

1B11

全反射赤外分光法によるセンサリーロドプシン I のイオン結合部位の構造研究
(名工大院工¹, 名大院理²) ○井上圭一¹, Louisa Reissig², 須藤雄気², 本間道夫², 神取秀樹¹

【序】細菌や古細菌に代表される微生物は細胞膜中に存在する光受容タンパク質であるロドプシンを使って、光のエネルギーを吸収し、プロトンポンプや信号伝達など多様な生理機能に役立っている。その中で Sensory rhodopsin I (SRI) は緑色光もしくは黄色光に吸収を持つ微生物型ロドプシンであり、細胞が可視光に向かって遊泳する正の走光性のためのセンサーである。SRI は初め *Halobacterium salinarum* の細胞膜中で発見された (*HsSRI*) が、界面活性剤による可溶化や低塩濃度に対する不安定さから詳細な研究が行われず、現在のところ SRI の信号伝達メカニズムはほとんど明らかにされていない。

しかし 2008 年真正細菌 *Salinibacter ruber* より新たな SRI (*SrSRI*) が単離精製され、*HsSRI* には無い可溶化状態や低塩濃度環境下における安定性を持ち、SRI の信号伝達メカニズムを調べるための理想的なタンパク質として注目されている。そしてその結果 *SrSRI* はタンパク質内部に塩化物 (Cl^-) イオンを結合することが明らかとなった (図 1)。これまで我々は過渡吸収法や過渡回折格子法を用いて *SrSRI* の光反応ダイナミクスの研究を行ってきた。そして Cl^- イオンの結合が *SrSRI* の反応速度やエンタルピーに大きな影響を与えることを明らかにしてきた。しかしその一方で *SrSRI* がどのように Cl^- イオンを結合するのか、また結合サイトが構造がどうなっているのか明らかにされておらず、 Cl^- イオンが *SrSRI* の光反応にこのような影響を及ぼす理由は未だもって不明なままである。そこで本研究では全反射赤外分光法 (ATR-FTIR) を用いてイオン結合に伴う吸収変化を測定し、結晶構造の無い *SrSRI* の Cl^- 結合サイトの構造を分子レベルで明らかにすることを目指した。

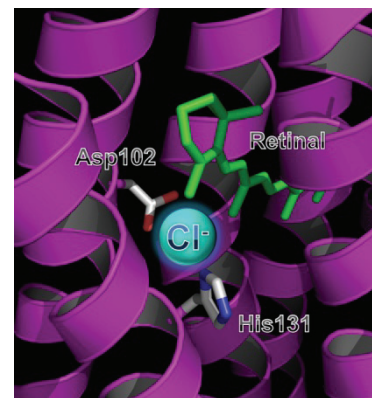


図 1. *SrSRI* のクロライドイオン結合サイトのモデル構造

【実験】 ATR-FTIR 測定は Bio-Rad 社製の FTS-6000 を用いて行った。試料である *SrSRI* は大腸菌を用いて発現し、phosphatidylglycerol (PG) に 1:50 のモル比で再構成した。測定には得られたタンパク質約 0.05 mg を図 2 で示したダイヤモンド基板上に加え、自然乾燥して基板に固定した。その後 O-ring を挟んで冷却水を流し、温度を 20°C に保ちながら、タンパク質の置かれたセル内を目的の溶媒で満たした。そして外部の切替えシステムを用いて 2 種類の溶媒を交互に流しながら、それぞれの溶媒中における試料の赤外吸収スペクトルを測定し、その差スペクトルを求めることで、溶媒交換に伴う *SrSRI* の赤外吸収スペクトル変化を求めた。各溶媒を 20-30 分流すのを 1 サイクルとして、10 サイクル程度測定を行い、得られたスペクトルを平均化したものを最終的なスペクトルとした。溶媒の pH は 5 mM Tris バッファーを用いて pH = 7.0 とし、以下に示す濃度の塩を加えて実験を行った。

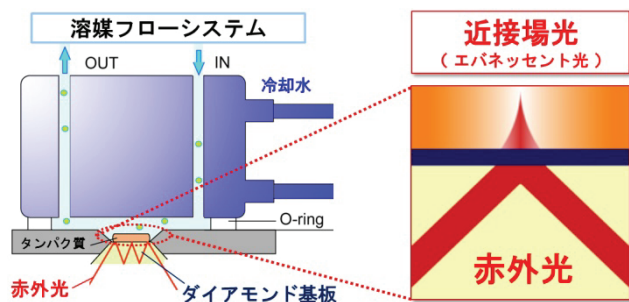


図 2. 全反射赤外分光法 (ATR-FTIR)

【結果と考察】図3に400 mM NaClと400 mM NaIの間で溶媒を交換した際に得られたATR-FTIRスペクトルを示す。この濃度ではSrSRIはほとんどCl⁻イオンに結合せず、ヨウ素イオン(I⁻)のみに結合するため、正のピークはイオン非結合型を、負のピークはイオン結合型に対応するスペクトルとなる。生データ(図3(a))にはタンパク質自身の構造変化に加え、様々なものに起因する吸収変化が現れているため、それらを補正する必要があることが明らかになった。その補正の手順は以下のようになる。まず2800-3000 cm⁻¹において正の400 mM NaCl側にPGのC-H伸縮振動と思われるピークがみられる。これは脂質膜の膨潤によるPGの吸収が現れたものと考えられる。これを補正したものが図3(c)であり、ここからさらに

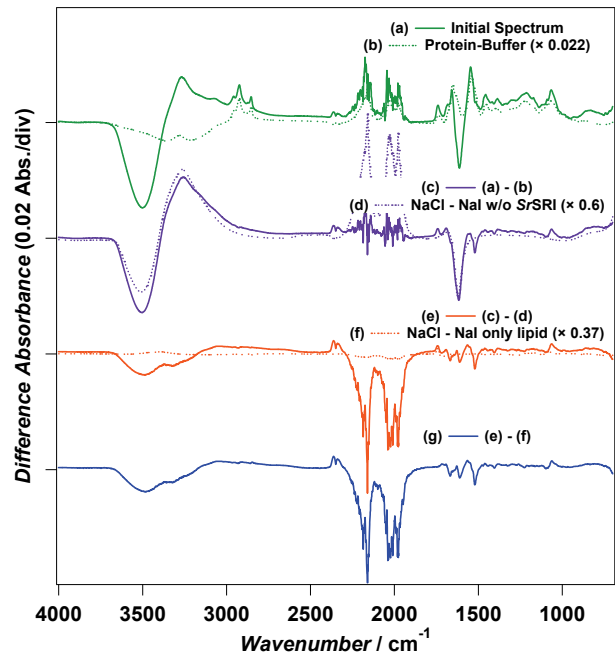


図3. SrSRIのATR-FTIRスペクトル
(正: 400 mM NaCl, 負: 400 mM NaI)

溶媒のみで得られた差スペクトルを補正したものが図3(e)となる。今回の場合、タンパク質だけでなくPGの吸収変化も1740 cm⁻¹に確認されたため、それを差し引くことで最終的に得られた図3(g)のスペクトルをSrSRIの吸収変化とした。このスペクトルの900-1800 cm⁻¹の領域を拡大し、それぞれのピークの波数を記したものを図4に示す。これを見るとイオンの結合・解離に伴って様々なバンドが変化していることが分かる。まず1716 cm⁻¹にはプロトン化カルボン酸のC=O伸縮振動と思われるピークが見られる。次に1667 cm⁻¹、1628 cm⁻¹、1611 cm⁻¹には主鎖C=Oのバンド(Amide-Iバンド)が見られ、タンパク質骨格の大きな構造変化があることを示唆している。また1564 cm⁻¹および1521 cm⁻¹のバンドはAmide-IIもしくはレチナールのC=C伸縮に由来すると考えられる。そして最も特徴的なものとして1062 cm⁻¹に強い正のピークが観測された。この振動数はヒスチジン残基の振動が観察される領域にあり、恐らく結合サイトを構成するHis131のイオン結合に伴う構造変化に起因すると考えられる(図1)。今回のATR-FTIR測定より、イオン結合・解離に伴うSrSRIの構造変化を反映した赤外吸収スペクトル変化を測定することに成功した。講演では変異体や同位体ラベル体を用いた結果についても紹介し、SrSRIのイオン結合についてより詳しい議論を行う。

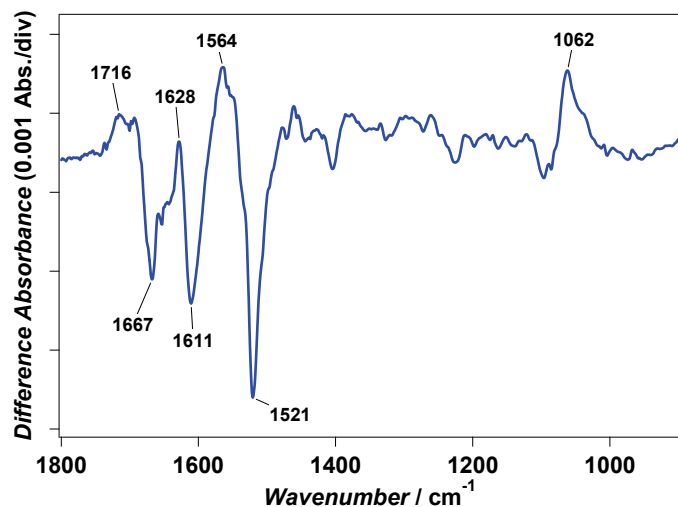


図4. 補正後のSrSRIのATR-FTIRスペクトル
(正: 400 mM NaCl, 負: 400 mM NaI)

【参考文献】

- (1) Kitajima-Ihara et al. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, pp. 23533-23541.
- (2) Inoue et al. (2011) *J. Phys. Chem. B.*, 112, pp. 2542-2547.

