



Title	蛍光飽和を利用した高い蛍光量子収率を持つ蛍光タンパク質のスクリーニング
Author(s)	
Citation	令和3（2021）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2022
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/85619
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和3年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	いいだまひろ 飯田眞大	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	永井健治	所属	薬学研究科		
研究課題名	蛍光飽和を利用した高い蛍光量子収率を持つ蛍光タンパク質のスクリーニング				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
<研究目的> 蛍光タンパク質は、遺伝子導入をすることで様々な細胞に発現させ、蛍光化することができるため、生体分子の動態や細胞内環境を可視化するプローブとして薬学研究を含む生命科学研究に幅広く用いられている。蛍光タンパク質の蛍光強度の向上は、画質の向上や励起光による細胞ダメージの軽減に重要である。蛍光タンパク質の明るさは蛍光量子収率とモル吸光係数によって評価される。 蛍光強度は励起光強度の上昇に伴って増大するが、ある段階で励起光強度が大きくなっても蛍光強度が変化しなくなる。この蛍光飽和という現象は、蛍光寿命(蛍光分子が励起されてから基底状態に戻るまでの時間)と吸収断面積(一蛍光分子あたりの励起光の吸収割合)、つまり蛍光タンパク質自身の光化学特性にのみによって影響される。本研究では、蛍光飽和現象による蛍光タンパク質の光化学特性の評価を行うため、蛍光飽和特性の解析を行った。 <研究結果> 1. 蛍光飽和現象とは 蛍光飽和現象と、蛍光量子収率、モル吸光係数との関係について論じる。そのためには、蛍光飽和という現象について理解する必要がある。蛍光タンパク質を励起する際、光の照射範囲にある分子の数は有限であり、蛍光分子が励起された後、蛍光を発して基底状態に戻るまでに時間がある(蛍光寿命)。そのため、励起光強度が大きくなっていくと、基底状態の分子の数が減少して蛍光強度の変化量が小さくなっていく。これが蛍光飽和という現象である。励起光のエネルギーを吸収しやすいほど、また蛍光寿命が長いほど蛍光飽和が起こりやすい。 この蛍光飽和を引き起こすための励起光強度 (Saturation intensity, I_s) は下記の式¹⁾から求めることができる。 $W_A = \sigma_A \times I \times \frac{1}{hc/\lambda} \cdots (1)$					

W_A : 分子の励起速度(回/秒)、 σ_A : 1 光子吸収断面積(cm^2)、 I : 励起光の強度(W/cm^2)、 h : プランク定数($\text{J} \cdot \text{s}$)、 λ : 励起光の波長(m)、 c : 真空中の光速(m/s)

(1)式について、 W_A の逆数は分子が一回励起されるのにかかる時間ということになる。この値が蛍光寿命より短いとき、励起される速度が基底状態に戻る速度を上回るため蛍光飽和が起こる。すなわち、

$$I_s = \frac{hc}{\lambda \sigma_A \tau} \cdots (2)$$

I_s : 飽和強度(W/cm^2)、 τ : 蛍光寿命(秒)

(2)式より、吸収断面積が大きいほど、蛍光寿命が長いほど飽和強度は小さくなるということが分かる。吸収断面積はモル吸光係数に比例し、下記の関係にある²⁾。

$$\sigma = 3.82 \times 10^{21} \varepsilon \cdots (3)$$

蛍光タンパク質のデータベースである FPbase³⁾に登録されていて蛍光寿命と蛍光量子収率のデータの記載がある蛍光タンパク質について、蛍光寿命と蛍光量子収率の相関を調べた。(図 1)

