

## 緑色蛍光タンパク質変異体 CFPとGdFPにおける光特性に関する理論的研究

(横浜市大院生命ナノ<sup>1</sup>, 北里大薬<sup>2</sup>) 高橋麻里奈<sup>1</sup>, 小関準<sup>2,1</sup>, 北幸海<sup>1</sup>, 立川仁典<sup>1</sup>

【序】緑色蛍光タンパク質 (GFP: Green Fluorescent Protein) は、1962年下村ら [1] によりオワンクラゲ (*Aequorea Victoria*) から発見され、1990年代にはその遺伝子の単離方法が確立された。それ以来、細胞生物学や医学等の幅広い分野で生物マーカーとして利用されてきた。さらに、現在に至るまで様々な蛍光特性をもつ蛍光タンパク質が合成、また発見されてきた。蛍光タンパク質の蛍光特性は、主にタンパク質の内部に存在する発光素 (CRO: Chromophore) の構造に依存することが報告されている [2]。例えば、GFPのCROを形成する Tyr を Trp に変異させると、青緑色蛍光を放つ CFP (Cyan Fluorescent Protein) となり (Figure 1-a)、さらに、CFPの Trp にアミノ基を付加させると、強い黄色蛍光を放つ GdFP (Gold Fluorescent Protein) [3] となる (Figure 1-b)。

CFPの吸収および発光スペクトルは、それぞれ 434, 452 nm、と 476, 505 nm に弱いダブルピークをもつ形状となるが、GdFPは吸収および発光共にシングルピークであり、それぞれ 466 nm と 574 nm である。CFPと比較してGdFPは、吸収において10-30 nm、発光において70-100 nm程度のレッドシフトを示し、その結果生じるおよそ100 nmもの大きなストークスシフトは、GdFPの特徴のひとつである。一方で、GdFPのアミノ基をメチル基置換した (4-Me-Trp)CFP (Figure 1-c) では、吸収および発光ともにCFPとほぼ同一のスペクトルであることが報告されている [3]。また、アミノ基の付加位置を変化させた 5-amino-Trp (Fig.1-d) は、実験的にも興味もたれているが実現には至っていない [5]。このように、CFPの類似体間で特徴的な蛍光特性の違いが報告されている。2007年 Nifosiら [5] は、TD-B3LYP 計算を用いて吸収エネルギーや分子軌道に着目した理論的解析を行った。彼らの計算では、CFPおよびGdFPの吸収エネルギーはそれぞれ 2.92 eV, 3.32eV と報告している。しかしながら、彼らはCFPとGdFPの間に生じる光特性変化の原因について議論しておらず、未だにその詳細は解っていない。そこで本研究では、アミノ基付加によってCFPからGdFPへの光特性変化が生じる原因の解明を目的とし、理論的解析を行った。

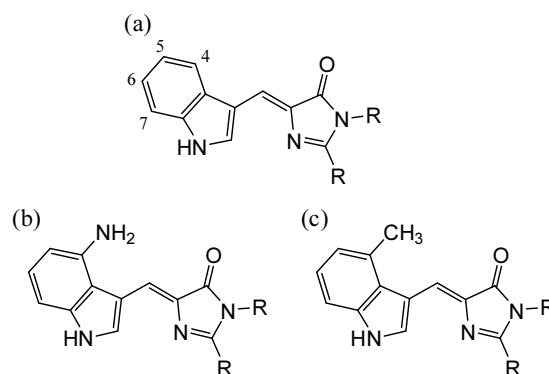


Figure 1: The chromophore (CRO) structures of CFP (a), GdFP (b), and (4-Me-Trp)CFP (c).

【手法】蛍光タンパク質の蛍光特性は主にCRO構造に依存することから、本研究では、 $\pi$ 共役に関与する部分の構造を抽出し、その末端をメチル基で終端させることでCFPとGdFPおよび(4-Me-Trp)CFPをモデル化した (Figure 1において置換基Rをメチル基とした構造に対応)。基底状態に対してはHFおよびB3LYP/6-31+G(d)レベル、励起状態に対してはCISおよびTD-B3LYP/6-31+G(d)レベルで構造最適化を行い、吸収エネルギーと発光エネルギーの解析を行った。

## 【結果と考察】

Table 1にCISおよびTD-B3LYP計算によって得られた吸収および発光エネルギーと、対応する実験値の値を示した。

Table 1: The absorption and fluorescent energies for CFP, GdFP, and (4-Me-Trp)CFP. [eV]

	Absorption Energy			Fluorescent Energy		
	CIS	TD-B3LYP	Exptl.	CIS	TD-B3LYP	Exptl.
CFP	4.57	3.31	2.74, 2.86	3.79	3.02	2.46, 2.60
GdFP	4.37	2.73	2.66	3.67	2.38	2.16
(4-Me-Trp)CFP	4.50	3.24	2.72, 2.83	3.74	2.98	2.43, 2.58

吸収エネルギーにおいては、CFPと比較して(4-Me-Trp)CFPでは、実験値において0.02-0.03 eV、計算値において0.07 eVと、若干のレッドシフトを示している。一方で、GdFPは実験値において0.08-0.20 eV、CISおよびTD-B3LYP計算においては0.20 eV、0.58 eVものレッドシフトがみられた。したがって、吸収エネルギーにおいて、いずれの手法による計算結果も定性的に実験値と一致した結果を得ることができた。さらに、ストークスシフトの実験値は、CFPおよび(4-Me-Trp)CFPでは0.25-0.29 eV、GdFPでは0.50 eVであるのに対し、TD-B3LYP計算から得られたCFP, (4-Me-Trp)CFP, GdFPのストークスシフトはそれぞれ0.26, 0.29, 0.35 eVであり、定性的に一致した値を得ることができた。

また、分子軌道を解析した結果、GdFPのアミノ基窒素のp軌道は、インドール環に対して垂直に伸びていることがわかった。このことは、アミノ基付加により、 $\pi$ 共役が伸張したことを意味している。一方、(4-Me-Trp)CFPではこのような $\pi$ 共役伸張はみらなかった。さらに、NBO電荷計算の結果は、インドール環を構成する原子の電荷分布にGdFPにおいて最も大きな偏りがあることを示しており、GdFPにおけるアミノ基の置換基効果(R効果)により生じたと考えられる。電荷分布の偏りの大きさは、メチル基およびアミノ基の置換基効果の大きさと対応して、GdFP, (4-Me-Trp)CFP, CFPの順であった。

これらの結果により、CFPからGdFPへの光特性変化の原因は、アミノ基置換による (i)  $\pi$ 共役の伸張および (ii) 置換基効果(R効果)による電荷分布の偏りによるものである可能性が示唆された。ONIOM計算およびその他の詳細な結果については当日ポスターにて発表する。

[1] O. Simomura, F. H. Johnson and Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223 (1962) [2] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509 (1998) [3] J. H. Bae, M. Rubini, G. Jung, G. Wiegand, M. H.J. Seifert, M. K. Azim, J. Kim, A. Zumbusch, T. A. Holak, L. Moroder, R. Huber and N. Budisa, *J. Mol. Biol.*, **328**, 1071 (2003) [4] Noam Agmon, *Biophys. J.*, **88**, 2452 (2005) [5] R. Nifosi, P. Amat and V. Tozzini, *J. Comput. Chem.*, **28**, 2366 (2007)