水溶液中のタンパク質の高感度時間分解赤外分光測定

(¹兵庫県立大・院・生命理, ピコバイオロジー研究所, ²兵庫県立大・院・生命理, 生命科学専攻) ○久保稔¹, 山口悟², 望月正雄¹, 伊藤-新澤 恭子², 吉川信也^{1,2}, 小倉尚志^{1,2}, 中島聡¹

【序】 赤外分光法は、官能基の分子振動を通して、プロトン移動や水素結合ネットワークの変化を検出できる実験手段であり、タンパク質の反応機構を理解する上で、X 線結晶構造解析と相補的な役割を担う重要な構造解析手法である。しかし、水溶液中のタンパク質への適用はまだ限られているのが現状である。その最大の理由は、水の赤外吸収が非常に強いために、生理条件下でのスペクトル測定が極めて難しいからである。したがって、タンパク質の赤外分光においては、従来の測定法で可能な研究が進められる一方で、生理条件下で反応を観測できる新しい赤外分光技術の開発が求められてきた。そこで本研究では、フェムト秒レーザーを用いて、生理条件下（室温・水溶液中）であってもタンパク質の構造変化を高感度で追跡できる新しい時間分解赤外分光装置を開発し、ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の CO 光解離後の構造ダイナミクスの追跡に応用した。

【実験】 光源にはフェムト秒赤外パルス光を使用した。従来の黒体輻射光源と比べて桁違いに輝度の高いフェムト秒パルス光を使用することで、たとえ水が存在しても高感度測定に十分な光子数を得た。赤外パルス光は、Ti:S ベースのフェムト秒パルスから、OPA、DFG によって発生させた。このパルス光は、波長可変 (3-16 μm)、広帯域 (>350 cm^{-1} FWHM)、高出力 (10 $\mu\text{J}/\text{pulse}$)、高安定性 (< 5 % p-p)、高繰り返し周波数 (1 kHz) であった。

赤外パルス光をビームスプリッターで分割後 (probe 光と参照光)、それぞれを同一試料の異なる場所に照射した。それらの透過光をイメージング分光器で分散後、上下二段の 64 チャンネル HgCdTe 検出器で検出した。検出器からの信号は 1 パルス毎に 16 bit で AD 変換した。

試料セルは、テフロンスペーサーを 2 枚のフッ化カルシウム窓板で挟んだものを使用し、1300 rpm で回転させた。試料の温度は、冷却された N_2 ガスをセル窓板に吹き付けることで、約 25 °C に保った。水蒸気の影響を除くために、光学系はチャンバーの中に入れ、内部を乾燥空気で満たした (湿度<5%)。

CO 光解離のトリガーには Nd:YAG レーザーの第二高調波 (25 ns, 532 nm, 1 kHz, 150 $\mu\text{J}/\text{pulse}$) を用い、pump-probe 法によりナノ秒からサブミリ秒のダイナミクスを観測した。ただし、光チョッパーを用いて pump 光を 0.5 kHz でチョッピングし、pump on, pump off のスペクトルを交互に測定した。pump on/off の差スペクトルを 2 パルス毎に計算し、差スペクトルを積算した。このとき、probe 光の強度を常に参照光の強度で割ることで、pulse-to-pulse の強度ゆらぎを補償した (これによりスペクトルの S/N 比は約一桁改善された)。遅延時間は 50 ns - 100 μs までの 11 点を選び、それらをランダムな順番で測定した。各遅延時間のスペクトルの積算時間は 1 分程度であった (pump on 24000 パルス/pump off 24000 パルス)。

【結果と考察】CO 光解離後の CcO の Amide I 領域のナノ秒時間分解赤外差スペクトルを図 1A に示す。ただし、pump 光と probe 光は共に直線偏光であるので、それらが互いに平行あるいは垂直となる配置で測定を行ない、等方的に平均化されたスペクトル ($\Delta A = (\Delta A_{\parallel} + 2\Delta A_{\perp})/3$) を計算することで、回転緩和の効果を除いてある。このスペクトル領域は水の強い吸収とタンパク質骨格の強い吸収を含むが (本実験条件では、 $1640\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ の領域の O.D. ~ 1.8)、微小なスペクトル変化を高感度で検出することに成功した。

最も強度の小さな変化は 1691 cm^{-1} に negative peak として観測された。この信号の拡大図を図 1B に示す。この信号強度は $72\text{ }\mu\text{OD}$ であり、測定誤差は $\pm 14\text{ }\mu\text{OD}$ であった。吸収の強い $1640\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ の領域でも感度は同じレベルであり (図 1C)、これらの結果から、本装置を用いると、1 分の積算で S/N 比 ~ 15000 のスペクトルを取得できることがわかった。

最も顕著なスペクトル変化は、 $1655(+)/1666(-)\text{ cm}^{-1}$ に見られた (図 1A)。このバンドペアは 50 ns 以内に現れ、 $\sim 2\text{ }\mu\text{s}$ で消失する。これらのバンドの強度、CO フリー型・CO 結合型の X 線結晶構造解析¹、および時間分解共鳴ラマン分光測定²のデータから、 $1655(+)/1666(-)\text{ cm}^{-1}$ の信号は、Helix X に存在する bulge 部位 (unpaired backbone C=O) の構造変化を反映していると考えられた。他のスペクトル領域の測定や Global fitting による解析と合わせて、詳細は当日議論する。

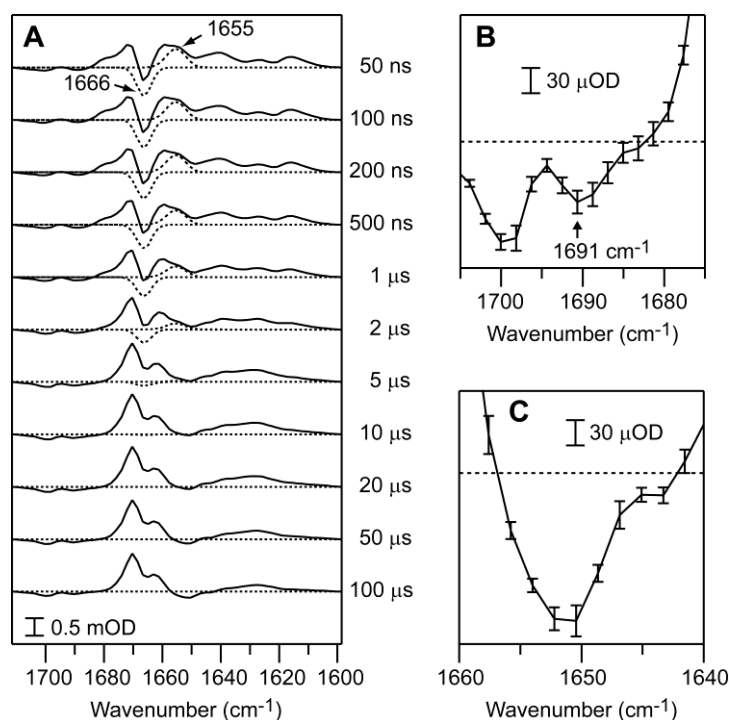


図 1. (A) CO 光解離後の CcO の時間分解赤外差スペクトル. CcO 濃度 0.68 mM (H_2O 緩衝液中), 光路長 $13\text{ }\mu\text{m}$. (B) および (C) はそれぞれ, $1675\text{-}1705\text{ cm}^{-1}$ および $1640\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ の領域における $100\text{ }\mu\text{s}$ のスペクトルの拡大図. エラーバーは 5 回の実験の標準偏差.

1. K. Muramoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7881 (2007); K. Muramoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 7740 (2010).
2. E. W. Findsen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5367 (1987).

マウス脂肪細胞の CARS 分光イメージング ～脂肪分解過程の実時間追跡～

(東大院・理¹, 立命館大・スポーツ健康科学², 兵庫県立大院・生命理³, NCTU 分子科学研究所⁴)

○加納英明¹, 瀬川尋貴¹, 奥野将成¹, 橋本健志², 大隅隆³, 濱口宏夫^{1,4}

【序】 脂肪の蓄積及び代謝過程における異常は、メタボリックシンドロームなど各種病態と密接に関係している。従って、脂肪細胞における細胞機能異常と、組織の病態との関連を分子レベルで明らかにすることは、近年の生化学の重要な研究テーマの一つとなっている。脂肪細胞は、いくつもの巨大脂肪滴を細胞内に蓄えることで効率的にエネルギーを貯蔵し、必要に応じてそれらを分解して用いている。これまでの研究から、脂肪分解過程において微小脂肪滴が発生することがわかっているが、その役割と過程には不明な点が多い。これまで橋本、大隅らは、脂肪分解の際、脂肪滴中の中性脂肪がリパーゼにより加水分解され、それにより生じた脂肪酸が小胞体にリクルートされることで微小脂肪滴として再生産されるのではないかと、いう作業仮説を立てて研究を進めてきたが、その直接の証拠を捉えることは、これまでできなかった。そこで本研究では、我々が新しく立ち上げたマルチプレックス CARS 及び三光子と周波分光イメージング装置を用いることで、脂肪分解刺激を与えた後の脂肪細胞の動態を、非染色にて可視化追跡した。

【実験】 本研究では、我々が開発したサブナノ秒マイクロチップレーザーをベースとしたマルチプレックス CARS 顕微分光装置を用い¹、前方方向に出射する信号光を分光器及び CCD カメラにより分光測定し、イメージを構築した。その際、近赤外域及び可視域の信号を同時に取得できるようシステムを拡張することで、CARS (近赤外) 及び三光子と周波 (可視) の同時測定を実現した²。

試料にはマウス由来の脂肪細胞 (3T3-L1) を用いた。培養の過程で、重水素化されたパルミチン酸 (200 μM) を培地に導入した。これにより、パルミチン酸が細胞内に取り込まれ、巨大脂肪滴に重水素化された中性脂肪が蓄積される。細胞を顕微鏡にセットした後、アドレナリン作動薬により脂肪分解刺激を与え、動態観察を行った。細胞はすべてガラスボトムディッシュで培養したものを用い、培養液に満たされた状態で測定を行った。

【結果】 図 1 に、薬剤導入前後における脂肪細胞の動態を追跡した結果を示す。上段及び中段は CH_2 及び CD_2 伸縮振動による CARS イメージ、下段は三光子と周波によるイメージである。いずれのイメージにおいても、薬剤導入後、微小脂肪滴の出現が明瞭に観察された。 CD_2 伸縮振動でも微小脂肪滴の出現が見られたことは、これら微

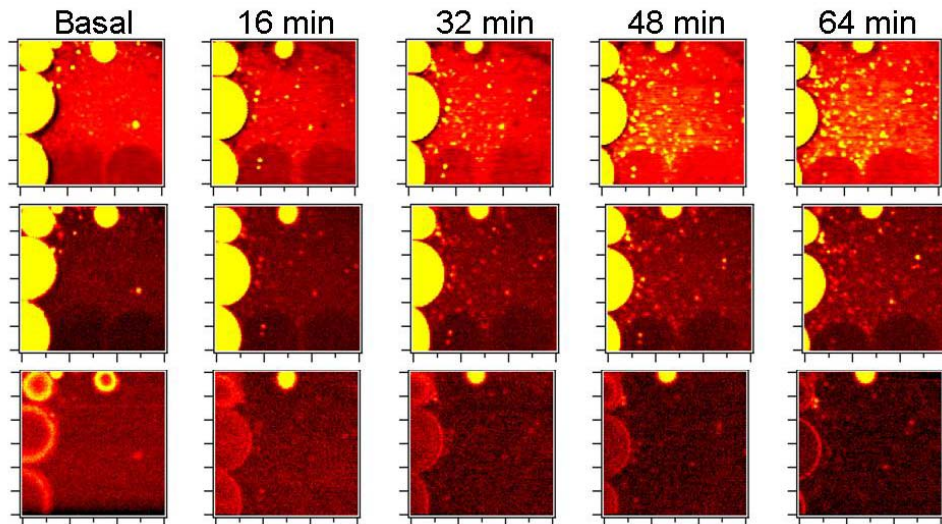


図1. 薬剤導入前(Basal)及び導入 16, 32, 48, 64 分後の脂肪細胞の CARS (CH₂ 伸縮振動; 上段, CD₂ 伸縮振動; 中段) 及び三光子和周波 (下段) 分光イメージングの結果。イメージ取得時間は約 8 分。

小脂肪滴が細胞内の巨大脂肪滴から産生していることを示している。また、三光子和周波において巨大脂肪滴がリング状に観測されるのは、三光子和周波の信号発生機構に由来する界面選択性によるものであると考えられる²。CARS(CH₂ 及び CD₂ 伸縮)、三次和周波のイメージがよく対応することは、三次和周波が細胞内の脂肪滴の界面を選択的に可視化していることを意味している。

