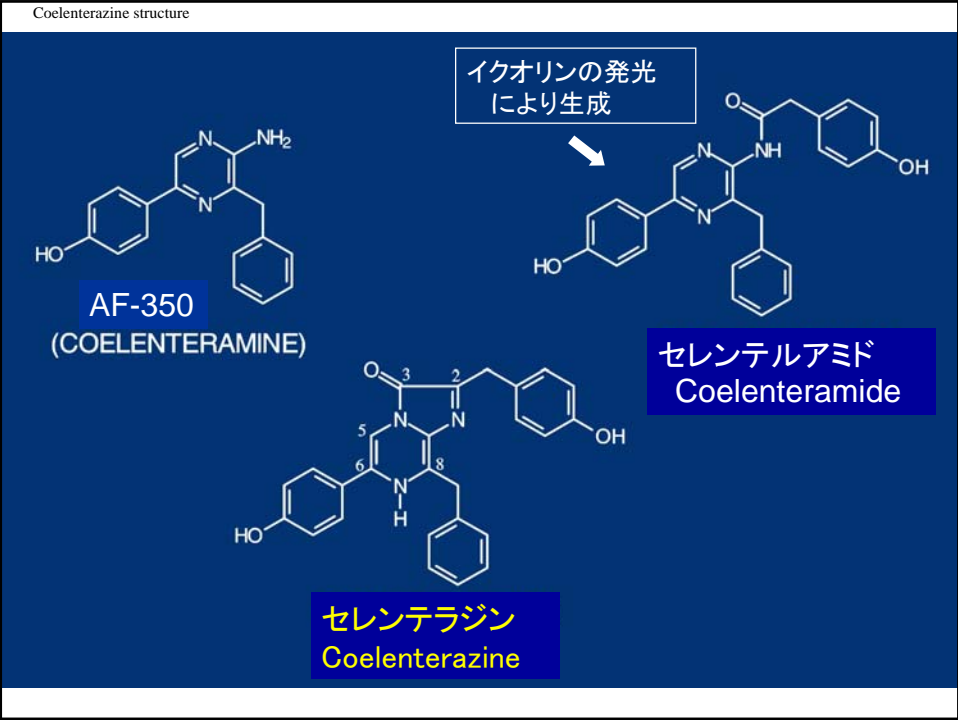


1 mg の AF-350 を得るためには
5万匹 (2.5トン)のクラゲから抽出
精製して得た150 mg のイクオリン
が必要

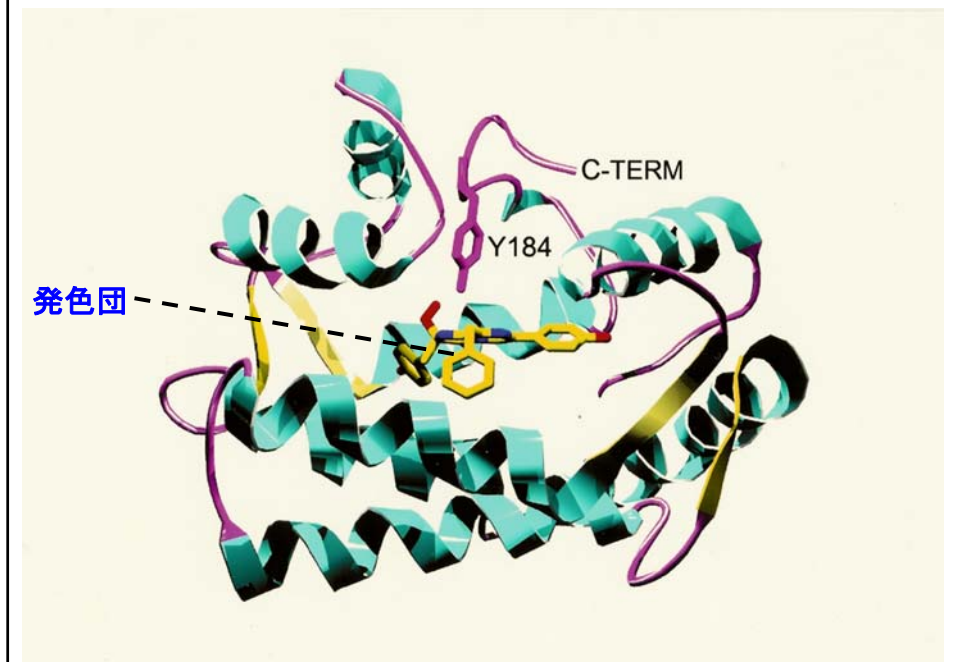
AF-350

2-アミノピラジン骨格は海蛍オキシルシフェリン
やエチオルシフェリンと共通





イクオリンのX線分子構造 (Head *et al.*, 2000)



GFP 発色団の分離精製

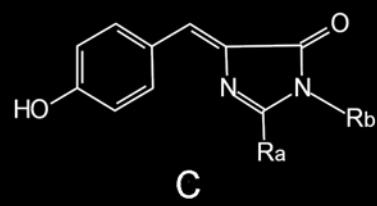
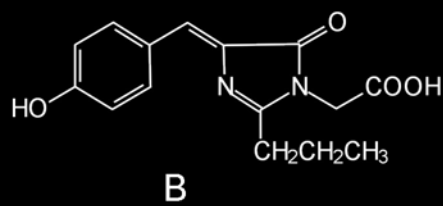
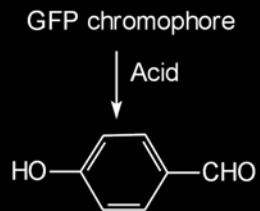
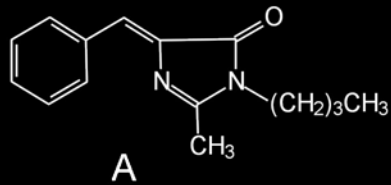
GFP (100 mg)

