

## 業績紹介：蛍光タンパク質の隠れた電子励起状態

細井晴子 (理研)  
山口祥一 (理研・計画研究分担者)  
田原太平 (理研・計画研究代表者)

論文題目: "Electronic Excited State of Enhanced Green Fluorescent Protein"

著者: Haruko Hosoi, Shoichi Yamaguchi, Hideaki Mizuno, Atsushi Miyawaki, and Tahei Tahara

雑誌巻号: *J. Phys. Chem. B* **112**, 2761-2763 (2008)

蛍光タンパク質による細胞のイメージングは分子生物学における最先端技術の一つであり、蛍光タンパク質(GFP)の果たす役割は非常に重要である。最初に発見されたオワンクラゲ GFP(wtGFP)をベースとしてさまざまな変異体が開発され用いられているが、蛍光タンパク質の分子論的理解は、wtGFP を除いて十分に進んでいるとは言えない。

本研究で我々が注目したのが蛍光タンパク質の二光子励起過程である。最近、試料の光劣化が少なく深部を観測できる二光子励起イメージングが行われているが、二光子励起された蛍光タンパク質の発光機構や関与する電子状態は全く不明である。そこで、wtGFP とその変異体 eGFP の電子励起状態に関する知見を得ることを目的として二光子吸収スペクトルを測定した。

我々が以前開発したマルチブレックス二光子吸収分光法[1]により、非常に精密な二光子吸収スペクトルが得られる。図 1(a)(b)は wtGFP と eGFP の一光子、および二光子吸収スペクトルである。蛍光タンパク質の発色団にはチロシン由来のフェノール性水酸基があり、ニュートラルとアニオンの二種類がある。発色団は同じであるが酸解離平衡定数が異なるため、wtGFP ではニュートラル(400nm)が、eGFP ではアニオン(490nm)が主に存在している。これらの発色団には対称心がないため、観測領域に一つの電子遷移しか存在しない時は一光子吸収と二光子吸収スペクトルは同じになると予想される。wtGFP のニュートラルの一光子吸収と二光子吸収極大はよく一致しており、予想通りどちらでも同じ電子励起状態( $S_1$ )への遷移が起こることを示している。一方、eGFP のアニオンの吸収極大は、一光子吸収では 490nm、二光子吸収では 470nm となり、20nm の短波長シフトが観測された。

