



蛋白質中的夜明珠—— 綠色螢光蛋白

詹姆士·華森：

「如果我們不扮演上帝，誰來扮演？」

下村脩：「我一生總共抓了85萬隻水母，從大量原材料中萃取出一點點物質，這可是最傳統的化學研究。」

蕭世裕

在夏夜裡，閃亮迷人的螢火蟲；在淺灣中，隨潮汐漂流的發光水母；在深海中，頭前帶著照亮著黑暗海世界的燈籠魚。這些各式各樣會發光的生物，造就了自然界多采多姿的有趣模樣，但這些會發光的生物體內究竟隱藏著什麼奧秘呢？

生物體發出的螢光，可藉由螢光素和螢光蛋白產生。經由螢光素酶催化後，螢光素變成一種不穩定的化合物，以螢光的方式釋放出能量，螢火蟲、海螢就是利用這種方式發光。螢光蛋白是一種可直接發出螢光的蛋白質，它吸收外來的能量，像是紫外

線，就會發出螢光。本文的主角發光水母，便是藉由這方式發光。

2008年，諾貝爾化學獎頒給日本化學家下村脩（Osamu Shimomura）、美國科學家馬丁·查爾菲（Martin Chalfie）和美籍華裔科學家錢永健（Roger Y. Tsien）3人，表彰他們「發現和應用了綠色螢光蛋白質」。

下村脩1928年生於京都，是3位得獎人中資歷最老的日籍海洋生物學家。他的科學冒險故事開始於1950年代，二次世界大戰結束後的日本。1955年，求學之路因戰爭而中斷，但仍受名古屋

大學平田 (Yashimasa Hirata) 教授聘為研究助理，要找尋一種海螢磨碎殘骸遇水發光的原理。海螢發光的原理與螢火蟲相同，是由螢光素酶催化螢光素，把它變成一種不穩定的分子，然後放出螢光。

他隨後前往美國新澤西州普林斯頓大學法蘭克·強生 (Frank

H. Johnson) 的實驗室，探討水母發光機制。水母發光的機制與螢火蟲不同，牠具有兩種特殊的蛋白，一是水母素，另一是綠色螢光蛋白 (green fluorescent protein, GFP)。首先由水母的螢光素—水

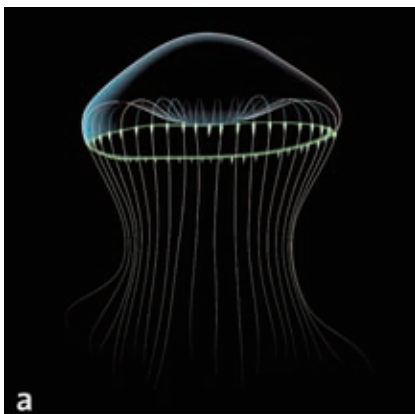


海螢是一種海洋節肢動物，是生活在海灣裡的浮游生物，具有發光特性，也稱「海裡螢火蟲」。

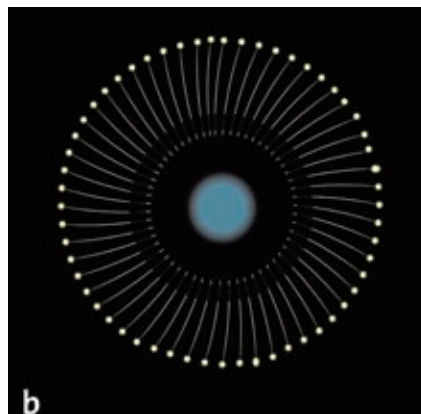
母素發出藍光，藍光經由綠色螢光蛋白吸收後，釋出綠色螢光。

1961年，下村脩在位於北美西岸的福來德港灣的實驗室，開始研究這些出現於實驗室兩側，早晚潮汐成群且一遇到刺激便會

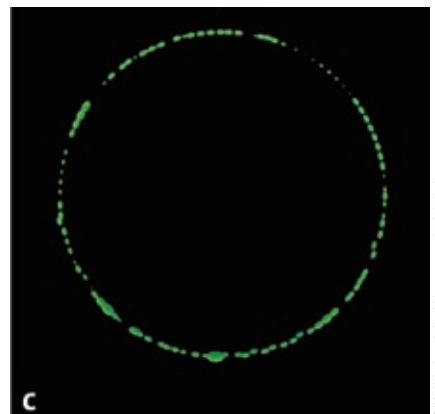
發光的維多利亞管水母。水母會發光的器官位於傘狀邊緣，這些是由許多像是小燈泡的顆粒組成的，把這器官切下再用濾紙擠壓，就能獲得水母發光菁華液。下村脩於1962年從這些發光菁華



