

2P092

二光子吸収分光法による青緑色蛍光タンパク質 eCFP の構造不均一性の観測

(東邦大理¹・理研田原分子分光²・理研光量子工学³)

○細井 晴子¹・田山 亮¹・高見 朋代¹・竹内 佐年^{2,3}・田原 太平^{2,3}

【序】 蛍光タンパク質は生きたままの細胞や組織のイメージングにおいて重要なツールである。観察結果の適切な解釈や新規蛍光タンパク質の開発には、その基礎となる電子状態や発光機構に関する知見が不可欠である。本研究で対象とするのは FRET ドナーとして最も広く利用されている青緑色蛍光タンパク質 cyan fluorescent protein (CFP) である。CFP の一光子吸収 (OPA) スペクトルには 435 nm と 451 nm に 2 つのピークが現れるが、その起源は明らかでない。Fig. 1 に示すように 3 つの異なる機構、すなわち、(a) 独立した 2 種類の $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移、(b) 2 種類の異なる電子励起状態への遷移 ($S_1 \leftarrow S_0$ 遷移と $S_2 \leftarrow S_0$ 遷移)、(c) 2 種類の異なる振動励起 S_1 状態への遷移、が提案されており、これらの機構をめぐる議論が続いている。本発表では CFP の OPA スペクトルの 2 つのピークの起源を明らかにすることを目的として、CFP の 1 つである enhanced CFP (eCFP) と発色団モデル化合物 cCFP (Fig. 2b) の二光子吸収 (TPA) スペクトル測定を行った結果を報告する。

【実験】 TPA スペクトルはマルチプレックス二光子吸収法 [1] により測定した。 ω_1 に近赤外光 (1300 nm、1397 nm および 1750 nm)、 ω_2 に白色光 (450-750 nm) を用い、CCD によるマルチチャンネル検出を行った。

【結果と考察】 cCFP の OPA スペクトルはメタノール中、DMSO 中ともに単一のピークを示した。また各 OPA スペクトルは、対応する TPA スペクトルとよく一致した (Fig. 3a, b)。この結果は、cCFP は一光子励起でも二光子励起でも同じ S_1 状態に励起され、観測波長領域内の他の電子励起状態の寄与は小さいことを意味している。cCFP の量子化学計算においても $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移が他の遷移に比べて十分に大きな振動子強度をもち、実験結果と一致する結果が得られた。一方、eCFP の OPA スペク

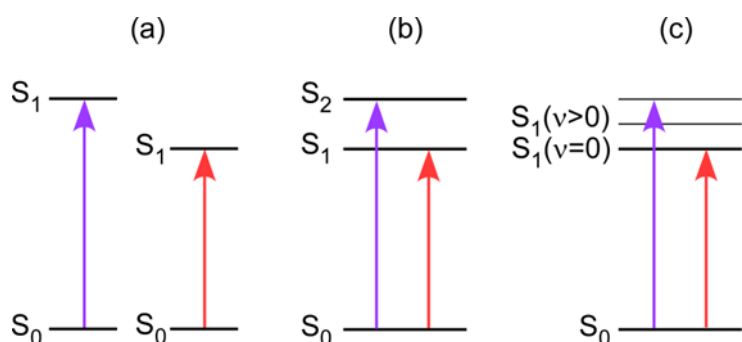


Figure 1. CFP の吸収スペクトルの二つのピークの起源に関する 3 つの異なる機構。(a) 独立した 2 種の $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移。(b) 2 種の電子励起状態への遷移 ($S_1 \leftarrow S_0$ 遷移と $S_2 \leftarrow S_0$ 遷移)。(c) 2 種の異なる振動励起 S_1 状態への遷移。

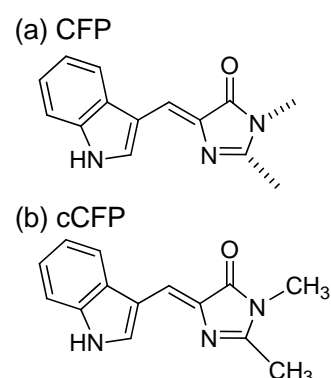


Figure 2. (a) CFP の発色団と (b) 発色団モデル化合物 cCFP の構造。

トルには2つのピークが観測される (Fig. 3c 黒線) が、eCFPはcCFPと同じ構造の発色団をもちcCFPとよく似た電子構造をもつと考えられるため、eCFPの2つのOPAピークが異なる電子励起状態に由来するとは考えにくい。従って、2つのピークが $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移と $S_2 \leftarrow S_0$ 遷移に由来するというFig. 1(b)の機構は除外できるといえる。

