

カルシウムセンサー蛍光タンパク質 cameleon の 共鳴エネルギー移動効率の不均一性

(理研・田原分子分光*, 理研・脳センター**) ○石井邦彦*, 細井晴子*, 水野秀昭**, 宮脇敦史**, 田原太平*

【序】カルシウムセンサー蛍光タンパク質 cameleon は、 Ca^{2+} 認識部位を有するリンカーを介し、青緑色蛍光を発する CFP 系蛍光タンパク質と黄色蛍光を発する YFP 系蛍光タンパク質が結合した構造をもつ (図 1) [1]。この結果、周囲の環境の Ca^{2+} 濃度に依存してリンカー部分の構造が屈曲・伸長し、2つの発色団の間の共鳴エネルギー移動(Förster Resonant Energy Transfer, FRET)効率を変化させることで蛍光センサーとして機能する。我々はこの FRET 効率がリンカー部分の構造変化のプローブとなることに注目し、FRET 効率の静的な不均一性およびその動的な揺らぎの観測を通してタンパク質の構造揺らぎについての知見が得られると考えた。そこで時間分解蛍光測定と二波長蛍光相互相関分光法を適用し、分子毎の FRET 効率の不均一性とその時間変化を検討した。

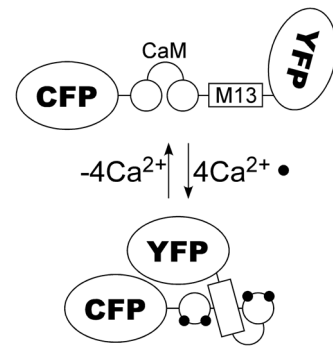


Fig. 1. cameleon の構造変化の模式図。

【実験】実験には circular permutation により FRET 効率を改善した cameleon 変異体 YC3.60 を用いた[2]。時間分解蛍光測定はフェムト秒チタンサファイアレーザー(Coherent, Mira-900F, 76 MHz)の二倍波(435 nm)を励起光とし、試料からの蛍光をアバランシェフォトダイオード検出器(id Quantique, id-100-20, 時間分解能約 60 ps)および時間相関光子計数ボード(Becker & Hickl, SPC-140)で時間分解検出することにより行った。超高速時間領域に対してはアップコンバージョン法による時間分解測定を行った。二波長蛍光相互相関分光は落射型共焦点顕微鏡(Nikon TE-2000U, 対物レンズ: 100倍, N.A.=1.3)と上記レーザー光源および2台のアバランシェフォトダイオード検出器を用いて行い (図 2)、485 nm, 550 nm の二つの波長で観測された蛍光光子の絶対到着時刻を基に蛍光強度の相互相関関数を計算した。

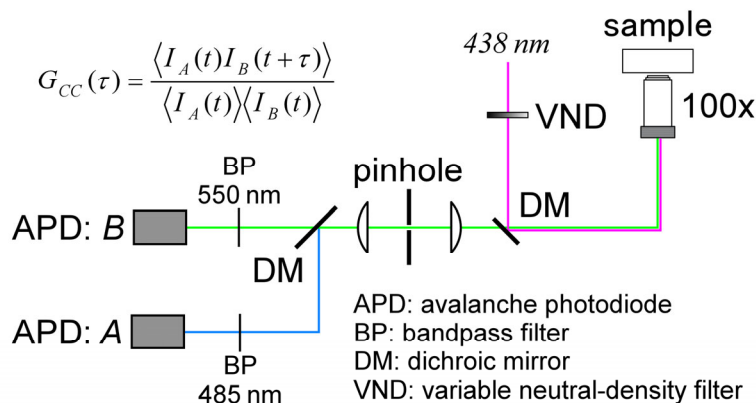


Fig. 2. 二波長蛍光相互相関分光装置。各検出器で測定した蛍光強度 $I_A(t)$, $I_B(t)$ から相互相関関数 $G_{CC}(\tau)$ を求める。