(a) 名為維多利亞管水母 (*Aequorea victoria*) 水母生長在北美西岸海邊；



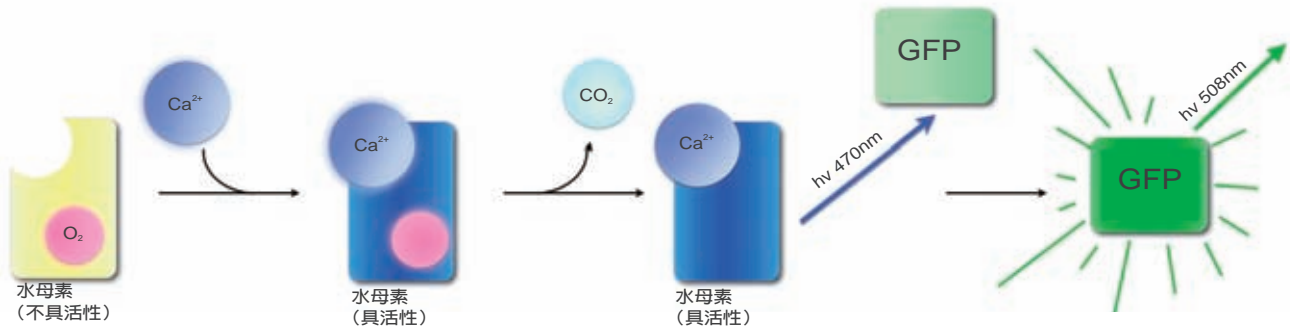
(b) 及 (c) 這種水母發光組織在傘狀邊緣。



圖片來源：2008 諾貝爾獎大眾新聞稿

各式各樣會發光的生物，造就了自然界多采多姿的有趣模樣，
但這些會發光的生物體內究竟隱藏著什麼奧祕呢？

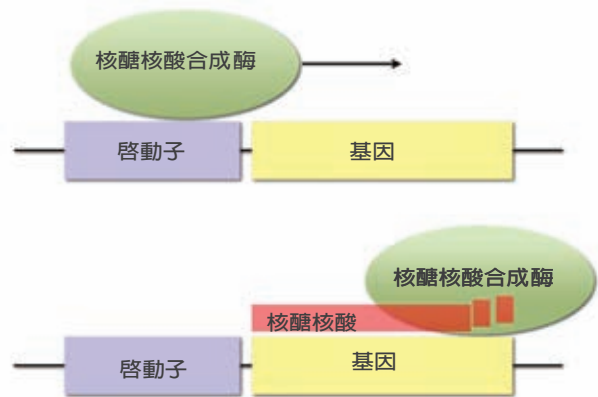
在 1962 年下村脩發表的論文中，除了描述水母素的純化分離方法外，也發表另外一個蛋白質的存在。這個蛋白質後來照亮了其他生物的細胞，並廣泛應用於其他不會發光的生物上。



綠色螢光蛋白發光機制 水母素在鈣離子 (Ca²⁺) 及氧 (O₂) 的結合下，把化學能轉換成光能，而釋放出藍光 (波長 470 nm)，這藍光經由 GFP 吸收後放出綠色螢光 (波長 508 nm)。



馬丁·查爾菲：「何不讓綠螢光蛋白走出水母，到其他生物中去發光？」1989年，在一場研討會中的突發奇想造就出許多發出螢光的模式生物。



什麼是啓動子？啓動子能夠穩定地與核醣核酸合成酶 (RNA polymerase) 結合，以啓動下游基因的表現。不同的基因具有不同的啓動子，且同一基因在不同的器官組織中，啓動子會有不同的活性，造成基因表現的組織特異性。

液中，分離並且純化出藍色螢光蛋白，稱為水母素。

這個藍色螢光蛋白是在一次偶然的情況下發現的。有一天下村脩正準備離開實驗室，他順手把部分水母發光菁華液倒進水槽裡並關燈，就在關燈的剎那間，回頭一望，看見水槽竟發出閃亮的藍光。這意外的發現，使得下村脩開始研究發光機制。後來才知道發光的原因是因為海水中的鈣

