

2B12

数 K における単一タンパク質分光を用いた 可視蛍光タンパク質内のプロトン移動を伴った構造変化の観測

○藤原正規¹、平野充遥¹、渡辺正勝²、伊関峰生³、藤芳 暁¹、松下道雄¹

(¹東工大院・理工、²光産業創成大・光バイオ、³東邦大・薬)

緑色蛍光タンパク質(GFP)は生体蛍光マーカーとして高い汎用性が示されている一方、複雑な発光過程を持つ[1]。この発光過程の理解は低温における分光研究によって大きく前進した[2, 3]。GFP には中性状態(A)と脱プロトン化状態(B)の二つの安定状態が存在する。温度 1.2 K において B の吸収極大 472 nm を励起すると 482 nm に蛍光極大が出現する。一方、A の吸収極大 429 nm を励起すると 440 - 460 nm に弱い蛍光帯、501 nm に強い蛍光極大が出現する。これは図 1(a)のように A が A* に電子励起された後(“*”は電子励起状態を表す)、励起状態プロトン移動(ESPT)が起き、A*→I* へ変化する(I は中間状態を表す)。その後 501 nm の蛍光を放出して I*→I へと脱励起すると解釈されている[2]。この解釈と GFP の立体構造解析から提案された GFP 発色団と周囲のアミノ酸側鎖の相対配置を図 1(b)に示す[4]。A↔I 間では水分子 W22、セリン(S)205 を経由して、発色団とグルタミン酸(E)222 の間でプロトンが移動する。一方、I↔B 間ではスレオニン(T)203 側鎖の回転を主とした構造変化が起きるとされる。しかし、このような構造変化が実際に実現されているかを直接観測するのは困難である。これは通常の分光測定の場合、光励起と同期しない構造変化が熱運動と集団平均の効果によって埋もれてしまうからである。構造変化を直接観測するには温度数 K に冷却して熱運動を抑制し、タンパク質一個の発光を時間追跡する方法が有効である。そこで我々は GFP の一分子測定から A, B 状態間の構造変化の観測を目指した。

GFP の A, B 状態間の構造変化を観測するには、各状態に対応するスペクトルが区別できなければならない。ここで、A, B 状態間の吸収極大の差(40 nm)は、I, B 状態間の蛍光極大の差(20 nm)の二倍大きい。このように吸収極大の差が大きいと、各状態の吸収スペクトルの線幅と比較しても十分に状態を区別することができる。従って我々は蛍光スペクトルではなく、吸収に相当する発光励起スペクトルから A, B 状態を区別すること考えた。ただし、B 状態のストークスシフトは 10 nm と小さく、吸収帯の長波長端まで測定ができない。そこで我々は GFP に蛍光色素 Alexa Fluor647(A647)を標識した。図 2 のように GFP の吸収波長域である 400 ~ 500 nm の領域を光励起すると、発色団が蛍光を放出する代わりに Förster 型共鳴エネルギー移動(FRET)によって励起エネルギーが A647 に移動してから蛍光を放つ。A647 の蛍光極大は 680 nm のため、実効的なストークスシフトを 200 nm に拡大することができ、発光励起スペクトルの吸収の長波長端まで測定可能となる。

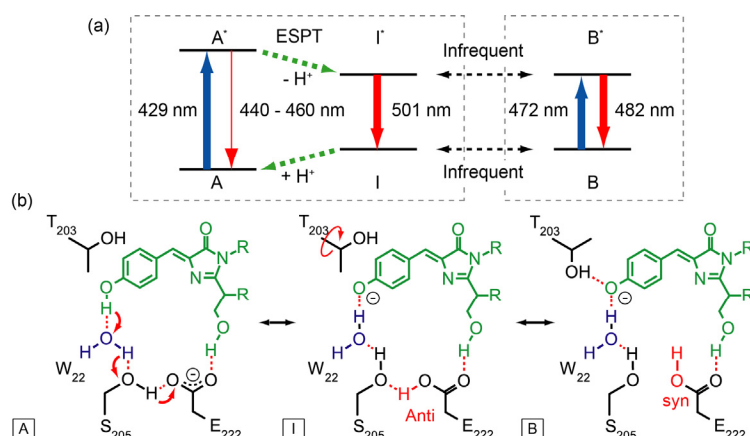


図 1(a): GFP の三状態エネルギーダイアグラム。図中の波長は温度 1.2 K での測定値[3]を引用。(b): 三状態に対応した発色団及びアミノ酸側鎖の配置。赤点線は水素結合を表す。文献[4]を参照して作図。

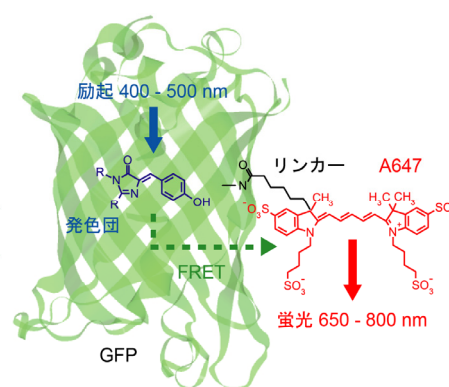


図 2: 標識した蛍光色素への Förster 型共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した単一 GFP の発光励起スペクトル測定。

