

蛍光タンパク質eYFPとそのY145変異体の蛍光寿命に与える 発色団周辺環境の影響

¹東邦大・理, ²理研・伊藤ナノ医工学
間 紗希子¹, 宮武 秀行², 内田 朗¹, ○細井 晴子¹

Effect of the Environment around the Chromophore on Lifetimes of Enhanced Yellow Fluorescent Protein eYFP and its Y145 Mutants

Sakiko Hazama¹, Hideyuki Miyatake², Akira Uchida¹, ○Haruko Hosoi¹

¹Department of Biomolecular Science, Toho University, Japan

²Nano Medical Engineering Laboratory, RIKEN, Japan

【Abstract】 The goal of our study is to answer the fundamental question of why fluorescent proteins are fluorescent. Previously, we performed fluorescence lifetime measurements of enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) and its 19 different Y145 mutants. The lifetimes of the Y145 mutants varied drastically over a wide range of 3.4 ns to 82 ps. Further, the lifetime decreases as the mutated amino acid side chain volume becomes smaller. In this study, we determined the crystal structures of eYFP wild type (3.3 ns lifetime) and its Y145G mutant (1.0 ns lifetime) to clarify the correlation between the lifetime and the structural change caused by mutation. The overall structures are very similar ($C\alpha$ RMSD 0.447 Å) but there are several local differences. In the Y145G mutant, two voids were found around the chromophore, whereas such voids were not observed for the wild type. It is considered that the voids found in the Y145G mutant would induce an internal degree of freedom of the chromophore and lead to an efficient nonradiative decay process.

【序】 われわれは、すべての蛍光タンパク質に共通する発光メカニズムの解明を目指して研究を進めている。これまでにオワンクラゲ由来黄色蛍光タンパク質 eYFP の蛍光寿命が、145 番アミノ酸一つの変異で大きく変化すること、また、145 番アミノ酸側鎖体積が小さくなるほど短くなることを明らかにした (Fig. 1) [1]。現在、蛍光寿命変化の起源の解明を目的として、eYFP 野生型とその Y145 変異体 19 種類の X 線結晶構造解析を進めている。本発表では、構造決定に成功した長寿命 (3.3 ns) の eYFP 野生型と短寿命 (1.0 ns) の Y145G 変異体の構造を比較した結果を報告する。

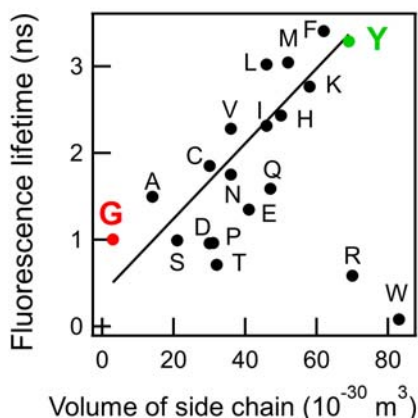


Fig. 1. A plot of the fluorescence lifetime of eYFP wild type and its Y145 mutants as a function of the amino acid side chain volume. The wild type (Y) and Y145G (G) are highlighted in green and red, respectively. A solid line indicates the linear regression line. R and W were excluded in the fitting [1].

【方法】 N-末端に His タグを有する eYFP 野生型 (Clontech) と eYFP Y145G 変異体を作製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。得られた結晶の X 線回折強度データを SPring-8 理研ビームライン BL26B1、BL26B2 で収集した。

【結果と考察】 eYFP 野生型と Y145G 変異体の構造を、それぞれ 2.0 Å、1.4 Å の分解能で決定した。野生型と Y145G 間の C α 炭素原子の平均二乗偏差 (RMSD) は 0.447 Å と非常に小さく、Y145G 変異によるタンパク質骨格構造の変化は非常に小さいことが分かった。

また、野生型と Y145G 変異体の発色団はともに cis 型、平面構造をとっており、Y145G 変異による発色団構造の変化も小さいことが分かった。この結果は、「発色団が cis 型だと光る、trans 型だと光らない。発色団が平面構造だと光る、非平面だと光らない。」[2]というこれまでの慣習的な描像とは異なる。

野生型と Y145G 変異体の構造の違いは非常に局所的な次の 4 点である (Fig. 2)。① G145 の C α 炭素が発色団 (β -バレル内部) に約 0.9 Å 近づく。②野生型において Y145 側鎖 ($-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$) がある場所に、Y145G (側鎖-H) では 5 個の水分子が入る。③S205 側鎖が 2 種類の構造 (double conformation) をとる。④E222 側鎖が S205 から遠ざかるように約 1.7 Å 移動する。

これらの構造の違いから、野生型よりも Y145G 変異体の蛍光寿命が短くなる理由を以下のように説明することができる。野生型の発色団は周辺アミノ酸によって完全にパッキングされ、内部自由度が少ない。そのため、振動緩和などの無輻射減衰過程が起こりにくく、蛍光寿命は長くなる。一方、Y145G 変異体では、変異により Y145 側鎖のあった場所に隙間 A ができる (Fig. 2)。隙間 A は G145 が β -バレル内部に移動するだけでは十分に補償されずに残る。さらに隙間 A に入った水分子と水素結合できるように、S205 側鎖が逆向きの構造が double conformation として現れる。逆向きの S205 側鎖は G145 主鎖カルボニル酸素とも新たに水素結合を形成する。その結果、野生型で観察された S205 側鎖-E222 側鎖間の水素結合が消失して距離が遠くなり、隙間 B ができる。最終的に発色団周辺には 2 か所の隙間ができる。その結果、 β -バレル中においても発色団の内部運動自由度が大きくなり、蛍光寿命が短くなると考えられる。

この説明は、145 番アミノ酸側鎖体積が小さい変異体ほど寿命が短くなるという傾向 (Fig. 1) と矛盾しない。今後は他の変異体についても検討し、蛍光寿命の体積依存性の起源を明らかにする。

【参考文献】

- [1] H. Hosoi, S. Hazama, and Y. Takeda, *Chem. Phys. Lett.*, **618**, 186 (2015).
[2] 例えば、S. J. Remington, *Protein Science* **20**, 20, (2011).

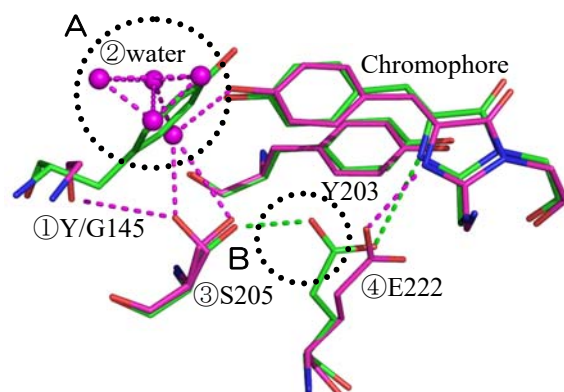


Fig. 2. Structures of eYFP wild type (green) and its Y145G mutant (red). The dotted lines indicate hydrogen bond. The dotted circles indicate the void around the chromophore.