

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K05764

研究課題名(和文) すべてのオワンクラゲ由来蛍光タンパク質に共通する蛍光寿命と発色団周辺構造の相関

研究課題名(英文) Correlation between the fluorescence lifetime and the local environment of the chromophore: Universal nature to fluorescent proteins from the jellyfish *Aequorea Victoria*

研究代表者

細井 晴子 (HOSOI, Haruko)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：00313396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光タンパク質はクラゲやサンゴなどがもつ光るタンパク質である。蛍光タンパク質によって初めて、生きたままの細胞や組織の中にあるタンパク質の位置や動きの観察が可能になり、現在、蛍光タンパク質は生命科学分野の研究にとって欠かせないツールである。本研究では最も基本的な問いである「なぜ蛍光タンパク質は光るのか」を明らかにするために、238アミノ酸で構成される蛍光タンパク質eYFPのアミノ酸ひとつを置換しただけで光らなくなるのはなぜかに注目して研究を行った。時間分解蛍光寿命測定とX線結晶構造解析により、タンパク質中の光る部位(発色団)の剛直性の違いが重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

数多くの蛍光タンパク質が開発され、実際に可視化実験に用いられている。得られた結果を正しく理解するためにはその蛍光メカニズムが既知であることが必須であるが、現状では困難である。本研究では、eYFPとeGFPという2種類の蛍光タンパク質に対して、発色団周辺の剛直性が大きいほど蛍光寿命が長くなる、つまり強く光るようになるという共通の性質があることを明らかにした。この性質は、蛍光タンパク質全般に成り立つと考えており、現在、その拡張性を検討中である。これにより、可視化の基盤技術の向上、新規蛍光タンパク質の戦略的かつ効率的開発を可能にする知見を、社会に発信できる予定である。

研究成果の概要(英文)：The role of various fluorescent proteins (FPs) developed as “optical highlighters” is of importance in the fields of cell and molecular biology. It is essential to understand the fluorescence mechanisms of FPs. However, a general fundamental mechanism that applies to all FPs has not been clarified. We have investigated fluorescence mechanism of FPs to answer the fundamental question of why fluorescent proteins are fluorescent. Previously, we found that fluorescence lifetimes of enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) and its 19 different Y145 mutants are largely different. If we can understand why only one amino acid makes it not fluoresce, we can understand why fluorescent proteins fluoresce. In this study, we found by time-resolved fluorescence lifetime measurements and X-ray crystallography that the rigidity and flexibility around the chromophore determine the fluorescence lifetime.

研究分野：物理化学

キーワード：蛍光タンパク質 時間分解蛍光分光法 X線結晶構造解析 蛍光寿命

1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質 (FP) を用いた生きた細胞や個体のバイオイメージングは生命科学研究を支える重要な技術である。その光物理を理解するため、様々な FP の発光メカニズムが調べられているが、その研究は個別の FP の各論に留まっている。すべての FP に共通する発光メカニズムを明らかにするため、研究代表者は、「発色団モデル化合物が無蛍光性」である点に注目した。これは、FP が光るためには、発色団とβ-バレル内のアミノ酸との相互作用が必要であることを意味している。多数の発色団周辺アミノ酸の中で、どのアミノ酸とどのような相互作用が発色団を光る状態にしているかを明らかにすることができれば、重要な情報となる。そこで研究実施者は以前、黄色蛍光タンパク質 eYFP の Y145 変異体 計 20 種類を作製し、時間分解蛍光測定によりその蛍光寿命を測定した (H. Hosoi, et al., *Chem. Phys. Lett.*, **2015**, *618*, 186–191)。Y145 変異体の蛍光寿命は、アミノ酸一つの違いで 3.4 ns から 82 ps まで大きく変化し、さらに、145 番アミノ酸側鎖体積が小さくなるほど蛍光寿命が短くなる、つまり光らなくなることを明らかにした。

2. 研究の目的

寿命の短い変異体がなぜ光らなくなったのかが分かれば、なぜ eYFP が光るのかを知ることができる。そこで本申請課題では、eYFP Y145 変異体の蛍光寿命の変化の起源を明らかにし、それを土台としてオワンクラゲ由来 FP に共通する性質を見出すことを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

