

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2013

課題番号：21687007

研究課題名(和文)立体構造情報を利用した高輝度蛍光タンパク質の合理的なデザイン法の開発

研究課題名(英文)Development of the concept for structure-aided rational design of bright fluorescent protein

研究代表者

松田 知己 (MATSUDA, Tomoki)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50419206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000円、(間接経費) 6,360,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光タンパク質は生物学研究において欠かせないツールとして用いられているが、その蛍光強度の増強はランダムな変異導入によって行われており効率化が求められてきた。本研究では、ランダム変異導入により蛍光強度を増強させた蛍光タンパク質の各中間変異体の立体構造を決定し、それらを比較することにより蛍光タンパク質改良の指針となる構造的特徴を見出した。蛍光強度の増強された変異体では、蛍光発色団の平面性の向上が見られ、主鎖のストランドはより蛍光発色団に近づいて安定化に寄与していた。今後、現在構築中の計算機シミュレーションによる分子モデリングの系を用いた高輝度蛍光タンパク質の合理的なデザイン法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fluorescent proteins are used as indispensable tool for biological research. However, enhancement of the fluorescence intensity has been accomplished by repeating the random mutagenesis, thus the effective way for improvement has been required. In this study we determined structures of the intermediates those were generated through the improvement of the fluorescence intensity for a bright fluorescent protein. From the comparison among them, we found structural features contributing to the improvement. In the mutants fluorescence intensity has enhanced, planarity of fluorescent chromophore is enhanced and main chain of the beta strand comes close to the fluorescent chromophore for stabilization. In combination with currently creating molecular modeling system based on the computational simulation, establishment of the rational design concept for bright fluorescent protein is expected by further study.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：蛍光タンパク質 構造生物学 タンパク質工学 分子シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質は GFP(緑色蛍光タンパク質) を発見した下村脩博士のノーベル化学賞受賞により幅広い層の人々に知られるようになったが、現在のような細胞内のイメージングのツールとして成熟するまでには同時に受賞した Roger Tsien らによるより明るいものへ改良しようという飽くなき挑戦が無くてはならないものであった。様々な蛍光色を持つ蛍光タンパク質が用いられるようになった今日でも尚、蛍光強度の増強は蛍光タンパク質の開発において常に克服しなければならない問題として残されている。研究代表者らのグループにおいて UV 励起蛍光タンパク質 Sirius を開発した際にも、ランダム変異導入を繰り返してより蛍光量子収率の高い変異体を得る必要があった。

2. 研究の目的

今日では生物学研究において欠かせないツールとして、様々な蛍光色を持つ蛍光タンパク質が、生細胞イメージング等に用いられるようになってきている。このような現状においても尚、蛍光強度の増強は主にランダムな変異導入とスクリーニングによって行う必要があり、時間と労力を必要としている。従って、その効率化は蛍光タンパク質の開発において未だに克服しなければならない課題として残されている。本研究では、ランダム変異導入によって段階的に蛍光強度を増強させた UV 励起蛍光タンパク質 Sirius の各段階の変異体の立体構造を決定し、分子シミュレーション等の技法を組み合わせながら系統的に比較・解析して、蛍光タンパク質改良に必要な変異のデザインの方法を見いだすことを目的とした。

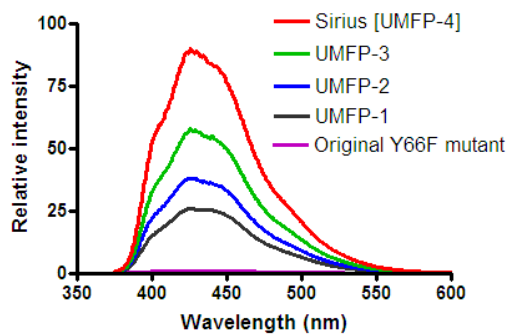


図1 変異導入に伴う蛍光強度の増強

変異導入により段階的に蛍光強度を増強させて UV 励起蛍光タンパク質 Sirius が得られた。

3. 研究の方法

本研究では蛍光強度が段階的に異なる UV 励起蛍光タンパク質 Sirius 及びその変異体を研究対象とした。

蛍光タンパク質の蛍光発光には発色団周

囲の環境が大きく関わっているため、発色団付近の水分子を含めた詳細な立体構造情報を得ることができる X 線結晶構造解析により各変異体の立体構造を決定した。

決定された変異体間の立体構造の比較によりそれらの間の差異を見出し、それを手がかりに蛍光強度変化をもたらし要因となり得る構造的特徴を明らかにした。

さらに、各変異体について、タンパク質の運動性と蛍光量子収率の相関を計算化学的に考察するために QM/MM-MD (量子化学/分子力学-分子動力学) 計算を行う系を構築している。