観測されたシフトについてさらに検討するために、

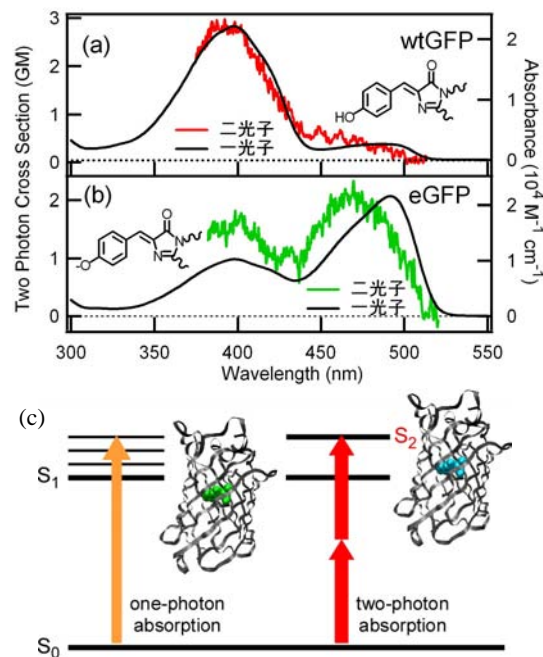


図 1. (a) wtGFP (b) eGFP の一光子、および二光子吸収スペクトル。挿入図はそれぞれの発色団の構造。(c) eGFP の電子状態の模式図。

発色団のモデルである有機分子(HBDI)についても二光子吸収スペクトルの測定を行った。その結果、HBDIでも同様に、ニュートラルでは一光子吸収と二光子吸収極大が一致し、アニオンでは二光子吸収極大の短波長シフトが観測された。これらの結果から eGFP のアニオンには、一光子励起により生成する  $S_1$  電子励起状態の近傍に、別の電子励起状態( $S_2$ )が存在すると結論した。 $S_0$ - $S_1$  遷移と  $S_0$ - $S_2$  遷移は一光子励起、二光子励起ともに許容であるが、それぞれの遷移の相対強度が異なることと遷移エネルギーが近いことから、ピークが分離されずシフトとして観測されたと考えられる。

eGFP の  $S_2$  状態は、同じ発色団を持つすべての蛍光タンパク質に共通に存在すると考えられる。これまでいくつかの蛍光タンパク質について二光子励起蛍光アクションスペクトルと一光子吸収スペクトルにずれがあることが報告されているが、精密な二光子吸収スペクトル測定により、初めてその起源を明らかにすることができた。

引用文献 [1] S. Yamaguchi and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **376**, 237 (2003); S. Yamaguchi and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **390**, 136 (2004).

## 業績紹介：シスチルベン $S_n \leftarrow S_1$ 遷移に現れる顕著な振電相互作用を発見

石井邦彦 (理研・計画研究分担者)  
竹内佐年 (理研・計画研究分担者)  
田原太平 (理研・計画研究代表者)

論文題目: "Pronounced Non-Condon Effect as the Origin of the Quantum Beat Observed in the Time-Resolved Absorption Signal from Excited-State cis-Stilbene"

著者: Kunihiko Ishii, Satoshi Takeuchi, and Tahei Tahara

雑誌巻号: *J. Phys. Chem. A* **112**, 2219-2227 (2008)

シスチルベンに紫外光を吸収すると異性化を起こし、二重結合部分が反転したトランス体を生成する。この光異性化反応は最低励起一重項状態 ( $S_1$  状態) から基底電子状態への内部転換の過程で起こるため、 $S_1$  状態における分子構造の変化、すなわち核波束ダイナミクスを解明することが反応機構の理解に直結する。我々は以前に 10 フェムト秒オーダーの極短パルスを用いたポンプ-プローブ吸収分光法により、 $S_1$  状態の核波束ダイナミクスを反映する強い量子ビートを観測することに成功した[1]。

本研究は、この  $S_1$  状態からの過渡吸収に現れる量子ビートの起源に関するものである。この量子ビートに対応する全対称振動は異常に強い共鳴ラマンバンドとその倍音系列を与えることが知られていたが[2]、この振動が  $S_n \leftarrow S_1$  遷移とどのようなカップリングを通して強度を獲得しているのかは不明であった。そこで我々は、波長分散型のポンプ-プローブ吸収分光法を適用してこの量子ビートのプローブ波長依存性を調べ、合わせて波束理論に基づくシミュレーションを行って量子ビートの起源を考察した。

図 1 に示すのは波長分散法で測定したシスチルベン  $S_n \leftarrow S_1$  吸収スペクトルの時間変化である。吸収ピーク両側に同位相の量子ビートが現れていることは、この吸収バンドの吸収強度全体が核波束の運動に伴い増減を繰り返していることを意味する。実際、このスペクトル変化は有効線形応答理論[3]に non-Condon 効果 (遷移モーメントの核座標依存性) を取り入れたシミュレーションによって良く再現することができた。つまり、量子ビートの起源は振電相互作用による電子状態の混合であると結論できる。通常基底電子状態の全対称振動に対して振電相互作用の効果が観測されることは稀であるが、本研究の結果は、 $S_n \leftarrow S_1$  遷移のよう

に高エネルギー電子状態 ( $S_n$  状態) を含む遷移においては一般に振電相互作用が重要となる可能性があることを示唆している。

引用文献

[1] K. Ishii, S. Takeuchi, and T. Tahara, *Chem. Phys. Lett.* **398**, 400-406 (2004).