次に、作業仮説を検証するため、小胞体における脂肪酸の再エステル化を阻害する薬剤を用いて培養した脂肪細胞の測定を行った。図 2 に薬剤導入前(Basal)及び導入 120 分後の脂肪細胞の CARS (CH₂ 伸縮振動) 分光イメージングの結果を示す。脂肪分解刺激を与えても微小脂肪滴は出現しない。このことから、微小脂肪滴の産生は、小胞体における再エステル化能の有無により明らかに異なることがわかった。従って、微小脂肪滴は小胞体から産生されることが裏付けられ、小胞体が活発な脂肪分解の場として機能していることがわかった。

[1] M. Okuno *et. al.*,
Angew. Chem. Int. Ed
49, 6773 (2010); 特願
2008- 66832

[2] 本討論会 4P089,
瀬川, 奥野, 加納, 濱
口, “白色レーザーを
用いた生細胞の非縮
退マルチプレックス
三次和周波分光イメ
ージング”

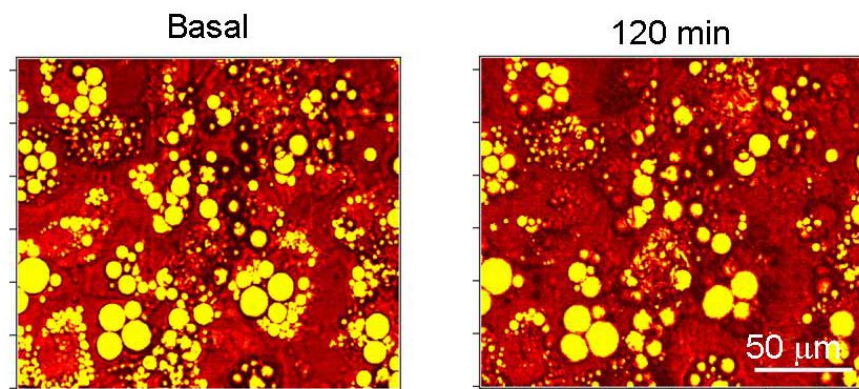


図2 薬剤導入前(左)及び導入 120 分後(右)の脂肪生細胞の CARS 分光イメージ (CH₂ 伸縮振動)。

時間分解拡散検出による青色センサータンパク質 PixD の

タンパク質間相互作用ダイナミクス

(京大院理¹、東大院総合文化²、阪府大院理³)田中啓介¹、岡島公司^{2,3}、池内昌彦²、徳富哲³、○寺嶋正秀¹

【序】タンパク質の化学反応からその機能のメカニズムに迫るためには、一つのタンパク質の化学反応だけでなく、タンパク質間相互作用のダイナミクス検出が必要となる。ここでは、拡散係数の時間分解測定によって、タンパク質間相互作用ダイナミクスを捉えた研究について報告する。このために、PixDと呼ばれるシアノバクテリアの走光性の調節に関わる青色光センサータンパク質を用いた。青色光の受容のために、発色団としてフラビンを結合するBLUF (sensors of Blue Light Using FAD)ドメインを持ち、その構造や光反応機構が近年多くの興味を集めている。

PixDは図1に示すように、環状の五量体が2つ重なって十量体を形成することが結晶解析により明らかにされている。¹PixDの光誘起の構造変化がこのタンパク質間相互作用を変化させると考えられるが、青色光照射後サブナノ秒で吸収スペクトルがわずかにレッドシフトした中間体が生成するということが報告されているのみであり、タンパク質全体の構造変化についてはほとんど明らかにされていない。これまで我々のグループでは、PixDの光反応に伴う構造変化や会合状態の変化を明らかにするために、光励起後の体積変化や拡散係数変化を高い時間分解能で観測できる過渡回折格子法(TG法)を用いて光反応ダイナミクスを調べてきた。また、生化学的研究によって、暗状態では十量体をもとにして、レスポンスレギュレータであるPixEと、PixD:PixE = 10:5の複合体を形成し、青色光照射によりPixDの二量体とPixEの単量体に解離することが報告されている。²この解離反応、すなわち光誘起のタンパク質間相互作用変化が生体内での情報伝達において重要な役割を果たすと提案されている。ここでは、PixDの反応について述べ、次いでタンパク質間相互作用のダイナミクス検出のためにレスポンスレギュレータであるPixEを加えた系での反応を調べた。

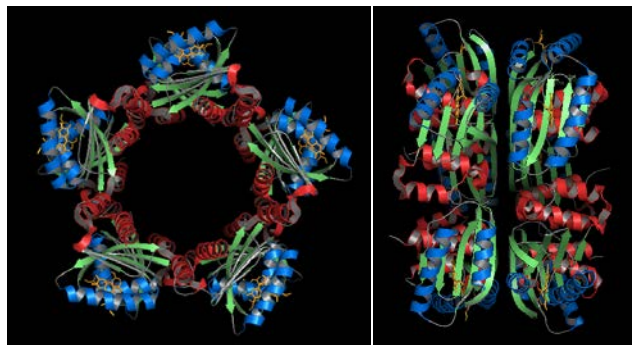


図1. PixDの結晶構造: (左) 正面図、(右) 側面図。

【実験】
シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803のPixD (Slr1694)を組換え大腸菌を用いて発現・精製し、測定に用いた。TG測定では、波長460 nmの色素レーザーを励起パルス光、840 nmのダイオードレーザーをプローブ光とした。

【結果・考察】

まず、PixEのない場合のPixDの反応についてまとめる。図2にPixDを弱い青色光で励起した後に観測されるTG信号を示す。弱い光強度での励起の時、数十ミリ秒に観測された山形の信号は様々な

条件での測定により、立ち上がりが体積膨張速度、減衰が一成分の分子拡散過程であることが分かった。また、体積変化の時定数は50 ms、拡散係数は $4.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ と決定された。すなわち、光反応によって、構造変化は起こっても、この分子の拡散係数に変化はない(すなわち、親水性部分の露出といった大きな構造変化や解離反応などは起こっていない)ことを示している。また、ここで決定された拡散係数の値は、10量体を示しており、PixEが存在しない状態でも10量体になっていることが分かった。これはゲル濾過によっても確認された。さらに、励起のための光強度を増加させていくと、図2に示すように、信号の形が劇的に変化することが見出された。信号型の解析から、立ち上がりが生成物の拡散、減衰が反応物の拡散であることが分かった。また、決定されたそれぞれの拡散係数の値は、反応物がPixDの10量体、生成物がPixD二量体として妥当な値であった。このことは、10量体のうち複数個が励起されるとはじめて解離反応が起こることを意味する。すなわち、解離するのはPixEの存在のためではなく、PixD自体の性質であることを示している。また、M93A変異体では、WTで観測された体積変化や拡散係数変化が観測されなかったことか

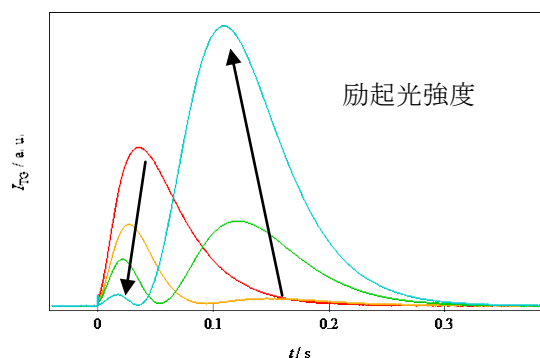


図 2. TG 信号の励起光強度依存性.

ら、解離に重要な変化はMet93残基およびこれを含むループ領域の構造変化、あるいはその領域での揺らぎ増大で起こっていることが示された。

次に、情報の伝わるはずのPixEが存在するとどのように反応が変わるのか、またどのような速度で情報が伝わるのかを調べた。図3にPixD-PixE複合体を青色光で励起した後に観測される分子拡散信号の観測時間依存性を示す。立ち上がり・減衰成分からなる分子拡散信号が観測されたことは、光反応に伴う拡散係数の変化が起こっていることを表している。信号型の解析から、立ち上がりが生成物の拡散、減衰が反応物の拡散であることが分かった。また、決定されたそれぞれの拡散係数の値は、反応物がPixD10-PixE5複合体、生成物がPixD二量体およびPixE単量体として妥当な値であった。よって、これまではゲル濾過という定常的な方法でしか検出できなかったPixD-PixE複合体の解離反応が、時間分解で観測できたことがわかる。

励起分子数で規格化されたこれらの信号は、その強度が時間に強く依存していた(図3)。信号強度は反応物と生成物の拡散係数の差を反映するため、このことは、この時間スケールで拡散係数変化を伴う反応が起こっていることを示している。そこで拡散係数の時間依存性を取り入れた解析式を用いて信号強度をグローバルフィッティングすることにより、拡散係数変化速度を500 msと決定することができた。測定・解析の原理、および得られた結果から考察されるシグナル伝達機構の詳細について発表する。

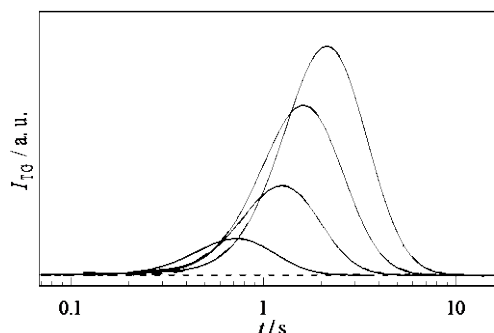


図 3. PixD-PixE サンプルの TG 信号

参考文献

1. *Biochemistry*. (2006) ,45, 12687-12694.
2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2008), 105, 11715-11719.

1B15

Study on the mechanism of the West Nile Virus NS3 protease inhibitor using the Divide and Conquer method

(Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.¹, Inst. Mol. Sci.², Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.³, JST-CREST⁴)
○ Patchreenart Saparpakorn¹, Masato Kobayashi^{1,2}, Hiromi Nakai^{1,3,4}

Introduction

West Nile Virus (WNV) is a member of the *Flavivirus* genus and is transmitted through mosquitoes. Currently, there is no effective vaccine and drug against WNV for human. In viral replication, WNV NS2B-NS3 protease plays an important role in the step for posttranslational cleavage of the substrate. 2-naphthoyl-Lys-Lys-Arg-H (Naph-KKR-H) is an effective substrate-based tripeptide inhibitor which was found to interact with NS2B-NS3 protease's active site in the similar way as substrate. Crystal structure complex between WNV NS2B-NS3 protease and Naph-KKR-H, pdb code 3e90, reveals two forms of Naph-KKR-H's binding in the active site [1]. In addition, the C-terminal aldehyde of Naph-KKR-H forms the covalent bond to a catalytic amino acid, Ser135. This form is called as tetrahedral intermediate (TI) form. Based on the conformation taken from the crystal structure, some water molecules in the binding pocket were also found to play an important role to stabilize or form the water-mediated interaction between the inhibitor and some amino acids. However, the mechanism of this inhibitor is proposed as an induced-fit mechanism [1]. In this study, one form of the inhibitor's binding is selected to study its mechanism by using divide and conquer (DC) method.