次に、2つの異なる振動励起 S_1 状態への遷移によって2つのOPAピークが生じるという機構 (Fig. 1c) について検討した。この場合、eCFPの2つのOPAピークは $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移におけるフランク・コンドン因子 (振動構造) を反映しているといえる。通常、対応するTPAスペクトルも同じフランク・コンドン因子を反映するため、OPAとTPAスペクトルは同じ形状を示すと期待される。しかし、Fig. 3cに示す通り、eCFPのOPAとTPAスペクトルは一致しないことが分かった。この測定結果は、2つの異なる振動励起 S_1 状態への遷移を考えることでは説明することができない。さらに、発色団周辺アミノ酸であるY145またはH148を置換した一部の一置換変異体は、野生型で見られた2つのピークを有するOPAスペクトルとは明らかに異なる形状を示すことが分かった (図省略)。周辺アミノ酸の置換により発色団の振動構造が大きく変化することは考えにくいいため、この結果も2つの異なる振動励起 S_1 状態への遷移の考え方では説明することができない。

これらに対し、独立した2種類の $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移 (Fig. 1a) を考えることにより、これまでの観測結果を矛盾なく説明することができる。つまり、発色団の置かれた環境の違いによって2種類のeCFPが生成し、それぞれの $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移エネルギーが異なる (435 nmと451 nm) ため、それらが2つのOPAピークとして現れると理解することができる。また、一置換変異体で観測されたOPAスペクトル形状の変化は、周辺アミノ酸の置換により発色団環境が変化し、その結果、2つの $S_1 \leftarrow S_0$ 遷移エネルギーの差が変化するためと考えられる。さらに、eCFPのOPAとTPAスペクトルの違いは、2つのピーク波長間で一光子吸収確率の比と二光子吸収確率の比が異なるためと捉えることができる。

【結論】eCFPとその発色団モデル化合物の二光子吸収スペクトルから、eCFPのOPAスペクトルに見られる2つのピークは発色団周辺の環境が異なる2種類のeCFPの存在に起因することが示唆された。

【参考文献】 [1] H. Hosoi, S. Yamaguchi, H. Mizuno, A. Miyawaki, T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 2761; H. Hosoi, R. Tayama, S. Takeuchi, T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* 630 (2015) 32.

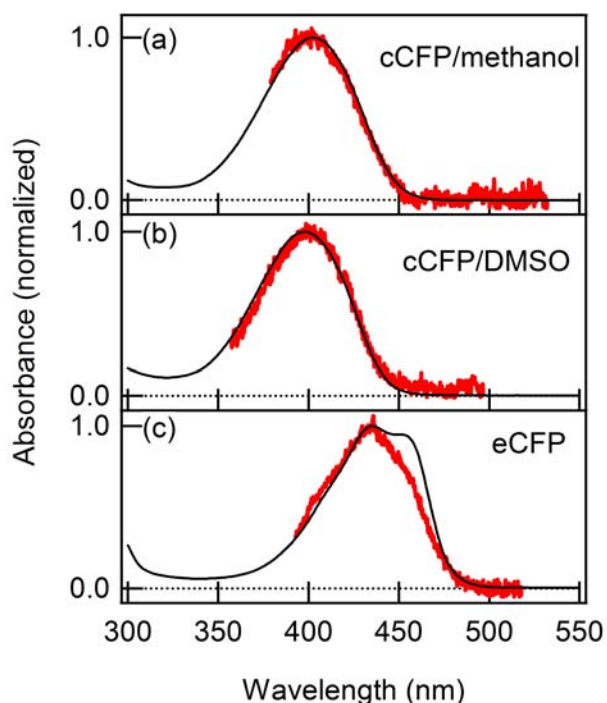


Figure 3. 一光子 (OPA)、及び二光子 (TPA) 吸収スペクトル。cCFPの (a) メタノール溶液と (b) DMSO 溶液、および(c) eCFP。