

赤外超解像原理を利用した蛍光タンパク質発色団部位の 赤外スペクトル測定

岡山理大・理

○高橋広奈, 三宅智也, 大上達也, 酒井誠

IR spectrum of fluorescent protein chromosphere by transient fluorescence-detected resonance IR spectroscopy

○Hirona Takahashi, Tomoya Miyake, Tatsuya Oue, Makoto Sakai

Faculty of Science, Okayama University of Science

【Abstract】 It is known that chromospheres in fluorescent protein absorb or emit different wavelength depending on the interaction with amino acids around chromospheres. IR spectroscopy is one of powerful tools for the investigation of structure of biological molecules including proteins. However, there are too many amino acid around chromospheres to detect IR absorption of chromospheres selectively. In addition, it is difficult to measure IR spectra of biological molecules in aqueous solution because of strong IR absorption of water. In this study, we have developed a novel transient fluorescence-detected resonance IR spectroscopy, which detect IR absorption of fluorescent molecules selectively. We have succeeded in measuring the IR spectrum of flavin mononucleotide (FMN) in aqueous solution. The IR spectrum of FMN is compared with the spectrum measured in sound Raman spectroscopy, and the similarity of those spectra will be discussed. In the presentation, we will report the IR spectrum of fluorescent protein chromospheres in aqueous solution.

【序】 蛍光タンパク質の中には、類似の発色団を持ちながら、その吸収や蛍光波長が異なるものが存在する。そのような波長の変化は、蛍光タンパク質発色団と周囲のアミノ酸の相互作用が異なるためと考えられている。しかしながら、発色団の構造や周囲との相互作用が実際にどのようなになっているかを分光学的に明らかにした研究は多くない。分子構造に敏感な分光法には赤外分光法があるが、発色団の周囲には多数のアミノ酸が存在するため、発色団部位のみを選択的に観測することは容易ではない。さらに、生体試料の観測に用いられる水溶液中での測定は、溶媒の水が赤外光を吸収してしまうため困難である。そこで我々は、過渡蛍光検出赤外 (TFD-IR) 分光法と赤外超解像原理を利用することで、水溶液中で蛍光タンパク質の発色団部位のみの赤外スペクトルを測定可能な装置を開発した。TFD-IR 法 (Fig. 1) では、特定の赤外光により振動励起した分子のみを可視光で選択的に電子励起することで、 S_1 状態から発生する蛍光 (過渡蛍光) を検出する[1]。過渡蛍光強度をモニターしながら赤外光を波長掃引することで、赤外スペクトルに相当する情報が得られる。蛍光タンパク質に置き換えると、可視光を照射した場合、発色団部位からは蛍光が発生するが、周囲のアミノ酸からは発生しない。そのため、TFD-IR 法を利用すると発色団部位のみの赤外スペクトルが得られると考えた。また、可視光と赤外光の重なった部分からのみ過渡蛍光が発生するので、2つ

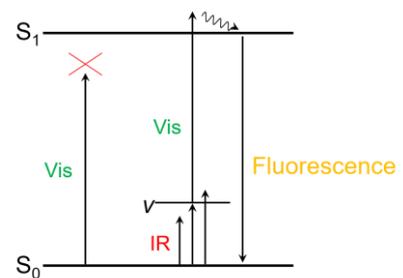


Fig. 1. Principle of transient fluorescence detected IR (TFD-IR) spectroscopy.

のレーザー光を集光することで、赤外の回折限界を突破した可視光と同等の回折限界を達成でき、水による赤外光の吸収に阻害されることなく、測定が可能になる。

【実験】 励起光源の可視光と赤外光を発生するために、再生増幅器によって増幅させたピコ秒レーザーシステム（パルス幅：2 ps）を採用した。赤外光は 5500 ~ 9000 nm まで波長を可変できるようにした。赤外光と可視光を同軸・同方向から入射し、反射対物レンズで CaF₂ セルの表面に集光させた。発生した過渡蛍光は入射に用いたのと同じ反射対物レンズで集光し、CCD カメラで過渡蛍光を画像として検出した。赤外スペクトルは検出した蛍光強度を赤外波長に対してプロットすることで構築した。

【結果・考察】 本研究では、まず、タンパク質補酵素であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) について、水溶液中での赤外スペクトル測定を試みた。Fig. 2 は FMN の蛍光画像である。可視光のみを照射した場合、蛍光は観測されない。一方、可視と赤外光 (1598 cm⁻¹) を同時に照射すると Fig.

