

3P090

緑色蛍光タンパク質 GFP 発色団の励起状態失活過程におけるタンパク質・溶媒環境の役割 (¹理研・田原分子分光、²理研・光量子工学領域、³東邦大・理)

○倉持光^{1,2}、細井晴子³、藤澤知績¹、竹内佐年^{1,2}、田原太平^{1,2}

Role of protein/solvent environment on the deactivation process of green fluorescent protein chromophore in the excited state

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN¹, Ultrafast Spectroscopy Research Team, RIKEN Center for Advanced Photonics (RAP)², Department of Biomolecular Science, Faculty of Sciences, Toho University³)

Hikaru Kuramochi^{1,2}, Haruko Hosoi³, Tomotsumi Fujisawa¹, Satoshi Takeuchi^{1,2}, and Tahei Tahara^{1,2}

Green Fluorescent Protein (GFP)は生体イメージングにおいて欠かすことのできない蛍光タンパク質である。近紫外光吸収に伴い GFP の発色団は~10 ps の時定数をもって励起状態プロトン移動 (Excited-State Proton Transfer, ESPT)を起こし、フェノール部位のプロトンがタンパク質中にて形成される水素結合ネットワークを通じてグルタミン酸 (E222) へと渡される。結果として生成する脱プロトン化したアニオン型の発色団から緑色(~510 nm)の蛍光が生じる。一方で溶液中における GFP 発色団モデル化合物 HBDI

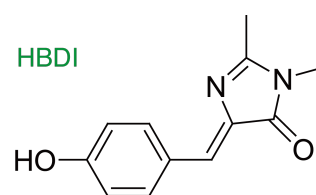


図 1. GFP 発色団モデル化合物、(cis-)HBDI の構造。

(4'-hydroxybenzylidene-2,3-dimethyl-imidazolinone, 図 1) の励起状態失活過程はタンパク質中のそれとは大きく異なり、光励起後わずか 1 ps 以内に内部転換過程を通じ電子基底状態に緩和する[1,2]。励起状態において進行する cis-trans 異性化がこの超高速失活過程の要因であることが理論的研究などから示唆されている。またタンパク質・溶媒環境がこの失活過程に大きな影響を与えると考えられているが、その実験的な検証、特に構造学的知見は乏しい。そこで我々はフェムト秒時間分解インパルスラマン分光法 (Time-Resolved Impulsive Stimulated Raman Scattering, TR-ISRS [3])を用い溶液中における HBDI のフェムト秒構造ダイナミクスの観測を行った。また以前我々が報告した野生型 GFP の励起状態ラマンスペクトル [4]との比較を行い、タンパク質環境が励起状態ダイナミクスに及ぼす役割について検討した。

TR-ISRS ではまず光反応を開始させるための励起光 (390 nm, 90 fs) により電子励起状態を生成させる。任意の遅延時間 ΔT の後、HBDI の誘導放出遷移 ($S_1 \rightarrow S_0$) に共鳴する可視極短パルス (520-700 nm, 7 fs) を照射し、インパルス誘導ラマン散乱過程を利用し電子励起状態に核波束運動を誘起した。この核波束運動を時間分解吸収信号のビート成分の形でプローブ光 (520-700 nm, 7 fs) を用いて検出し、励起状態の分子振動を時間領域で観測した。

まず図 2 に野生型 GFP と溶液 (メタノール) 中における HBDI の基底状態の誘導ラマンスペクトルを示す。多くのバンドが広い周波数領域に渡って両者に共通して観測されているが、 $>1500 \text{ cm}^{-1}$ にて観測される C=C, C=N, C=O 伸縮振動といった分子の骨格構造を鋭敏に反映するようなバンドに大きなピーク波数の違いは見られない。この結果はタンパク質・溶液中において発色団の骨格構造は基底状態では大きく異なることを示唆する。

次に TR-ISRS を用いたメタノール中における HBDI の励起状態構造ダイナミクス測定の結果を示す(図 3)。光励起後各遅延時間における励起状態での核波束運動に伴うビート信号(a)を測定し、これら時間領域信号をフーリエ変換することで周波数領域の振動スペクトル(b)を得た。観測された振動バンドは HBDI 励起状態の寿命に対応して ~ 0.4 ps の時定数で減衰するが、この間に大きなスペクトル形状の変化、波数のシフトは観測されない。この結果は観測されたラマンスペクトルは励起状態の準安定構造に由来することを示唆する。図 3c に観測された

