

2P088

Yellow Fluorescent Protein (YFP)の蛍光寿命の pH 依存性と細胞内 pH 計測

(北大院環境¹, 北大院電子研², 北大院先端生命³) ○大下 周吾¹, 中林 孝和^{1,2},
澄川 亮哉¹, 孫 凡³, 三國 新太郎³, 金城 政孝³, 太田 信廣^{1,2}

【序論】 蛍光タンパク質の一種である YFP はオワンクラゲより単離された緑色蛍光タンパク質の変異型であり、530 nm に蛍光極大波長を持つことが知られている。YFP の蛍光強度は pH によって大きく変化し、また、pH が 7.0 付近において変化量が大きいことから、様々な生理現象に伴う細胞内の pH 変化を YFP の蛍光を用いて測定できることが期待される¹⁾。また、蛍光強度に依らない蛍光寿命を利用した蛍光寿命イメージングを用いることによって、より定量的な観測が可能になり、蛍光寿命変化から様々な生理現象に伴う細胞内 pH 変化が観測できると期待される。本研究では、YFP の緩衝溶液中における吸収・蛍光スペクトルおよび蛍光減衰曲線の pH 依存性を測定した。また、YFP を HeLa 細胞内に発現させ、蛍光寿命イメージングの pH 依存性の測定から、YFP の蛍光寿命を用いた細胞内 pH 同定について検討した。

【実験】 YFP の溶液試料は、変異型 YFP (EYFP) を各 pH に調整したリン酸緩衝液に加えて作製した。これらの溶液試料を用いて吸収・蛍光スペクトル、蛍光減衰曲線を測定した。蛍光寿命イメージング測定では、励起光源としてフェムト秒チタンサファイアレーザーの第二高調波を用いた。励起光を共焦点顕微鏡に導き、光学フィルター(515~560 nm)を通った蛍光を光電子増倍管で検出した。各画素における蛍光減衰を時間ゲート法により 4 分割(0~2, 2~4, 4~6, 6~8 ns)し、単一指数関数による解析から蛍光寿命イメージングを得た。励起波長は主にアニオン種励起の 440 nm を用いた。蛍光寿命イメージングの測定用試料は、HeLa 細胞に EYFP のプラスミド DNA をトランスフェクションした後、インキュベーター内(37°C, CO₂ 5%)で一晩培養した細胞を用いた。酸性と中性に pH を調整したリン酸緩衝溶液を導入し、蛍光寿命画像を測定した。

【結果と考察】 各 pH における YFP の吸収スペクトルの測定結果を Fig.1 (a)、吸収強度と pH の相関関係を Fig.1 (b)に示す。YFP の発色団はアニオン種と中性種の平衡状態として存在することが知られている。pH が高いときにはアニオン種に平衡が移動するためアニオン種の 515 nm 付近の吸収が増加し、pH が低いときには中性種に平衡が移動するため中性種の 400 nm 付近の吸収が増加する。Fig.1 (b)からは、吸収は pH 7.0 付近での変化量が大きいことがわかった。アニオン種を主に励起する励起波長 480 nm での各 pH における YFP の蛍光スペクトルの測定結果を Fig.1 (c)、蛍光強度と pH の相関関係を Fig.1 (d)に示す。この結果から pH が 7.0 付近で蛍光強度の変化量が大きいのは、Fig.1 (a,b)からわかるように、アニオン種の量が変化したことによるものである。中性種を主に励起する励起波長 400 nm での各 pH における YFP の蛍光スペクトルの測定結果を Fig.1 (e)、蛍光強度と pH の相関関係を Fig.1 (f)

に示す。高い pH 領域では中性種の吸収はほとんど観測されないにもかかわらず、高い pH 領域にて中性種側の蛍光も強く観測された。このメカニズムについては、YFP の光活性化や何らかの中間体形成等の観点から現在検討中である。

励起波長 470 nm における蛍光減衰曲線の測定結果を Fig.2 に示す。470 nm 励起において YFP の蛍光寿命は 2 成分で再現でき、長寿命成分は 3.25 ns、短寿命成分は約 200 ps であった。

Fig.2 (a) から得られた平均蛍光寿命と pH の相関関係を Fig.2 (b) に示す。pH 6.0 付近から平均蛍光寿命の変化があり、アニオン種励起では低 pH 領域でわずかな pH 依存性があることを示している²⁾。また、励起波長 400 nm の蛍光減衰曲線を Fig.2 (c) に示す。

pH 低下に伴い中性種の短寿命成分が増加しており、中性種励起において平均蛍光寿命は著しい pH 依存性を持つことがわかった。

蛍光寿命イメージング測定の結果を Fig.3 に示す。440 nm 励起において HeLa 細胞内での EYFP 発現は十分に確認可能である。現在は中性と酸性下において観測し、これらの結果については講演にて報告する。

