



圧力応答蛍光蛋白質の高圧下構造解析

辻井美香¹、渡邊朋信²、西山雅祥³、本間道夫⁴、今田勝巳¹

¹大阪大学大学院理学研究科、²理研 QBIC、³京都大学白眉センター、⁴名古屋大学大学院理学研究科

1. 背景と研究目的

緑色蛍光タンパク質(GFP)およびその変異体は、細胞内の状態を調べるセンサーとして広く使われている。我々は GFP の変異体の 1 つである YFP に対して発色団近傍の β 鎖へアミノ酸を挿入した変異体が、圧力変化に応じて蛍光強度とスペクトルを大きく変化させる現象を見いだした。また、この変異体を用いて細胞内の圧力測定が可能であることを示した。しかし、この変異体が圧力応答性を示す理由は不明である。そこで、この YFP 挿入変異体の構造解析を高圧力下で行い、常圧での構造と比べることで蛍光の圧力応答の分子機構を明らかにすることを目的とした。

2. 実験内容

強い圧力応答性を示す Gly を 3 残基挿入した YFP-3G の結晶と結晶保持液をダイヤモンドアンビルセルに入れ、180 MPa および 340 MPa で X 線回折強度測定を行った。圧力は、セル内に結晶と共に入れたルビーの蛍光ピーク波長シフトから算出した。X 線回折強度データ収集はいちシンクロトロン BL2S1 にて行った。セルによる X 線の吸収を減らすため、波長 0.7498 Å で室温にて測定した。回折データはプログラム XDS を用いて処理し、プログラム Aimless を用いてスケーリングを行った。

3. 結果および考察

収集した回折強度データを処理し、180 MPa 条件下では 1.73 Å までで R_{merge} 9.6 %, completeness 99.7 %, 340 MPa 条件下では 2.1 Å までで R_{merge} 7.4 %, completeness 96.8 % の回折強度データを得た。それぞれの圧力における構造解析は、プログラム Phenix を用いて YFP-1G の低温常圧下での結晶構造 (PDB ID: 3W1C) を使用した分子置換法により行った。構造モデルの修正と精密化はプログラム Coot とプログラム REFMAC を用いて行った。現在の $R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ は、180 MPa 条件下の構造が 17.2 % / 22.3 %, 340 MPa 条件下の構造が 16.2 % / 24.4 % である。室温高圧下の構造を低温常圧下の YFP-3G の構造 (PDB ID: 3W1D) と比べると、室温高圧では disorder していた挿入領域の電子密度が高圧下では現れ、この部分のモデルを作成することができた。また、発色団のカルボニル酸素がフリップし、それに伴い Q94 と E223 の位置が変化していた。変化後の発色団付近の構造は、挿入変異のない YFP と同様の構造であった。このことから、圧力添加により YFP-3G の発色団周辺の構造は YFP に近い構造となり、そのために蛍光強度増強やスペクトルシフトが起きたものと考えられる。

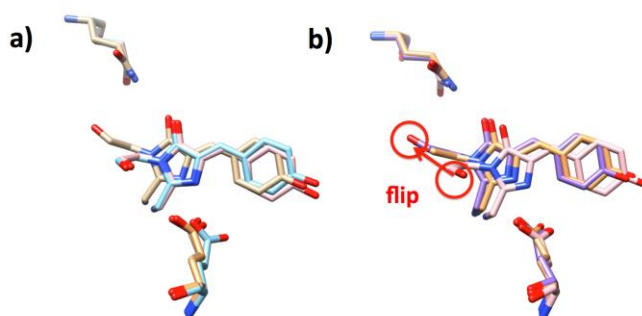


Fig.1 圧力による YFP-3G の発色団近傍の構造変化
a) 低温常圧における、YFP (黄色), YFP-1G (水色), YFP-3G (桃色)の構造。b) YFP-3G の圧力応答。低温常圧 (桃色)、180 MPa (橙色)、340 MPa (紫色)。