[2] P. Matousek, A. W. Parker, D. Phillips, G. D. Scholes, W. T. Toner, and M. Towrie, *Chem. Phys. Lett.* **278**, 56-62 (1997).

[3] A. T. N. Kumar, F. Rosca, A. Widom, and P. M. Champion, *J. Chem. Phys.* **114**, 701-724 (2001).

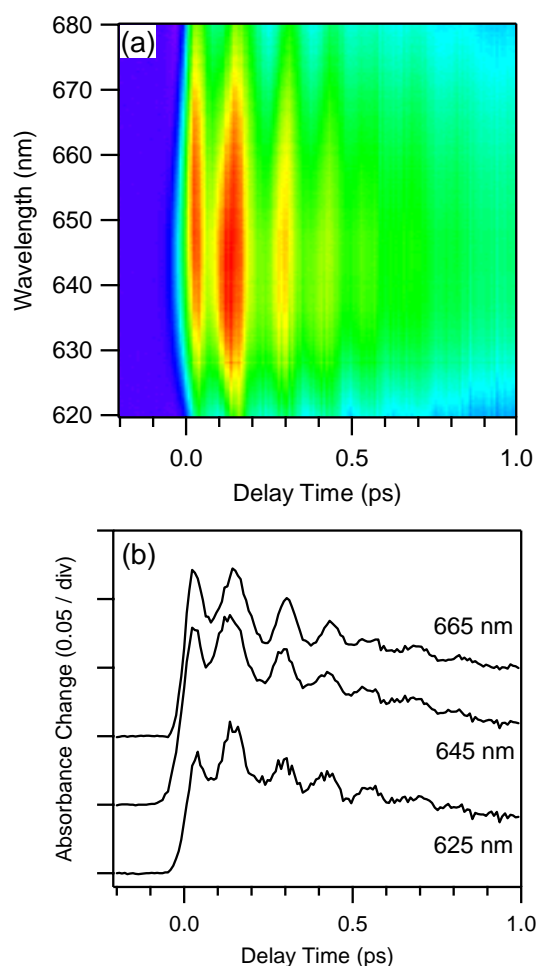


図 1. シスチルベンの時間分解吸収スペクトル変化 (a). 吸収ピーク全体にわたって同位相のビートを示していることがわかる (b).

## 特許申請報告：包接マトリックスを用いた MALDI 法

藤野竜也（首都大院理工・A02 計画班）

以下の内容について特許申請を行いましたので報告いたします。

発明の名称：包接マトリックスを用いた MALDI 法

発明者：藤野竜也、山口惣大、伊永隆史

出願人：公立大学法人首都大学東京

特願 2008-025881

レーザー脱離質量分析法 (LDI-MS) は、1980 年代に注目され、主に金属や半導体などの表面分析に用いられてきた。試料の脱離に際しレーザー光を用いることから、他のイオン化法に比べ微小領域の分析が可能であるという特徴を持っている。しかしながら、イオン化効率が低く、目的分子を解離させてしまうなどの欠点を持っており、巨大分子の測定が不可能であった。そのような背景の中、2002 年のノーベル化学賞受賞者である田中耕一氏が開発した MALDI 法 (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法) が注目を浴びている。MALDI 法の特徴は、試料に対してマトリックスと総称される化合物を大過剰 (十倍から千倍) に混合し、混晶状態とした試料を用いることであり、分子量の大きなマクロ分子・超分子 (DNA やタンパク) を壊さず、親分子のイオンとして検出できる能力を持つことである。従ってこの MALDI 法を飛行時間型の質量分析装置 TOF-MS と組み合わせた MALDI-TOF-MS 法は非常に有用な分析技術であるが、欠点の一つとして上げられるのが、マトリックス由来のフラグメントピークである。通常マトリックス剤は固体の有機酸が用いられ、この分子量が大体 500Da 以下であることから、500Da 以下の質量領域には、マトリックス由来の多数のピーク (アルカリ金属付加体、多量体、フラグメント) が存在してしまっており、例えば 500Da 以下の分子量を持つ測定対象試料は測定できないという欠点があった。本発明では、構造を持つ宿主分子に従来のマトリックス剤を包接させることにより、マトリックス由来のピークを効果的に消す方法を発見した。

