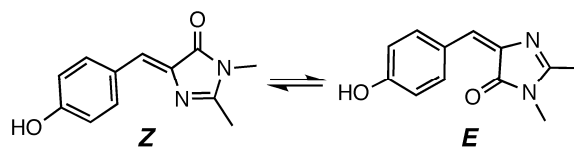


## ポリマー中に分散された GFP 発色団のモデル化合物の構造と光学過程の外部電場効果

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

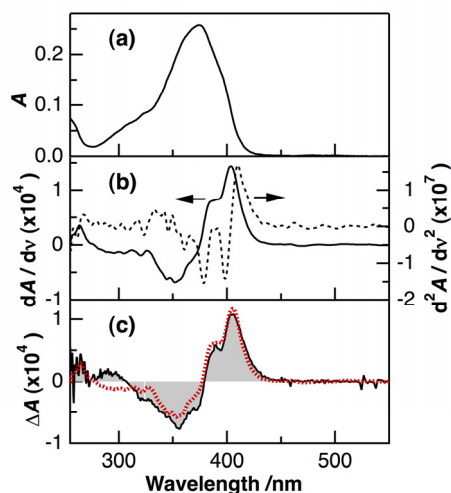
**【序】** 変異型蛍光タンパク質(GFP)を細胞内に発現させ、GFPの蛍光寿命を用いて細胞内の環境変化の計測を行っている<sup>1-5</sup>。GFPはオワンクラゲから単離された発光性のタンパク質であり、現在では吸収および蛍光波長が異なる様々な蛍光タンパク質が遺伝子工学によって作られ、細胞や生体組織の可視化に用いられている。光活性や活性酸素産生機能などを有する次世代蛍光タンパク質なども開発されている。これらの光学特性や光機能性の違いは、蛍光タンパク質内にある発色団の分子構造および発色団と周囲を取り囲むアミノ酸残基との静電的な相互作用に起因する。本講演では、蛍光タンパク質の発色団のモデル化合物である*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<sup>6</sup>。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ブされた 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<sup>6</sup>。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<sup>7</sup>。

**【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  $0.7 \text{ MV cm}^{-1}$ .

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<sup>9</sup>、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、 $0.9 \text{ MV cm}^{-1}$  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),  $1.1 \text{ MV cm}^{-1}$  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<sup>6</sup>。

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、 $10 \text{ MV cm}^{-1}$  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.

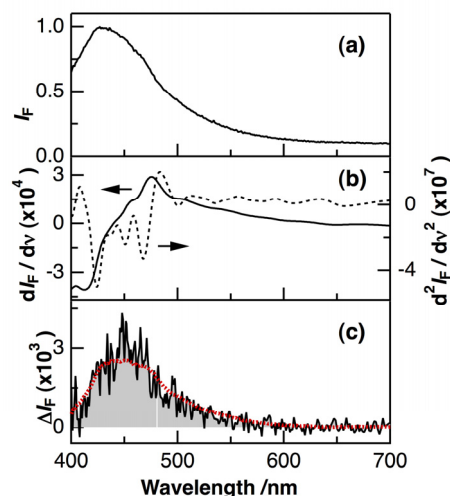


Fig. 2. (a) Fluorescence spectra of  $p$ -HBDI in a PMMA film, (b) the first (solid line) and second (dotted line) derivatives of the fluorescence spectrum, (c) electrophotoluminescence spectrum (shaded line) and the fitted one (dotted line). Excitation wavelength was 379 nm. The field strength was 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

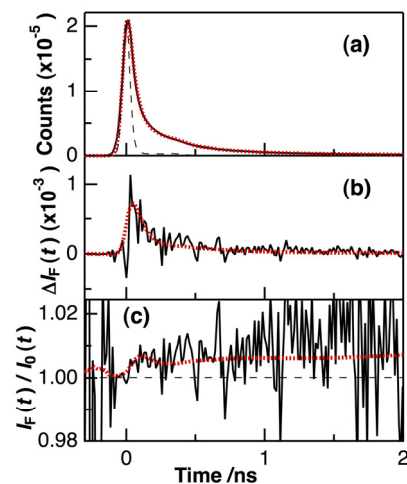


Fig. 3. (a) Fluorescence decay (solid line) of  $p$ -HBDI in a PMMA film at zero field, (b) the difference between the decays at  $1.1 \text{ MV cm}^{-1}$  and at zero field (solid line), (c) the ratio of the decay at  $1.1 \text{ MV cm}^{-1}$  relative to that at zero field (solid line). The fitted 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.