Methodology

The models consisting of catalytic triad (His51, Asp75, and Ser135), six surrounding amino acids, five water molecules, and a part of Naph-KKR-H forming the covalent bond are partially optimized and varied along the reaction coordinate of covalent bond forming using HF/3-21G* method. The Synchronous Transit-Guided Quasi-Newton (STQN) method is used to locate the transition state (TS). TI, TS and starting binding (Michaelis complex, MC) forms, as shown in Fig. 1, are refined without the restraint of reaction coordinate and checked with the frequency calculations. All models are performed single point energy calculation at DC-B3LYP, DC-MP2 and DC-SCS-MP2 methods [2,3] with 6-31G** basis set in both gas phase and CPCM model (water and $\epsilon = 4$ used as solvent). Furthermore, effective fragment potential (EFP) method is also studied by treating with five water molecules.

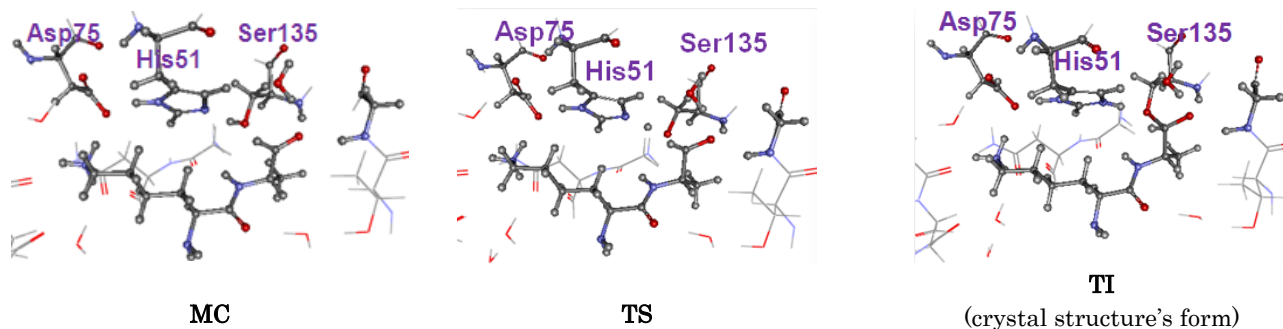


Fig. 1 Structures of Michaelis complex (MC), transition state (TS), and tetrahedral intermediate (TI)

Results and Discussion

From the partial optimization, two conformation of His51 are found. Conf.1 is similar to the conformation in crystal structure and Conf.2 reveals the flip of imidazole ring. For the energy profile according to the reaction coordinate, local minima of TI forms cannot be found with the gas phase calculations. In the CPCM models, solvent models as water and $\epsilon = 4$ give the similar trend of the results. Relative total energies of Conf.1 are about 2-4 and 1-2 kcal/mol lower than those of Conf.2 for DC-B3LYP and DC-SCS-MP2 methods, respectively. For DC-MP2 method, relative total energies of Conf.1 are close to and lower about 1 kcal/mol than those of Conf.2, but relative total energy of Conf.1 at TS is lower than that of Conf.2 at a point before TS. According to the energy profiles of three methods, we conclude that pathway of Conf.1, which is no flip of His51, is more preferable. Energy profile of DC-SCS-MP2 method is shown in Fig. 2. From the results, solvation models using the solvent with dielectric constant of water and $\epsilon = 4$ show the similar energy barrier. Energy barriers obtained from DC-MP2 method are lower than those obtained from DC-B3LYP and DC-SCS-MP2, respectively. For the reaction energy, solvation models with dielectric constant of $\epsilon = 4$ give the reaction energies higher than the models with dielectric constant of water about 2 kcal/mol. The order of the reaction energy in each method is as follows; DC-MP2 < DC-B3LYP \approx DC-SCS-MP2. In the system that water molecules are treated as EFP (Model 2), the energy barriers are close to the results of the models including the water molecules in ab initio calculations (Model 1) but

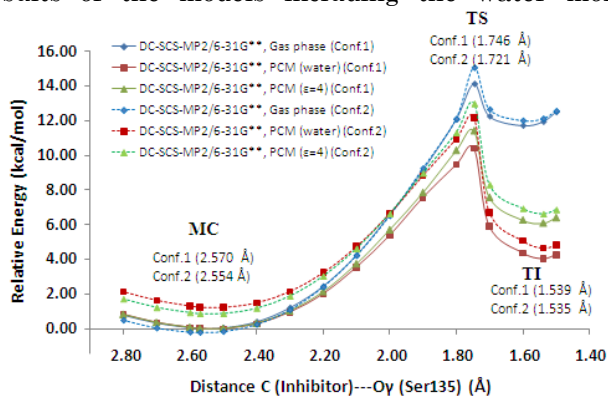


Fig 2. Energy profile of DC-SCS-MP2 method. The energy barriers obtained from this study are about 7-13 kcal/mol. The reaction energies are presented as endothermic reaction. Dielectric constant and EFP only affect with the TI models, as shown in the reaction energies, about 3-4 kcal/mol.

Table 1. Energy barrier, reaction energy, and interaction energy in kcal/mol

Method	Solvent	Energy barrier (kcal/mol)		Reaction energy (kcal/mol)		Interaction energy of MC form (kcal/mol)			
		Model1	Model2	Model1	Model2	Model1*		Model2	
						Conf1	Conf2	Conf1	Conf2
DC-B3LYP/6-31G**	water	8.99	10.28	4.18	7.10	-54.92	-53.52	-53.59	-51.97
	$\epsilon=4$	9.99	11.20	6.24	9.07	-82.48	-81.46	-81.45	-80.25
DC-MP2/6-31G**	water	6.85	8.81	1.25	5.05	-73.36	-72.28	-71.56	-70.12
	$\epsilon=4$	7.85	9.73	3.24	7.01	-101.03	-100.32	-99.27	-98.23
DC-SCS-MP2/6-31G**	water	10.41	11.90	4.04	7.17	-63.97	-62.83	-64.40	-62.94
	$\epsilon=4$	11.42	12.85	6.08	9.17	-91.75	-90.98	-92.20	-91.14

* 5 water molecules are included in ab initio calculations (Model 1) and are treated as effective fragment potential (Model 2)

References

- [1] G. Robin, K. Chappell, M.J. Stoermer, S. Hu, P.R. Young, D.P. Fairlie, and J.L. Martin, *J. Mol. Biol.*, 385, 1568 (2009).
- [2] T. Akama, M. Kobayashi, and H. Nakai, *J. Comput. Chem.*, 28, 2003 (2007).
- [3] M. Kobayashi, Y. Imamura, and H. Nakai, *J. Chem. Phys.*, 127, 074103 (2007).

人工光合成分子の電荷分離状態に関する理論化学的研究

東大院・工¹, CMSI 拠点研究員²○城野 亮太^{1,2}, 山下 晃一¹

【序】

光合成や太陽電池で行われる光電変換は 1. 光子を吸収し, 2. 電荷分離状態になり, 3. 伝達物質へ電子を受け渡す, の 3 つの過程を経る. この電荷分離状態はエネルギー創生を考える上で重要である. 光合成の電荷分離過程で主役となるクロロフィルとキノンをモデル化したポルフィリンとベンゾキノンをペプチド基で連結した ZnP-BQ(図 1)は人工光合成分子として知られており, ベンゼン溶媒中でポルフィリン Q 帯に対応する光子を吸収したあとに緩和によって電荷分離状態を形成することが時間分解過渡吸収によって観測されている[1][2]. 本発表では *ab initio* 法および密度汎関数法(DFT)を用いて電荷分離状態を探索し, その性質を明らかにしたので報告する.

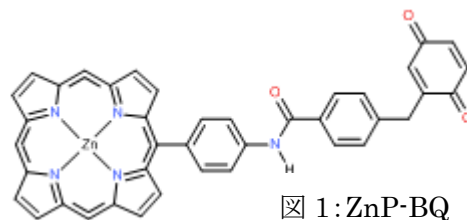


図 1: ZnP-BQ

【方法】

B3LYP/6-31G* レベルで最適化した構造を用いて, SAC-CI/LANL2DZ レベルで励起状態の計算を行った. 比較のため CIS および LDA, GGA, hybrid, LC-DFT を含む 16 種の汎関数を用いた時間依存密度汎関数法(TD-DFT)計算による励起状態計算を行った.

【結果】

最適化後の構造はポルフィリン環と *meso* 位に結合したフェニル基がほぼ垂直となるため, ZnP 部と BQ 部の電子の共役は断ち切られていた. この構造について frozen-core のもとで CIS/LANL2DZ 計算を行った結果, 電荷分離状態の準位を記述するには 73 の占有軌道と 242 の非占有軌道までを活性空間にいれれば CI 係数 0.01 以上の軌道を考慮に入れられることがわかった. この活性空間を用いて SAC-CI/LANL2DZ レベルで電荷分離状態のエネルギーを求めたところ, Q 帯よりも高いエネルギーを持つことがわかった(図 2). Q 帯から電荷分離状態への遷移双極子はなく, 結果として図 2 中に示したように振動子強度(f)はゼロであった. この結果は Q 帯から緩和によって電荷分離状態が生成するという実験結果を説明できない. 実験はベンゼン溶媒中で行われているが, ベンゼン分子を計 4 つ直接配置して得られた電荷分離状態のエネルギー準位はベンゼンなしのもの比べてわずか 0.1 eV 程しか安定化されなかったことから, ベンゼンのような非極性溶媒は電荷分離状態の安定化にあまり寄与していないことが示唆される. また, ZnP-BQ はその連結部位に回転可能な二面角が 4 箇所ある. この回転による構造変化が電荷分離状態の安定化に繋がる可能性を考慮するために 4 つそれぞれの二面角変化に対する励起状態のポテンシャルエネルギー変化を計算したが(図 3), いずれも電荷分離状態のエネルギーは Q 帯よりも高く, 実験結果を説明できなかった. これらの結果から, through bond では電荷分離状態を形成できないと考え, through space での形成を考えた.