【結果と考察】YC3.60はCFP発色団の吸収帯を励起すると図3に示すように Ca^{2+} 濃度に依存する蛍光スペクトル変化を示し、YC3.60と Ca^{2+} との相互作用によりCFPからYFPへのFRET効率が增大することを確認できる。このようなFRET効率の増大はドナー蛍光の減衰を加速する。ドナー蛍光波長485nmで観測された時間分解蛍光減衰(図4a)は多成分的で、これを三成分の指数関数でフィットすると表1に示す結果が得られ、 Ca^{2+} の添加により平均蛍光寿命が減少することが分かった。一方アップコンバージョン法による超高速領域の測定では、 Ca^{2+} を加えることで約10psの超高速成分が新たに出現した(図4b)。もし系が均一であれば、すべての分子でこの超高速成分に対応するFRETが起こり、ナノ秒オーダーの寿命成分はほとんど観測されないはずである。したがって、FRET効率について幅広い不均一性が存在し、その不均一な分布全体が Ca^{2+} 濃度の関数として変化した結果、平均として図3のような全蛍光スペクトルの変化が観測されていると考えられる。

このようにFRET効率の不均一性が存在すると、分子毎に蛍光スペクトルのドナー/アクセプター強度比が変化し、その結果としてアンサンブル平均したドナー蛍光強度とアクセプター蛍光強度の間の相関が弱くなるため、それらの相互相関関数が減少する。図5に示したドナー蛍光・アクセプター蛍光の二波長相互相関関数は実際に自己相関関数よりも小さく、確かにFRET効率の不均一性が存在することが分かる。相互相関関数は Ca^{2+} 濃度の上昇と共にさらに減少しており、系の不均一性が増している。一方不均一性の時間変化に注目すると、自己相関関数と相互相関関数の比はどの Ca^{2+} 濃度条件でも本実験の測定可能時間範囲内(μs ~数ms)でほぼ一定であり、動的な揺らぎは見られなかった。つまり、観測された不均一性はこの時間スケールで静的なものであると言える。

【参考文献】

[1] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien, *Nature* **388**, 882-887 (1997).
 [2] T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, and A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10554-10559 (2004).

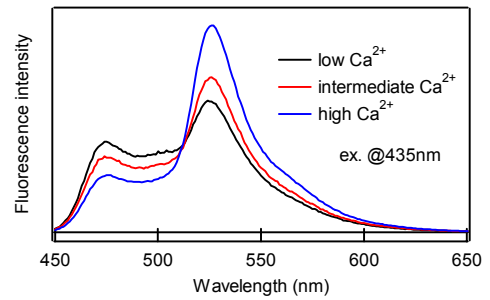


Fig. 3. YC3.60の定常蛍光スペクトル。

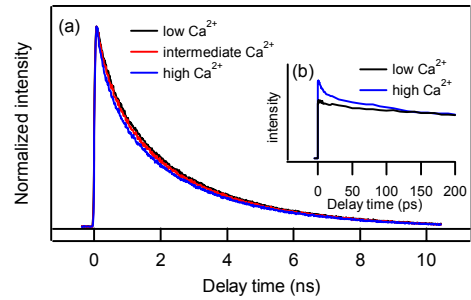


Fig. 4.(a)時間相関光子計数法によるYC3.60のドナー蛍光の時間分解蛍光減衰。(b)アップコンバージョン法による超高速時間領域の蛍光減衰(観測波長480nm)。

Table 1. フィッティング解析の結果。時定数(ns)と相対比(カッコ内)。

	low	intermediate	high
#1	0.17 (0.13)	0.11 (0.13)	0.09 (0.19)
#2	0.61 (0.30)	0.56 (0.33)	0.53 (0.32)
#3	2.41 (0.57)	2.40 (0.54)	2.40 (0.49)
平均	1.58	1.49	1.36

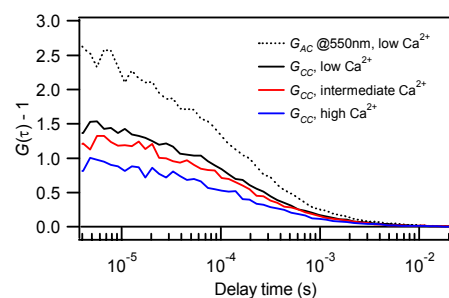


Fig. 5. YC3.60の二波長相互相関関数 $G_{CC}(\tau)$ と自己相関関数 $G_{AC}(\tau)$ 。