申請時の提案に沿って、eYFP とその Y145 変異体の結晶構造解析、その他、5 種類のオワンクラゲ由来 FP の Y145 変異体を作製し、その蛍光寿命測定を行った。実験が順調に進んだため、さらに 3 種類のサンゴ由来の FP についても検討を行った。サンゴ由来 FP はオワンクラゲ由来 FP と同様に広くイメージングに用いられている。さらにオワンクラゲ由来 FP の一つである緑色蛍光タンパク質 eGFP の Y145 変異体の結晶構造解析も開始した。

4. 研究成果

4-1. オワンクラゲ由来 FP の Y145 変異体の蛍光寿命のアミノ酸体積依存性

FP として、青色蛍光タンパク質 eBFP、緑青色蛍光タンパク質 eCFP、緑色蛍光タンパク質 sapphire GFP と eGFP、最初に発見された *Aequorea victoria* GFP の 5 種類についてその 145 変異体 19 種類を作製し、蛍光寿命測定を行った。そのうち、eGFP の Y145 変異体の蛍光寿命の体積依存性を、対応する eYFP の結果とともに Fig.1 に示す。eGFP の Y145 変異体の寿命は Y145 変異によって大きく変化せず、eYFP で観測された大きな体積依存性は、eGFP では観測されなかった。他の 4 種類の FP についても、145 変異による寿命の変化はさまざまであった。よって、発色団の近傍にある 145 アミノ酸側鎖の影響は、FP の種類によって異なることが明らかになった。これらの FP では、発色団周辺のアミノ酸の種類はほぼ同じである。

4-2. サンゴ由来 FP の W143 変異体の蛍光寿命のアミノ酸体積依存性と蛍光寿命のコントロール

一方、サンゴ由来 FP として、mOrange、mStrawberry、mCherry について発色団周辺の複数のアミノ酸について検討したところ、W143 が eYFP

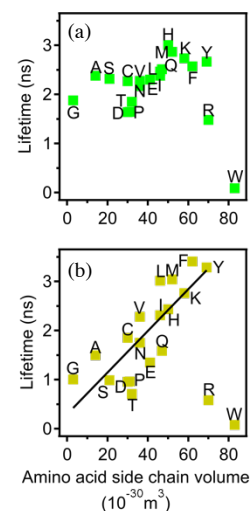


Figure 1. Plots of fluorescence lifetime of Y145 mutants of (a) eGFP and (b) eYFP as a function of amino acid side chain volume.

の Y145 に対応することが分かった。そこで各 FP の W143 変異体を作製し、その蛍光寿命を測定した。得られた各変異体の蛍光寿命とアミノ酸側鎖の体積をプロットした図を Fig.2 に示す。これらの FP については、eYFP と同様の体積依存性があることが分かった。これらの FP の発色団周辺のアミノ酸の種類はオワンクラゲ由来 FP とは大きく異なる。

発色団近傍の W143 アミノ酸側鎖体積が小さくなると蛍光寿命が短くなることが明らかになったため、さらに、同様の効果を示すアミノ酸を探索した。その結果、163 番アミノ酸(M:mOrange と mStrawberry, Q:mCherry)においても、最もアミノ酸体積が小さいグリシンに置換した 163G 変異体の寿命がそれぞれ約 1/5 に減少することを見出した。これまでに得られた知見をもとに、ランダムミューテーションなどの場当たりの実験ではなく、戦略的かつ効率的に、これらの変異体の創出を行ったと考えている。

4-3. eYFP と eGFP の Y145 変異体の結晶構造解析

4-1 より、オワンクラゲ由来 FP である eYFP と eGFP では 145 変異の影響が異なることが明らかになった。そこで、eYFP Y145 変異体の蛍光寿命の体積依存性の起源を明らかにするとともに、eYFP と eGFP の違いを説明するため、それぞれの結晶構造解析を行った。これまでに、図 1 に示した eYFP Y145 変異体 17 種類と eGFP Y145 変異体 11 種類の精密化に成功した。図 3 に示すように 145 変異による 3 次元構造は非常によく似ており、野生型と変異体との RMSD は最大 0.35 Å であった。