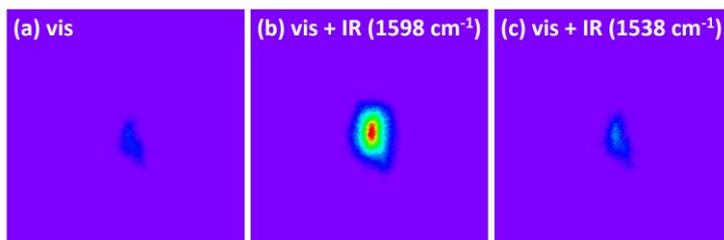


Fig. 2. Fluorescence image of FMN (a) without and with (b,c) IR irradiation (ν_{vis} : 527 nm, ν_{IR} : (b) 1598 cm⁻¹, (c) 1538 cm⁻¹).

2(b)に示すように強い蛍光が発生する。これは、赤外振動と分子振動が一致しているため、過渡蛍光が発生したからである。一方、赤外光が 1538 cm⁻¹ (Fig. 2(c)) では蛍光が殆ど観測されないが、これは分子による赤外光の吸収が殆ど起こっていないためである。観測された蛍光はスポットであるが、これは反射対物レンズの焦点からの蛍光のみをモニターしているためである。Fig. 3 は過渡蛍光強度の赤外波長依存性を示したもので、赤外スペクトルに相当する。スペクトルを見ると、水による吸収が存在する赤外波長域でもバンドが観測できていることが分かる。得られたスペクトルをラマンスペクトル[2]と比較する (Fig. 3) と、振動情報が一致しているため、本研究で開発した手法で赤外スペクトルに相当するものを測定できると結論した。

Fig. 4 には、同様の手法で水溶液中で蛍光タンパク質の 1 つである phiYFP を測定した結果を示す。図にはいくつかの明瞭なピークが観測されており、この結果を発色団モデル分子のラマンスペクトル[3]と比較すると、(○)においては同じ振動数にバンドが観測された。一方、構造変化に敏感なバンドと報告されている (◆) のピークは、phiYFP では周囲のアミノ酸との相互作用により異なる振動数にバンドが観測されたと考える。これより、phiYFP の発色団部位のみの赤外スペクトル測定に成功したと結論した。発表では、発色団部位は同じで蛍光波長の異なる蛍光タンパク質についても同様の測定を行い、発色団部位の構造や周囲との相互作用について議論する。

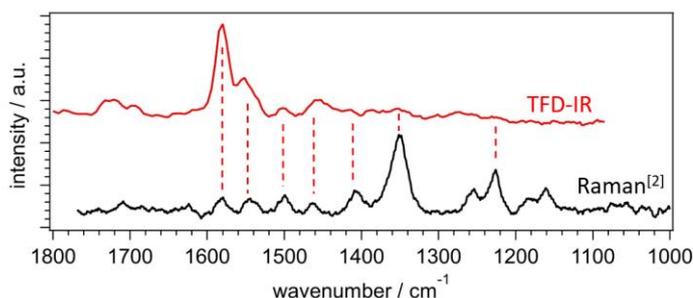


Fig. 3. TFD-IR and Raman (excitation: 620 nm) spectra of FMN.

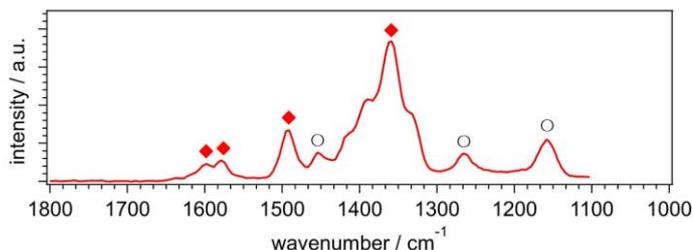


Fig. 4. TFD-IR spectrum of the chromophore of phiYFP.

【参考文献】 [1] M. Sakai *et al. Chem. Phys. Lett.* **439**, 171 (2007). [2] M. Sakai and H. Takahashi *J. Mol. Struct.*, **379**, 9 (1996). [3] A. F. Bell *et al. Biochemistry*. **39**, 4423 (2000).