離子和水母素結合，再和空氣中的氧氣反應而釋放出藍光。

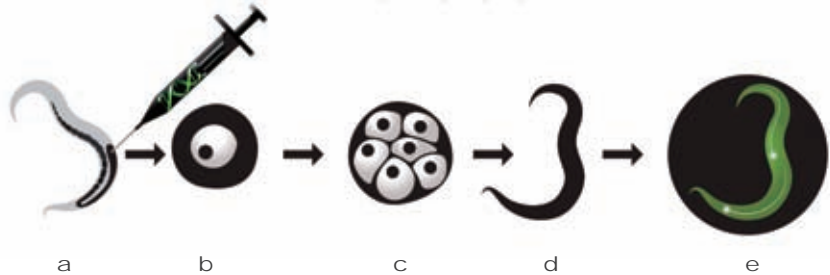
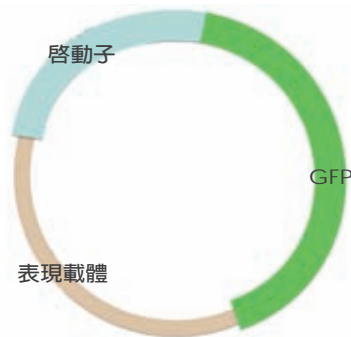
在 1962 年他們發表的論文中，除了描述水母素的純化分離

方法外，也發表另外一個蛋白質的存在，它在陽光下是綠色，在鎢絲燈下呈黃色，在紫外燈下呈強烈綠色。隨後在 1974 年，他們純



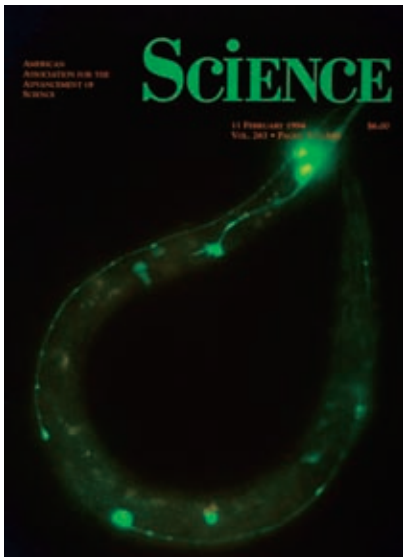
什麼是基因標籤？它是用來標定某一個基因，然後觀察這基因在生物體或細胞內表現的情形。做法是把綠色螢光蛋白 (GFP) 基因接在 A 基因上後，若 A 基因表現，便可以偵測到綠色螢光，藉此做為基因表現的標示。

查爾菲把綠色螢光蛋白當作基因標籤，用來觀察各種基因在細胞內或生物體內的表現情形。他發展出的技術已可使綠色螢光蛋白在特定的細胞或組織，甚至整個生物個體中表現。



圖片來源：2008年諾貝爾獎大獎新聞稿

查爾菲博士把綠色螢光蛋白質表現在秀麗線蟲的觸感受神經元部位。做法是把綠色螢光蛋白質的 cDNA 放到一種表現載體上，緊接在一種啓動子後面，這種啓動子在秀麗線蟲的觸感受神經元部位有很活躍的表現。他的實驗方法是：(a) 先把這表現載體打入秀麗線蟲的生殖腺，讓其自體受精，進而產生 (b) 帶有這表現載體的受精卵，經 (c) 分裂及 (d) 發育成新的個體，在顯微鏡下發現 GFP 成功地表現在秀麗線蟲的觸感受神經元部位。



查爾菲博士的研究結果發表在1994年2月分 Science 期刊上，表現綠色螢光蛋白質的秀麗線蟲也成為當期的封面。

化出這一個蛋白質，並稱它為綠色蛋白，後人稱為綠色螢光蛋白。

下村脩沒有預料到存在於發光水母中的綠色螢光蛋白，在被他發現的30年後，也照亮了其他生物的細胞，並廣泛應用於其他不會發光的生物上。

2008年諾貝爾化學獎的另外一個得主馬丁·查爾菲 (Martin Chalfie) 博士，今年61歲，美國人，目前任職於美國哥倫比亞大學，是生物學教授兼系主任。主要的研究方向是利用秀麗線蟲做為模式生物，探討神經細胞的發育和功能。這次獲獎的主要貢獻，是把綠色螢光蛋白當作基因標籤，用來觀察各種基因在細胞內或生物體內表現的情形。他發展出的技術已可使綠色螢光蛋白在特定的細胞或組織，甚至整個生物個體中表現。

在1989年4月25日的一個下午，查爾菲博士參加系上舉辦的一場生物體發光研討會中，首次認識了綠色螢光蛋白，並大為驚豔。一般螢光素酶需要其他受質參與作用才能發出螢光，但綠色螢光蛋白只需經由紫外光激發便可以放出螢光。

