

蛍光タンパク質rb-Akaneにおける発色団の構造変化と発光特性

¹北里大院理, ²北里大理
○宮永峻広¹, 笠原康利², 石川春樹²

Structural Change and Emission Property of the Chromophore of the Fluorescent Protein rb-Akane

○Takahiro Miyanaga¹, Yasutoshi Kasahara², Haruki Ishikawa²

¹Division of Molecular Sciences, Graduate School of Science, Kitasato University, Japan

²Department of Chemistry, School of Science, Kitasato University, Japan

【Abstract】 Green Fluorescent Protein (GFP) and its variants play indispensable role in biological imaging and analysis. Many GFP-like proteins from corals display green-to-red photoconvertibility. rb-Akane, one of GFP-like proteins, is known to have the green fluorescent chromophore and the *cis*- or *trans*-form red chromophore in nature. In addition, the relative populations between them change with pressure. In the present study, to reveal the relation between the structures of these chromophores and their emission properties, we synthesize the chromophore of the fluorescent protein rb-Akane and measure fluorescence spectra under various condition. We also have simulated the structure and the vibration frequency of the *cis*- and *trans*-form chromophore. The *cis*-form is found to be more stable than the *trans*-form by 21 kJ/mol. This is due to the formation of the intramolecular N_B⋯H hydrogen bond. The *trans*-form is planar structure but *cis*-form is not. This difference may be related to the change in calculated UV-VIS spectra.

【序】 1960年代に緑色蛍光タンパク質 (GFP : Green Fluorescent Protein) がオワンクラゲから単離されて以来, 緑色と赤色の両方の蛍光を発する GFPlike タンパク質と呼ばれる Kaede や DsRed などサンゴから単離されており, 生体分子をラベルして可視化する技術は広く普及している。一方で, pH や圧力, 溶媒の違いによるタンパク質中における発色団の構造変化や発光特性についても研究が進められている。GFPlike タンパク質である rb-Akane は紫外光を当てることで Fig. 1 に示すような光化学転換によって緑色蛍光発色団から, *trans* 体と *cis* 体の二種類の赤色蛍光発色団を生成すると考えられ, さらに圧力によって *cis-trans* の存在比率や体積が変化することが分かっている[1]. そこで本研究では, rb-Akane が蛍光を発する要因である発色団を合成し, 固体や様々な溶液中における各種測定を行い, 構造変化や発光特性を解明することを目的とした。

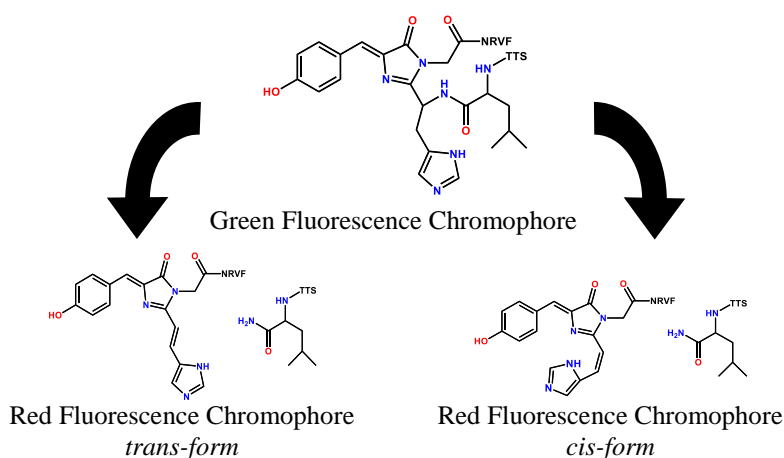
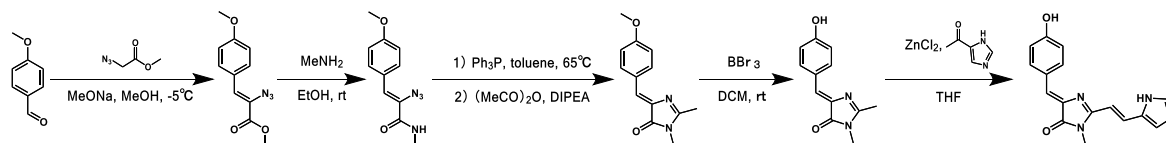