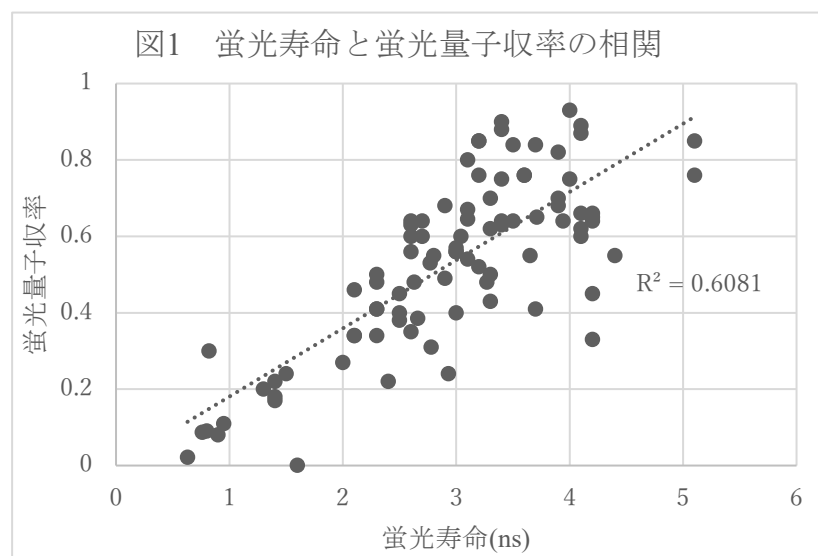


図 1 より、蛍光寿命と蛍光量子収率には正の相関があることが分かる。

シアン色蛍光タンパク質 mTurquoise2 の開発においては、蛍光寿命を測定し、長い蛍光寿命を持つものを選択することで高い蛍光量子収率を持つ蛍光タンパク質を得た⁴⁾。(3)式、図 1 から、高い蛍光量子収率、高いモル吸光係数を持つ明るいタンパク質は高い吸収断面積、長い蛍光寿命を持つ、すなわち飽和強度が小さいと考えられる。

2. パワー密度測定

共焦点レーザー顕微鏡を用いてレーザーの出力と蛍光強度の相関を調べ、その傾きの変化から飽和強度を推定する実験を計画した。蛍光飽和を引き起こすためには強い励起光が必要であるため、最大のパワー密度で励起光を照射できる条件を調べた。

波長 405nm のレーザーを最大出力で用いて、それぞれの対物レンズを用いた場合のサンプルに照射される励起光のパワーをレーザーパワーメーターを用いて測定し、下記の式を用いてパワー密度を測定した。

$$\text{パワー密度 (W}/\text{cm}^2) = \frac{\text{パワー (W)}}{\left(\frac{0.61 \times \lambda(\text{nm})}{NA \times 10^7}\right)^2 \times \pi} \cdots (4)$$

λ : 励起光波長、NA: 対物レンズの開口数

結果を以下の表に示す。(表 1)

表 1

対物レンズ	パワー(W)	開口数 NA	パワー密度(W/cm ²)
UPLAPO 10x	0.0007827	0.4	65341
UPLFLN 40x O	0.0002678	1.3	236129
UPLSAPO 60x O	0.0002330	1.35	221567
UAPO 40x OI/340	0.0002668	1.35	253720
PLAPO 40x WL SM	0.0002591	0.9	109514
UPLSAPO 60x W	0.0002320	1.2	174352

結果より、UAPO 40x OI/340 を用いることで最大のパワー密度が得られることが分かった。

3. 蛍光強度測定

本研究は mTurquoise2 の論文⁴⁾に基づき、長い蛍光寿命のものは蛍光量子収率が高いという前提で行っている。そのため、本研究ではこの論文内で開発された mTurquoise2 と、論文内で比較がなされている ECFP をサンプルとして用いて蛍光強度を測定した。

mTurquoise2 と ECFP の特性を表 2 に示す。mTurquoise2 は ECFP より長い蛍光寿命を持ち、吸収断面積は同等の値であるから、mTurquoise2 のほうが低い励起光強度で蛍光飽和が起これと予想できる。

表 2

	モル吸光係数 $\epsilon^4)$ (10 ³ M ⁻¹ cm ⁻¹)	蛍光量子収率 $\Phi^4)$	吸収断面積 σ (cm ²)	蛍光寿命 $\tau^4)$ (ns)	飽和強度 I_s (W/cm ²)
mTurquoise2	30	0.93	1.15×10^{-16}	4.0	1.1×10^6
ECFP	30	0.36	1.15×10^{-16}	3.0	1.4×10^6

吸収断面積はモル吸光係数から(3)式を用いて計算した。

・サンプルの調製

mTurquoise2、ECFP をコードする遺伝子がクローニングされた pRSETb ベクターによって大腸菌 JM109(DE3)を形質転換し、アンピシリンを加えた LB 寒天培地プレートにまき、37℃で一晩培養した。生じたコロニーをスライドガラスに塗り、カバーガラスをのせた。

・測定

共焦点レーザー走査型生物顕微鏡 FV1000 を用いて蛍光強度の測定を行った。波長 405nm のレーザー、UAPO 40x OI/340 対物レンズを用いた。画素滞在時間は 2.0 μ s/pixel に設定した。

