

## 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<sup>1</sup>・理研田原分子分光<sup>2</sup>・理研 BSI<sup>3</sup>)○細井晴子<sup>1</sup>・田山亮<sup>1</sup>・竹内佐年<sup>2</sup>・水野秀昭<sup>3</sup>・宮脇敦史<sup>3</sup>・田原太平<sup>2</sup>

【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。 $\omega_1$  に近赤外光 (1400 nm および 1750 nm)、 $\omega_2$  に白色光 (450-750 nm) を用い、CCD によるマルチチャ

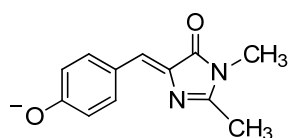


Figure 1 HBDI アニオンフォームの構造

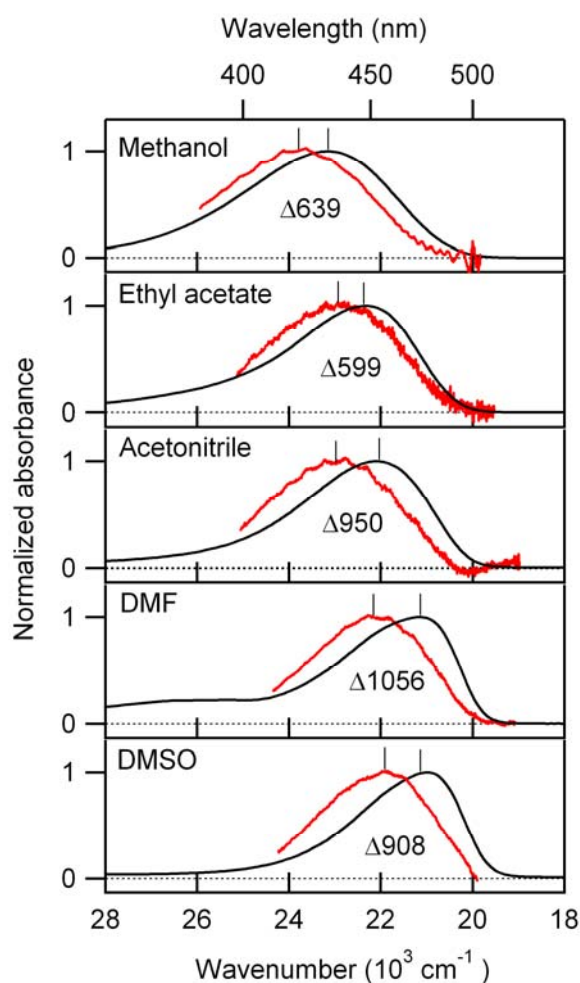


Figure 2 HBDI アニオンフォームの一光子 (黒), 及び二光子 (赤) 吸収スペクトル. 図中の数値は一光子と二光子吸収極大エネルギーシフトの大きさ (波数単位) を示す.

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.

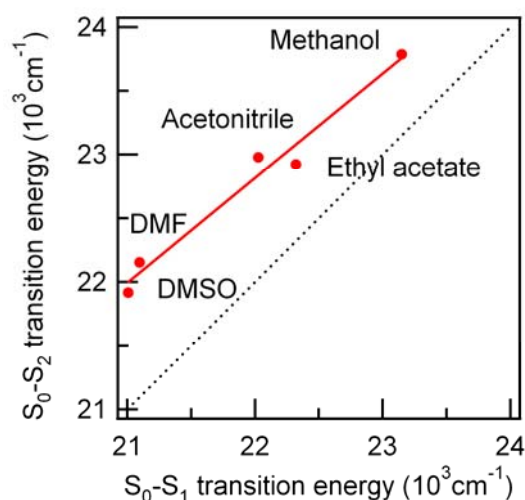


Figure 3 HBDI アニオンフォームの  $S_0-S_1$  遷移エネルギーと  $S_0-S_2$  遷移エネルギーの相関 (赤丸). 赤線は直線近似の結果を示す. 点線は傾き 1 の直線をアイガイドとして示す.