Fig. 1. Hypothesis for the green-to-red conversion of GFP-like proteins

【方法 (実験・理論)】 Scheme 1 [2, 3] に示すような経路で発色団の合成を行った。また、その化合物の *trans* 体, *cis* 体について B3LYP/6-31G(d,p) レベルの DFT 及び TD-DFT 計算による構造最適化及び基準振動解析を行った。



Scheme 1 Synthesis of GFP-like proteins chromophore

【結果・考察】 発色団における 3 つの環構造を Fig. 2 上部のように ring A-C とした。DFT 計算によって得られた最適化構造もその下に示した。*trans* 体では三つの環構造がすべて同一平面上に存在するのに対して *cis* 体では各環構造がねじれの関係にあることがわかった。ring A と ring B では約 20° ねじれ, ring B と ring C ではその半分程度のねじれがある。さらにこのねじれによって N_B と近接水素原子との原子間距離に違いが生じている。*trans* 体では, C_A に結合している水素原子との距離が 2.366 Å, β 水素との距離が 2.595 Å であるのに対して, *cis* 体においては C_A の水素が 2.519 Å, N_C の水素が 1.822 Å となっており, *cis* 体の方が N_B と近接水素原子との距離が短いといえる。*cis* 体の方がエネルギー的に 21 kJ/mol 安定という結果が出たのは, 上記のように *trans* 体に比べて N_B と近接水素原子との距離が短くなり分子内水素結合がより強く働いたからだと考えられる。

また, Fig. 3 に TD-DFT 計算によって得られた可視紫外吸収スペクトルを示す。450 nm 付近のピークが *trans* 体の方が強度が大きいことや, 230 nm 付近に *cis* 体のみピークが現れていることなど, 構造によるスペクトルの違いが生じていることがわかる。

講演では, 合成した発色団の実測のスペクトルと量子化学計算の結果を比較しながら, スペクトルの違いと構造変化について発表する。

【参考文献】

- [1] A. Maeno *et al.* *High Pressure Research* **37**, 224-232 (2017).
- [2] M. Baranov *et al.* *Chem. Commun.* **49**, 5778-5780 (2013).
- [3] W. Chuang *et al.* *Chem. Commun.* 6928-6984 (2009).

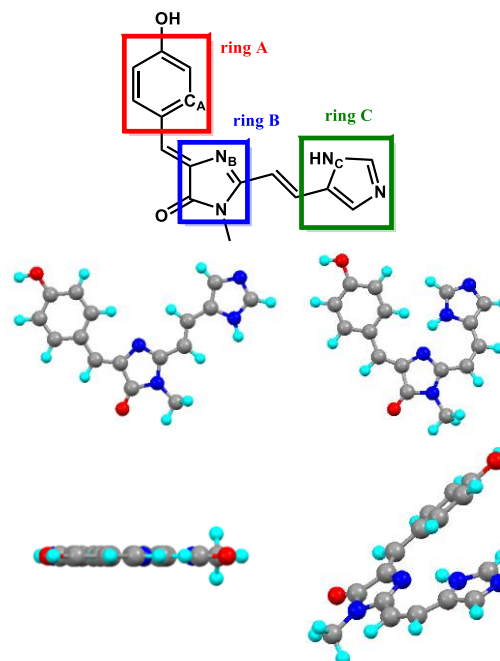


Fig. 2. Structure of chromophore; *trans*-form (left) and *cis*-form (right)

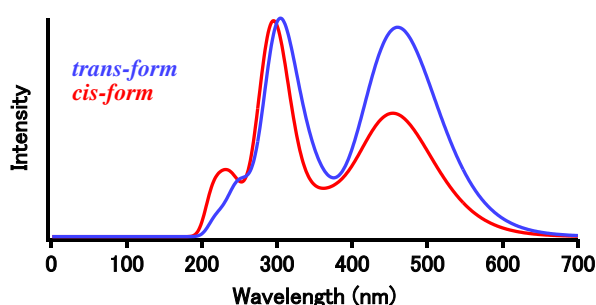


Fig. 3. Calculated UV-VIS spectrum