

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

(横浜市立生命ナノ¹, 北里大薬²) 高橋麻里奈¹, 小関準^{2,1}, 北幸海¹, 川島雪生¹, 立川仁典¹

Theoretical study on the absorption/fluorescence properties for the mutants of green fluorescent protein, CFP and GdFP

(Yokohama City Univ.¹, Kitasato Univ.²) Marina Takahashi¹, Jun Koseki^{2,1}, Yukiumi Kita¹, Yukio Kawashima¹, Masanori Tachikawa¹

【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光特性をもつ蛍光タンパク質が合成、発見されてきた。蛍光タンパク質の光特性は、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 に変異させた CFP (Cyan Fluorescent Protein) は青緑色蛍光を放ち、さらに、CFPの Trp にアミノ基を付加させた GdFP (Gold Fluorescent Protein) [3] は、強い黄色蛍光を放つ。また、多くの蛍光タンパク質において、CROは周囲残基や水分子と水素結合ネットワークを形成している (Figure 1)。この水素結合ネットワーク変化は、CROのイオン化状態変化を誘導し、光特性に変化をもたらすことが報告されている [4]。

CFPの吸収スペクトルは、434, 452 nm に弱いダブルピークをもつ形状となるが、GdFPは446 nm にシングルピークをもつ。一方で、GdFPのアミノ基をメチル基置換した (4-Me-Trp)CFP では、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]。さらに、CFP については2種の異なる立体配座 (PDB ID: 1OXD, 1OXE) を、また GdFP については単一の立体配座 (1OXF) の X線結晶構造を報告し、異なるスペクトル形状はこれらの立体配座の違いが原因であると説明した [3]。これに対して Demachy らは 1OXD および 1OXE について分子動力学計算を行い、異なる立体配座における吸収エネルギーに違いがないことを示した。彼らは CFP における弱いダブルピークは $\pi\pi^*$ 及び $n\pi^*$ 励起により異なる電子状態が混在するためであると示唆した [5]。

このように、CFPの類似体間で特徴的な光特性の違いが報告されている [3] が、その光特性変化の原因については、未だにその議論に決着がついていない。そこで本研究では、アミノ基置換によって CFP から GdFP へと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。

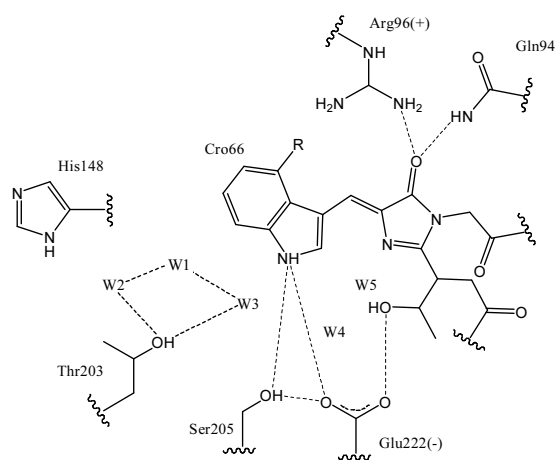


Figure 1: The largest model for the active sites of CFP(R: H), (4-Me-Trp)CFP(R: CH₃) and GdFP(R: NH₂).

【手法】

蛍光タンパク質の光特性は主にCRO構造に依存することから、 π 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(4-Me-Trp)CFPおよびGdFPをモデル化した (Figure 2におけるModel I)。構造はB3LYPレベルで最適化し、励起状態計算はTD-B3LYPを用いて1点計算を行った。基底関数は全て6-31+G(d)を用いた。

また、CRO周囲環境を考慮するためタンパク質全体に対してONIOM(QM:MM)計算を実行した。QM計算にはModel Iと同一の計算レベルを、MM計算にはAMBERを用い、PDB ID: 1OXD, 1OXFを初期構造に最適化した。ONIOM計算におけるModel領域はCRO部分と隣接する残基とのペプチド結合まで含み、水素で終端させた (Figure 2におけるModel II)。さらにタンパク質効果をみるために、ONIOM計算による最適化構造からタンパク質部分を除去することで得たModel II分子についてもModel Iと同様に励起状態計算を行った。

【結果と考察】

Table 1に計算によって得られた吸収エネルギーと、対応する実験値を示した。CFPと(4-Me-Trp)CFPの吸収スペクトルに関するレッドシフトの実験値は0.02-0.03 eVであるが、気相Model Iによる計算結果は0.07 eVとなり、実験値を定性的に再現している。同様に気相モデルにより、GdFPのレッドシフトも定性的に再現できた。その他の手法による計算結果もCFPと比較した(4-Me-Trp)CFPおよびGdFPのレッドシフトに関して定性的に実験値と一致した結果を得ることができた。また、Model IIを用いた気相及びタンパク質中における計算結果を比較することにより、タンパク質効果はCROの吸収スペクトルを0.04-0.07 eVブルーシフトさせることがわかった。

さらに、CFPとGdFPにおいてスペクトル形状の違いが生じる原因を明らかにするために、ONIOM計算による最適化構造を用いてCRO周囲にある各残基あるいは水が励起エネルギーに及ぼす影響について解析を行っている。これらの結果詳細については当日ポスターにて発表する。

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

		CFP	(4-Me-Trp)CFP	GdFP
Gas phase	Model I	3.31	3.24	2.73
	Model II	3.10	3.06	2.84
In Protein	Model II	3.14	3.13	2.90
Exptl.		2.74, 2.86	2.72, 2.83	2.66

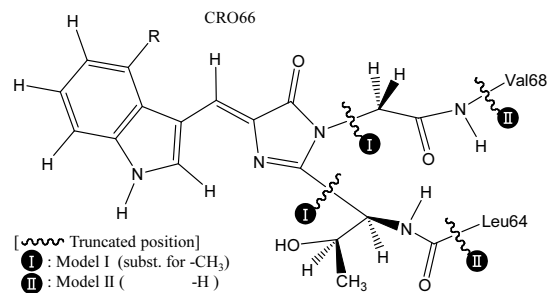


Figure 2: The chromophore(CRO) structures of CFP (R: H), (4-Me-Trp)CFP (R: CH₃), and GdFP (R: NH₂). Model I and II are truncated by methyl groups and hydrogens respectively.

[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] I. Demachy, J. Ridard, H. L. Pasquier, E. Durnerin, G. Vallverdu, P. Archirel and B Lévy, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 24121 (2005)