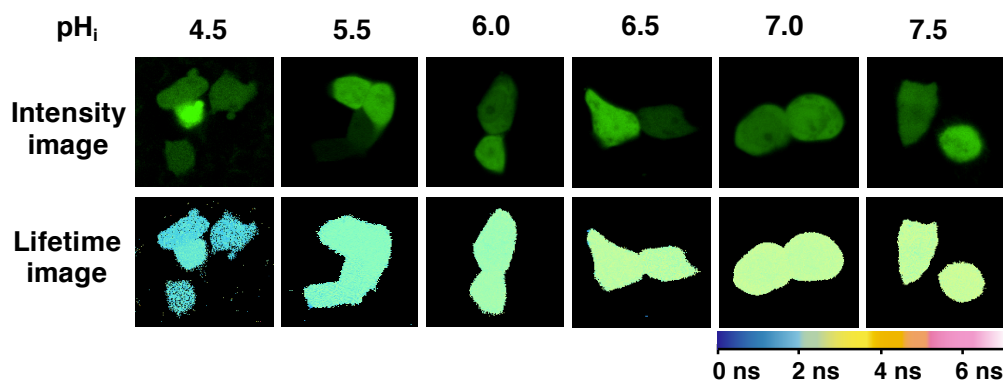


(北大電子研) ○中林孝和・王 会平・長尾一生・金城政孝・太田信廣

**【序】** 蛍光による細胞のイメージングにおいて、蛍光強度ではなく、時間分解分光技術を用いて蛍光寿命をイメージングすることにより、細胞内のイオン濃度の定量測定および各種外来刺激に対する細胞内の環境変化について検討している<sup>1-3</sup>。蛍光強度は蛍光分子の濃度、励起光強度および光学系に依存するのに対し、蛍光寿命は光退色や励起光強度などに依存しない。そのため強度測定に比べて定量性が大きく増加し、細胞内の蛍光分子の環境変化などを高感度に検出できると考えられる。また時間分解測定から細胞内の光励起ダイナミクスを直接観測することができ、"蛍光寿命"というパラメーターから、単一細胞内の様々な現象を明らかにすることができると考えている。本講演では、蛍光寿命イメージングを用いて単一細胞内のpHのイメージング測定を行うことができることを示す。(1) 変異型緑色蛍光タンパク質(EGFP)と(2) pH感応色素であるBCECF(2',7'-Bis(carboxyethyl)-4(5)-carboxyfluorescein)を蛍光プローブとした単一細胞内pH計測についてそれぞれ紹介する。

**【実験】** 蛍光寿命イメージングシステムは、フェムト秒チタンサファイアレーザー(100 fs, 81 MHz)とビームスキャン型の共焦点蛍光顕微鏡を用い、マッピングの各点において光子計数検出による蛍光減衰曲線の測定を行う構成とした。蛍光減衰曲線を分割する時間ゲート法を用いることにより、数分で蛍光寿命イメージングを得ることができる<sup>1</sup>。本研究では、蛍光減衰曲線を0-2 ns, 2-4 ns, 4-6 ns, 6-8 nsと4分割し、各ピクセルにおいて4分割された蛍光減衰曲線を単一指数関数を用いて解析し、蛍光寿命イメージングを得ている。

**【結果】** (1) *EGFP* の蛍光寿命を用いた単一細胞内 pH 計測 *EGFP* は $\beta$ -can と呼ばれる $\beta$ -シートのポリペプチド鎖で覆われた円筒の内部に発色団を有した構造をとっており、高効率で緑色蛍光を発することが知られている。*EGFP* の発色団は、ナノ秒の蛍光寿命を持つ中性種とサブナノ秒の蛍光寿命を持つアニオン種との平衡状態からなり、その存在比は pH に依存する。そのためアニオン種と中性種の両方の蛍光が観測される蛍光波長を選ぶと、pH による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<sup>4</sup>。我々はこの現象を単一生細胞に応用できると考え、人の癌細胞である HeLa 細胞に *EGFP* を発現させ、蛍光寿命による細胞内の pH 計測について検討した。Fig. 1 に HeLa 細胞中における *EGFP* の蛍光寿命イメージングの細胞内 pH 依存性を示す。中性種の吸収バンドに対応する 405 nm にて試料を励起し、510 nm の蛍光を観測している。イオノフォアであるモネンシンを細胞の培養液に



**Fig. 1.** Fluorescence intensity images and corresponding fluorescence lifetime images of HeLa cells expressing EGFP. Intracellular pH is shown on the top of each image. Monensin was added to equalize intracellular and extracellular pH. Excitation and monitoring wavelengths were 405 and 510 nm, respectively.