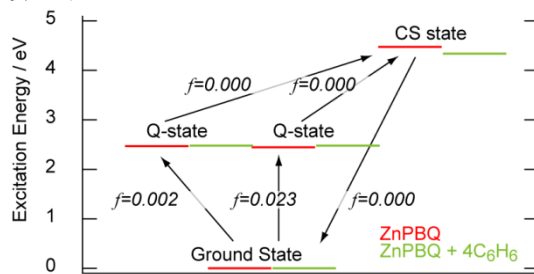


図 2: 基底状態と励起状態のエネルギー準位

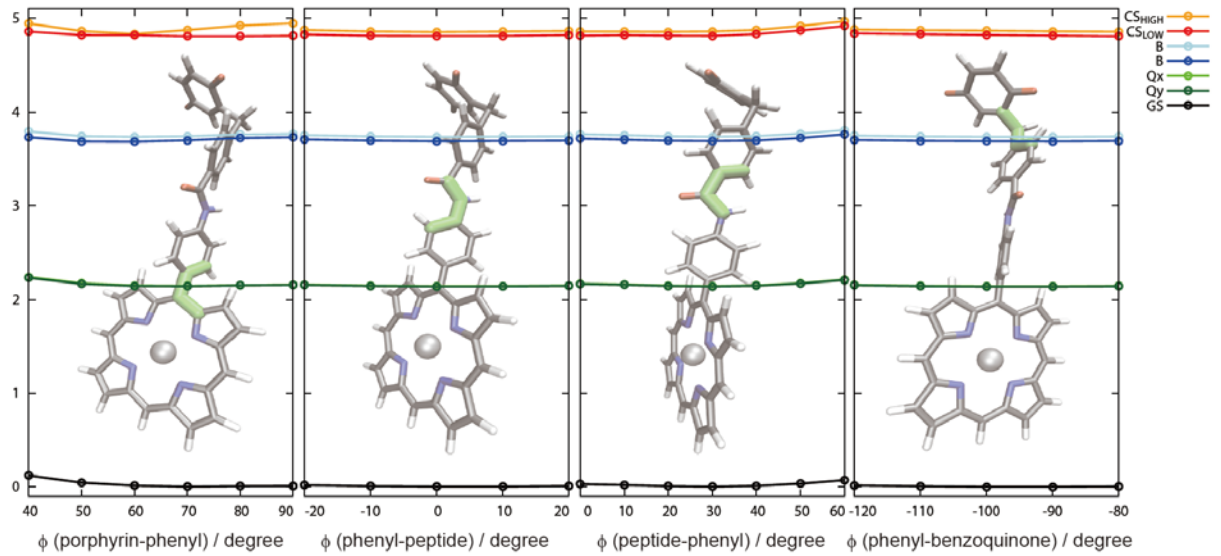


図 3：二面角変化に対するポテンシャルエネルギー曲線

through space で電荷分離状態を起こすような分子の配置は複数考えられるが、ここでは極端な例として *C_i* 対称な二量体を考え、B3LYP/6-31G* レベルで最適化した構造について SAC-CI/6-31G* レベルでエネルギーを求めた。単量体の計算から主要な分子軌道は ZnP 部の 4 つのフロンティア軌道と BQ 部の LUMO であることが分かっているため、これらの軌道を活性空間にとった。得られた電荷分離状態のエネルギーは Q 帯よりも低く、実験結果を定性的に再現した。亜鉛と酸素間で代表させた二量体間の距離に対するポテンシャルエネルギー曲線を図 4 に示す。これから ZnP-BQ の電荷分離状態は、基底状態(図 4 黒線)あるいは Q 帯の励起状態(図 4 緑線)でのポテンシャルエネルギー曲線を下ることで二量体を形成し、安定構造周辺で電荷分離状態のポテンシャルエネルギー曲線(図 4 赤線)と交差することによって電荷分離状態になることが示唆される。こうして得られた電荷分離状態はさらにポテンシャルエネルギー曲線を下ることでより安定な状態へと遷移し、有限な寿命をもつことがわかった。電荷分離状態に関連する遷移双極子については当日報告する。

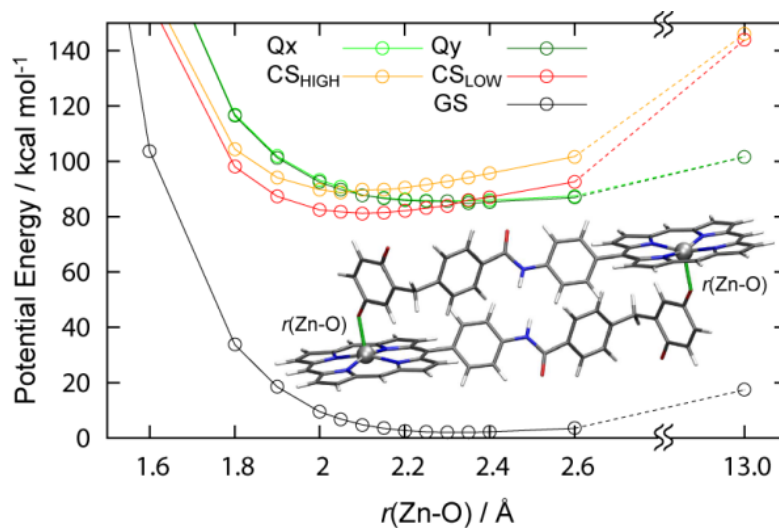


図 4：二量体間距離に対するポテンシャルエネルギー曲線

- [1] H. Imahori, et al. *Chem. Phys. Lett.*, (1996) **263** 545
 [2] T. Asahi, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, (1993) **115** 5665

1B17

光合成蛋白質中におけるクロロフィル二量体上の電荷分布の起源

(京大生命科学系キャリアパス)

○齊藤圭亮, 石北央

【序】高等植物などの光合成反応に寄与している光化学系 I (PSI) および II (PSII) には、それぞれ、クロロフィル(Chl)二量体 P_A/P_B と P_{D1}/P_{D2} が存在している(図 1)。これらの二量体は光誘起電子移動において第一電子供与体として働き、電子移動が起こるとラジカルカチオン $[P_A/P_B]^{\bullet+}$ および $[P_{D1}/P_{D2}]^{\bullet+}$ が二量体上に生ずる。このときにおける二量体内の 2 つのクロロフィルへの正電荷の分布比は実験的に計測されており、 $P_A^{\bullet+}/P_B^{\bullet+}$ では 50/50~10/90 と P_B 側に多く分布し[1,2], $P_{D1}^{\bullet+}/P_{D2}^{\bullet+}$ では 70/30~80/20 と P_{D1} 側に正電荷が多く分布する[3,4]と報告されている。本研究[5]は PSI および PSII それぞれについて、二量体上の正電荷の分布比を決定している起源を明らかにすることを目的とする。

【計算手法】 全ての計算は X 線結晶解析で得られた PSI および PSII の蛋白質複合体の立体構造[6,7]を基にした。量子力学/分子力学(QM/MM)の手法を用いて $P_A^{\bullet+}/P_B^{\bullet+}$ と $P_{D1}^{\bullet+}/P_{D2}^{\bullet+}$ の正電荷分布比を求めた。ここで、Chl 二量体を QM 領域に、残りの全ての蛋白質と余因子を MM 領域とした。連続体モデルを用いた静電的計算により、Chl 単量体 P_A, P_B, P_{D1}, P_{D2} の酸化還元電位 E_m を求め、さらに、PSI と PSII の蛋白質複合体の中心部を構成する擬対称サブユニット対(PSI では PsaA/PsaB, PSII では D1/D2)内の各残基から単量体の E_m への寄与を算出した。

【結果】 QM/MM による $P_A^{\bullet+}/P_B^{\bullet+}$ と $P_{D1}^{\bullet+}/P_{D2}^{\bullet+}$ の正電荷分布比はそれぞれ、28/72 および 77/23 と計算され、実験値とよい一致を示した。計算された Chl 二量体上の分布比

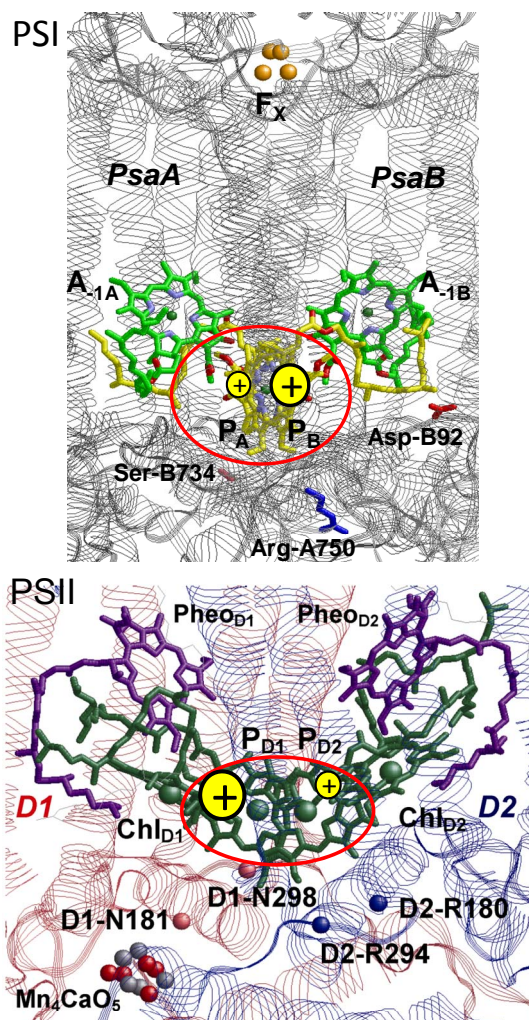


図 1: PSI(上)および PSII(下)における第一電子供与体のクロロフィル二量体 P_A/P_B と P_{D1}/P_{D2} [6,7]

は Chl 単量体の E_m の計算値と強く相関しており，単量体の E_m 間の差が大きいほど正電荷は片一方のクロロフィルに多く分布した．PSII においては蛋白質サブユニット D1/D2 の静電的性質の差が正電荷分布比に強く影響を与えているのに対し，PSI では PsaA/PsaB の静電的性質に差は少なくほとんど影響を与えていなかった．PSI においては(1)Chl 分子への水素結合の有無，(2) P_B は Chl a であるのに対し P_A はその光学異性体 Chl a' であること[図 2(a)]，が電荷分布比に強く影響していた．一方，PSII における P_{D1}/P_{D2} の分子構造の違い[図 2(b)]に起因する影響は D1/D2 からの影響に比べて小さかった．

【結論】 Chl 二量体上の正電荷分布比を決定している支配的要因は，PSI においては P_A/P_B 間の Chl 分子構造および水素結合の有無の違いであるが，PSII においては P_{D1}/P_{D2} を取り囲む蛋白質サブユニット D1/D2 の静電的性質の違いである．

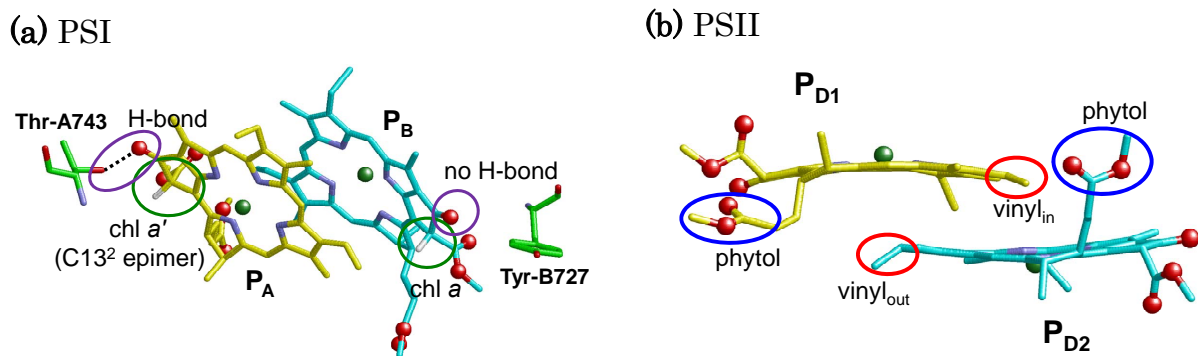


図 2: Chl にみられる構造の違い[6,7]. (a) PSI における P_A/P_B : P_A は Thr-A743 と水素結合しているが P_B はしていない(紫) ; P_A (Chl a')と P_B (Chl a)は $C13^2$ 光学異性体の関係にある(緑). (b) PSII における P_{D1}/P_{D2} : phytol 基(青)および vinyl 基(赤)の向きが P_{D1} と P_{D2} とで異なっている.

