

## 時間分解分光法による緑色蛍光タンパク質 eGFP Y145 変異体の 蛍光寿命の決定と黄色蛍光タンパク質 eYFP との比較

(東邦大<sup>1</sup>・理研<sup>2</sup>) ○木ノ下佑奈<sup>1</sup>・重野守<sup>1</sup>・間紗希子<sup>1</sup>・内田朗<sup>1</sup>・宮武秀行<sup>2</sup>・細井晴子<sup>1</sup>

Determination of fluorescence lifetime of enhanced fluorescent protein eGFP Y145 mutants and comparison with enhanced yellow fluorescent protein eYFP

(<sup>1</sup>Toho Univ., <sup>2</sup>RIKEN) ○Yuna Kinoshita,<sup>1</sup> Mamoru Shigeno,<sup>1</sup> Sakiko Hazama,<sup>1</sup> Akira Uchida,<sup>1</sup> Hideyuki Miyatake<sup>2</sup>, Haruko Hosoi<sup>1</sup>

The goal of our study is to answer the fundamental question of why fluorescent proteins (FPs) are fluorescent. The elucidation of the fluorescence mechanism of fluorescent proteins leads to proper imaging data analysis and useful FP development. So far, we have found that the fluorescence lifetime of the Y145 mutants of enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) become shorter when the volume of the 145th amino acid side chain is smaller. In this study, the Y145 mutants of enhanced green fluorescent protein (eGFP), which differs in five of the 239 amino acids of eYFP, were examined. It is revealed that the effect of the Y145 mutation on the fluorescence lifetime differs between eGFP and eYFP.

**Keywords :** *Fluorescent protein; Fluorescence lifetime; Picosecond time-resolved fluorescence spectroscopy; Fluorescence mechanism*

我々は、イメージングデータの適切な解釈や有用な蛍光タンパク質 (FP) の開発に不可欠な、全ての FP に共通する発光メカニズムの解明を目指している。これまでに黄色蛍光タンパク質 eYFP Y145 変異体において、145 番アミノ酸側鎖体積が小さい変異体では、蛍光寿命が大きく減少することを見いだした<sup>1)</sup>。FP の普遍的な性質を明らかにするための足掛かりとして、eYFP の 239 個のアミノ酸のうち僅か 5 個のみが異なる緑色蛍光タンパク質 eGFP について検討し、eGFP と eYFP における 145 番アミノ酸の蛍光寿命への影響を比較することが、本研究の目的である。そこで、eGFP 野生型とその Y145 変異体 19 種類のタンパク質作製とストリークカメラを用いた蛍光寿命の決定を行った。

図に eGFP と eYFP の Y145 変異体の蛍光寿命と 145 番アミノ酸側鎖体積の関係を示す。Y145W 変異体の蛍光寿命は eGFP、eYFP とともに例外的に短いため、以後は除いて議論する。eYFP Y145 変異体の蛍光寿命は、3.3 ns から 0.59 ns と大きく変化した。一方、eGFP Y145 変異体の蛍光寿命の変化は小さく、3.0 ns から 1.5 ns であった。これは、eGFP と eYFP では、蛍光寿命に対する Y145 変異の影響の大きさが異なることを示す結果である。また、eGFP では eYFP のように明確な蛍光寿命の体積依存性は見られなかった。この理由を解明するため、結晶構造解析により eYFP 野生型の立体構造を決定し、既報の eGFP 野生型の立体構造 (2y0g) と比較した。異なる 5 つのアミノ酸によって生じる立体構造の違いが、eGFP と eYFP の Y145 変異による蛍光寿命の変化の違いをもたらしている可能性が示唆される。

1) H. Hosoi, et al., *Chem. Phys. Lett.*, 618, 186-191 (2015).

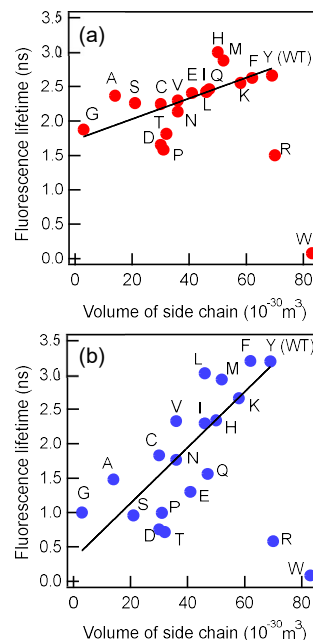


図 (a) eGFP と (b) eYFP の Y145 変異体の蛍光寿命と 145 番アミノ酸側鎖体積の関係。直線は Y145R と Y145W を除いた近似直線。