

蛍光タンパク質 赤 Kaede の フェムト秒時間分解蛍光ダイナミクスとエネルギー移動

(理研) ○細井晴子・水野秀昭・宮脇敦史・田原太平

【序】細胞のイメージングは 21 世紀の生物分野における最先端技術の一つであり、その中で蛍光タンパク質が果たす役割は非常に重要である。緑の蛍光を発する Green Fluorescent Protein (GFP) を初めとする蛍光タンパク質は、遺伝子工学的に細胞内に導入することで、蛍光顕微鏡により生きたままの細胞や組織の観測を可能にするため、生体のイメージングに広く用いられている。蛍光タンパク質のより優れた活用方法の開発には、その発光機構を明らかにすることが不可欠である。

GFP の発光機構は詳細に調べられており、励起状態におけるプロトン移動反応が重要であることが明らかになっている。一方、単量体として存在する GFP とは対照的に、常にオリゴマーとして存在する蛍光タンパク質の中には、GFP と発光機構が異なる例があることが知られている。しかし、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、四量体を形成する蛍光タンパク質 (Fig.1) である Kaede に注目した。Kaede はヒュサンゴ由来の蛍光タンパク質であり、紫外光照射によりその蛍光が緑から赤に変化するという性質を持つ。本研究では、赤の発色団を持つ Kaede (赤 Kaede) について、フェムト秒時間分解蛍光測定によりその発光機構を明らかにした。

【実験】緑の蛍光を発する緑 Kaede は大腸菌に発現させたものを精製した¹。赤 Kaede は緑 Kaede の光照射により調整した。タンパク質濃度は $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 、pH は 7.3 である。フェムト秒時間分解蛍光測定は up-conversion 法²を用いて行った (時間分解能 200 fs)。時間分解蛍光スペクトル測定にはストリークカメラを用いた (時間分解能 20 ps)。



Fig. 1 Tetrameric structure of fluorescent proteins.

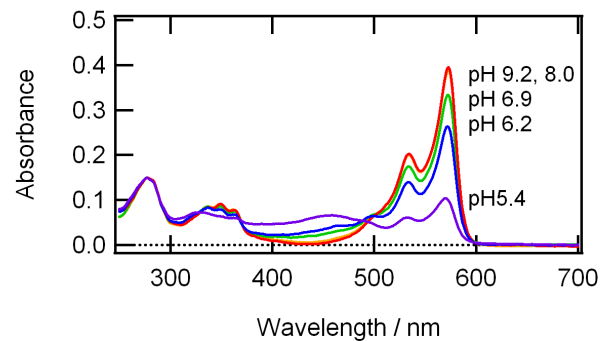


Fig. 2 Absorption spectra of red Kaede at various pH.

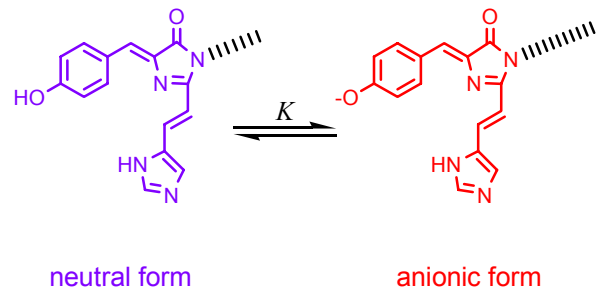


Fig. 3 The structure of the neutral and the anionic forms of red Kaede chromophore and the acid-base equilibrium.