4. 研究成果

(1) UV 励起蛍光タンパク質の X 線結晶構造解析

タンパク質の結晶化と回折測定

アミノ酸置換変異導入により段階的に蛍光強度を増強させた UV 励起蛍光タンパク質変異体の結晶化を行った。構造決定を予定した蛍光強度の異なる 7 つの変異体のうち全てにおいて回折測定に十分な大きさの結晶を得ることができた。当初の予定に反して、反射の得られたサンプルの結晶化条件はそれぞれ異なり、個々に条件のスクリーニングを必要とした。それらについて、北海道大学薬学研究科の稲垣教授の研究室と共同で研究室内の X 線発生装置や国内の放射光施設で回折測定を行った。そのうち、最終改良変異体である Sirius を含む 5 つの変異体の結晶については平成 21 年度中に構造決定に十分な分解能 2 付近かそれ以下の良好な反射データを得ることができた。残りの 2 変異体に関して引き続き結晶化条件のスクリーニングを行い、平成 22 年度にそのうちの 1 サンプルについて解析に十分な 2 付近の反射データを得た。

測定データの解析

良好な反射の得られた 6 つのサンプルについて解析を行い、立体構造を決定した。それらの立体構造座標データは本研究の成果論文の発表に合わせて登録する予定である。

(2) 変異体間での立体構造の比較

mSECFP-Y66F 変異体発色団からの 6 員環の脱離

X 線結晶構造解析により、UV 励起蛍光タンパク質 Sirius 開発の初段階で作製された無蛍光性の変異体 mSECFP-Y66F では、それ以降の改良変異体で見られる 5 員環と 6 員環から形成されている蛍光発色団の 6 員環部分が脱離していることが立体構造情報から明らかになった。また、共役系の広がりが大きいほど吸収・蛍光スペクトルの長波長化が起こるという予想に相反して、5 員環のみからなる発色団を持つ mSECFP-Y66F の吸収スペクトルの形状が、5 員環と 6 員環が共存し、より共役系の広がりを持つと思われる

Sirius のものとはほぼ一致するような知見も得られていた。そこで、北海道大学電子科学研究所の玉置教授の研究室と共同で mSECFP-Y66F と Sirius それぞれの発色団単体の化学合成及び吸収・蛍光スペクトル比較を行ったところ、いずれも Sirius タンパク質に近い吸収波長ピークを示し、mSECFP-Y66F 由来の 5 員環構造に特徴的な現象であることを明らかにした。これらの結果から、Sirius の吸収も 5 員環部分で主に起こっていることが示唆された。

また、mSECFP-Y66F の 6 員環の脱離をより直接的に裏付ける為に、トリプシン消化した mSECFP-Y66F について質量分析による解析を行い、発色団が 5 員環のみから形成されていることが示唆される結果を得た。

蛍光発色団の平面性の違い

変異体間の蛍光発色団の立体構造を比較すると、蛍光量子収率の低い変異体から最終改良変異体 Sirius へ近づいていくにつれて、発色団を形成する 5 員環と 6 員環の間のねじれが小さくなり、2 つの環の間の平面性が高くなる傾向が見られた。このことは、吸収した励起光のエネルギーを効率良く蛍光へと変換することに大きく寄与しており、蛍光量子収率の向上に役立っていることを示唆している。発色団周辺のアミノ酸残基に、この平面性を向上させる変異を導入させることにより更なる改良が見込まれる。

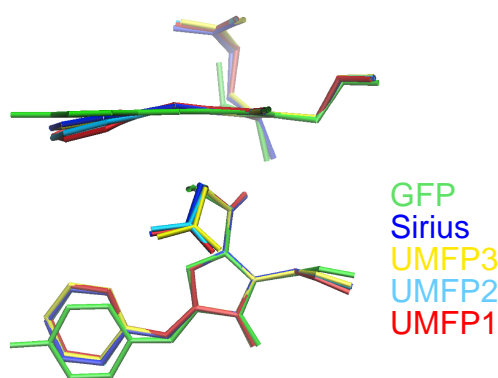


図2 変異体間の蛍光発色団の平面性の違い

UMFP1 UMFP2 UMFP3 Sirius の順に蛍光量子収率が大きくなるにつれて平面性が増している。

蛍光発色団付近のパッキング

Sirius の立体構造では、発色団中の 65 残基目に変異導入されたグルタミン残基の側鎖が発色団を形成する 6 員環、5 員環のなす平面から上方に突き出して発色団近傍の蛋白質内部の空隙を埋めるように位置しており、発色団の立体構造の揺らぎを小さくして安定化させることにより蛍光量子収率の増

強に寄与していることが示唆された。

さらに変異体の主鎖の立体構造を詳細に比較したところ、蛍光タンパク質に特徴的な β -can 構造を形成する ストランドのうち、7 番目の ストランドにおいて各変異体の立体構造間で顕著な違いを見出した。蛍光強度の増加した Sirius ではこの 7 番目の ストランドがより蛍光発色団に近い位置にシフトしており、タンパク質内での蛍光発色団のパッキングの向上に寄与していることが示唆された。

