

# 1Dp04 SAC-CI 法による生体分子のスペクトロスコピー: Green Fluorescent Protein と Phytochrome

(京大院工) ○長谷川 淳也・藤本 和宏・中辻 博

## 1. Introduction

光が関わる生体内の主要な化学反応過程において、分子構造の変化に伴い光吸収スペクトルが変化する例は数多く知られている。このような系では、構造と励起スペクトルの関係を直接的に研究できる理論計算の重要性は高い。我々はこれまで SAC-CI 法を用いて生体分子の光吸収スペクトルの研究を行い、同方法から信頼性の高い帰属が得られることを示してきた。最近の SAC-CI 法のプログラム開発の結果、より大規模な系での計算時間が短縮し、応用性を高めることができた。実際に、対称性の無い生体分子系において active orbital が約 450 軌道程度の計算を実行している。本発表では、Green Fluorescent Protein (GFP) と Phytochrome における光化学に SAC-CI 法を応用し、それらの光化学過程における分子構造と光吸収スペクトルについての研究を報告する。

## 2. Structure and excited states of GFP chromophore and its mutants

GFP はオワンクラゲ(*Aequorea victoria*)に含まれる緑色蛍光タンパク質であり、その優れた蛍光特性により分子生物学における分子マーカーとして広く用いられている。また、吸収・発光波長の異なる幾つかの mutant が作られている。これらの光化学を研究する上では、基底状態の分子構造やタンパク質との電子移動過程を理解することが必要となっている。

Fig. 2 と Table 1 に GFP と mutant の構造と励起・蛍光エネルギーを示す。SAC-CI 法の結果は実験値をよく再現している。これまで BFP と CFP の基底状態の構造が不確定であったが、今回の結果は、それぞれ BFP-II と trans-CFP の構造をとることが示唆している。

また、Thor らにより GFP は UV 光(4.9eV)の照射により、GFP<sub>UV</sub>へと非可逆的に構造変化することが示され、Glu222 から色素への電子移動が引き金となる仮説が提案されている。そこで光化学過程に関与するとされるアミノ酸残基を全て含めた計算モデルを構築し(Fig. 3)、SAC-CI 法により励起状態を求めた。基底関数は DZP に anion 基底を含め、active space は 447 次元とした。Table 2 に示したように、励起エネルギーで 5.6eV までの 10 状態が算出され、 $5^1A_1$  状態(4.18eV)が Glu222 にも振幅を持つ軌道からの励起である。しかし、population 解析の結果、移動した電荷はごく僅かであり、GFP 色素から Glu222 への CT 状態の性質は小さいことが分かった。その他の励起状態は色素に局所的な励起状態であった。即ち Thor が提唱する仮説が否定される結果が得られた。

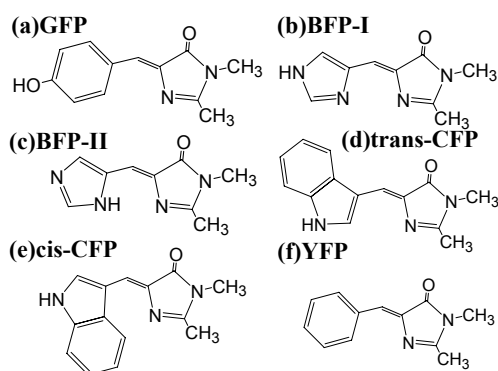


Table 1. GFP とその変異体の色素の励起・蛍光エネルギー

| Molecule | Excitation energy (eV) |                      | Fluorescence energy (eV) |               |
|----------|------------------------|----------------------|--------------------------|---------------|
|          | SAC-CI                 |                      | SAC-CI                   |               |
|          | Gas <sup>a</sup>       | Protein <sup>b</sup> | Gas                      | Protein       |
| GFP      | 3.23                   | 3.21                 | 3.12                     | 2.70 (緑)      |
| BFP-I    | 3.41                   | 3.16                 |                          | 2.92          |
| BFP-II   | 3.11                   | 3.22                 | 3.25                     | 2.77 2.78 (青) |
| cis-CFP  | 3.15                   |                      |                          | 2.68          |
| trans-CF | 2.99                   |                      | 2.84                     | 2.55 2.56 (紺) |
| YFP      | 3.33                   |                      | 3.44                     | 2.81 2.81 (青) |

Fig. 2 Structure of GFP chromophore and its mutants.

<sup>a</sup>Gas phase calculations. <sup>b</sup>Electrostatic effect is included by point-charge model.

Table 2 Excited states of the active center of GFP.

| State                         | SAC-CI                                             |                                   |                        | Exptl.               |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------------|
|                               | Character                                          | $E_{\text{ex}}$ (eV) <sup>a</sup> | Osc. (au) <sup>b</sup> | $E_{\text{ex}}$ (eV) |
| 2 <sup>1</sup> A <sub>1</sub> | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP } \pi^*$            | 3.27                              | 0.56                   | 3.12 <sup>c</sup>    |
| 3 <sup>1</sup> A <sub>1</sub> | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP Ryd.}$              | 3.98                              | $0.40 \times 10^{-2}$  |                      |
| 4 <sup>1</sup> A <sub>1</sub> | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP Ryd.}$              | 4.11                              | $.7 \times 10^{-3}$    |                      |
| 5 <sup>1</sup> A <sub>1</sub> | GFP $\pi$ , Glu222 $\rightarrow \text{GFP } \pi^*$ | 4.18                              | $2.7 \times 10^{-2}$   |                      |
| 6 <sup>1</sup> A <sub>1</sub> | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP Ryd.}$              | 4.34                              | $1.1 \times 10^{-2}$   |                      |
| 7 <sup>1</sup> A <sub>1</sub> | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP } \pi^*$            | 4.56                              | $1.2 \times 10^{-2}$   |                      |
| 8 <sup>1</sup> A <sub>1</sub> | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP } \pi^*$            | 4.85                              | 0.15                   |                      |
| 9 <sup>1</sup> A <sub>1</sub> | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP Ryd.}$              | 4.95                              | $6.8 \times 10^{-3}$   |                      |
| 10 <sup>1</sup> A             | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP Ryd.}$              | 5.17                              | $1.0 \times 10^{-2}$   |                      |
| 11 <sup>1</sup> A             | GFP $\pi \rightarrow \text{GFP Ryd.}$              | 5.58                              | $8.9 \times 10^{-2}$   |                      |

