

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550033

研究課題名(和文) 蛍光タンパク質の隠れた電子励起状態

研究課題名(英文) Hidden electronic excited state of enhanced green fluorescent protein

研究代表者

細井 晴子 (HOSOI, Haruko)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：00313396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光タンパク質は生きたままの細胞の三次元イメージングを可能にするが、その基礎となる蛍光タンパク質の二光子励起蛍光メカニズムは観測技術の制約によりほとんど調べられていない。研究代表者は、新規に開発されたマルチプレックス二光子吸収分光法を用いて、最もイメージングに利用される蛍光タンパク質 enhanced GFP (eGFP) と、様々な溶媒中での eGFP 発色団モデル化合物 HBDI の二光子吸収スペクトルを測定した。その結果 eGFP では、一光子励起によって生成する S1 電子励起状態の近傍に "隠れた" 電子励起状態 (S2) が存在することを示し、GFP の二光子蛍光メカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence imaging by two-photon excitation has attracted attention as a new imaging technique. However, fluorescence mechanism of two-photon excited fluorescent proteins is completely unknown. We measured two-photon absorption spectra of enhanced GFP (eGFP), which is the most important marker, and its model chromophore, HBDI, in various solvents by a multiplex two-photon absorption spectroscopy to clarify the fluorescence mechanism. The results indicate that the existence of a "hidden" excited state in the vicinity of the lowest excited singlet state of eGFP. We conclude that this is the origin of the discrepancy between the one-photon and two-photon excitation spectra of eGFP, which is well known in the field of biology.

研究分野：物理化学

キーワード：マルチプレックス二光子吸収分光法 HBDI eGFP 電子励起S2状態 高振動励起S1状態

1. 研究開始当初の背景

蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP、図 1(a)) を用いたイメージングは生命科学分野における最先端技術の一つであり、特に近年、二光子励起蛍光イメージングが注目されている。イメージング技術が確立している一方、その基礎となる二光子励起された GFP の発光メカニズムは、適切な観測手段が限られているため不明のままであった。

そこで研究代表者は以前、新規に開発されたマルチプレックス二光子吸収分光法を用いて、最初に発見されたオワンクラゲ GFP と最もイメージングに利用される GFP 変異体 enhanced GFP (eGFP) の二光子吸収 (TPA) スペクトルを精度よく測定した。オワンクラゲ GFP の TPA スペクトルと一光子吸収 (OPA) スペクトルがよく一致したのに対して、eGFP では TPA スペクトルが OPA スペクトルと一致せず高エネルギー側に現れた。eGFP の結果は群論から期待される「オワンクラゲ GFP や eGFP 発色団のような対称心のない構造 (図 1(b)) を持つ分子では、すべての遷移は一光子・二光子過程ともに許容となり、両スペクトルは一致する」とは異なる。よって eGFP では、一光子励起によって生成する S_1 電子励起状態の近傍に”隠れた”電子励起状態 (S_2) が存在する (図 2(a)) と結論した[1]。しかしその後、蛍光励起スペクトル測定に基づき、eGFP の二光子励起過程に関与するのは S_2 励起状態ではなく、 S_1 の高い振動励起状態 ($S_1(v>0)$) である (図 2(b)) という、われわれとは異なる帰属が報告された[2]。

さらに計算科学研究においても、研究代表者の帰属を支持する報告[3]がある一方で、 S_1 の高い振動励起状態を支持する報告[4]もあり、広く議論になっていた。

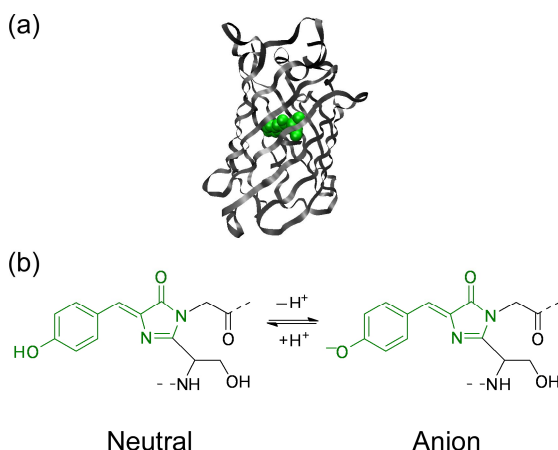


図1.(a) 蛍光タンパク質と(b)GFP発色団の構造。発色団のフェノール性水酸基の解離平衡により、ニュートラル型とアニオン型が存在する。オワンクラゲGFPではニュートラル型が、eGFPではアニオン型が優勢である。

