

緑色蛍光タンパク質のピコ秒時間分解発光分光

小澄研究室 橋本 史

緑色蛍光タンパク質 (**G**reen **F**luorescent **P**rotein, GFP) はオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) から発見された、緑色の蛍光を放つタンパク質である^[1]。11本の β -シート鎖から構成される β -バレル構造をとり、その中心に三つのアミノ酸残基 Ser65-Tyr66-Gly67 から形成される発色団をもつ (図 1(a))。GFP は安定性が高く、蛍光に補酵素を必要としないことから生体への適用が容易であり、蛍光タグとして広く用いられている。野生種の GFP は基底状態において、プロトン化された中性の A 状態をとる。光励起により脱プロトン化反応が起こり、I 状態と呼ばれる中間体を経由して発光し、基底状態プロトン移動反応によって A 状態に戻る。一方、A 状態とは別に、基底状態で脱プロトン化され負に帯電する B 状態という二つの構造多型を持ち、その存在比はおよそ A:B = 6:1 である^[2]。B 状態では光励起後、中間体を経ずに直接基底状態への蛍光が起こる。各状態を解析するために各種の変異体が開発され、発色団周辺の残基置換により、単一特定状態に安定化された変異タンパク質が形成される。222 番目のアミノ酸であるグルタミン酸 (図 1(b)) をグルタミン (図 1(c)) に置換した E222Q 変異体は B 状態を安定化する変異体であり、先行研究によりその高分解構造が報告されている^[3]。本研究では、ピコ秒時間分解発光を用いた GFP 野生種と E222Q 変異体の蛍光特性及び分光学的な違いの解明を目的とした。

図 1(d) に GFP 野生種と E222Q 変異体の定常吸収スペクトルを示す。野生種 (Wild Type) は主に A 状態による 398 nm にピークを示し、B 状態が安定化した E222Q 変異体は 475 nm にピークを示した。GFP 野生種及び E222Q 変異体の分光学的特性を解明するため、時間相関単一光子計数法を用いたピコ秒時間分解発光分光測定を行った。野生種は励起波長 390 nm の光パルスを用いて A 状態を励起し、その後の脱プロトン化反応により生じる I 状態の発光を観測した。E222Q 変異体は励起波長 470 nm の光パルスで励起を行った。450 nm から 650 nm の波長域において発光減衰を観測し、140 K と 296 K の温度で測定を行った。

発表では、観測した GFP 野生種と E222Q 変異体の励起状態ダイナミクスと分光学的な違いについて、その物理的要因を報告する。

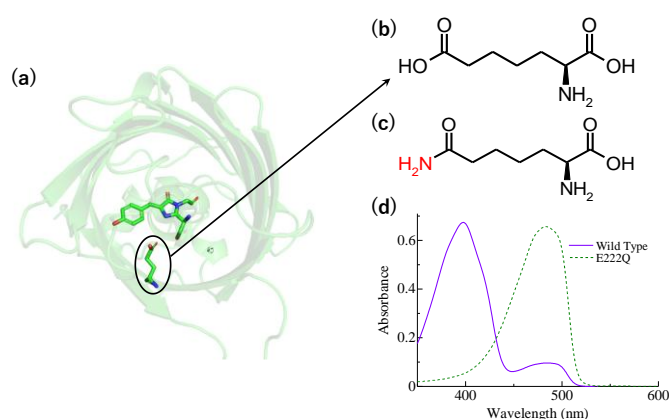


図 1: (a) GFP 野生種のタンパク質構造。(b)グルタミン酸及び (c)グルタミンの分子化学構造式。(d) 野生種と E222Q 変異体の定常吸収スペクトル。

参考文献:

- [1] O. Simomura et al., *J. Cell Comp. Physiol.* **59**, 223-239, (1962)
- [2] K. Brejc et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2306-2311, (1997).
- [3] K. Takaba et al., *IUCrJ*, **6**, 387-400, (2019).