

種々の分光法による 蛍光タンパク質rb-Akaneにおける発色団の構造変化の観測

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

Observation structural change of the chromophore of the fluorescent protein rb-Akane with various spectroscopy

○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】 The green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* and its variants play indispensable role in biological imaging and analysis. Many GFP-like proteins 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 the present study, to observe the change in structures of these chromophores, we synthesize the chromophore (compd. 1) and its similar compounds (compd. 2, 3) of the fluorescent protein rb-Akane and measure various spectra under many conditions. From UV-VIS spectra measured in MeOH solvent and simulated by the TD-DFT calculation, compd. 1-3 have $\pi - \pi^*$ transition character in HOMO-LUMO transition. We observed the change from *Z*- to *E*-form chromophores in DMSO- d_6 solvent exposed 365 nm UV light in 3 hours by ¹H NMR. Especially, compd. 1 has several structural isomers. On the other hand, crystalline compd. 1-3 exposed UV light has not changed in Raman spectrum.

【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 GFP-like タンパク質と呼ばれる Kaede や DsRed など単離されており, 生体分子をラベルして可視化する技術は日々発展している. GFP-like 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 *cis* 体と *trans* 体の二種類の赤色蛍光発色団が生成すると考えられ, さらに圧力によって *cis-trans* の存在比率やタンパク質の体積が変化することが分かっている[1]. そこで, この赤色蛍光タンパク質中の発光の要因である compd. 1 に着目した. この化合物は, フェノールのベンゼン

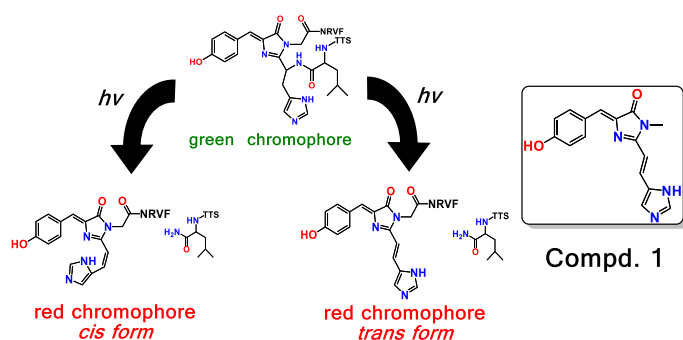
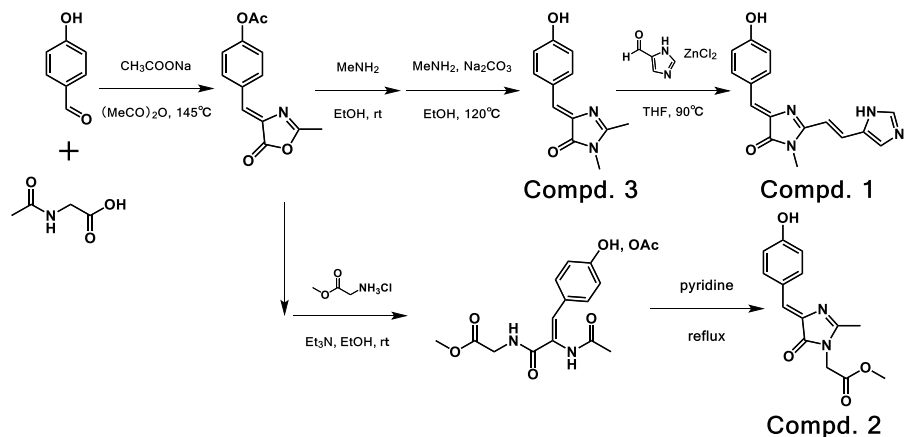


Fig. 1. Hypothesis for the green-to-red conversion
of GFP-like proteins

環から末端のイミダゾール環まで一つの共役系で繋がっていることや, OHやNHなどの水素結合サイトが存在することが特徴的である. 本研究では, rb-Akane が蛍光を発する要因である compd. 1 を合成し, その化学的性質を調べるとともに類似化合物 compd. 2, 3 との比較による検討を行った.