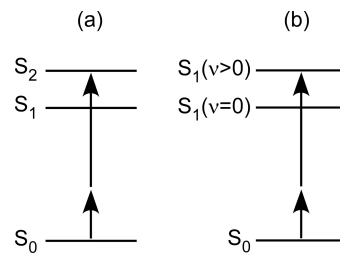


図2.eGFPの二光子吸収スペクトルの短波長シフトの原因として考えられる2種類の異なるメカニズム。(a) ”隠れた”電子励起状態 (S_2) への遷移。(b) S_1 の高い振動励起状態 ($S_1(v>0)$) への遷移。

2. 研究の目的

そこで本研究では、eGFP の二光子励起過程への S_2 励起状態の関与を明確に証明し、さらに eGFP だけでなく、多くの蛍光タンパク質に共通する知見を得ることを目的とし、二光子吸収分光法を用いて次の二つの課題に取り組んだ。

eGFP 発色団モデル化合物の二光子吸収スペクトルの溶媒依存性

予備実験により、eGFP 発色団モデル化合物も eGFP と同様に高エネルギーシフトを示すことが分かっていた。そこでモデル化合物、HBDI アニオンの二光子吸収スペクトルの溶媒依存性を検討した。溶媒によって一光子と二光子吸収ピークのシフト量が大きく変化すれば、 S_1 振動励起状態の関与の可能性は低くなり、 S_2 励起状態への帰属を裏付ける結果になると予想を立てて研究を進めた。

GFP とは異なる発色団構造を持つ蛍光タンパク質の二光子励起に関与する電子励起状態

多くの蛍光タンパク質について、eGFP のメカニズムに関する議論をもとに、 S_1 の高い振動励起状態が関与すると主張されている[5]。しかし研究代表者は、eGFP の S_2 電子励起状態は発色団構造に特有であり、この結果をもとに他の蛍光タンパク質について類推することはできないと考えた。そこで、eGFP とは異なる発色団構造を持つ蛍光タンパク質について、タンパク質とその発色団モデル化合物の二光子吸収スペクトルの比較から、二光子励起電子励起状態とその発光メカニズムを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

二光子吸収分光測定

装置概略を図 3 に示す[1]。近赤外領域の波長 ω_1 の狭帯域パルスと、450-750 nm 領域 ω_2 の広帯域白色光パルスを試料に照射し、 $\omega_1 + \omega_2$ の波長領域で二光子吸収スペクトル

を測定した。

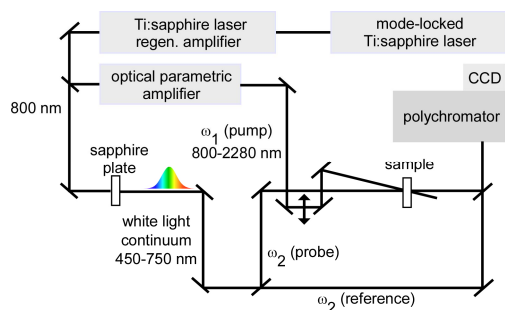


図3.マルチプレックス二光子吸収分光測定装置。近赤外光と白色光を同時に試料に照射して二光子吸収過程を誘起する。

蛍光タンパク質の作製

Cyan Fluorescent Protein (CFP)をコードしたプラスミド (pRSET_B) を大腸菌 (BL21 (DE3)) に導入し、形質転換を行った。形質転換された大腸菌を培養し、CFP を精製した。

発色団モデル化合物の合成

代表的な GFP の発色団モデル化合物である 4'-hydroxybenzylidene-2,3-dimethylimidazolinone (HBDI、図 4(a)) と、CFP 発色団モデル化合物 cCFP (図 4(b)) を文献[6]に従って合成した。

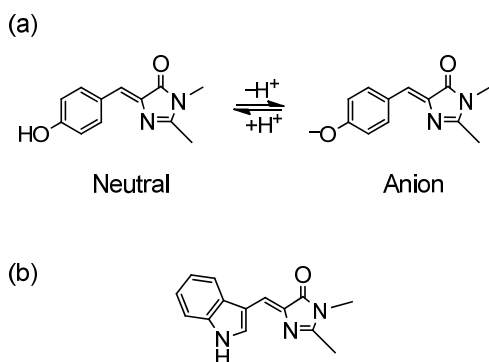


図4.(a) GFP発色団モデル化合物HBDIと(b)CFP発色団モデル化合物cCFP。

4. 研究成果

GFP 発色団モデル化合物の二光子吸収スペクトルの溶媒依存性

図 5(a)に、5 種類の溶媒 (メタノール、酢酸エチル、アセトニトリル、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)) 中の HBDI ニュートラル型の OPA および TPA スペクトルを示す。すべての溶媒中において、ニュートラル型の二光子吸収スペクトルは実験誤差内で一光子吸収と一致した。この結果は群論で予想されるように、ニュートラル型では一光子励起でも二光子励起でも同じ励起状態 S_1 に励起されるとい