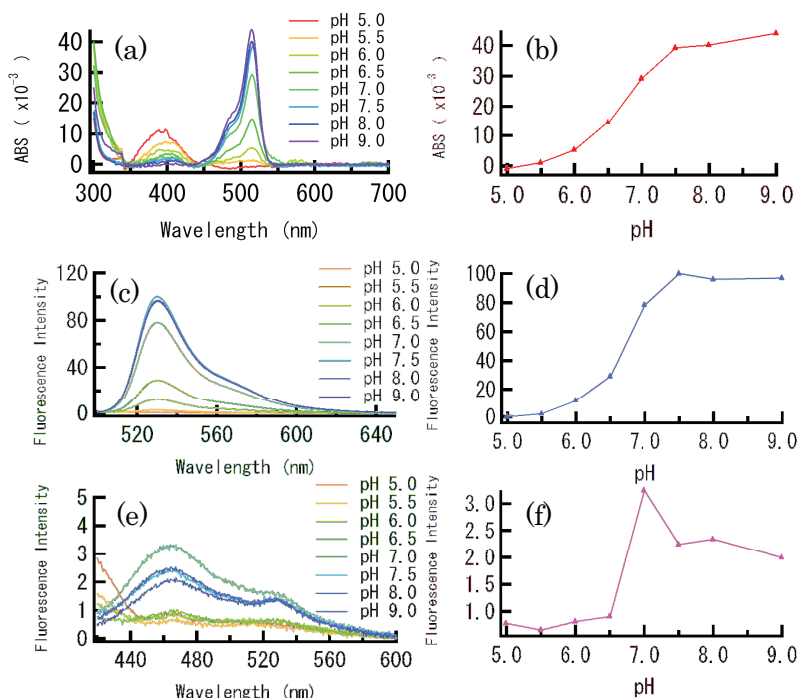


Figure 1. (a) Absorption spectrum of EYFP in various pH (9.0, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0). (b) Plots of pH against absorbance at 515 nm. (c,e) Fluorescence spectra of EYFP. Excitation wavelength was 480 nm (c) and 400 nm (e). (d,f) Plots of pH against fluorescence intensity. Emission wavelength was 530 nm (d) and 460 nm (f). These measurements were obtained in PBS(-).

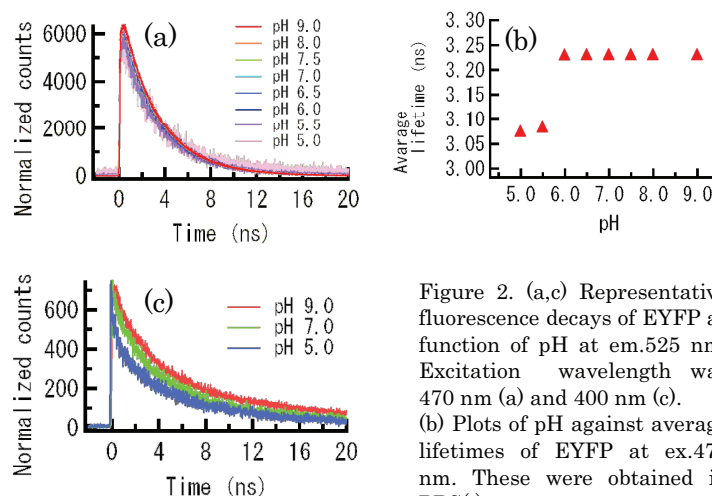


Figure 2. (a,c) Representative fluorescence decays of EYFP as function of pH at em.525 nm. Excitation wavelength was 470 nm (a) and 400 nm (c). (b) Plots of pH against average lifetimes of EYFP at ex.470 nm. These were obtained in PBS(-).

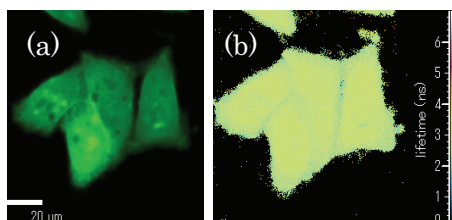


Figure 3. Fluorescence intensity image (a) and fluorescence lifetime image (b) of HeLa cells expressing EYFP excited at 440 nm under pH 7.0 of PBS(-).

1) Tim B. McAnaney. et al., *Biochem.*, Vol. 44, 5510, (2005).
 2) Yuexin Liu. et al., *J. Phys. Chem. B.*, Vol. 110, 24138, (2006).