References:

- [1] A. N. Webber, W. Lupitz, Biochim. Biophys. Acta. 1507 (2001) 61.
- [2] M. Pantelidou, P. R. Chitnis et al., Biochemistry 43 (2004) 8380.
- [3] I. H. Davis, P. Heathcote et al., Biochim. Biophys. Acta. 1143 (1993) 183.
- [4] T. Okubo, T. Tomo et al., Biochemistry 46 (2007) 4390.
- [5] K. Saito, T. Ishida et al., J. Am. Chem. Soc. (2011), to be published.
- [6] P. Jordan, P. Fromme et al., Nature 411 (2001) 909.
- [7] Y. Umena, K. Kawakami et al., Nature 473 (2011) 55.

極低温超高速蛍光測定と理論計算の融合で見てきた光化学系 II の光捕集ダイナミクス

(名大院理¹、東北大院理²、阪市大院理³、岡山大院理⁴、Johannes Kepler University Linz⁵)
○柴田 穰^{1,2}、西 俊介¹、川上 恵典³、沈 建仁⁴、Thomas Renger⁵

[序] 植物の光合成反応中心の一つ、光化学系II(PS II)反応中心には、35個のクロロフィル (Chl) 分子が密集する。最初の光誘起電荷分離を担うのは、PS IIのほぼ中央にある数個のChlからなるChlオリゴマー (以下、Reaction Center Pigments: RCP) である。その他の大部分のChlは、吸収した光エネルギーをRCPへと渡すアンテナ色素として機能する。我々はこれまで、極低温超高速蛍光分光法によりPS IIのアンテナChl からRCP へのエネルギー移動ダイナミクスを研究してきた。その結果、PS II では77 K よりも低温にすると蛍光スペクトルのピークが短波長側にシフトすることを見出した。この現象は、蛍光を強く消光するRCP よりも低い励起エネルギーを持つChl (以下、長波長Chl) が数個存在することを示唆する。長波長Chlは、必ずしも高効率な励起エネルギー捕集に有利ではない。我々は、長波長Chl が励起エネルギー捕集効率を調節する機能を持っているとの仮説をたて、研究を行ってきた。この仮説の検証には、長波長Chlが結晶構造中のどのChlに対応するのかを特定することが重要である。

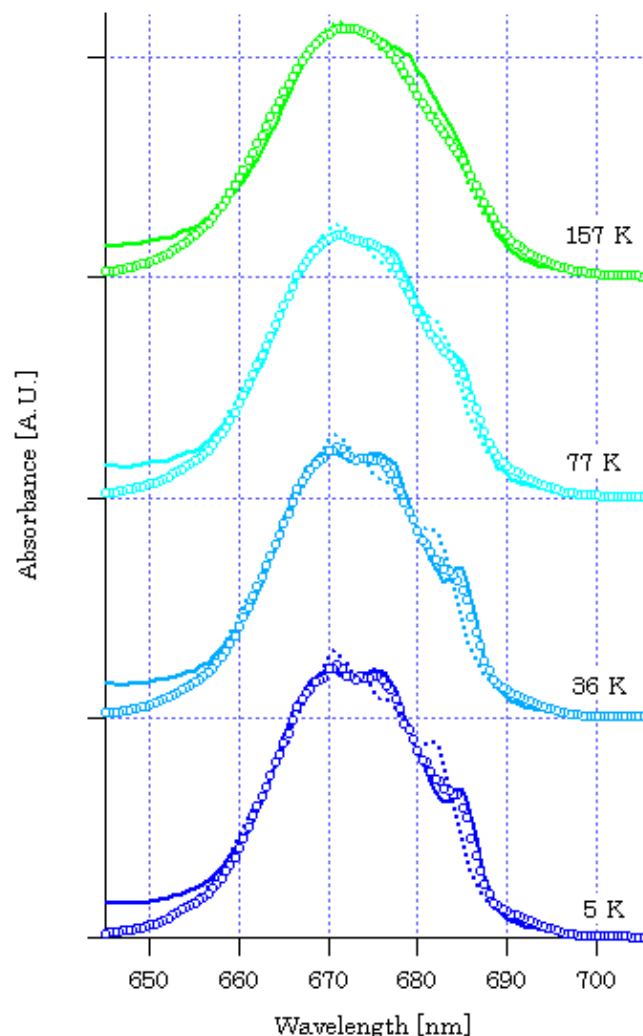
光化学系タンパク質 - 色素複合体の構造は、近年原子レベルで解明されてきた。しかし、結合する各Chl分子の吸収波長 (以下、サイトエネルギー) という基本的な量が分からないため、その光捕集過程を構造情報に立脚して理解することが出来なかった。そのような中、2008年に共同研究者のT. RengerらはPS IIのサイトエネルギーを決定し、光捕集過程をシミュレーションにより再現した[1]。理論計算の入力パラメータは、各Chlのサイトエネルギー及び不均一幅、フォノンのスペクトル密度 $\rho(\omega)$ 、フォノンとのカップリング強度を示すホアン・リー因子であり、これらが入力されれば任意の温度での光学過程がダイナミクスを含めて再現できる。本研究では、PS IIの蛍光ダイナミクスの温度依存性をシミュレーションにより再現することを試み、長波長Chlの特定及びその生理的機能の解明を目指した。

[結果] 採用する理論モデルでは、まず Chl 分子間の励起子相互作用の強度に閾値を設け、閾値より強く相互作用する Chl 同士は同じグループに属する、というルールにより全 Chl 分子をいくつかのグループに分割する。グループ内では励起は非局在化するとし、エネルギー移動は励起子準位間の緩和としてレッドフィールド理論で扱う。一方グループ間のエネルギー移動は、住らによって提唱された一般化フェルスター機構[2]で扱う。このようなモデルを採用することで、励起状態がある程度は非局在化するが PS II の全 Chl にまでは拡がらない、という光合成系の励起ダイナミクスを再現する。PS II は、6 個の Chl と 2 つのフェオフィチンを含む反応中心(RC)、16 個の Chl を含む CP47、13 個の Chl を含む CP43、の 3 つのサブユニット部分からなる。これまで、過去に報告されている各サブユニット標品の吸収、蛍光、円偏光 2 色性 (CD)、直線偏光 2 色性スペクトルを再現するようにして、サイトエネルギーが決定された[1]。このようにして決定されたサイトエネルギーを用いて、結晶構造の解かれているシアノバクテリア由来の PS II の

吸収スペクトルの温度依存性を計算したものが下図の破線である。実線で表されている実験結果を、この計算ではうまく再現できていない。この原因として、1) サブユニットのスペクトルの報告されている CP43、CP47 は植物由来のものでありシアノバクテリア由来のものとは異なる、2) サブユニットに分割することで、サイトエネルギーの変化がある、という2つが考えられた。

幸い、CP43 の極低温での吸収、CD スペクトルには、683 nm 付近に特徴的なピークが見られ、図に見られるように PS II 全体のスペクトルではこのピークが 685 nm へ長波長シフトしている。このピークを再現するように CP43 のサイトエネルギーを微調整することで、PS II 全体のスペクトルが再現できるようにした。こうして微調整されたサイトエネルギーを用いて計算された吸収スペクトルが、図の白丸である。広い温度範囲で、スペクトルの特徴を再現できていることが分かる。こうして決定されたサイトエネルギーを用いて時間分解蛍光分光測定の結果の温度依存性を計算した結果、77 K 以下でのピークの短波長シフトなどをうまく再現できることが分かった。また計算の結果、長波長 Chl が CP43 と CP47 にある Chl に由来することも明らかとなった。

[考察] PS II では、酸化的条件でアンテナ Chl の一部も酸化されることが知られている。酸化される Chl は、RC 内に含まれる Chl_z と呼ばれる特定の Chl であるとの説があるが、これには必ずしも実験的裏付けはない。このようなアンテナ Chl の酸化に伴い、蛍光寿命が速くなるという現象が報告されている[3]。Chl⁺ は 800 nm に吸収ピークを持つため、フェルスター機構による Chl⁺ へのエネルギー移動がこの蛍光消光の機構として考えられている。このような Chl⁺ による励起消光は、PS II の反応を抑制する必要がある環境下で積極的に励起エネルギーを熱へと変換する機構として働く可能性がある。今回長波長 Chl として特定された Chl は、酸化されると考えられている Chl_z にも近い位置にあり、Chl_z⁺ による消光という機構を支持する。講演ではより定量的な解析結果を示し、酸化的条件での蛍光消光の機構について論じる。



[参考文献]

- [1] G. Raszewski & T. Renger, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008), 4431.
- [2] H. Sumi, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999), 252.
- [3] R. Schweitzer et al., *J. Phys. Chem. B* 102 (1998), 8320.

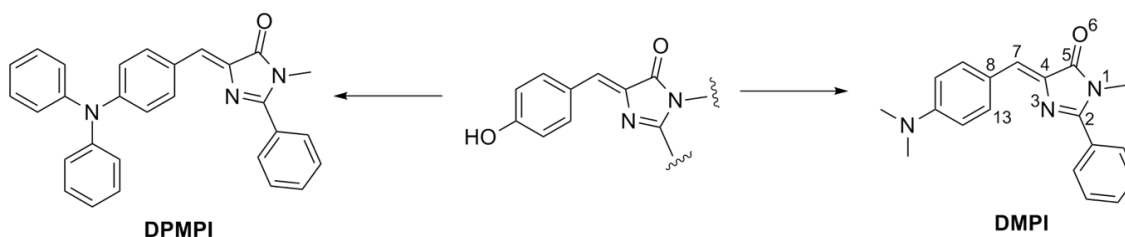
Why GFP Chromophore Analogs Weakly Fluorescent? A Spectroscopic and Theoretical Study

(Department of Chemistry, IIT Kanpur, India) ○ SEN Pratik, RAFIQ Shahnawaz, RAJBONGSHI Basanta K., NAIR Nisanth N., RAMANATHAN Gurunath

Introduction

Green fluorescent protein is highly fluorescent ($\phi \sim 0.8$, $\tau_f = 3.3$ ns) in its native, however the denatured protein and most of the synthetic analogs are unexpectedly nonfluorescent ($\phi \sim 10^{-3}$, $\tau_f = 1$ ps) in bulk solutions, which renders it photophysically very important.¹⁻³ The most arguable debate is how the excited state relaxes, whether through a single bond rotation, rotation about exocyclic double bond or via the simultaneous rotation of both the bridging bonds known as “hula-twist”.

To understand the above phenomenon, two GFP luminophore analogs: (4Z)-4-(*N,N*-dimethylaminobenzylidene)-1-methyl-2-phenyl-1,4-dihydro-5*H*-imidazolin-5-one (DMPI) and (4Z)-4-(*N,N*-diphenylaminobenzylidene)-1-methyl-2-phenyl-1,4-dihydro-5*H*-imidazolin-5-one (DPMPI) were synthesized and their excited state dynamics was explored by fluorescence up-conversion spectroscopy and quantum mechanical calculations with the results being substantiated by HPLC and NMR.



Scheme 1. Molecular structure of GFP chromophore and two analog under consideration of present work.