90度で加熱変性
パパインでダイジェスト
pH 1 のブタノールで抽出
LC 精製

**発色団の部分
(0.1 mg)**

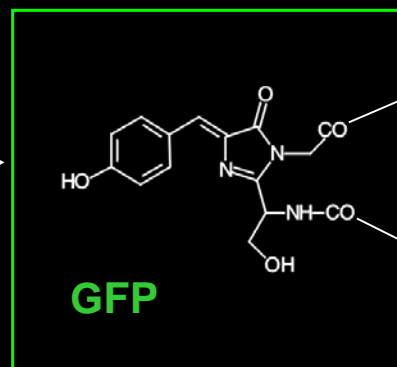
FEBS Lett. 104, 220-2 (1979)

GFP 発色団(chromophore)の構造



Ra = Rb = ペプチド鎖

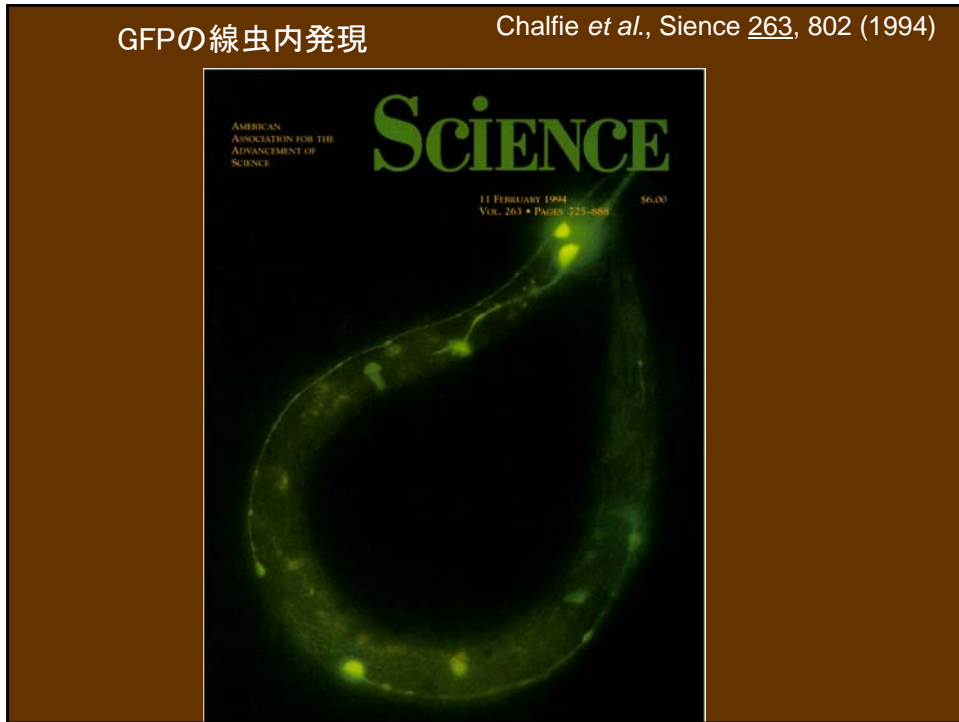
GFPの発色団



ペプチドの脱水と酸化で発色団が生成する

GFPの線虫内発現

Chalfie *et al.*, *Science* 263, 802 (1994)



緑色蛍光兎アルバ



GFPハツカネズミ



Perry and Wakayama, Advanced Cell Technology, Worcester, MA

種々のGFP系蛋白(Tsien)

天然色



蛍光



イースト菌細胞分裂における蛋白フィラメント生成



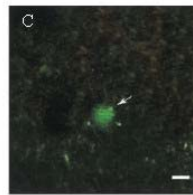
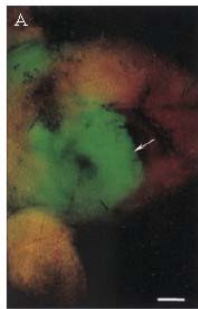
3分間隔

Van Hemert, *et al.*,
PNAS 99, 5390
(2002)

マウス メラノーマ転移脳腫

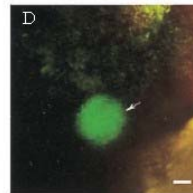
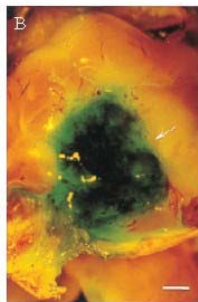
Yang *et al.*, PNAS
97, 1207 (2000)

転移後
3週間

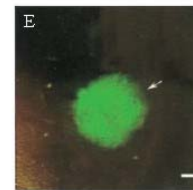


14日

Aを切開



19日



25日

Bar=1.28 mm

GFP系蛍光蛋白質を使った種々のセンサー

検出/測定目的	GFPと蛋白または生物、方法
ハロゲン イオン	YFP
カルシウム イオン	CFP-YFP-Calmodulin (Cameleon) [FRET] YFP-Calmodulin (Camgaroo) GFP-Calmodulin (Pericam)
マルトーゼ	BFP-YFP-マルトーゼ結合蛋白 [FRET]
カドミウム, 亜鉛	オタマジャクシ中、GFP-metallothionein promoter(マウスより)
匂い(揮発性分子)	線虫、BFP-YFP-臭覚神経蛋白 [FRET]
害虫駆除剤やサリン	バクテリア中、GFP-有機燐化合物加水分解酵素
爆薬TNT	バクテリア中、GFP-TNT分解酵素
癌細胞	GFPラベル、多種
薬のスクリーニング	GFP-バクテリアや細胞、多種
土壌中の水分不足	GFP-植物

オワンクラゲの緑色発光

