

GFP スペクトルのレッドシフトに関する理論的研究

(横浜市大院国際総合科学*, JST-CREST†) ○小関 準*, 立川 仁典*,†

【序】

緑色蛍光タンパク質(GFP)は、生物マーカーとして利用され、生物学、薬学などの分野において、非常に強力なツールである[1]。GFPには、異なる吸収波長と発光波長を持つ様々な変異体が存在する。その波長変化は蛍光タンパク質自身が持つ Chromophore(CRO)構造に依存することが知られている[2]。

一方、光を吸収することで GFP から赤色蛍光タンパク質(RFP)へ変化する蛍光タンパク質が、Elowitz ら[3]や Ando ら[4]によって報告されている。Elowitz らは、酸素欠乏状態で GFP に 488 nm の短いパルスレーザーを照射し続けると、不可逆的に吸収波長および発光波長がレッドシフトすることを観測した。また Ando らは紫外光照射で不可逆的に蛍光が変化する性質を持ったタンパク質(KAEDE)を発見した。

しかしながら、これらの蛍光タンパク質は共に光吸収で波長がレッドシフトする性質をもっているが、その条件は全く異なっている。Elowitz らの反応は酸素欠乏状態で GFP がもつ励起波長で光異性化を引き起こすが、Ando らの反応は紫外光照射という条件のみで光異性化を引き起こすという点である。このような異なる条件でスペクトルがレッドシフトするメカニズムは未だに解明できていない。そこで我々は、このメカニズムを解明することを目的として、分子軌道計算を実行した。

【計算方法】

Figure 1 に今回計算したモデルを示す。構造(a)は GFP-CRO に Arg96 を付加したモデルであり、赤色化前の GFP を示している。一方、赤色化後の構造は未だ十分には分かっていないため、構造(b)のモデルをたてた。GFP の赤色化は、Arg96 と GFP-CRO との間で Schiff 塩基を形成することで生じると考えたためである。このモデル構造の妥当性を示すためにそれぞれの吸収エネルギーを計算した。構造(a)と(b)は、それぞれ MP2/6-31G*レベル

で最適化を行い、その後 CIS(D)/6-31G*レベルで吸収エネルギーを計算し解析した。また赤色化前後での構造変化、即ち(a)から(b)への反応経路を、基底状態と励起状態に対して調べた。

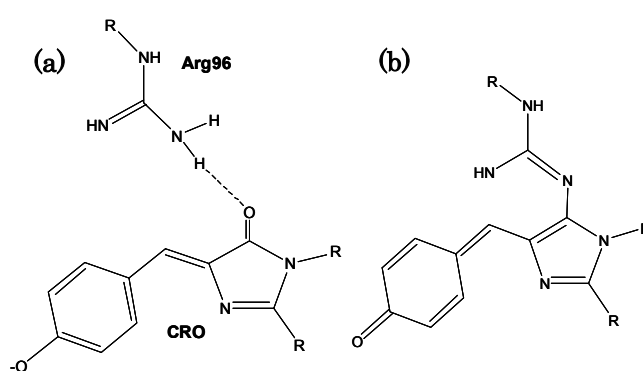


Figure 1 : Computational models ; (a) The structure of GFP chromophore and Arg96, (b) the Schiff-base structure.

【結果と考察】

Table 1 に CIS(D)/6-31G*レベルで算出した構造の吸収エネルギーと実験値を示す。計算により算出された GFP の anion 状態での吸収エネルギーは、実験値と 0.26 eV の差で再現している。赤色化後のモデルとして立てた構造(b)は 2.66 eV となり実験値の 2.36 eV と、その差 0.30eV で良い一致を示している。構造(b)では Schiff 塩基の形成によって π -共役が伸張するために、HOMO と LUMO の軌道エネルギーの差が縮まるので、吸収エネルギーのレッドシフト量(0.21 eV)が生じると考えられる。Figure 2 には構造(b)での HOMO と LUMO を示した。これらの結果より、構造(b)に示した Schiff 塩基モデルと GFP の anion 状態との吸収エネルギー差 0.21 eV は、実験によるエネルギー差 0.25 eV と非常に良く一致している。以上より、今回示した Schiff 塩基モデル構造(b)は、赤色化問題を取り扱うのに妥当であると考えられる。赤色化反応経路解析の結果及び研究の詳細については、当日ポスターにて発表する。

Table 1 : Theoretical and experimental absorption energies. (Units in eV).

	Structure (a)	Structure (b)	Energy difference
Model System	2.87	2.66	0.21
Experimental value ^[3]	2.61	2.36 [†]	0.25

[†] absorption spectra of GFP exposed by brief pulses in the absence of oxygen

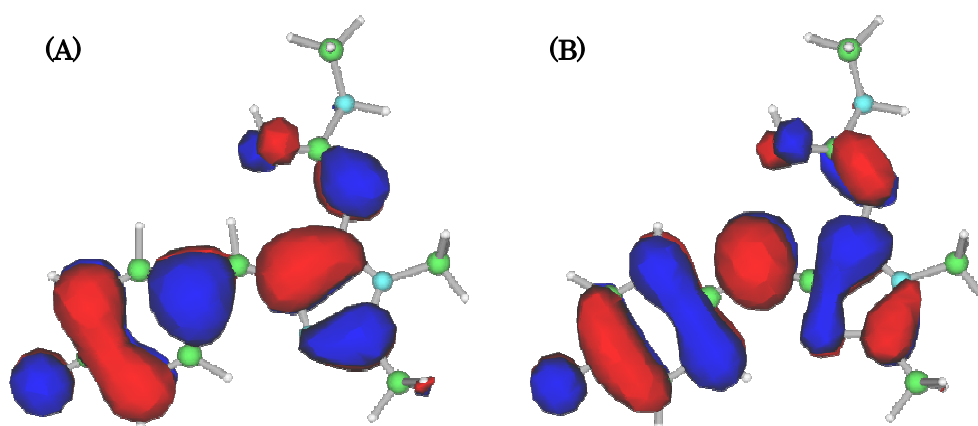


Figure 2 : Molecular orbital of schiff-base model structure (b) ; (A) HOMO, (B) LUMO

[1] M. Zimmer *Chem. Rev.* **102**, 759 (2002)

[2] R. Y. Tsien *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509 (1998)

[3] M. B. Elowitz, M. G. Surette, P.-E. Wolf, and J. Stock, S. Leibler, *Curr. Bilo.* **7**, 809 (1997)

[4] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, and A. Miyawaki *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 12651 (2002)