Results and Discussions

Bi-exponential decay kinetics in solvents of varying viscosity establishes the viscosity dependent relaxation dynamics. Based on previous literature³ and observed viscosity dependence, the second time constant (τ_2) was assigned to internal conversion via a large amplitude motion, which negates the “hula-twist” based relaxation kinetics. Solvent polarity was found to have a monotonous

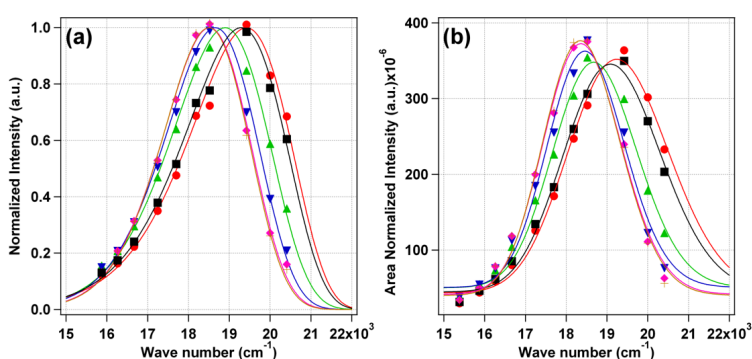


Fig. 1. (a) Intensity normalized time resolved emission spectra (TRES) of DMPI in acetonitrile, constructed from the decay transients obtained at ten different wavelengths. The time resolved emission spectra were plotted for 0 ps (●, Red), 0.1 ps (■, Black), 0.5 ps (▲, Green), 1 ps (▼, Blue), 3 ps (◆, Pink), and 5 ps (+, Orange). (b) Time-resolved area normalized emission spectra (TRANES) of DMPI in acetonitrile. The symbols have their meaning as mentioned for TRES. The TRANES reports the occurrence of an isoemissive point and hence infers the existence of two states in the excited state deactivation process.

effect on the first time component (τ_1), which fastens with increase in polarity and hence inferences towards the depletion of locally excited state to charge transfer state. Time resolved emission spectra (TRES) and time resolved area normalized emission spectra (TRANES) were constructed to authenticate the occurrence of excited state intramolecular charge transfer, which suggest that the charge transfer is

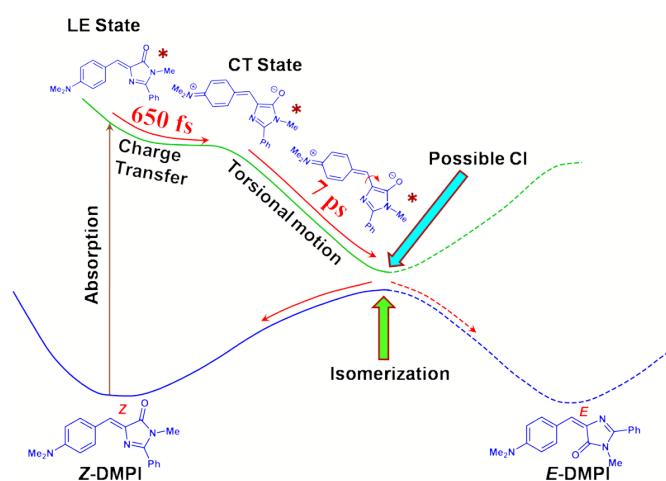


Fig. 2. Schematic excited state dynamics of DMPI in acetonitrile..

completed within 3-5 ps followed by IC via torsional motion. Quantum chemical calculations were used to map the potential energy surfaces of the S_0 and S_1 states, which divulge that the IC via torsional coordinate is only possible by a rotation of the exo-methylene double bond. A torsional rotation of the bridging single bond cannot lead to IC because of the high energy (S_0 - S_1) gap. Also, the rotational coordinates of both the bridging single and double bonds cannot lead to IC because of high activation barrier of twisting. Both the up-conversion measurements and the three dimensional energy maps anticipate an *E-Z* isomerization about the exo-methylene double bond. HPLC profiles authenticated the occurrence of two peaks corresponding to *E*- and *Z*- isomers after irradiating the *Z*-DMPI. Similarly, proton-NMR measurements of the irradiated analogs manifest the presence of additional peaks certifying the existence of both the isomers and hence reveal isomerization about the exo-methylene double bond. These all observations invalidate the role of “hula twist” motion and the torsion about single bond in the relaxation dynamics of the two GFP chromophore analogs under investigation. Present study ascertain the role of the β -barrel coat in the GFP to suppress the deactivating intramolecular charge transfer and internal conversion via the non-radiative pathway resulting in high quantum yields in the GFP.

References

1. Meech, S. R. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2922.
2. Tsuji, F. I. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, 13617.
3. Huppert, D. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1540.

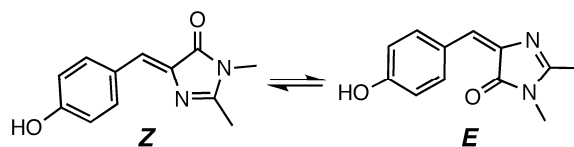
Contact:

Dr. Pratik Sen
 Department of Chemistry
 Indian Institute of Technology Kanpur
 Kanpur, UP, PIN – 208 016, India
 Email: psen@iitk.ac.in

ポリマー中に分散された GFP 発色団のモデル化合物の構造と光学過程の外部電場効果

(北大電子研¹・愛知教育大²) ○中林 孝和¹・日野 和之²・太田 有香²・伊藤沙由里²・中野 博文²・太田 信廣¹

【序】 変異型蛍光タンパク質(GFP)を細胞内に発現させ、GFPの蛍光寿命を用いて細胞内の環境変化の計測を行っている¹⁻⁵。GFPはオワンクラゲから単離された発光性のタンパク質であり、現在では吸収および蛍光波長が異なる様々な蛍光タンパク質が遺伝子工学によって作られ、細胞や生体組織の可視化に用いられている。光活性や活性酸素産生機能などを有する次世代蛍光タンパク質なども開発されている。これらの光学特性や光機能性の違いは、蛍光タンパク質内にある発色団の分子構造および発色団と周囲を取り囲むアミノ酸残基との静電的な相互作用に起因する。本講演では、蛍光タンパク質の発色団のモデル化合物である*p*-HBDI (*p*-hydroxybenzylidene-dimethylimidazolinone) (Scheme 1)の吸収、蛍光スペクトルおよび蛍光減衰曲線の外部電場効果を用いて、発色団の電子励起状態の構造および発色団と外部電場との相互作用に伴う光励起ダイナミクスの変化について検討した⁶。HBDIの*Z-E*異性化過程についても議論を行う。*p*-HBDIは最も基本的な発色団構造であり、野生型GFP、EGFP、EYFPなどの発色団のモデルとなる。



Scheme 1. Z and E isomers of *p*-HBDI

【実験】 ITO 石英基板上に試料がドープされた PMMA (poly(methyl methacrylate))高分子薄膜を作成した。半透明アルミニウム(Al)を PMMA 膜上に蒸着し、ITO と Al 間に交流電場を印加した。透過光または蛍光強度の外部電場に同期する成分を検出し、吸収および蛍光スペクトルの外部電場による変化成分(電場吸収および電場蛍光スペクトル)を得た⁶。蛍光減衰曲線の外部電場効果の測定は、励起光源としてフェムト秒チタンサファイアレーザーの2倍波を用い、外部電場があるときの時間相関光子計数法による蛍光減衰曲線と電場がないときの曲線を30ミリ秒で交互に測定し、それぞれを積算して得た⁷。

【結果】 電場吸収スペクトルは、吸収スペクトルの0次微分、1次微分、そして2次微分の線形結合で表すことができ、1次および2次微分の項から、光励起に伴う分子分極率および双極子モーメントの変化量をそれぞれ求めることができる。Fig. 1 に PMMA 中における *p*-HBDI の電場吸収スペクトルを示す。*p*-HBDI の中性種に由来する吸収バンドが観測されている。電場吸収スペクトルは、吸収スペクトルの一次微分の形を示し、光励起に伴う分子分極率の変化($\sim 70 \text{ \AA}^3$)が支配的であることがわかる。二次微分の寄与は小さく、光励起に伴う双極

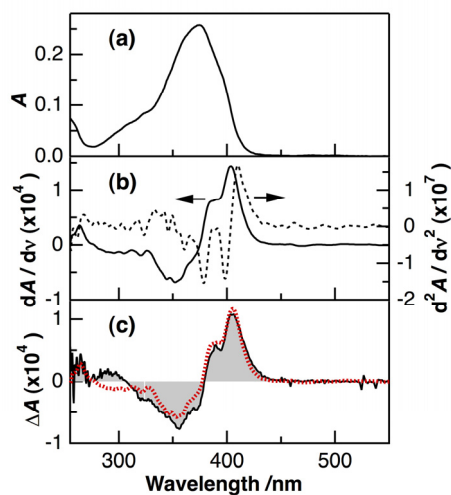


Fig. 1. (a) Absorption spectrum of *p*-HBDI in a PMMA film, (b) the first (solid line) and second (dotted line) derivatives of the absorption spectrum, (c) electroabsorption spectrum (shaded line) and the fitted one (dotted line). The field strength was 0.7 MV cm^{-1} .

子モーメントの変化量は約 $2 D$ であった。中性状態の p -HBDI の双極子モーメントは、基底状態と励起状態において差が小さいことが理論的に示唆されており⁹、本実験結果と一致する。

Fig. 2 に PMMA 中における p -HBDI の電場蛍光スペクトルを示す。電場吸収スペクトルとは異なり、440 nm 付近に極大を示す中性状態の p -HBDI からの蛍光バンドの強度が、外部電場と相互作用によって増加することがわかった。変化量の大きさは、 0.9 MV cm^{-1} の外部電場の印加に対して約 0.2% である。この蛍光強度の電場誘起増強効果の機構を明らかにすることを目的として、蛍光減衰曲線の外部電場効果を測定した (Fig. 3)。エタノール中における蛍光寿命はサブピコ秒領域であるのに対し、高分子の PMMA 中においては蛍光寿命の増加が観測された。PMMA 中の蛍光減衰曲線は 3 成分の指数関数にて再現され、平均蛍光寿命は約 80 ps であった。電場が ON と OFF のときの蛍光減衰曲線の強度差と強度比は、外部電場によって蛍光寿命が増加することによって再現することができ (Fig. 3b, c), 1.1 MV cm^{-1} の印加に対して約 0.5% の蛍光寿命の増加を見積もることができた。この結果は、電場との静電的な相互作用によって、 p -HBDI の無輻射緩和速度が減少することを示している⁶。

GFP はポリペプチド鎖の円筒の内部に、発色団が存在する構造を持ち、発色団と周囲を取り囲むアミノ酸残基との静電的な相互作用の大きさは、 10 MV cm^{-1} のオーダーであることが示唆されている。外部電場による変化量は電場の大きさの 2 乗に比例することから、本結果は、アミノ酸残基との静電的な相互作用が、GFP 内の発色団の光励起ダイナミクスに大きな影響を与えていることを示している。また、 p -HBDI は溶液中においては、 Z 体 (Scheme 1) が安定であり、PMMA 中の吸収スペクトルも Z 体の吸収と形状が一致する。しかし、PMMA 中の蛍光励起スペクトルは、 E 体の吸収スペクトルに一致する成分も観測され、PMMA 中では E 体も存在することがわかった。

1) 中林・太田, 日本レーザー医学会誌 30 (2010) 441. 2) 中林・太田, 分析化学 58 (2009) 473. 3) N. Ohta and T. Nakabayashi, *Molecular Nanodynamics* (Wiley-VCH) (2009) 607. 4) 中林・太田, ナノイメージング (エヌ・ティー・エス) (2008) 245. 5) 中林・太田, ぶんせき (2007) 597. 6) T. Nakabayashi et al., *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 8622. 7) N. Ohta et al., *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 16466. 8) M. Tsushima et al., *Rev. Sci. Instrum.* 75 (2004) 479. 9) A. K. Das et al., *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 1421.