【結果】赤 Kaede の吸収スペクトルは大きな pH 依存性を示す (Fig.2)。これは、発色団中のフェノール性水酸基の解離平衡 (Fig.3) による変化である。中性、アルカリ性で観測される 570 nm と 530 nm のピークは anionic form 由来であり、酸性条件で現れる 450 nm のピークは neutral form 由来である。pH 中性条件では、neutral form 励起と anionic form 励起による蛍光スペクトルは一致し、ともに 580 nm に強いピークを持つ anionic form の蛍光を与える。neutral form の蛍光は、酸性条件でのみ 500 nm に観測された。

pH 7.3 の赤 Kaede 水溶液について時間分解蛍光スペクトル測定を行ったところ、neutral form 励起により neutral form からの蛍光 (520 nm) がまず現れ、その減衰とともに anionic form 蛍光 (580 nm) の増大が観測された (Fig.4)。しかしその変化は速く、20 ps の時間分解能では不十分であったため、同溶液の up-conversion 測定を行った (Fig.5)。neutral form 励起による neutral form の減衰 (520 nm) の時定数と、anionic form の立ち上がり (570 nm) の時定数はともに 13 ps であった。よって、neutral form から anionic form への変換が 13 ps の時定数で起こると結論した。(なお 570 nm における瞬時に立ち上がる成分は、anionic form 直接励起による anionic form 発光に由来する。)

GFP では、励起された発色団の neutral form からの脱プロトン反応により anionic form が生成することが知られている。つまり、生成する anionic form は同じタンパク質の発色団由来である。しかし赤 Kaede の蛍光ダイナミクスには、水溶液の重水置換による変化が見られなかった。よって、赤 Kaede の発光機構では、励起状態での脱プロトン反応は重要でないと結論した。時間分解蛍光異方性測定の結果から、四量体を形成する赤 Kaede では、励起された neutral form から、四量体内の近接した別のタンパク質の anionic form への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起こり、その結果 anionic form 蛍光が観測されていることが明らかになった。

【参考文献】 (1) Ando, R.; Hama, H.; Yamamoto-Hino, M.; Mizuno, H.; Miyawaki, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12651. (2) Takeuchi, S.; Tahara, T. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3052.

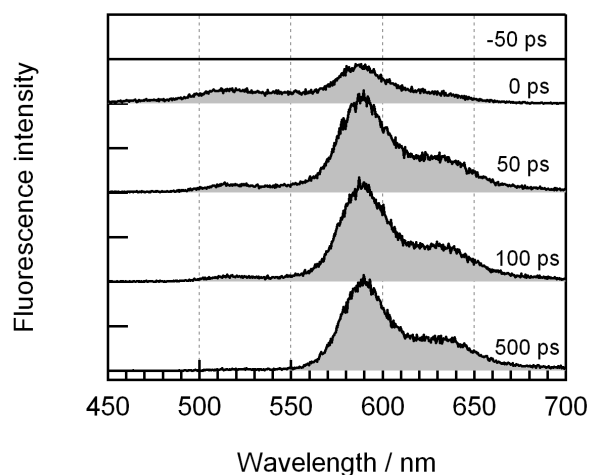


Fig. 4 Time-resolved fluorescence spectra of red Kaede excited at 400 nm.

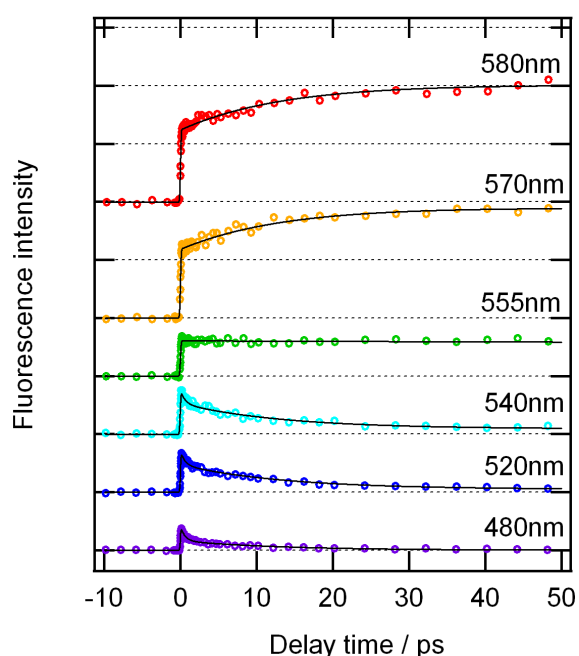


Fig. 5 Time-resolved fluorescence signals of red Kaede excited at 400 nm.