

Spring-8 BL-26B1/2011G248 &amp; Photon Factory BL-5A/2011A1917

## 単量体 Azami Green の安定緑色蛍光の構造基盤解明のための X線結晶構造解析

### Structure of mAG, a monomeric mutant of the green fluorescent protein Azami-Green, reveals the structural basis of its stable green emission

永田宏次\*, 海老沢樹, 田之倉優

東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

#### 1 はじめに

mMC (monomeric Midoriishi Cyan) はミドリイシサンゴの一種 (*Acropora* sp.) から単離されたシアン色の蛍光タンパク質である Midoriishi Cyan を単量体化したものであり、Midoriishi Cyan と同様にシアン色の蛍光をもつ。mMC は代表的なシアン色蛍光タンパク質である amFP486 と 62% のアミノ酸配列相同性を持つが、両者の蛍光特性には違いがあり、mMC (励起ピーク: 469 nm, 蛍光ピーク: 496 nm) は amFP486 (励起ピーク: 453 nm, 蛍光ピーク: 486 nm) よりもやや長波長側に励起・蛍光ピークがある。このため、mMC は一般的な緑色蛍光タンパク質と amFP486 の中間の蛍光特性を持つ。本研究では、mMC の X 線結晶構造解析を行い、mMC と amFP486 の発色団付近の構造を比較することで、両者の蛍光特性の差を生じさせる構造的要因を解明することを目的としている。

#### 2 実験

大腸菌を宿主として mMC を大量発現、精製し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。得られた mMC の結晶について、前期は SPring-8 BL-26B1 にて、結晶の質の評価を中心に回折実験を行い、後期は前期の結果を参考にして Photon Factory BL-5A で回折データを収集した。取得した回折データを用いて、分子置換法により mMC の 2.2 Å 分解能結晶構造を決定した。mMC と amFP486 の立体構造比較から、両者の蛍光特性の違いを生じさせるアミノ酸残基を推定した。また、mMC の点変異体発現系を作製した。現在、これらの点変異体の蛍光特性解析を進めており、今後、結晶構造解析を行う予定である。

#### 3 結果および考察

大腸菌を宿主として mMC を大量発現し、精製、結晶化した。SPring-8 BL-26B1 および Photon Factory BL-5A での X 線回折データを用いた結晶構造解析により 2.2 Å 分解能の mMC の立体構造を決定した。mMC 結晶は、空間群  $P6_5$ 、格子定数  $a = b = 124.5$  Å,

$c = 161.3$  Å で、非対称単位中に 4 分子の mMC が存在していた (図 1)。 $R_{\text{work}} = 19.4\%$ ,  $R_{\text{free}} = 23.9\%$  まで構造精密化した。

mMC は他の蛍光タンパク質と同様の  $\beta$  バレル構造を有していた (図 1)。色素団は、 $\beta$  バレルの内側に存在し、Gln-Tyr-Gly の 3 アミノ酸残基の翻訳後修飾により形成されることが示された。色素団と周囲のアミノ酸残基の観察から、mMC と amFP486 の蛍光特性の違いを生じさせる構造的要因として、両分子の色素団に共通の Tyr 側鎖と相互作用している異なるアミノ酸残基 [mMC の Gln166 (親水性で長い側鎖) と amFP486 の Ala165 (疎水性で短い側鎖)] が候補に挙げられた。現在、変異体解析により、この位置のアミノ酸残基側鎖が mMC の蛍光特性に与える影響について検証を進めている。

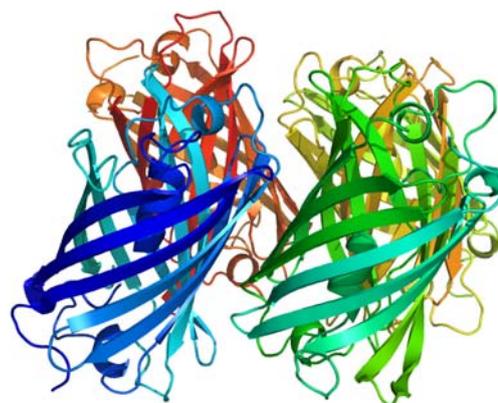


図 1 : mMC の結晶構造

#### 4 まとめ

mMC の 2.2 Å 分解能結晶構造を決定し、mMC と amFP486 との蛍光特性が異なる原因を特定中である。

#### 謝辞

SPring-8 BL26B1 および Photon Factory BL-5A のスタッフの皆様にご心より感謝申し上げます。

\* aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp