

蛍光タンパク質の蛍光寿命を用いた細胞内 pH の その場検出

(北大電子研¹・北大院先端生命²) ○中林 孝和¹・大下 周吾¹・澄川 亮哉¹・
孫 凡²・金城 政孝²・太田 信廣¹

【序】 顕微鏡を用いた生細胞の蛍光観察において、蛍光強度ではなく、蛍光寿命を画像化することにより、細胞内のイオン濃度および各種刺激に対する細胞内の環境変化の高感度検出を行っている¹⁻⁵。本講演では、蛍光タンパク質の蛍光寿命を用いた細胞内 pH 計測について報告する。我々は、以前に変異型緑色蛍光タンパク質(EGFP)の蛍光寿命イメージングを用いた単一細胞内 pH 計測を提案している⁶。この手法は、EGFP内に存在する発色団がピコ秒の蛍光寿命を持つ中性種とナノ秒の蛍光寿命を持つアニオン種との酸塩基平衡状態にあることを利用しており(Fig. 1a)、アニオン種と中性種の両方を励起し、両方の蛍光が観測される蛍光波長を選ぶと、細胞内 pH の変化による中性種とアニオン種の平衡状態の変化を蛍光寿命の変化として観測することができる。しかし、EGFPのみではなく多くの蛍光タンパク質においても、発色団が酸塩基平衡状態

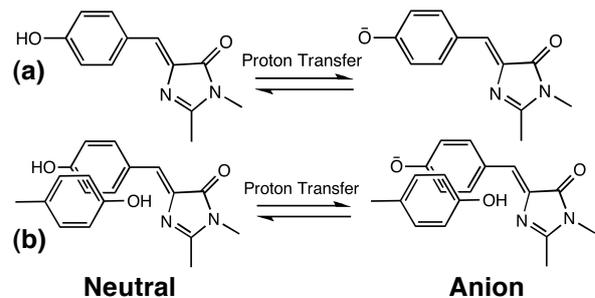


Fig. 1 The neutral and anionic forms of the chromophore of EGFP (a) and EYFP (b).

にあることが報告されており、蛍光タンパク質の蛍光寿命を用いた細胞内 pH 測定は、多くの蛍光タンパク質に対して適用可能な一般的な手法となり得ることができる。そこで本研究では、変異型黄色蛍光タンパク質(EYFP)の蛍光寿命の pH 依存性について、HeLa 細胞内および緩衝溶液中において検討した⁷。EYFP の発色団も EGFP と同様に酸塩基平衡を示すことが知られている(Fig. 1b)。また酸解離定数(pKa)が7付近にあることから、pH が7付近で蛍光寿命の大きな変化が起きることが予想され、多くの生理現象に対して適用できることが期待される。

【実験】 蛍光寿命イメージングシステムは、フェムト秒レーザーと共焦点顕微鏡を用い、画像の各点において時間ゲート法によって蛍光寿命画像を得る構成とした¹⁻⁵。EYFP を HeLa 細胞に発現させ、様々な pH に調整した緩衝溶液内で培養させて蛍光寿命画像の測定を行った。イオノフォアを用いて細胞内外の pH を等しくさせ、細胞外の pH を測定することによって細胞内の pH の値を得て

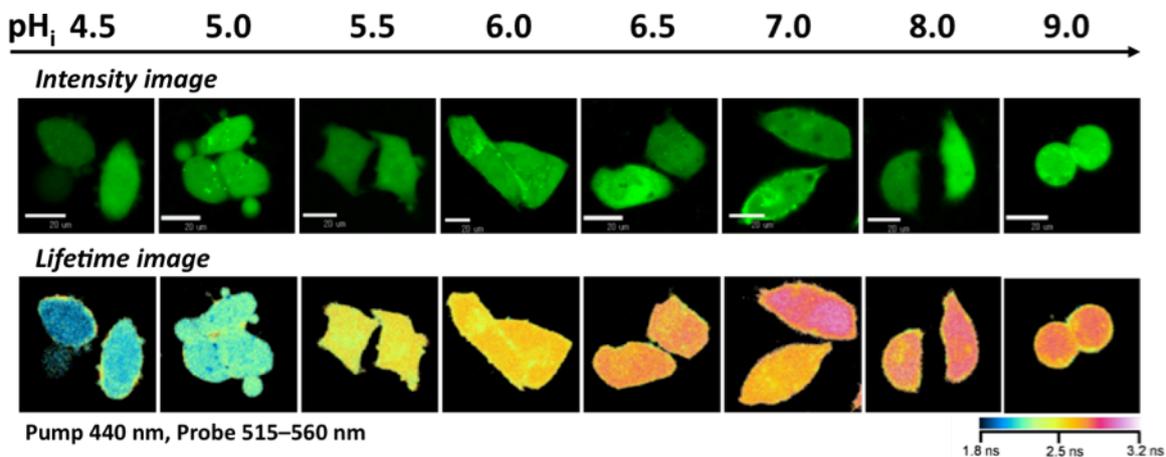


Fig. 2. Fluorescence intensity and corresponding fluorescence lifetime images of HeLa cells expressing EYFP. Intracellular pH is shown on the top of each image. Ionophore was added to equalize intracellular and extracellular pH. Excitation and monitoring wavelengths were 440 and 515–560 nm, respectively.

いる⁸⁾。緩衝溶液中における EYFP の蛍光減衰曲線の測定は、時間相関光子計数法を用いている。EYFP が発現した大腸菌を大量培養し、超音波を用いて大腸菌を破壊した後、Ni カラムにより EYFP を単離精製した。各 pH に調製した緩衝溶液に EYFP を導入し、蛍光減衰曲線を測定した。

【結果】 Fig. 1 に HeLa 細胞内における EYFP の蛍光寿命画像の細胞内 pH 依存性を示す。蛍光寿命は疑似カラーにて示してある。440 nm を励起波長として用い、中性種とアニオン種の両方を励起している。細胞内 pH が小さくなるにつれて蛍光寿命の値が短くなっており、EYFP の蛍光寿命を用いて細胞内 pH をその場で検出できることがわかる。しかし Fig. 2 に示すように、蛍光寿命の細胞内 pH 依存性は pH が 6 以下で単調に変化する挙動を示し、酸塩基平衡に基づく pH が 7 付近での大きな変化は観測されなかった。

Fig. 3 に様々な励起波長を用いて測定した緩衝溶液中での蛍光寿命の pH 依存性を示す。蛍光減衰曲線は Fig. 4 に例を示すように、多成分の減衰定数からなり、その加重平均を蛍光寿命として用いている。中性種を主に励起する 400 nm 励起では、pH7 付近で蛍光寿命が大きく変化しており、発色団の酸塩基平衡を用いて実測値を再現することができた。一方、アニオン種を主に励起する 470 nm 励起およびアニオン種と中性種の両方を励起する 440 nm 励起では、pH が 5.5–6.5 付近で蛍光寿命の変化を示しており、発色団の酸塩基平衡のみでは説明できないことがわかる。さらに、約 130 ps の寿命を持つ成分を新たに加えなければ蛍光減衰曲線を再現することができず、このサブナノ秒の寿命成分が蛍光寿命の pH 変化に対して大きな影響を与えていることがわかる。細胞内の蛍光寿命の pH 依存性(Figs. 1, 2)についても、サブナノ秒の寿命成分が大きな影響を与えていると考えられる。現在、このサブナノ秒成分の同定を検討している。また、EYFP の発色団の pKa 値が塩素イオン濃度に依存することを用いて、EYFP の蛍光寿命を用いた塩素イオン濃度の検出を現在行っている。

1) 中林・太田, 日本レーザー医学会誌 30 (2010) 441.

2) 中林・太田, 分析化学 58 (2009) 473. 3) N. Ohta and T. Nakabayashi, *Molecular Nanodynamics* (Wiley-VCH) (2009) 607. 4) 中林・太田, ナノイメージング (エヌ・ティー・エス) (2008) 245. 5) 中林・太田, ぶんせき (2007) 597. 6) T. Nakabayashi et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 668. 7) N. Ohta et al., *Proc. of SPIE* 7576 (2010) 7576G (invited). 8) J. A. Thomas et al., *Biochemistry* 18 (1979) 2210.

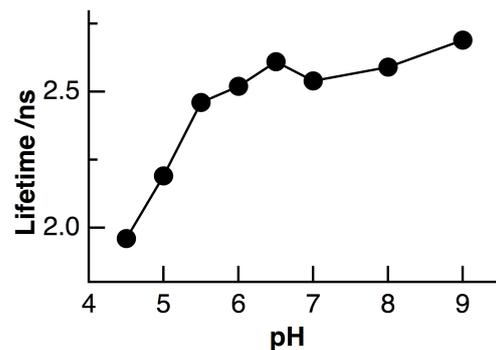


Fig. 2. Plots of the fluorescence lifetime of EYFP in HeLa cells against intracellular pH. Excitation and fluorescence wavelengths were 440 nm and 515–560 nm, respectively.

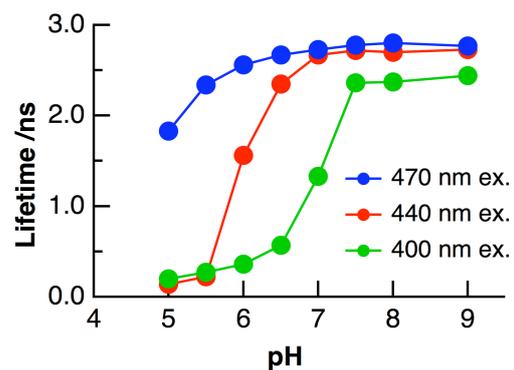


Fig. 3. Plots of the fluorescence lifetime of EYFP in buffer solution against pH. Excitation wavelengths were 400 nm (green), 440 nm (red), and 470 nm (blue), respectively. Fluorescence wavelength was 535 nm.

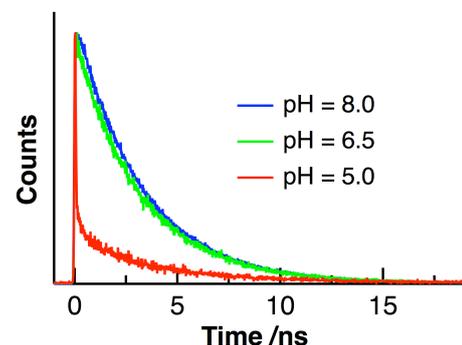


Fig. 4. Fluorescence decays of EYFP in buffer solution at pH of 5.0 (red), 6.5 (green), and 8.0 (blue) at the excitation wavelength of 440 nm. Fluorescence wavelength was 535 nm.