本実験では、包接特性化合物として  $\alpha$ -CD ( $\alpha$ -シクロデキストリン) を用い、マトリックスは THAP (2',4',6'-トリヒドロキシアセトフェノン) 及び CHCA ( $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸) を用いた。モデルペプチドの一つであるサブスタンス P(1347.6Da)を測定した結果、どのマトリックス剤を用いた場合でも、

- (1) マトリックス多量体ピークの除去
- (2) マトリックスのフラグメント抑制
- (3) アルカリ金属付着ピークの除去

といった効果が観測された。従来の MALDI 法によるスペクトル(a)と本法(b)の比較を図 1 に示した。

また分子量が 500Da 以下の試料としてヌクレオシドの一つであるアデノシン(267Da)を測定した。その結果を図 2 に示した。マトリックス由来のピークが効果的に除去され、本来妨害ピークによって確認することが難しいアデノシンのフラグメントピークであるアデニンも観測された。本法により、従来の MALDI 法が苦手とした低分子量領域の議論が可能となるため、MALDI 法のさらなる発展が期待される。

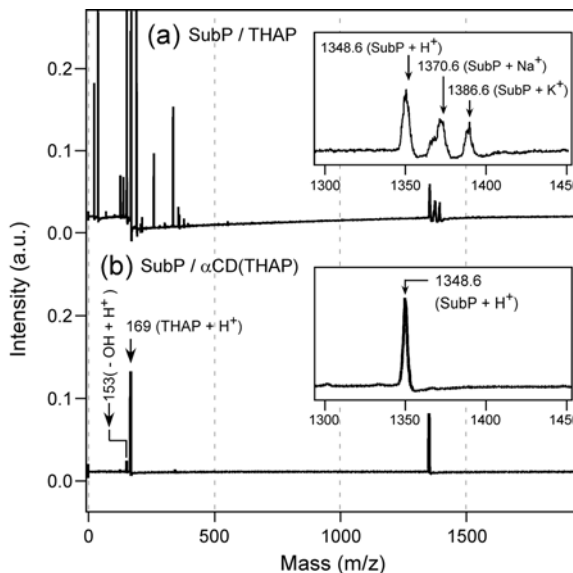


図 1. 従来の MALDI 法による測定(a) (試料：サブスタンス P、マトリックス：THAP)。本法による測定(b)。

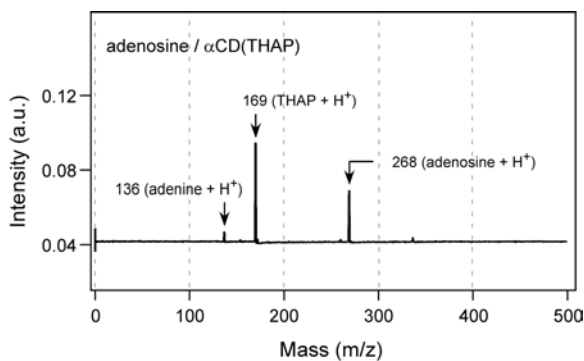


図 2. 本法によるアデノシンの測定。フラグメントのアデニン(136Da)が観測されている。

## ミニ公開シンポジウム「生体分子の蒸発法と気相分光」報告

藤井正明 (東工大資源研・総括班)