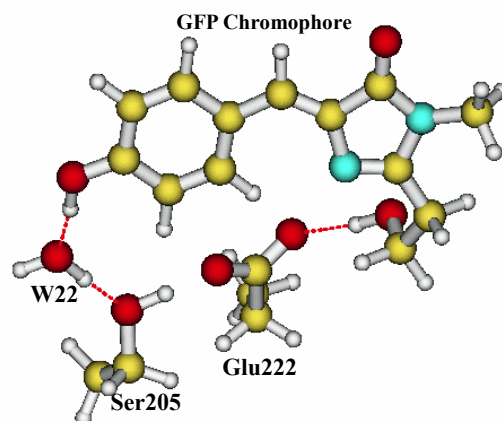
<sup>a</sup> Excitation energy. <sup>b</sup> Oscillator strength..<sup>c</sup> H. Lossau et al. Chem. Phys. 213 (1996) 1-16.

Fig. 3 Computational model of GFP active site

#### 4. Excited states of linear tetra-pyrroles : Photo-isomerization mechanism of phytochrome

ビリル化合物はポルフィリン類と同様にテトラピロール構造を有し、アンテナ蛋白質の光吸収や光受容蛋白質の光センサーとして、重要な役割を担っている。本研究ではビリル化合物としてアンテナ蛋白質に含まれるフィコシアノビリルと、光受容蛋白質、フィトクロムに含まれる色素分子フィトクロモビリルについて基底状態、励起状態の電子構造、及び光吸収スペクトルに関する研究を行った。

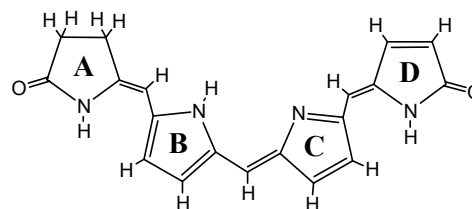


Fig. 4 フィコシアノビリルの基本骨格

まず、フィコシアノビリル(Fig. 4)とクロリン(環状テトラピロール)について分子軌道と励起状態を比較し、開環効果が励起状態に及ぼす影響を検討した。クロリンのスペクトルは Gouterman の4軌道モデルにより、Q-、B-帯と呼ばれる特徴的なピークが現れる。一方、フィコシアノビリルの分子軌道は開環効果や末端の酸素原子置換により、4軌道モデルは完全に失われる。

フィトクロムは赤色・遠赤色光受容蛋白質であり、形態形成など植物の様々な生理反応に深く関わっている。フィトクロムには2つの異性体(Pr, Pfr)が存在する。生理的に活性な Pr は赤色光(666 nm)により、不活性な Pfr に異性化し、逆に Pfr は遠赤色光(730 nm)により Pr に異性化する。これらの変換はフィトクロム中の色素分子であるフィトクロモビリルの光異性化が引き金になっている。これまで2種類の光異性化機構、1) Pr:ZZZasa $\rightarrow$ Pfr:ZZEass、2) Pr:ZEZaas $\rightarrow$ Pfr:ZEEaaa が提案されたが、結晶構造は未だ得られておらず結論に至っていない。本研究では各異性体について SAC-CI 法により励起スペクトルを求め、実験結果と比較し、光異性化機構と色素のプロトン化状態について検討した。

色素をプロトン化すると励起エネルギーは大幅に赤方シフトするので、蛋白質中では中性に近い構造をとると考えられる。また、機構2に対応する異性体は実験の吸収位置から 0.3eV 程度ずれており、Pr と Pfr の吸収強度の関係も再現できなかった。機構1に対応する異性体の励起スペクトルが実験結果に近い値を示した(Fig. 5)。従って色素の異性化は機構1によることを示唆する結果が得られた。

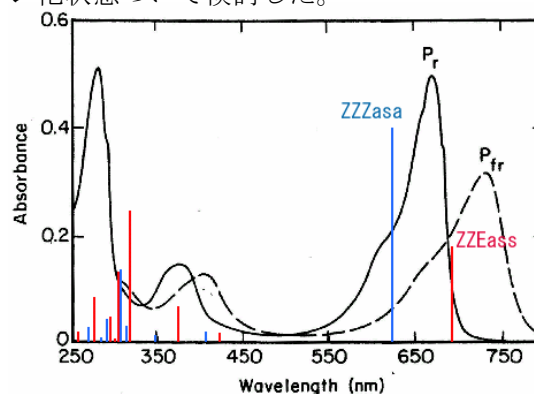


Fig. 5. Pr, Pfr の光吸収スペクトル。