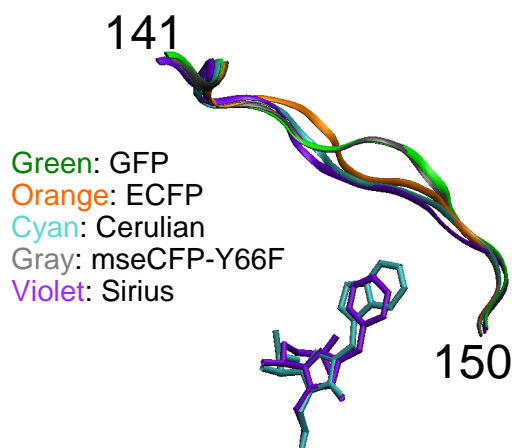


図3 蛍光発色団と 7 番目の ストランドの位置関係の比較

蛍光強度の最も増強された Sirius では 7 番目の ストランド主鎖が発色団に接近している。

(3) 分子シミュレーションによる解析

決定した変異体立体構造を用いて発色団近傍の詳細な電子状態を知るための QM (量子化学) 計算を行う並列計算環境を平成 22 年度予算により購入した量子化学計算用ワークステーションにて構築し、発色団単体についての電子状態の計算を行った。

さらに、立体構造と蛍光量子収率の相関を考察するために QM/MM-MD (量子化学/分子力学-分子動力学) 計算を行う系を大阪大学蛋白質異質研究所の中村教授の研究室との共同研究により構築している。第一段階として、蛍光発色団のみに対して QM 計算を行い、その結果を、Sirius、mSECFP-Y66F 両蛍光タンパク質の発色団の吸収ピーク波長と比較したところ、測定値に近い値を得ることができた。

現在はタンパク質中でのタンパク質の運動を考慮した計算を QM/MM-MD 計算を行う段階へと進んでいる。

以上の知見から、Sirius の変異導入による蛍光量子収率の増加は、発色団切断の回避と発色団構造の安定化の 2 段階の要因によって起こっていることが明らかになった。これらの結果を論文発表することを予定してい

る。今後、構造比較によって得られたこれらの特徴をもつ変異体を、現在取り組んでいるQM/MD 計算による分子モデリングによって合理的にデザインする方法が確立されることが期待される。また、QM/MD 計算により静的な構造では説明出来なかった変異による効果を、動きのあるタンパク質内での効果として説明することのできる発展性も期待される。

本研究で用いた蛍光タンパク質立体構造データの比較解析の手法は、他の蛍光タンパク質の改良にも応用され、2量体を形成する光増感蛍光タンパク質の単量化等の波及的な研究成果をもたらしている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

N. Fukuda, T. Matsuda, T. Nagai, Optical control of the Ca^{2+} concentration in a live specimen with a genetically encoded Ca^{2+} -releasing molecular tool, ACS Chem. Biol., 査読有、9巻、2014、pp.1197-1203

DOI: 10.1021/cb400849n

松田 知己、永井 健治、光スイッチング機能プローブで挑む細胞の個性、生体の科学、査読無、65巻、2014、pp101-106
<http://medicalfinder.jp/ejournal/2425101587.html>

K. Takemoto (1), T. Matsuda (2)、他 12名、SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation, Sci. Rep., 査読有、3巻、2013、pp.2629 (on line)

DOI: 10.1038/srep02629

K. Ohtsuka (1), T. Matsuda (6)、他 6名、Fluorescence imaging of potassium ions in living cells using a fluorescent probe based on a thrombin binding aptamer-peptide conjugate、Chem. Comm., 査読有、48巻、2012、pp.4740-4742

DOI: 10.1039/C2CC30536D

K. Horikawa (1), T. Matsuda (3)、他 8名、Spontaneous Network Activity Visualized by Ultra-sensitive Ca^{2+} Indicators, Yellow cameloan-Nano、Chem. Comm., 査読有、7巻、2010、pp.729-732

DOI: 10.1038/nmeth.1488

[学会発表](計 7 件)

松田 知己、蛍光タンパク質プローブによる生理機能イメージングと操作、日本生体エネルギー研究会第39回討論、2013年12月18日 静岡県コンベンションアーツ

センター(静岡県)[招待講演]

T. Matsuda、Beyond the diffraction limit with an advanced photoswitching fluorescent protein、International Symposium on Morphological Science XXIII IMSM 2013、2013. 9. 13、Toki Messe Niigata Convention Center (Niigata) [invited]

T. Matsuda、Structural analysis of ultramarine fluorescent protein Sirius、Biophysical Society 57th Annual Meeting、2013. 2. 3、Pennsylvania Convention Center (Philadelphia, USA)

松田 知己、蛍光タンパク質プローブによる生理機能イメージングと操作、日本生体エネルギー研究会第39回討論、2011年6月7日 ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

松田 知己、群青色蛍光タンパク質 Sirius の X線結晶構造解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月8日 ホテル神戸ポートアイランド(神戸市)

松田 知己、生体組織内の任意の細胞での Ca^{2+} イメージングを可能にする光活性化指示薬の開発、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月16日 札幌コンベンションセンター(札幌市)

T. Matsuda、Direct measurement of protein dynamics in single living cells using a photoconvertible fluorescent protein Phamret、2009. 11. 2、Jenelia farm/HHMI(Ashburn, USA)

[その他]

ホームページ等

http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bs/research_101205_1.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 知己 (MATSUDA, Tomoki)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50419206