本特定領域研究のミニ公開シンポジウム「生体分子の蒸発法と気相分光」が、平成 20 年 3 月 18 日(火)、大阪大学銀杏会館(阪大吹田キャンパス)で開催された。ミニ公開シンポジウムは、重要なトピックスに焦点を絞って深く討論する小規模シンポジウムであり、研究グループの連携や研究促進を計る意図で今回初めて試みたものである。本シンポジウムでは高次機能を有する分子の代表として生体分子に着目し、生体分子の構成する分子ネットワークや運動性を研究するツールとして重要な気化法と気相分光法に焦点を絞って討論した。

本特定領域研究及びミニ公開シンポジウムの趣旨説明に引き続き、島津製作所・田中耕一記念質量分析研究所 岩本慎一氏より「MALDI 法の現状とその課題」と題する講演が行われた。MALDI 法は生体分子を蒸発・イオン化して質量分析を行う代表的な方法の一つであり、田中耕一氏がノーベル賞を受賞した日本発の方法である。講演では原理と装置、特長と種々の応用、今後の課題、最近の技術動向が紹介された。MALDI 法のイオン化メカニズムは様々なモデルが提唱され未だに確定していないとのことであるが、ハイスループット、1 価イオン化、わずか 1 fmol で分析可能といった優れた特長が実例と共に説明された。一方、結晶資料の不均一性が定量性、再現性に影響する事、マトリックス由来のイオンピークによる妨害、インソース/ポストソース分解、マトリックスの選定、試料調整の煩雑さと言った課題が挙げられた。講演に対し、MALDI 法のメカニズム、装置やマトリックスの選択まで様々な質問が出され、時間を大幅に超過して議論が行われた。

続いて横浜市立大・三枝洋之教授より「レーザー脱離法による生体分子の気化とレーザー分光」と題する講演が行われた。これはグラファイトを混合した試料から生体関連分子を中性のままレーザー光により脱離させ、もう一台の波長可変レーザーにより気化した試料分子のレーザー分光を行う方法である。グラファイトマトリックス法の歴史からグアニン、グアノシンなどの分光の実例、試料調整の詳細、さらにグラファイトマトリックス法の今後の一般化に向け、脱離レーザ

ー波長の選択についても述べられた。これに対し実験の実際に関する質問から、赤外スペクトルと量子化学計算の対応という解析の可能性と限界、生体分子の機能部位と呼べる分子システムを取り出すことの重要性、と言った研究の戦略に関わるコメントまで時間を超過して活発な議論が交わされた。

休憩をはさみ、後半では若手講演として神戸大・大学院博士課程を修了、学位取得したばかりの藤原亮正君から「エレクトロスプレー法とレーザー分光の可能性」と題する講演が行われた。エレクトロスプレー法は MALDI 法と共に代表的な生体分子の蒸発法であり、その歴史と共にレーザースプレー法、ソニックスプレー法といった様々な方法が紹介された。特にクラスター形成に関するソニックスプレー法の優位性が述べられ、これと多重極型イオントラップによる分子冷却を組み合わせた先進的な装置とその測定の実例が示され多くの質問と反響を呼んだ。

引き続き広大院理・江幡孝之教授より「加熱蒸発法を用いた生体分子の超音速ジェット・レーザー分光可能性と問題点」と題する講演が行われた。金属を用いない試料室を用いることで熱分解を回避し、アミノ酸とその水和クラスターのレーザー分光が紹介され、加熱蒸発の限界点、サンプル調整など含め活発な議論が行われた。

総合討論では A01 班、阪大・粟津、A02 班、首都大・藤野、A01 班・石内よりそれぞれの生体蒸発法に関する進捗の話題提供があり、全てを包括して MALDI 法、レーザー脱離法の蒸発、イオン化メカニズムを中心に議論が戦わされた。参加者はほぼ全員が質問、コメントしており、議論の活発さは特筆に値する。

最後に、シンポジウムの開催、進行をお世話いただいた、阪大粟津先生、鈴木先生、研究室のスタッフ、秘書、大学院生の皆様に深く感謝する。