低温、単一 GFP の発光励起スペクトル測定には二つの課題を解決する必要があった。一つは GFP の吸収波長から A647 の蛍光波長にいたる 400 ~ 800 nm の波長域において色収差が無視できる低温用光学系が必要であった。これは我々が開発した一体成形反射対物レンズ[5]を中心とした低温用共焦点顕微鏡によって解決した[6]。もう一つは単一 GFP の蛍光測定のため、回折限界のスポットに 100 W/cm² 以上の強度密度を持つ可視波長可変光源が必要であった。これはスーパーコンティニューム光(SC 光)と和周波発生(SFG)を利用した波長可変光源を開発することで解決した。本光源の概略図を図 3(a)に示す。フェムト秒パルスレーザーから射出した波長 $\lambda = 785$ nm の基本光の一部をフォトニック結晶ファイバー(PCF)に入射し、 $\lambda = 500 \sim 1600$ nm まで連続的に強度を持つ SC 光を発生させた。SC 光と残りの基本光をノッチフィルター上で同軸に揃えた後、BBO 結晶に集光し、SFG を起こした。この SFG 光をシングルモードファイバーで単一の空間モードに整形した後、共焦点顕微鏡へ導入した。SFG 光の波長掃引は位相整合条件を利用し、BBO 結晶の回転によって実現した。ただし、結晶の回転によって生じる基本光と SC 光の光路長のずれ、及び SFG 光の光路のずれは、それぞれ光学遅延路と結晶直後の色消しレンズの位置調整で補正した。また、波長に依らず強度を一定に保つため可変 ND フィルター(VND)を用いて調整した。これら 4 つの光学部品をそれぞれ電動ステージに配置し、SFG 光の波長ごとに自動制御した。図 3(b)にシングルモードファイバー射出直後の SFG 光の強度を示す。SFG 光の強度が波長に対して一定になるように VND で調整した結果、波長 402.5 nm ~ 507.5 nm の範囲で一定の強度 4.5 μ W を実現した。この強度を試料基板上的強度密度に換算すると 100 W/cm² 以上になる。図 3(c)に SFG 光スペクトルの半値全幅(FWHM)を示す。FWHM は波長に対してほぼ単調増加し、分解能 2.0 ~ 3.5 nm で波長掃引が実現できた。

図 4 に温度 1.5 K で測定した単一 GFP の発光励起スペクトルの時間変化を二例示す。図 4(a)は測定開始後 6 分まで 430 nm にピーク波長を持つスペクトルが、次の瞬間にスペクトル全体が 70 nm 長波長側に移動した。この変化は A* \rightarrow I*への ESPT からアミノ酸側鎖の構造変化が生じ、B*または B への遷移の瞬間を捉えたものと考えられる。一方、図 4(b)は測定開始後 470 nm のピークを持つスペクトルが数分間隔で発光と消光を繰り返した。この過程の中で、測定 12 分目にスペクトル全体が 10 nm 長波長に移動した後、15 分目には再び 15 nm 短波長に移動した。この変化は A、B 状態間の吸収極大の差と比較して小さく、A \leftrightarrow B 間の構造変化とは考えにくい。おそらく、B 状態における発色団周囲の水素結合ネットワークが少なくとも二通り存在し、その間の移動が観測できたものと考えている。

[1] R. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509 (1998). [2] M. Chattaraj, et al., *PNAS*, **93**, 8362 (1996). [3] T. M. H. Creemers, et al., *Nature Struct. Biol.*, **6**, 557 (1999). [4] K. Brejc, et al., *PNAS*, **94**, 2306 (1997). [5] M. Fujiwara, et al., *J. Opt. Soc. Am. B*, **26**, 1295 (2009). [6] S. Fujiyoshi, et al., *PRL*, **106**, 078101 (2011).

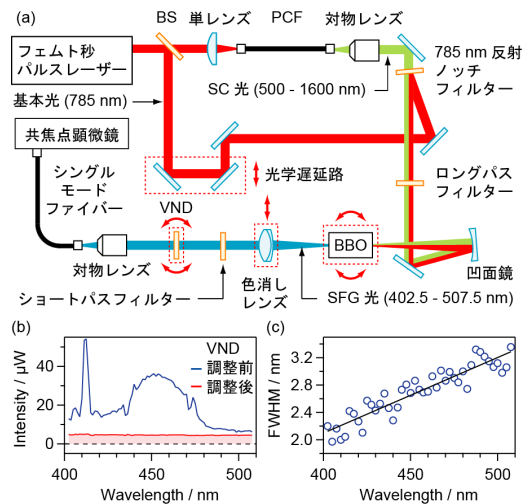


図 3(a): 可視波長可変光源。赤点線で囲まれた四つの光学部品の位置を自動制御することで、強度を一定に保つまま波長 400 ~ 500 nm まで波長掃引を可能にした。(b) & (c): シングルモードファイバー射出後の和周波光の強度とスペクトル線幅。

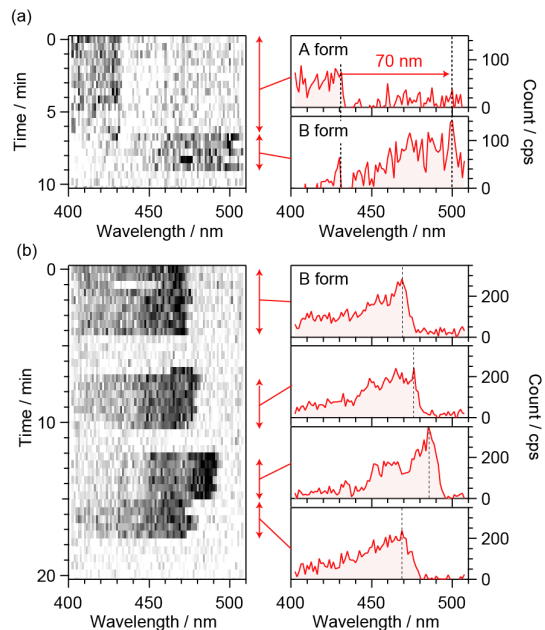


図 4(a) & (b): 温度 1.5 K で測定した単一 GFP の発光励起スペクトルの測定例。各矢印の領域をそれぞれ平均したスペクトル右側に示す。