

GFPuv 変異体の分子動力学解析と蛍光活性の実験的評価		
黒田研究室	学籍番号 05251002	秋山 沙織

### 【緒言】

本研究室で以前、UV 励起最適化 緑色蛍光タンパク質 (GFPuv) の分割断片をトランスプロテインスプライシング反応によって連結し、蛍光活性を持つ GFPuv を再構築する研究が行われた。その研究によって残基の置換又は挿入が GFPuv の蛍光強度を変化させることが明らかになった。本研究では、これらの残基置換や挿入により GFPuv 分子に表れる変化を調査することを目的とする。分子動力学法によってダイナミクスの変化を分析し、実験的手法によって蛍光活性および構造の変化を検証する。

### 【対象】

コントロールである GFPuv に対して、1 残基置換、2 残基置換、5 残基挿入を行った 3 配列について調査を行った。なお、本研究でコントロールとした GFPuv は、野生型 GFP に対して 5 残基 (S65T/F99S/M153T/V163A/Q80R) の置換がある。

Control	…144Y	145N	146Y	147N	…
1 residue replaced	…144Y	145C	146Y	147N	…
2 residues replaced	…144Y	145C	146F	147N	…
5 residues inserted	…144Y	145N	146Y	147N	…
			EYCFN		

β バレルの中心に存在する発色団を緑色で示す。

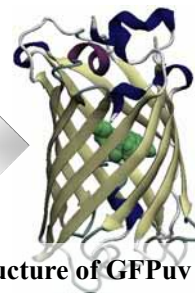


Fig. 1 structure of GFPuv

### 【方法】

分子動力学計算には Amber 8.0 を利用し、分子の結合角や結合長を定める力場は Amber ff03 を採用した。GFPuv の X線結晶構造 (PDB ID 2awk) を基に、系準備用プログラムにより残基の置換と挿入を行い、電荷を中和してから、厚さ 15 Å の箱型 TIP3P 水分子モデルに埋め込んだ。分子動力学計算用プログラムにより構造最適化を行い、系を昇温して、定温定圧条件で 10 ナノ秒間分子動力学計算を行った。計算の効率化のために周期境界条件を適用し、分子間相互作用のカットオフ、PME 法、SHAKE 法を用いた。

続いて、pET-21c で形質転換した E.Coli JM109 (DE3) pLysS により全ての GFPuv 変異体を発現し、His-Tag を利用して精製した。蛍光活性と円二色性はリン酸緩衝液 (pH7.0) 中で測定をした。

### 【結果】

計算過程のモデルについて二次構造を調べると、5 残基挿入モデルは β シートを形成する残基が減少した。また X 線結晶構造と計算モデルを比較すると、コントロールモデルの発色団は結晶構造の発色団に対して平均 0.21 Å の構造のずれがあったのに対し、5 残基挿入モデルはその倍以上の平均 0.46 Å のずれがあった。

続いて、計算過程にタンパク質モデルの内部に入出入りした水分子の個数を調べると、GFPuv に導入した変異によって大きく異なっており (Table 2)、1 残基置換モデルと 5 残基挿入モデルはコントロールに対して増加したが、2 残基置換モデルでは減少した。

蛍光測定結果と Tm を (Table 1) に示す。1 残基体と 2 残基置換体の蛍光強度および CD スペクトルは、コントロールに対して大きな変化は無かった。5 残基挿入体は蛍光活性を失っており、CD スペクトルが著しく変化した。また熱変性曲線から、5 残基挿入体は二状態変性をとらないことが判明した。

Table.2 Water penetration into GFP interior

	Model	i	ii
i :初期は分子内にあり、計算過程で分子外へ漏出した水分子数	Control	0	3
	1res. replaced	2	9
ii :初期は分子外にあり、計算過程で分子内へ侵入した水分子数	2res. replaced	0	0
	5res. inserted	6	16

Table.1 Fluorescence Intensity and Tm

Sample	Control	1 res. rp	2 res. rp	5res. in
蛍光強度	110±12	130±7	119±8	—
Tm (°C)	82.8	81.8	85.6	—

### 【考察】

5 残基の挿入によるシート構造の崩壊と発色団原子の構造変化により、蛍光が失活したと推測できる。計算結果と実験結果に相関があることが確認され、今後 GFP の分割再生を利用した各種モニターを開発する際においても計算によるスクリーニングが有用であることが示された。また、球状タンパク質における分子内水分子と分子外部水分子の交換は NMR によって実験的に観察されているが、タンパク質を透過するこれらの水分子がタンパク質の熱安定性やダイナミクスに影響を与える可能性があり、今後より詳しい調査が求められる。