

蛍光タンパク質 eGFP の“隠れた”電子励起状態： マルチプレックス二光子吸収およびフェムト秒時間分解蛍光法による追跡

(理研) ○細井 晴子・山口 祥一・水野 秀昭・宮脇 敦史・田原 太平

【序】蛍光タンパク質(GFP)は遺伝子導入によって細胞や組織を自由に蛍光ラベルすることができる、生体のイメージングに不可欠なタンパク質である。さまざまな波長の蛍光を発する変異体が開発され利用されているが、その分子科学的研究は最初に発見されたオワンクラゲ GFP にほぼ限られている。現に、蛍光タンパク質変異体で標識した細胞を二光子励起顕微鏡により観察する二光子イメージングが近年盛んだが、その基礎となる蛍光タンパク質の二光子励起発光過程は明らかになっていない。本研究では蛍光タンパク質の二光子励起発光の発光メカニズムを理解するため、その二光子吸収スペクトルを初めて広い波長範囲で精度よく測定した。得られた一光子吸収と二光子吸収スペクトルの比較から、最も広く用いられている蛍光タンパク質 eGFP について、“隠れた”電子励起状態の存在を示唆する結果が得られた。さらに詳細を明らかにするために、一光子励起と二光子励起のフェムト秒時間分解蛍光測定、および、量子化学計算を行ったので報告する。

【実験】二光子吸収スペクトルはマルチプレックス二光子吸収法^{1,2}により測定した。 ω_1 に近赤外領域(1300nm および 1820nm)、 ω_2 に白色光(400-800nm)を用い、CCD によるマルチチャンネル検出を行った。一光子(450nm)および二光子励起(900nm)の時間分解蛍光測定はアップコンバージョン法により行った。試料にはオワンクラゲ GFP(wtGFP)とその変異体である Sapphire(sap)と Enhanced GFP(eGFP)の pH7.5 リン酸緩衝水溶液(タンパク質濃度 10mM)を用いた。量子化学計算は Molpro プログラムにより行った(基底関数 cc-pVDZ)。

【結果と考察】本研究で対象とした3種類の典型的な蛍光タンパク質、wtGFP、sap、および eGFP の発色団は図1に示すような共通の構造をもつ。これらの発色団にはフェノール性水酸基があり、その酸解離平衡によりニュートラルとアニオンの二種類の発色団が共存する。図1から明らかなように、この発色団には対称

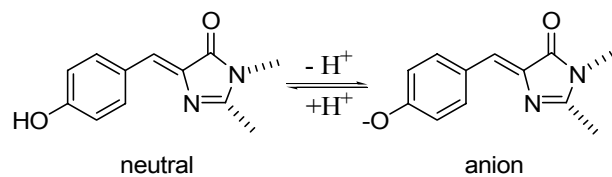


図1 wtGFP、sap、および eGFP の発色団の構造

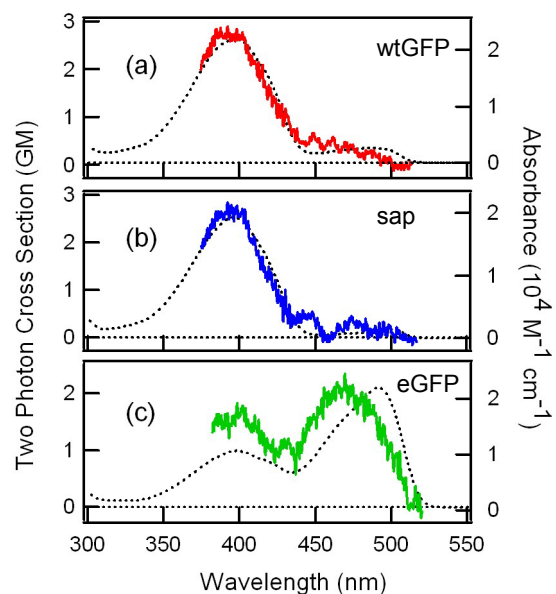


図2 一光子(点線)および二光子(実線)吸収スペクトル。(a) wtGFP、(b) sap、(c) eGFP。

心がない。対称心のない分子では、群論的にすべての励起状態への遷移が一光子、二光子励起ともに許容となるため、直感的には一光子吸収と二光子吸収スペクトルはよく似たものになると予測される。

図 2 に wtGFP、sap、および eGFP の一光子吸収と二光子吸収スペクトルをしめす。それぞれの一光子吸収スペクトルにおいて、400nm にニュートラル由来、490nm にアニオン由来の吸収が観測された。二光子吸収スペクトルにおいても同様に二つのピークが観測され、今回測定した 3 種類の蛍光タンパク質すべてについて、ニュートラルの二光子吸収は一光子吸収と同じ 400nm に現れた。この結果は予想されたように、ニュートラルでは一光子励起でも二光子励起でも同じ励起状態に励起されるということを示している。一方、eGFP のアニオンの吸収は 470nm に観測され、一光子吸収よりも約 20nm 短波長シフトしているように見える(図 2c)。この結果は、発色団のアニオンには通常観測される 490nm の励起状態(S_1)の他に、470nm に別の励起状態(S_2)が存在することを示唆している。

次に時間分解蛍光測定を行ったところ、一光子励起と二光子励起では蛍光ダイナミクスが異なることが分かった。この違いは、一光子励起と二光子励起で最初に(主として)生成する励起状態が異なることと相関があると考えられる。

そこで S_0 (基底状態)– S_1 、および S_0 – S_2 遷移に関する情報を得るために、eGFP 発色団のアニオンについて量子化学計算を行った。CASSCF(6,7)計算から、 S_0 と S_1 状態は主に 1 種類の電子配置で書き表すことができるのに対して、 S_2 状態では 3 種類の電子励起配置が重要になることが分かった。すなわち、 S_0 – S_1 遷移が主に(HOMO)→(LUMO)の性質を持つのに対して、 S_0 – S_2 遷移には(HOMO,HOMO)→(LUMO,LUMO)、(HOMO-1)→(LUMO)、(HOMO)→(LUMO+1)電子配置が寄与する。興味深いことに、最も寄与の大きい(HOMO,HOMO)→(LUMO,LUMO)配置は二電子励起配置であり、分子の対称性によらず一光子禁制二光子許容である。

以上の結果から、観測された eGFP の一光子および二光子吸収スペクトルの違いは以下のように考えられる。eGFP 発色団のアニオンは対称心を持たないが、 S_2 状態が一光子禁制二光子許容の二電子励起配置の性質を多く含んでいる。その結果、一光子吸収スペクトルでは S_0 – S_2 遷移確率が(禁制ではないが)小さくなるため、 S_0 – S_1 遷移が主に観測される。一方、二光子吸収スペクトルでは、 S_0 – S_2 遷移が相対的に大きく、また S_0 – S_1 と S_0 – S_2 遷移エネルギーが非常に近いことから、それぞれの遷移が分離されずに重なって現れ、ピークのシフトのように観測されたと考えられる。

(1) Yamaguchi, S.; Tahara, T. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, 376, 237-243.

(2) Yamaguchi, S.; Tahara, T. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 390, 136-139.