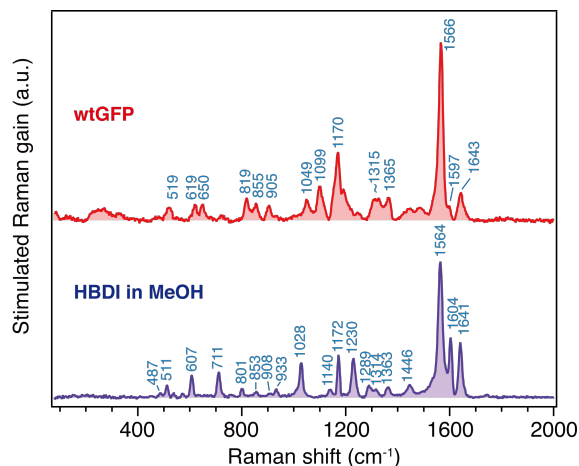


図 2. 野生型 GFP と溶液中における HBDI の基底状態ラマンスペクトル($\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm).

メタノール中における HBDI 励起状態のラマンスペクトルと野生型 GFP の励起状態ラマンスペクトルとの比較を示す。特筆すべきことに両スペクトルは共鳴条件はほぼ同じであるにもかかわらず、強度パターンと波数の両方において互いに大きく異なっている。基底状態ラマンスペクトルの高い類似性を考慮すると、この結果は光励起後、励起状態の準安定状態に至るまでの非常に短い時間スケールで両者の構造の違いが現れることを示唆する。発表ではアニオン型 HBDI の測定結果も含め、野生型 GFP と溶液中における HBDI の励起状態ダイナミクスについて詳細に議論する。

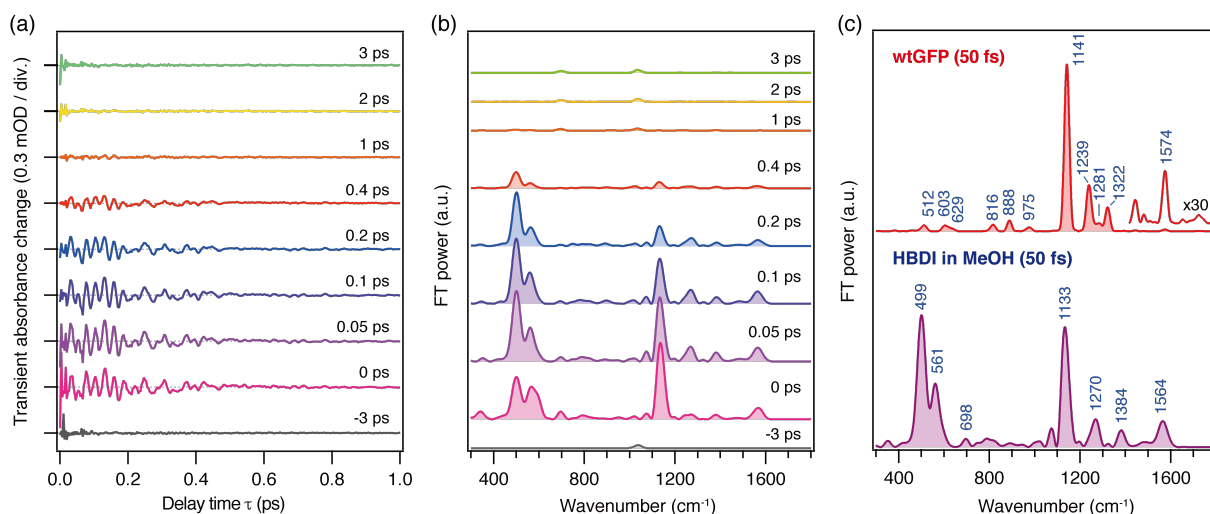


図 3. (a) 光励起後各遅延時刻 ΔT において得られた TR-ISRS 信号のビート成分. (b) TR-ISRS 信号のビート成分のフーリエ変換パワースペクトル. (c) 野生型 GFP と溶液中における HBDI の励起状態ラマンスペクトルの比較.

【参考文献】

- [1] D. Mandal, T. Tahara, S. R. Meech, *J. Phys. Chem. B* **108**, 1102-1108 (2003).
- [2] M. Vengris, I. H. M. van Stokkum, X. He, A. F. Bell, P. J. Tonge, R. van Grondelle, D. S. Larsen, *J. Phys. Chem. A* **108**, 4587-4598 (2004).
- [3] H. Kuramochi, S. Takeuchi, T. Tahara, *Rev. Sci. Instrum.* **87**, 043107 (2016).
- [4] T. Fujisawa, H. Kuramochi, H. Hosoi, S. Takeuchi, T. Tahara, *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3942-3945 (2016).