145 アミノ酸が発色団に与える影響は局所的であることが明らかになったため、現在、145 アミノ酸周辺の構造変化に注目して検討している。特に Fig. 4 に示す発色団周辺の水素結合ネットワークの一部である S205 と E222 間の水素結合が、eYFP では7割の変異体で切れているのに対して、eGFP では 2 割の変異体でしか切れていないことに注目している。eGFP の発色団は強固な水素結合ネットワークにより安定化され、145 番アミノ酸の変化の影響を受けにくい。逆に eYFP ではネットワークによる安定化の寄与が小さいために、145 番アミノ酸が小さくなることで形成される発色団近傍の隙間によって振動緩和が起りやすくなり、蛍光寿命が短くなると考えている。現在さらに詳細を考察している。

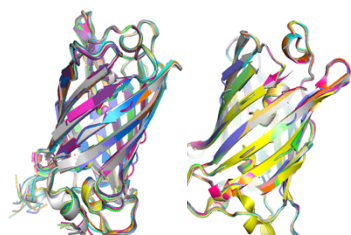


Figure 3. Superposition of 3D structures of eYFP and sixteen Y145 variants (left) and eGFP (2y0g.pdb) and eleven Y145 mutants (right).

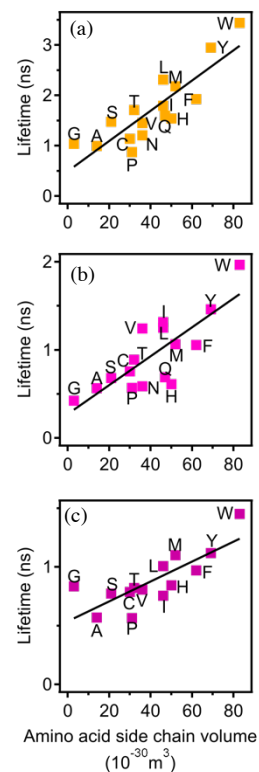


Figure 2. Plots of fluorescence lifetime of W143 mutants of (a) mOrange, (b) mStrawberry, and (c) mCherry as a function of amino acid side chain volume.

Table 1. Results of crystal structure determination.

eYFP			
変異体	分解能 (Å)	変異体	分解能 (Å)
WT	2.0	Y145K	1.8
Y145A	1.7	Y145L	1.8
Y145C	1.8	Y145M	1.6
Y145D	2.5	Y145N	1.6
Y145E	2.1	Y145Q	2.3
Y145F	2.6	Y145T	1.6
Y145G	1.4	Y145V	1.5
Y145H	2.8	Y145W	2.3
Y145I	1.2	-	-
eGFP			
変異体	分解能 (Å)	変異体	分解能 (Å)
Y145A	2.0	Y145P	1.9
Y145D	2.0	Y145Q	1.7
Y145E	1.4	Y145S	1.8
Y145F	1.2	Y145V	2.5
Y145G	2.3	Y145W	3.0
Y145K	1.7	-	-

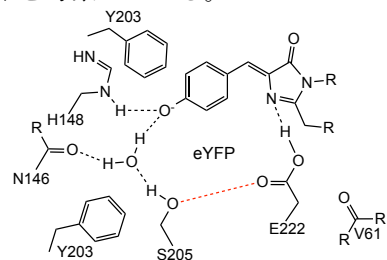


Figure 4. Hydrogen bond network of eYFP.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坪田 空樹, 間 紗希子, 山口 佳那子, 宮武 秀行, 内田 朗, 細井 晴子
2. 発表標題 蛍光タンパク質の蛍光寿命の制御
3. 学会等名 分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 間 紗希子・宮武 秀行・内田 朗・細井 晴子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第11回分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細井晴子
2. 発表標題 超高速時間分解分光法による蛍光タンパク質の発光メカニズムの研究
3. 学会等名 生物発光化学発光研究会 第33回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮武 秀行 (MIYATAKE Hideyuki) (50291935)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員 (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	内田 朗 (UCHIDA Akira) (30176680)	東邦大学・理学部・教授 (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関