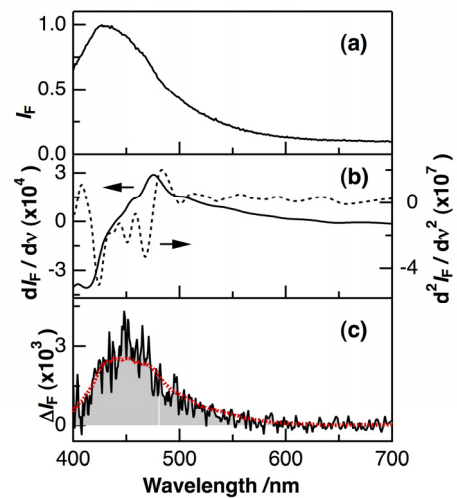


Fig. 2. (a) Fluorescence spectra of p -HBDI in a PMMA film, (b) the first (solid line) and second (dotted line) derivatives of the fluorescence spectrum, (c) electrophotoluminescence spectrum (shaded line) and the fitted one (dotted line). Excitation wavelength was 379 nm. The field strength was 0.9 MV cm^{-1} .

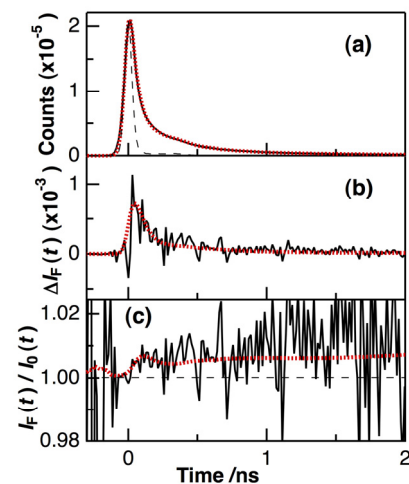


Fig. 3. (a) Fluorescence decay (solid line) of p -HBDI in a PMMA film at zero field, (b) the difference between the decays at 1.1 MV cm^{-1} and at zero field (solid line), (c) the ratio of the decay at 1.1 MV cm^{-1} relative to that at zero field (solid line). The fitted curve is shown in each panel by a dotted line. The fluorescence decay in ethanol is also shown in (a) by a dashed line. Excitation and monitoring wavelengths were 379 and 450 nm, respectively.

GFP 発色団モデル化合物における二光子吸収スペクトルの溶媒依存性

(東邦大理¹・理研田原分子分光²・理研 BSI³)○細井晴子¹・田山亮¹・竹内佐年²・水野秀昭³・宮脇敦史³・田原太平²

【序】蛍光タンパク質 (GFP) を用いたイメージングは生命科学分野における最先端技術の一つである。GFP を遺伝子的に導入することによって、生きたままの細胞や組織を蛍光ラベルすることができる。特に近年、細胞表面だけでなく深部を高い空間分解能で観測でき、また試料の光劣化が少ないという利点のある二光子励起蛍光イメージングが広く行われており、二光子励起に適した GFP の開発に興味を持たれている。しかし、二光子励起された GFP の発光メカニズムはほとんど不明のままであり、基本的な情報である二光子励起に関わる電子励起状態についても調べられていない。

我々は以前、最もイメージングに利用される enhanced GFP (eGFP) の二光子吸収スペクトルを測定した。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、一光子励起により生成する S_1 電子励起状態の近傍に、隠れた電子励起状態 (S_2) が存在し、さらにこの S_2 状態は発色団構造に特有であることを指摘した [1]。

この帰属を支持する報告 [2]がある一方で、 S_2 電子励起状態ではなく S_1 振動励起状態と帰属する報告 [3]もある。本研究では、この S_2 状態の存在を明確にすることを目的とし、eGFP 発色団のモデルとなる有機化合物 4'-hydroxybenzylidene-2,3-dimethylimidazolinone (HBDI) アニオンフォームの二光子吸収スペクトルの溶媒依存性を検討したので報告する。

【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 [4] により測定した。 ω_1 に近赤外光 (1400 nm および 1750 nm)、 ω_2 に白色光 (450-750 nm) を用い、CCD によるマルチチャ

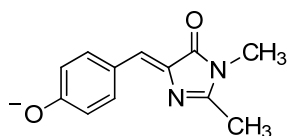


Figure 1 HBDI アニオンフォームの構造

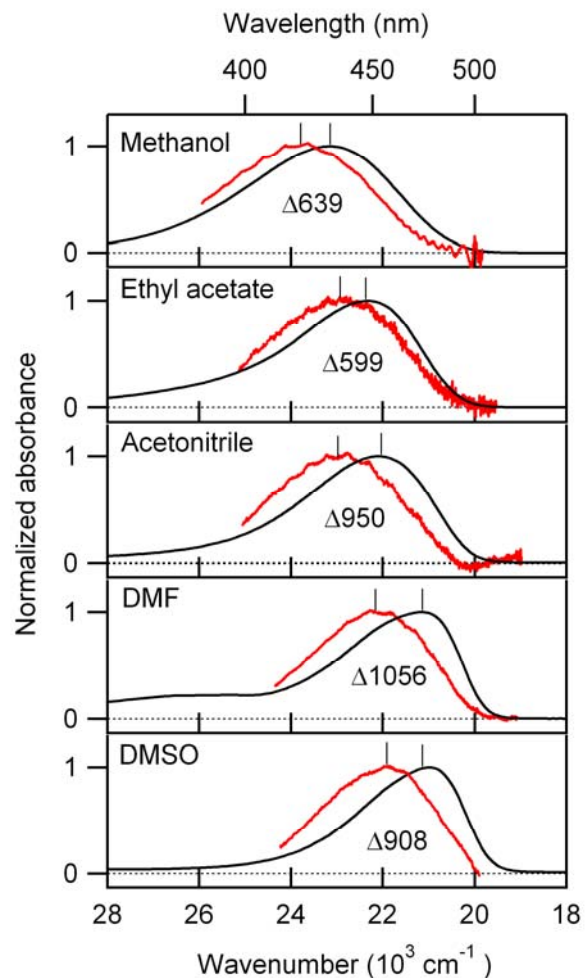


Figure 2 HBDI アニオンフォームの一光子 (黒), 及び二光子 (赤) 吸収スペクトル. 図中の数値は一光子と二光子吸収極大エネルギーシフトの大きさ (波数単位) を示す.

ンネル検出を行った。HBDI は文献 [5] に従って合成した。HBDI のアニオン溶液は、KOH を加えて調製した。アセトニトリル、酢酸エチル溶液にはさらに 18-crown-6 を加えた。

【結果と考察】eGFP をはじめとする蛍光タンパク質の発色団は、主鎖上の 3 つのアミノ酸から自己触媒的に生成する。その発色団には、チロシン由来のフェノール性水酸基の酸解離平衡がある。eGFP では、生理的条件下でアニオンフォーム（フェノレート）が優勢である。HBDI アニオンフォームは、eGFP 発色団の主鎖につながる部位を二つのメチル基に置換した構造を持つ (Fig. 1)。

Fig. 2 に酢酸エチル、メタノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、アセトニトリル、*N,N'*-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液における HBDI アニオンフォームの一光子、及び、二光子吸収スペクトルを示す。一光子と二光子吸収スペクトルの吸収極大ピークはどの溶媒中においても一致せず、シフトが観測された。これは、どの溶媒中でも一光子吸収では S_0-S_1 遷移が、二光子吸収では S_0-S_2 遷移が相対的に優勢に起こっていると考えることで理解できる。またシフトは溶媒によって $599-1056\text{ cm}^{-1}$ と大きく変化した。HBDI アニオンの振動スペクトルの溶媒依存性は小さい[6]ことから、二光子吸収バンドを S_1 振動励起状態に帰属することによって、観測された大きな溶媒シフトを説明することは困難である。従って、二光子吸収バンドは S_1 状態とは異なる電子状態である S_2 状態に由来すると考えられる。

ピークシフトの溶媒依存性は、溶媒による安定化の大きさが S_1 状態と S_2 状態とで異なることを意味している。 S_2 状態の電子的性質を考察するために、各溶媒中の S_0-S_2 遷移エネルギーを、 S_0-S_1 遷移エネルギーに対してプロットした図を Figure 3 に示す。 S_0-S_1 遷移エネルギーと S_0-S_2 遷移エネルギーにはよい相関がみられ、傾きが 0.8 の直線で近似された。HBDI アニオンフォームの S_0-S_1 遷移エネルギーは、主に溶媒の極性と酸性度に依存することが報告されている[7]。この結果から S_2 状態は、 S_1 状態と同様に溶媒の極性と酸性度に依存するが、 S_1 状態よりも小さい溶媒依存性を示す電子状態であると考えられる。

【参考文献】 [1] Hosoi, H.; Yamaguchi, S.; Mizuno, H.; Miyawaki, A.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 2761. [2] Olsen, S.; McKenzie, R. H. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *492*, 150. [3] Kamarchik, E.; Krylov, A. I. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 488. [4] Yamaguchi, S.; Tahara, T. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *376*, 237; Yamaguchi, S.; Tahara, T. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *390*, 136. [5] Voliani, V.; Bizzarri, R.; Nifosi, R.; Abbruzzetti, S.; Grandi, E.; Viappiani, C.; Beltram, F. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10714. [6] He, X.; Bell, A. F.; Tonge, P. J. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6056; Schellenberg, P.; Johnson, E.; Esposito, A. P.; Reid, P. J.; Parson, W. W. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5316. [7] Dong, J.; Solntsev, K. M.; Tolbert, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12038.

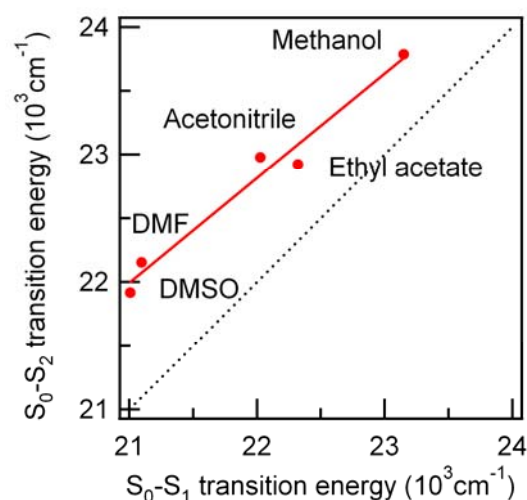


Figure 3 HBDI アニオンフォームの S_0-S_1 遷移エネルギーと S_0-S_2 遷移エネルギーの相関 (赤丸). 赤線は直線近似の結果を示す. 点線は傾き 1 の直線をアイガイドとして示す.