【方法 (実験・理論)】

Scheme 1.[2-4] に示すような経路で compd. 1-3 の合成を行い, NMR, IR, Raman, 吸収, 蛍光, 励起スペクトル測定及び単結晶 X 線構造解析を行った. また, 各化合物について RB3LYP/6-31G(d,p) レベルの DFT 及び TD-DFT 計算を行った.



Scheme 1. Synthesis of GFP-like proteins chromophore and similar compounds

【結果・考察】 compd. 1-3 についてメタノール溶液中で吸収スペクトルを測定し, 計算結果と共に Fig. 2. に示す. 計算によって得られた MO 図から全ての化合物の HOMO-LUMO 遷移は $\pi-\pi^*$ 遷移であることが分かった. また, compd. 2 と compd. 3 を比較するとスペクトルや MO 図に大きな違いはなく, メチルエステル導入は分子の電子状態にはさほど影響を与えていないと考えられる. 一方で二重結合を介してイミダゾール環を導入した compd. 1 は, 他の二つの化合物と比べて共役長が大きく伸び, ピークが長波長シフトしていることが確認できる. また, DMSO- d_6 溶液中の compd. 1 に 365 nm の UV を 3 時間照射した後, ^1H NMR を測定し, 芳香族領域のスペクトルを Fig. 3. に示し, すでに報告されている compd. 3 の結果[5]を参考にピークの帰属を行った.

主なピークは compd. 1 及びその構造異性体 compd. 1*であると帰属でき, compd. 2, 3 についても同様に帰属を行うことが出来た. しかし, 青矢印で示したピークについてはこの二つの異性体のみでは帰属が出来なかったため, 他の異性体を検討中である. 溶液中で異性化が観測された一方, 結晶についても UV 照射を行い照射前後の Raman スペクトルを比較したが異性化は観測されなかった. 講演では, 異性体の同定と共に, その吸収及び蛍光スペクトルを元に構造変化に伴う電子状態の変化などについても発表する.

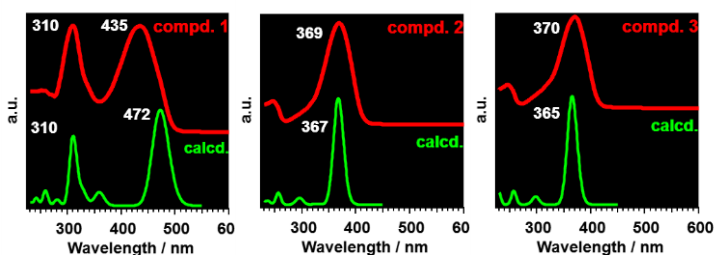


Fig. 2. UV-VIS spectra of compd. 1-3 in MeOH

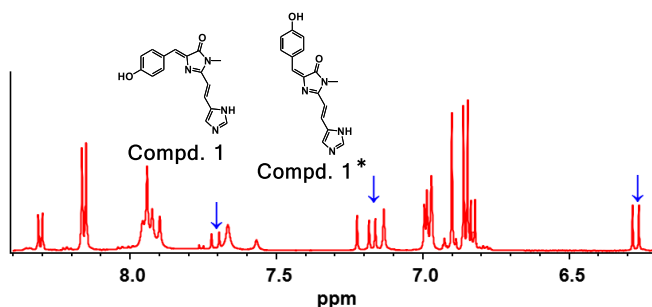


Fig. 3. ^1H NMR spectrum of compd. 1 in DMSO- d_6

【参考文献】

- [1] A. Maeno *et al.* *High Pressure Research* **37**, 224-232 (2017).
- [2] V. Voliani *et al.* *J. Phys. Chem. B* **112**, 10714-10722 (2008)
- [3] W. Chuang *et al.* *Chem. Commun.* 6928-6984 (2009).
- [4] C. Lee *et al.* *Tetrahedron* **68**, 5898-5907 (2012)
- [5] J. Yang *et al.* *Chem. Commun.* 1344-1346 (2008).