L1113-01	熱安定化／不安定化 緑色蛍光タンパク質変異体の 実験及び理論的解析					
	氏名	秋山 沙織	主査	黒田 裕	副査	養王田、吉野、中村(史)、斎藤

《緒言》

緑色蛍光タンパク質（GFP）はレポータとして優れた特徴を多く備えており、生物学・医学分野の研究において一般的に広く用いられている。この GFP の蛍光活性や熱安定性を向上させることで、GFP 変異体の応用範囲を広げ、生物・医学研究の発展に役立てることが出来る。

本研究は、GFP 変異体の蛍光活性および熱安定性を決定する構造的な要因を特定することを目的とした。変異体モデルとして当研究室で以前作製されたトランススプライシング反応効率向上型配列を用い、実験的手法と計算的手法（計算コストの低いカノニカル分子動力学法）を組み合わせて、この目的にアプローチした。

《対象》

オワンクラゲ由来野生型GFPに対し6残基変異のある EGFP を本研究のコントロールとし、このコントロール配列に対して以下に示す残基置換または残基挿入が分子表面のループ領域に導入された配列を用いた。

EGFP	… 143Y	144N	145Y	146N …	
1残基置換	… 143Y	144C	145Y	146N …	
2残基置換	… 143Y	144C	145F	146N …	
5残基挿入	… 143Y	144N	145Y	146N’ …	
			EYCFN		

《手法》

まず大腸菌により発現された GFP 変異体4配列に対して蛍光活性測定、円偏光二色性測定を行い、活性と安定性を決定した。分子動力学（MD）計算には AMBER8.0 を用い、陰性発色団のパラメータは Reuter N, *et al* (2002)より抜粋し、計算の効率化のため周期境界条件・PME・カットオフ・SHAKE を適用した。また、より適正な構造のサンプリングを行うため、初期速度をランダムに変えた 20 ns のシミュレーションを 3 回ずつ行い、計 60 ns 分の構造中から主成分分析により 1,000 スナップショットを選出し二次構造含量や水素結合状況などを解析した。

《結果と考察》

実験結果を表に示す。2残基置換が EGFP および1残基置換と比較して熱安定化したことが判明した（表2）。一方、5残基挿入では著しい蛍光強度の低下（表1）および熱不安定化（表2）が観測された。

分子動力学解析からは、置換した残基の側鎖を中心に局所的な構造変化が見られ、これに伴って水素結合パターンが変化したことが分かった。このような局所的構造変化は2残基置換における熱安定化にも関連があると推測される。また、5残基挿入モデルにおいては、他の全てのモデルにおいて観測された、発色団原子と近傍残基との間の水素結合の弱化または消失が確認され（図1）、これが著しい蛍光活性低下の要因であると考えられる。

本研究において、カノニカル MD ではやはり初期構造依存性が見られること、局所的な構造変化は追えるが分子全体の特徴を予測することは困難であること、などの問題点が確認された。しかしカノニカル MD 解析法と実験手法を組み合わせることで、GFP 変異体の性質に寄与すると推測される要因を特定することは、ある程度可能であることが示唆された。

表１〔実験結果〕変異体の蛍光活性

	Fluorescence activity (Excitation : 493 nm) Max intensity / Wavelength
EGFP	1343±30 / 511.1
1残基置換	1245±42 / 511.7
2残基置換	1239±20 / 511.2
5残基挿入	186± 1 / 512.2

表２〔実験結果〕変異体の熱安定性

	Thermal stability (°C)	
	T_m at pH 7.0	T_m at pH 4.6
EGFP	82.4	61.9
1残基置換	81.7	61.9
2残基置換	85.1	66.4
5残基挿入	72.6	55.9

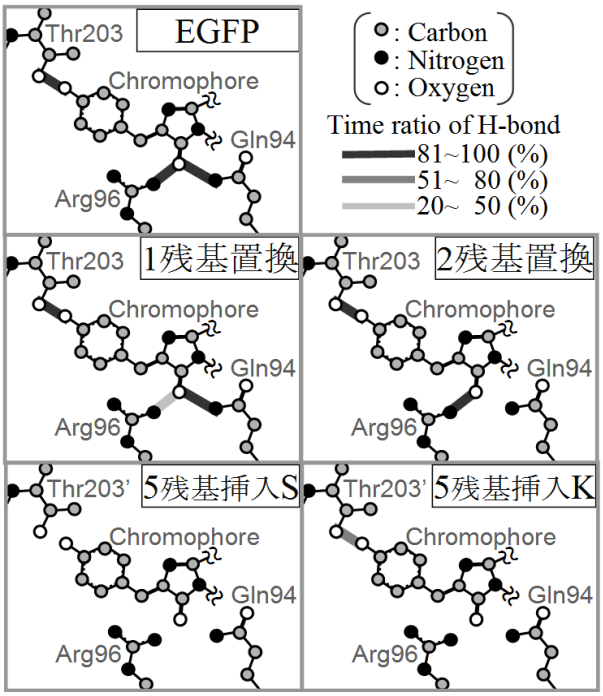

図１〔シミュレーション結果〕変異体モデルにおける発色団と近傍残基間の水素結合