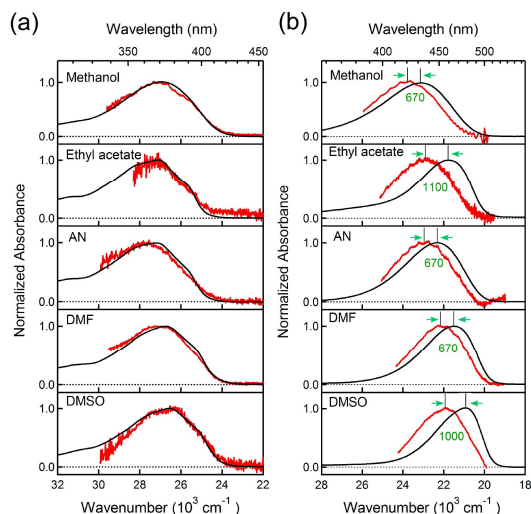


図5. HBDIの一光子吸収(OPA、黒)、および二光子吸収(TPA、赤)スペクトル。(a) ニュートラル型。OPAスペクトルとTPAスペクトルはよく重なっている。(a) アニオン型。TPAスペクトルはOPAスペクトルと一致せず、高エネルギーシフトしている。OPAとTPAピークのエネルギー差を緑で示す(波数単位)。溶媒によってエネルギー差が大きく異なる。

うことを意味している。背景でも述べたように、同様の結果が、ニュートラル型発色団を持つオワンクラゲ GFP でも観測されている[1]。

一方、HBDI アニオン型の TPA スペクトルは、eGFP と同様に、全ての溶媒中で OPA スペクトルと一致せず、高エネルギー側に現れた。また OPA と TPA ピークのエネルギー差は $670 \sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ と溶媒によって大きく変化した。この結果は $S_1(v>0) \leftarrow S_0$ 遷移への帰属と矛盾する。なぜならば、 $S_1(v>0) \leftarrow S_0$ 遷移と考える場合、OPA と TPA ピークのエネルギー差は関与する振動モードのエネルギーに相当するが、その溶媒依存性は一般に非常に小さい(数 cm^{-1} 程度)からである。よって、HBDI の二光子励起過程に関与するのは $S_1(v>0)$ ではなく S_2 励起状態であると結論した。

HBDI で得られた結論を適用して eGFP の二光子励起蛍光過程を理解することができる。二光子励起された eGFP はまず S_2 状態となるが速やかに S_1 状態へと緩和する。その S_1 状態の蛍光は、一光子励起によって観測される蛍光と全く同じとなる(図 6)。本研究により、最も広く利用される eGFP の二光子蛍光メカニズムを明らかにすることができた。(Haruko Hosoi, Ryo Tayama, Satoshi Takeuchi, and Tahei Tahara, "Solvent Dependence of Two-photon Absorption Spectra of the Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) Chromophore", *Chemical Physics Letters*, **630**, 32–36 (2015), 査読あり, doi:10.1016/j.cplett.2015.04.028.)

GFP とは異なる発色団構造を持つ蛍光タンパク質の二光子励起に関与する電子励起状

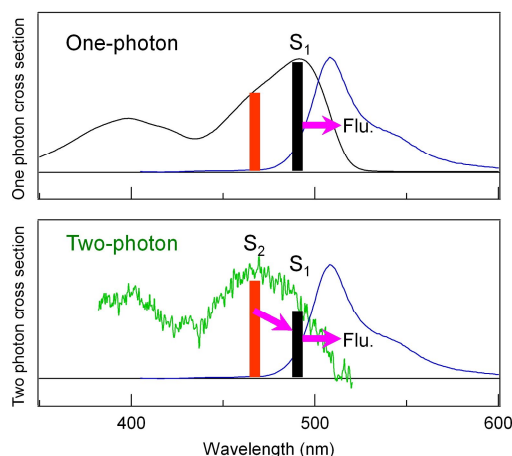


図6. eGFPの(a) 一光子、および、(b) 二光子発光メカニズム。

態

図 7(a)に、緑青色蛍光タンパク質 CFP の TPA、および OPA スペクトルを示す。CFP の OPA と TPA スペクトルは完全には一致しなかった。しかし発色団モデル化合物 cCFP の DMSO、およびメタノール中の OPA スペクトルと TPA スペクトル(図 7(b),(c)) はよい一致を示した。この結果から、CFP の二光子励起メカニズムでは、 S_1 の高い振動励起状態も、eGFP のような隠れた電子励起状態 S_2 も関与しないことが分かった。

