

3A11

共鳴ラマン分光法による蛍光タンパク質 Dronpa の発色団構造決定
(阪大院理) 東野飛鳥、○水野 操、水谷泰久

Structural determination of the chromophore in a fluorescent protein, Dronpa
(Osaka University) Asuka Higashino, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani

はじめに

蛍光タンパク質 Dronpa は、蛍光を発する明状態 B state と発しない暗状態 A₂ state との間でフォトクロミズムを示す。また、これらに加えて無蛍光性の A₁ state がある。A₁ state は中性条件で B state と共にわずかに存在し、酸性条件で存在比が増すことが報告されている (図 1) [1]。各状態での発色団の幾何構造は、B state ではシス形、A₂ state ではトランス形であることがすでにわかっている。しかし、A₁ state の発色団の幾何構造や、発色団のフェノール部分のプロトン化状態については、推測が行われているのみで、構造決定には至っていない。光変換機構を明らかにするためには、溶液試料での詳細な構造解析が必要である。

共鳴ラマン分光法はタンパク質中の発色団構造を調べるのに適している。しかし、Dronpa は強い蛍光を発し、可視共鳴ラマンスペクトルの測定が困難であるため、これまでにスペクトルの報告例はなかった。

本研究でわれわれは、共鳴ラマン分光法による Dronpa 発色団の構造決定を行うために、強い蛍光バックグラウンドを除去し、Dronpa 発色団の共鳴ラマンスペクトルの観測を試みた。観測されたスペクトルから、各状態の発色団と周辺アミノ酸残基の構造、さらにそれらの間の相互作用の pH 依存性について考察した。

実験

Dronpa は、大腸菌中で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。B state から A₂ state への光変換は波長 514.5 nm の光を用いて行った。共鳴ラマンスペクトルは、波長 400 nm 及び 561 nm の励起光を、セル中をフローする試料溶液に照射し、液体窒素冷却 CCD 検出器で検出することで観測した。検出器の素子間の感度補正は、ラマンスペクトルの観測と同じ光学系の配置で、色素 (硫酸キニーネ、およびローダミン 6G) の蛍光を測定して行った。蛍光によるバックグラウンドは波長のべき関数を用いて除去した。

結果と考察

波長 400 nm の励起光で Dronpa の A₁ state と A₂ state、および比較のために蛍光タンパク質 GFP の共鳴ラマンスペクトルを測定した。得られたラマンスペクトルは、強い蛍光のバック

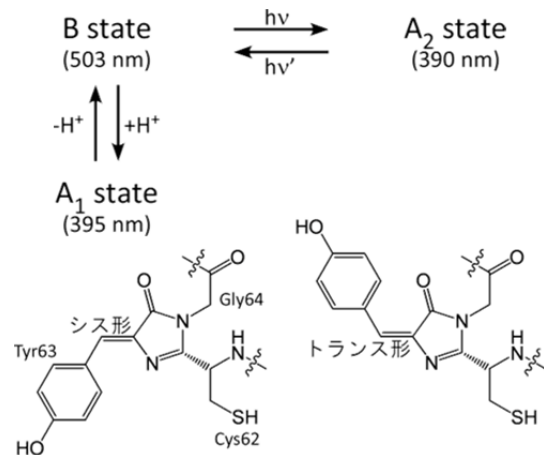


図 1. Dronpa の状態変化. 上: カッコ内は吸収極大波長. 下: 発色団の幾何構造.

グラウンドとともに観測されたが、そのままでも数本のラマンバンドの存在が確認できた。詳細な振動バンドの解析を行うために、蛍光の寄与を除いたスペクトルを図 2(a)に示す。それぞれのスペクトルには、発色団構造の違いを反映する差が観測された。特に、 A_2 state においてのみ 1145 cm^{-1} にバンドが現れた。GFP 発色団のモデル化合物に関する研究では、トランス形のラマンスペクトルでのみ 1125 cm^{-1} 付近にバンドが現れることが報告されている[2]。これらの結果から、 A_1 state がシス形の発色団を持つという推定を裏付けることができた。さらに、Dronpa 中の発色団についても、 1145 cm^{-1} のバンドがそのシス形とトランス形を区別するマーカーバンドとして利用できることが明らかになった。また、軽水緩衝液から重水緩衝液に置換することによって、 1560 cm^{-1} 付近に現れる C=N 伸縮振動バンドが低波数シフトした。これにより、 A_1 state と A_2 state が共に発色団中に交換しうるプロトンをもつことが示唆された。

波長 561 nm の励起光を用いて B state の前期共鳴ラマンスペクトルを測定した (図 2(b))。得られたスペクトルのマーカーバンドをもとに、B state の発色団がシス形であることを確認した。また、脱プロトン化した発色団を持つ GFP 変異体との比較から、B state の発色団が脱プロトン化していることが明らかになった。

A_1 state と B state との酸塩基平衡を調べるために、吸収、蛍光、および共鳴ラマンスペクトルの pH 依存性を調べた。pH 4 から pH 10 において、 A_1 state のスペクトル変化は一段階で起こることがわかり、 pK_a が 5.0 と求められた。GFP の吸収スペクトルは、pH 変化による明確な遷移を示さないことが知られており、Dronpa は GFP と異なる特徴をもつ。これは、発色団周辺の水素結合ネットワークが Dronpa と GFP では異なることに由来すると考えられる。プロトン化している野生型 GFP と比較して、中性で脱プロトン化していることが知られている GFP 変異体 (S65T) では、発色団周辺の水素結合ネットワークが変化している[3]。この GFP 変異体と同様に、Dronpa においても野生型 GFP とは異なる水素結合ネットワークが形成されており、これが Dronpa の pK_a が低く、脱プロトン化した発色団が安定である主な原因であると考えられる。脱プロトン化した GFP 変異体の pK_a が 6.0 と、Dronpa の値と比較的近いこともこの解釈を裏付けている。

参考文献

[1] Fron, E. *et al.* *JACS* **129**, 4870 (2007). [2] Luin, S. *et al.* *JACS* **131**, 96 (2009). [3] Brejc, K. *et al.* *PNAS* **94**, 2306 (1997).

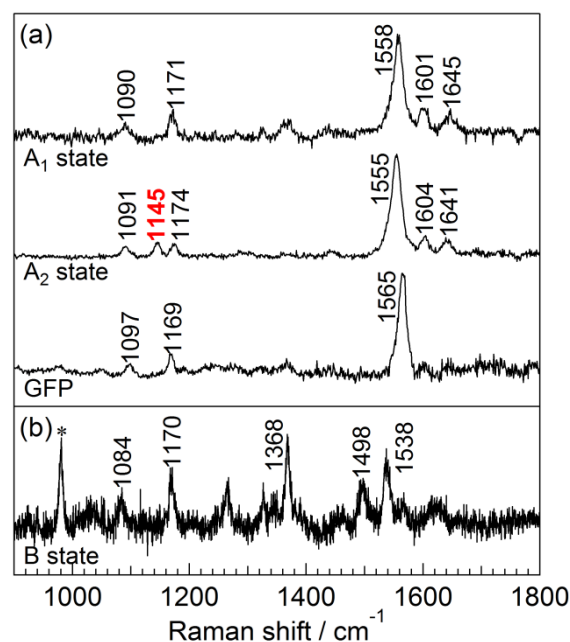


図 2. (a) Dronpa (A_1 state, A_2 state) および GFP の共鳴ラマンスペクトル. 励起光 400 nm . (B) Dronpa (B state) の前期共鳴ラマンスペクトル. 励起光 561 nm . 各スペクトルは蛍光の寄与を除いている。