這時一個瘋狂的想法出現在查爾菲博士的腦海中，「是否能將綠色螢光蛋白的基因與另一個基因的啓動子連結在一起，做為觀察這基因在細胞內表現的情形。」要實現這個想法，首先需要獲得綠色螢光蛋白的基因，互補去氧核糖核酸 (complement DNA, cDNA) 序列才行。但那時候綠色螢光蛋白的 cDNA 序列尚未被科學家發現，幾經波折後，終於在1992年10月，得到了綠色螢光蛋白的 cDNA 序列。1個月後，他成功地在大腸桿菌中表現出綠色螢光蛋白，在顯微鏡下可以看到發出綠色螢光的大腸桿菌。

祖籍中國浙江杭州的錢永健，今年56歲，1952年生於美國紐約，童年在新澤西州利文斯頓成長。家族中有許多人很有成就，堂叔是著名的「中國飛彈之父」錢學森，父親是波音公司工程師，舅

錢永健在解開綠色螢光蛋白的發光機制和結構後，
便開始以基因工程的方法改造綠色螢光蛋白，
製造出能發出不同顏色的螢光蛋白，並讓它們發光更久、更強烈。



2008年獲得諾貝爾化學獎3人中，錢永健的貢獻是綠色螢光蛋白開發和應用歷程中的最後一步。

舅是麻省理工學院工程學教授，哥哥錢永佑是著名的神經生物學家，曾任史丹福大學生理系主任，也是中央研究院院士。

錢永健可說出生於「科學家和工程師世家」，或許從兒時起，錢永健就注定要走進科學。他現在是美國科學院院士、醫學院院士，美國加州大學聖地牙哥分校化學及藥理學系教授。錢永健稱自己研究領域是分子工程學，對於自己的職業選擇，他做了這樣的描述：「我注定了繼承家族的血統，從事這樣的工作。」

身體略顯單薄的錢永健，小時候身體不好患有氣喘，也因為這樣，只能常常在家裡不能到處

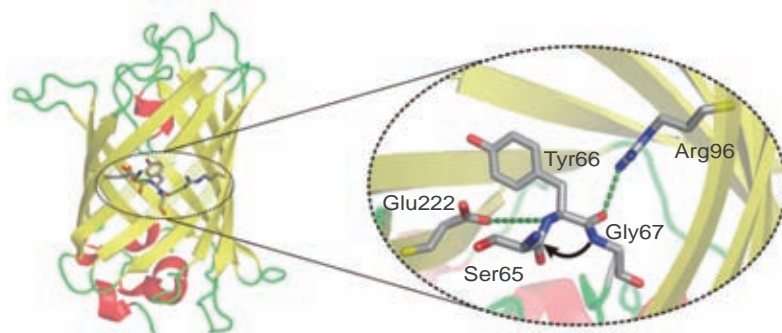
走動。但他沒有因此意志消沉，反而在家裡尋找自己感興趣的東西。他對化學實驗很有興趣，因此在家中的地下室自己做化學實驗，也愛上能產生奇妙色彩的化學，而且很有毅力，一次就做好幾個小時實驗。

錢永健16歲時，獲得人生第1個重大獎項：西屋科學天才獎，這個獎是美國頒給高中學生從事科學研究項目的最高獎，當時是研究金屬和硫氰酸鹽結合而獲獎。之後，錢永健領取美國國家優等生獎學金，進入哈佛大學就讀，20歲畢業，獲得化學物理學士學位。隨即進入英國劍橋大

學繼續深造，並於1977年獲得生理學博士學位。

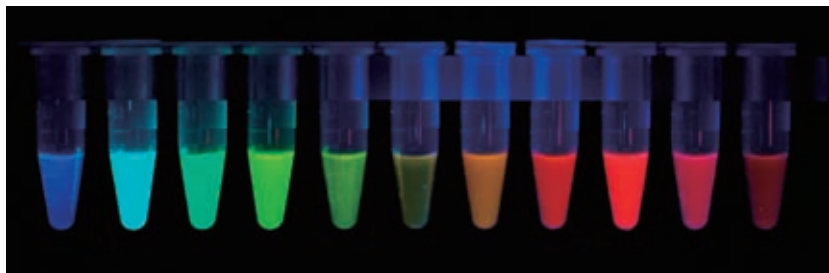
2008年獲得諾貝爾化學獎3人中，錢永健的貢獻是綠色螢光蛋白開發和應用歷程中的最後一步。

他在下村和查爾菲研究基礎上，進一步解開綠色螢光蛋白的發光機制。錢永健描繪綠色螢光蛋白中發光團結構是如何透過化學反應而產生，他發現在綠色螢光蛋白第65、66及67號位置的3個胺基酸相互作用生成發光團的結構，並進一步研究顯示這化學反應需要氧氣輔助。他解開綠色螢光蛋白發光團結構是經由自發



