

活性酸素高拡散型蛍光蛋白質 KillerRed の結晶構造解析

坂井直樹¹, 北郷悠¹, 竹本研², 松田知己², 綾部時芳¹, 永井建治²

1 北大院・先端生命, 2 北大・電子研

GFP に代表される蛍光蛋白質は生細胞内における蛋白質局在を知るためのマーカーや, 特定の分子間の相互作用を検出する FRET のツールとして現代の細胞生物学で広く利用されている. 蛍光蛋白質の持つ発色団は光増感作用を持ち, 光照射依存的に蛍光を発するが, 励起状態の発色団と細胞中の酸素原子が項間交差を起こすことにより一重項酸素いわゆる活性酸素を産生する. 一重項酸素は蛍光蛋白質自身を破壊し, 退色を引き起こし, 一部は分子外に拡散し近傍の分子を破壊する. この活性酸素による分子破壊を逆手にとり, 光照射依存的に蛍光分子近傍の微少領域内の分子を任意の時間に破壊する技術が CALI (Chromophore-assisted light inactivation) 法である. 従来 CALI には低分子蛍光化合物が用いられてきたが, ある種のクラゲより得た色素蛋白質の遺伝子を改変することにより, 通常の水銀光源を用いた光励起により強い光毒性を発揮する蛍光蛋白質 KillerRed が作成された[1]. この蛍光蛋白質の利用により遺伝情報に CALI を誘導する蛋白質を組み込むことが可能となり, 細胞イメージングのツールとして利用され始めた. KillerRed の顕著な光毒性は蛍光蛋白質に特徴的な β バレル構造の内部に位置する発色団付近で発生した活性酸素がバレル内に停滞することなく, 比較的速やかにバレル外へ拡散することにより生ずると考えられる. 本研究では KillerRed の顕著な光毒性の分子基盤を明らかにする目的で KillerRed の X 線結晶構造解析を行った.

KillerRed の結晶構造は分解能 2.9\AA で解析された ($R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ 0.245 / 0.298). β バレルの中央部には QYG のアミノ酸が環状化して形成される発色団の電子密度が明瞭に認められた. KillerRed とオワンクラゲ由来 GFP との構造比較においては $C\alpha$ の RMSD が 1.27\AA と類似した構造を取ることが明らかになった. KillerRed では β バレルの中央部に位置する発色団からバレルの片側開口部に向けてキャビティが形成されていた. このキャビティはこれまでに報告されている蛍光蛋白質では見られないものであり, 光励起によって発色団より産生する活性酸素がキャビティを通過して速やかにバレルの外側へ拡散することが可能な分子構造を有することが示された.