レーザーの出力を変えて撮影を行い、それぞれの画像の全体の蛍光強度の平均値を測定した。

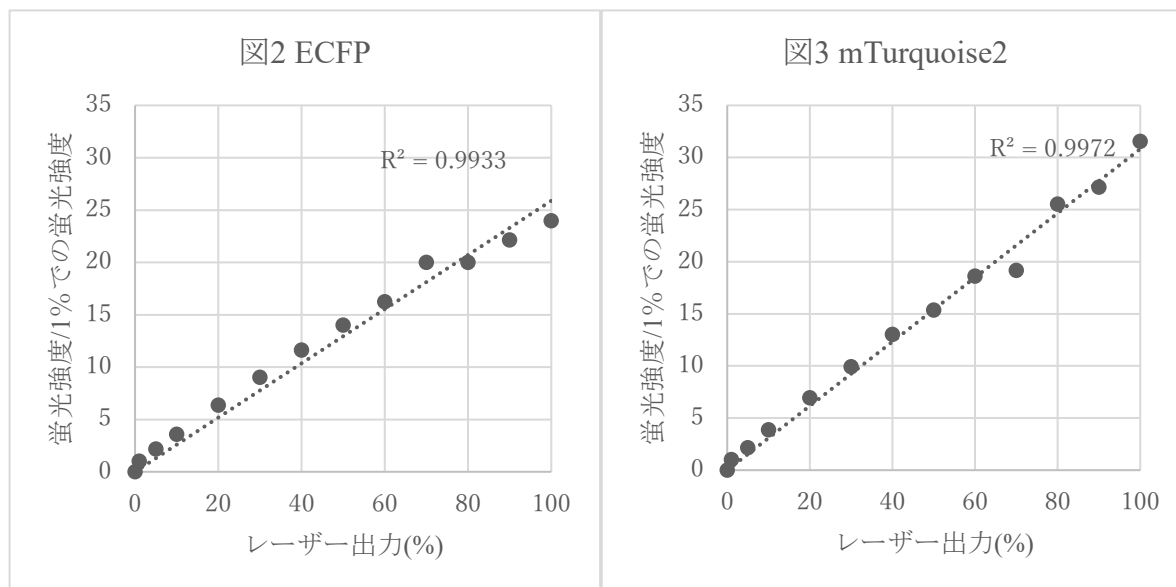
蛍光タンパク質は強い励起光を受けると構造の不可逆的な変化がもたらされ、蛍光を発しなくなることがある(退色)。退色による影響を補正するために、それぞれの出力での測定の間に、一定の出力で測定を行った。一定の出力での測定では、蛍光強度の変化は蛍光を発することができる蛍光分子の数の変化によるものである。

以下の通りにレーザー出力を変えてそれぞれの画像の全体の蛍光強度の平均値を測定した。

0%→1%→5%→1%→10%→1%→20%→1%→30%→1%→40%→1%→50%→1%→60%→1%→70%→1%

→80%→1%→90%→1%→100%

レーザー出力 0%の時の蛍光強度の値をバックグラウンド値として、それぞれの蛍光強度から差し引いた。それぞれの出力での蛍光強度を、その直前に測定した出力 1%の時の蛍光強度で割って蛍光強度の比を求め、レーザー出力を横軸に、蛍光強度の比を縦軸にとりグラフを作成した。(図 2,3)



蛍光飽和によってグラフの傾きが小さくなっていくことが予想されたが、ECFP、mTurquoise2 のどちらのグラフでもデータが直線状に並んでいるように見え、グラフの傾きの変化を確認することができなかった。そのため ECFP と mTurquoise2 の蛍光飽和のしやすさを比較することはできなかった。

4. 飽和強度の計算

mTurquoise2 と ECFP の特性から、(2)式を用いて飽和強度を計算した。波長は 405nm、プランク定数を $6.626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ 、真空中の光速を $2.998 \times 10^8 \text{ m/s}$ として計算した。結果は表 2 に示した。

本研究で用いた顕微鏡の最大のパワー密度は $2.5 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ であり、mTurquoise2 と ECFP の飽和強度の理論推定値はそれぞれ $1.1 \times 10^6 (\text{W/cm}^2)$ 、 $1.4 \times 10^6 (\text{W/cm}^2)$ であるため、本研究で用いた顕微鏡のパワー密度は蛍光飽和を観察するには十分でないといえる。

<課題、展望>

本研究は蛍光飽和に着目した蛍光タンパク質の光化学特性の評価方法の構築を目指したが、利用可能な機器のパワー密度が十分ではなく、評価方法の確立には至らなかった。得られたグラフは直線状に並んでおり、蛍光の退色による影響を補正することができていると考えられる。よってより高いパワー密度を持つ顕微鏡を用いて本研究と同様の測定を行えば、退色に影響されずにサンプル間の飽和強度の比較をすることができると期待される。

励起光強度と蛍光強度の関係がどのような式で表されるかを調べ、得られたデータをその式にフィッティングすることで、低いパワー密度からも飽和強度を推定できる可能性がある。

参考文献

- 1) 原口 徳子・木村 宏・平岡 泰編, 新・制細胞 蛍光イメージング, 共立出版, 2015, p.223
- 2) Lakowicz, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy (3rd ed.). Springer. p.59.
- 3) FPbase, Fluorescent Protein Table, アクセス日:2021 年 12 月 15 日
<https://www.fpbases.org/table/>
- 4) Goedhart, J. et al. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. Nature Communications, 3, 751