

# Energy Migration Dynamics of Fluorescent Protein Layers Adsorbed on Chemically Modified Gold Surfaces

著者	MOHD YUSOFF Hanis Binti
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	2795
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/56712">http://hdl.handle.net/10097/56712</a>

# 論文内容要旨

(NO. 1)

氏名	Hanis Binti Mohd Yusoff	提出年	平成 25 年
学位論文の 題目	<b>Energy Migration Dynamics of Fluorescent Protein Layers Adsorbed on Chemically Modified Gold Surfaces</b> (化学修飾された金表面に吸着した蛍光タンパク質凝集層での励起エネルギー移動ダイナミクス)		

## 論文目次

### ACKNOWLEDGEMENT

### ABSTRACT

### TABLE OF CONTENTS

### LIST OF TABLES

### LIST OF FIGURES

### LIST OF ABBREVIATIONS

### LIST OF APPENDICES

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Functions of Protein

### 1.2 Outline

#### 1.3 Experimental Approach of Adsorbed Protein on Surfaces

##### 1.3.1 Surface Morphology by Scanning Tunneling Microscopy (STM)

##### 1.3.2 Time Resolved Study of Protein

#### 1.4 Summary

### References

## 2 FUNDAMENTALS

### 2.1 Fluorescent Proteins

#### 2.1.1 Yellow Fluorescent Proteins

### 2.2 Scanning Tunneling Microscopy (STM)

#### 2.2.1 STM Tip

#### 2.2.2 STM on Metal [Au(111)]

### 2.3 Overview of Photochemistry

#### 2.3.1 Absorption of Light

#### 2.3.2 Photoluminescence

#### 2.3.3 Non Radiative Decay and Radiative Decay

#### 2.3.4 Fluorescence

#### 2.3.5 Steady State and Time-Resolved Fluorescence

#### 2.3.6 Fluorescence Quantum Yield and Fluorescence Quenching

### 2.4 Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC)

#### 2.4.1 Avalanche Photodiode (APD) Detector

#### 2.4.2 Time-to-Amplitude Converter

#### 2.4.3 Fluorescence Depolarization and Anisotropy Decay

### 2.5 Summary

### References

## 3 EXPERIMENTAL

### 3.1 Citrine's Purification

- 3.1.1 Absorption and Fluorescence Measurement
- 3.2 STM Measurement
  - 3.2.1 Gold Nano Particle (AuNP) Substrates
  - 3.2.2 Commercial Au(111) Substrates
  - 3.2.3 STM Tips
  - 3.2.4 Data Analysis for STM
- 3.3 Commercial Au(111) Surface Modification
- 3.4 TCSPC Measurement
  - 3.4.1 Instrument Response Function (IRF)
  - 3.4.2 Determination of G Value
  - 3.4.3 Analysis of TCSPC Data

### 3.5 Summary

### References

## 4 STM IMAGES OF CITRINE

- 4.1 YFP(Citrine)-RFP on AuNPs
- 4.2 Citrine on Commercial Au(111) Substrates
- 4.3 Citrine on Hydrophilically and Hydrophobically Modified Au(111) Surfaces
- 4.4 Summary

### References

## 5 FLUORESCENCE AND ANISOTROPY DECAY OF CITRINE

- 5.1 Absorption and Fluorescence Spectra of Citrine
- 5.2 Fluorescence and Anisotropy Decay of Citrine in PBS and Water
- 5.3 Fluorescence and Anisotropy Decay of Citrine on Modified Glass
- 5.4 Fluorescence and Anisotropy Decay of Citrine on Modified Au(111)
- 5.5 Summary

### References

## 6 CONCLUSION

- 6.1 Conclusion

## APPENDICES

### 論 文 內 容

Research involving protein adsorption at an interface has extended into many areas since protein adsorption may induce denaturation or structural changes. Knowing the nature of adsorbed protein is interesting in the area such as biomaterials and pharmacology. In this study, a fluorescent protein (FP) has been chosen as a model to understand protein behaviour when adsorbed on a surface. Citrine from yellow fluorescent protein (YFP) variants has been chosen among other variants. Several works related with fluorescence dynamics such as lifetime and anisotropy decay of fluorescent protein in solution have been reported. However, so far there has been no report upon fluorescent dynamics of dried protein film.

Two methods were used which involved scanning tunneling microscopy (STM) to study protein's morphology on surfaces as well as time correlated single photon counting (TCSPC) for understanding fluorescence dynamics. Citrine was dried on hydrophilically and hydrophobically modified gold surfaces by drop cast protein solution on the freshly modified surfaces. The drop cast solution formed a "ring-like" pattern having a concentrated and visible rim. Citrine films were observed with an STM under ambient condition and after that followed by TCSPC measurement.

Interestingly, from the fluorescence spectra and lifetime of adsorbed layers, citrine molecules seems to remain intact at the adsorbed surface. STM images revealed that citrine molecules were adsorbed more uniformly, being packed like crystals on the hydrophilic surface. On the contrary, citrine molecules were more randomly adsorbed forming some aggregates on the

hydrophobic surface. Furthermore, time-resolved anisotropy has clearly shown the tendency of faster decay curves which may correspond to randomized layers on the hydrophobic surface comparing with on the hydrophilic surface.

#### 論文審査の結果の要旨

Hanis Binti Mohd Yusoff 提出の論文は、蛍光タンパクの固気界面における吸着状態を走査型トンネル顕微鏡 (STM) および時間分解蛍光異方性測定により調べたものである。蛍光タンパクの吸着状態におけるエネルギー移動過程の研究は例が無く、励起移動が吸着タンパク間で極めて効率的に起こる事を示した意義は大きい。

蛍光タンパクとしては比較的安定と考えられている黄色蛍光タンパクの変種 (シトリン) が用いられた。固気界面での吸着フィルム作製に先だって、緩衝剤の効果の確認が行われている。これは STM 測定の際に塩が析出する事を防ぐためである。この結果、シトリンは緩衝剤を完全に取り除いた純水溶液中でも蛍光スペクトルが変化せず変性の可能性が無いことが確認された。一方、蛍光異方性減衰測定からは、緩衝液中に比べて非常に速い減衰と遅い減衰に変化することから、二量体などの凝集体を作る事が示唆された。この純水中のシトリンを親水性および疎水性の二種類の表面処理を行った金フィルム上に吸着させ、STM による表面観察と蛍光異方性減衰測定によるエネルギー移動過程の研究を行っている。

吸着状態の蛍光スペクトルが溶液のものと大きく変化しないこと、および STM による像観察から未変性タンパク質の整数倍に相当する大きさの凝集体が観察されたことから、シトリンは固気界面吸着状態でも変性しないものと考えられた。さらに STM 観察からは、吸着タンパクの凝集体の大きさのナノレベルの分布が疎水性表面では広く、親水性表面では狭く均一であることが明らかとなった。また蛍光異方性減衰曲線の解析からは、疎水性表面で非常に速い減衰が観測されるのに対し、親水性表面では比較的緩やかな減衰が観測された。この実験結果はシトリン分子間で励起エネルギー移動が効率良く起こること、またその速度は親水性表面より疎水性表面で早く、タンパクの吸着状態が疎水性表面においてランダムであることを示唆している。

以上の結果は、吸着状態の蛍光タンパク間で励起エネルギー移動が起こること、その速さは吸着状態のナノレベルにおけるモルフォロジーに依存することを明らかにしたものである。これらの研究結果は、本人が自立して研究を行うのに必要な能力と学識を有することを示している。したがって、Hanis Binti Mohd Yusoff 提出の論文は博士 (理学) の学位論文として合格と認める。