CFP の OPA スペクトルでは 435 nm と 453 nm に強度が同程度の二つのピークが現れた。一方、TPA スペクトルでは 435 nm のピークははっきりと現れたが、453 nm のピークは弱くなった。この二つのピークは、発色団モデル化合物 cCFP の DMSO、およびメタノール中の OPA、および TPA スペクトル(図 7(b),(c)) では一つのピークとなる。よって CFP の二つのピークは、発色団と周辺アミノ酸との特異的な相互作用に起因し、その相互作用は一光子励起と二光子励起によって変化することが示唆された。CFP の二光子励起発光メカニズムについては現在も検討中である。

<引用文献>

- [1] H. Hosoi, S. Yamaguchi, H. Mizuno, A. Miyawaki, and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2761-2763 (2008); 細井 晴子, 山口 祥一, 田原 太平, レーザー研究, 37(10), 734 (2009); 山口 祥一, 細井 晴子, 田原 太平, 高効率二光子吸収材料の開発と応用, シーエムシー出版 (2011)).
- [2] M. Drobizhev, S. Tillo, N. S. Makarov, T. E. Hughes, A. Rebane, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 855-859 (2009).
- [3] S. Olsen, R. H. Mckenzie, *Chem. Phys. Lett.*, **492**, 150 (2010).
- [4] (E. Kamarchik, A. I. Krylov, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2**, 488 (2011).
- [5] (M. Drobizhev, N. S. Makarov, S. E. Tillo, T. E. Hughes, A. Rebane, *Nature Methods*, **8**, 393

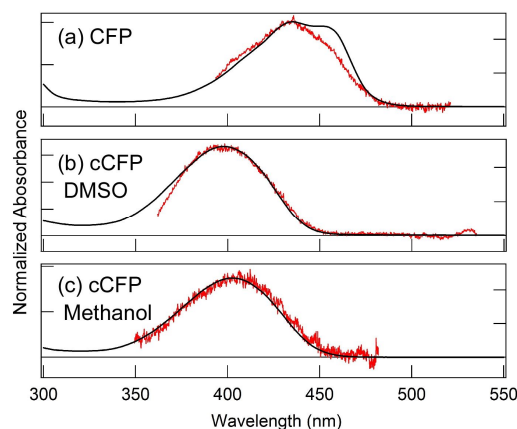


図7. (a) CFPとその発色団モデル化合物cCFPの(b)DMSO、および、(c) メタノール溶液の二光子(TPA、赤)、および、一光子(OPA、黒)吸収スペクトル。

(2011).

[6] V. Voliani, R. Bizzarri, R. Nifosi, S. Abbruzzetti, E. Grandi, C. Viappiani, F. Beltram, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 10714 (2008).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Haruko Hosoi, Sakiko Hazama, and Yuri Takeda, “Smaller 145th Residue Makes Fluorescent Protein Non-Fluorescent: Fluorescence Lifetimes of Enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP) Y145 Mutants and H148 Mutants”, *Chemical Physics Letters*, **618**, 186–191 (2015), 査読あり, doi:10.1016/j.cplett.2014.11.014.

〔学会発表〕(計 4 件)

Haruko Hosoi “Smaller 145th Residue Makes Fluorescent Protein Non-Fluorescent: Fluorescence Lifetimes of Enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP) Y145 Mutants and H148 Mutants”, The National Symposium on Radiation and Photochemistry, 2015 年 3 月 9 日, Kanpur (India).

細井 晴子・間 紗希子・石野 佳奈・山畔 麻優 “蛍光タンパク質 eYFP の蛍光寿命を決定する 145 番アミノ酸側鎖の性質”, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 30 日, 名古屋大学(愛知県名古屋市).

細井 晴子 “蛍光タンパク質の隠れた電子励起状態”, 特定領域研究「分子高次系機能解明のための分子科学 - 先端計測法の開拓による素過程の理解」成果公開シンポジウム, 2012 年 5 月 25 日, 東京工業大学(神奈川県横浜市)

Haruko Hosoi “Emission Mechanism of Fluorescent Proteins studied by Advanced Laser Spectroscopy”, 7th Asian Conference on Ultrafast Phenomena, 2012

年 2 月 14 日 Busan (Korea).

〔その他〕

ホームページ等

http://www.sci.toho-u.ac.jp/biomol/lab/hosoi_lab/index.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

細井 晴子 (HOSOI, Haruko)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：00313396