圖片來源：Alexey A. Pakhomov and Vladimir I. Matynov, 2008

左圖是綠色螢光蛋白的立體結構，它具有啤酒罐形狀。右圖是綠色螢光蛋白發光團的結構，由第65、66及67號3個胺基酸組成，可吸收紫外線和藍光放出綠色螢光。



圖片來源：Laboratory of Roger Y. Tsien

錢永健實驗室開發出各種顏色的螢光蛋白，有如像彩虹般各種顏色的調色盤。

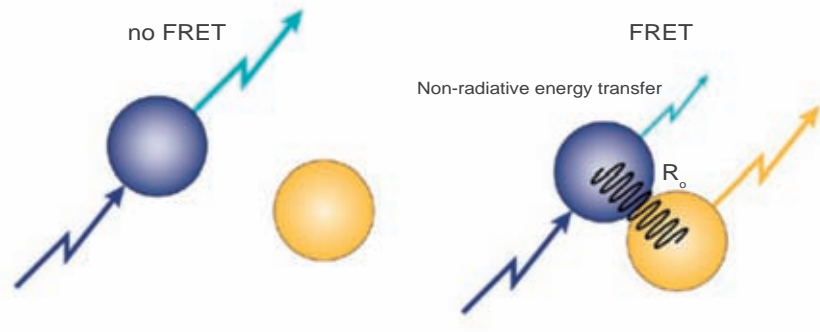
性生成，不需其他酵素或化合物來幫助。

錢永健在解開綠色螢光蛋白的發光機制和結構後，便開始以基因工程的方法改造綠色螢光蛋白。經由改變它的胺基酸排序，製造出能發出不同顏色的螢光蛋白，包括藍色、黃色、橙色、紫色等，並讓它們發光更久、更強烈。

綠色螢光蛋白帶來的衝擊

在過去使用顯微鏡礙於技術上的不足，無法直接觀察細胞內的真實情況。然而綠色螢光蛋白的發現，使研究人員可以經由顯微鏡，輕鬆確認生物體內各種基因表現的情形，和生物體內各種功能的相關性。

自1992至今，已超過兩萬篇和綠色螢光蛋白相關的學術論文發表，不論綠色螢光蛋白的研究或利用綠色螢光蛋白做為研究工



圖片來源：
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

使兩蛋白質分別和兩種不同的螢光蛋白進行融合，若在兩個蛋白質間偵測到螢光共振能量轉移（FRET）的訊號，便表示這兩個蛋白質有交互作用或結合的現象。

具，都如雨後春筍般蓬勃發展。目前最普遍利用的是：把其他蛋白質與綠色螢光蛋白融合而成融合蛋白，可觀察融合蛋白在生物體內的位置，運輸移動，其他生理功能等現象。另外在不同融合蛋白間，藉由螢光共振能量轉移（fluorescence resonance energy transfer, FRET）的原理，來了解兩個融合蛋白的交互作用。

FRET的原理是利用兩個發出不同顏色的螢光蛋白，分別以能量供給者及能量接受者的角色存在，當兩者靠近到一定距離（10~100 Å）時，做為能量供給者的螢光蛋白，經過激發光激發後，散射出的螢光被能量接受者

吸收，而使能量接受者釋放另一種顏色的螢光。

使兩蛋白質分別和兩種不同的螢光蛋白進行融合，若在兩個蛋白質間偵測到FRET的訊號，便表示這兩個蛋白質有交互作用或結合的現象發生。它可應用在蛋白質的交互作用，也可以用在偵測酵素動力反應、高能量分子（例如ATP、GTP）等。

此外，螢光在生物體內顯像，也是綠色螢光蛋白的另一個主要的應用。使綠色螢光蛋白在特定細胞（幹細胞、癌細胞等）或組織中表現，就可以即時觀察生物體中特定細胞或組織的發育、轉移等現象，這方法突破了以往無法在生物活體中即時觀察細胞或組織的困境。更重要的是可利用多種不同顏色的螢光蛋白，標定不同的胞器或組織，在同一時間點觀察細胞發生或胚胎發育的過程。

這些都是綠色螢光蛋白帶來的重大技術突破。 □

蕭世裕

成功大學生物科技研究所



圖片來源：Courtesy of I. Que, E. Kajizaki, C. Löwik, LUMC, Leiden, Netherlands

把老鼠神經幹細胞用綠色螢光蛋白標定後，再打到老鼠腦部，可藉由螢光影像追蹤幹細胞的分化及遷移。