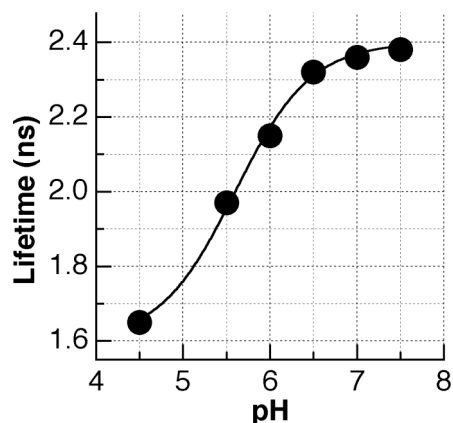
加えて、細胞内外の pH を等しくしている。そのため細胞外の pH を調製することによって、細胞内の pH を変化させることができる。細胞内の pH の値が小さくなるにつれて、蛍光寿命の値が短くなっており、EGFP の蛍光寿命を用いて細胞内の pH を観測できることがわかる。細胞内 pH と蛍光寿命( $\tau_f$ )との関係を図示した結果を Fig. 2 に示す。得られた結果は、以下の式を用いて再現することができる<sup>4)</sup>。ここで a および b は測定値のオフセットとダイナミックレンジに対応する。

$$\tau_f = a + b[1 + 10^{(pK_a - \text{pH})}]^{-1} \quad (1)$$

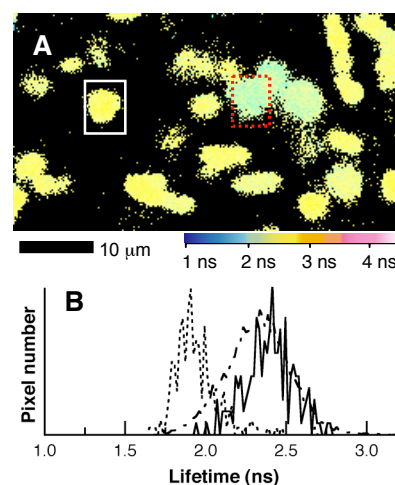
(1)式より細胞内における中性種とアニオン種の pKa 値は約 5.6 と見積ることができる。この値は緩衝溶液中の結果と定性的に一致している<sup>4)</sup>。このようにモネンシンなどを用いて細胞内の蛍光寿命と pH との間の検量線を作成し、その後目的の細胞の蛍光寿命を観測すれば、単一細胞内の pH を求めることができることがわかる。

**(2) BCECF の蛍光寿命を用いた単一細胞内 pH 計測**  
pH 感応色素である BCECF によって高度好塩菌 (*Halobacterium (Hb.) Salinarum*) を染色し、細胞内に存在する BCECF の蛍光寿命イメージング測定を行った<sup>2,3)</sup>。さらに高度好塩菌を含んだ溶液に電極を導入し、細菌の外部電場効果の測定を行った。細菌試料は、4 M NaCl を含む HEPES 緩衝溶液(基本液)に BCECF/AM を加えて 3 日間暗所放置する。その後十分に遠心洗浄を行ない、基本液に分散させたものを用いた。Fig. 3A に励起波長 450 nm、蛍光波長 515-560 nm における高度好塩菌の蛍光寿命イメージングを示す。細菌一つ一つの蛍光寿命を容易に判別できることがわかる。高度好塩菌の蛍光寿命の多くは 2.4 ns と計算され、蛍光寿命と細胞内 pH との間の検量線<sup>2)</sup>から、多くの細菌の細胞内 pH は 7.1 であることがわかった。しかし 2.4 ns の成分の他に、およそ 1.9 ns の蛍光寿命を持つ細菌も存在することがわかる。Fig. 3B に 2.4 ns の蛍光寿命を持つ細菌(実線)と 1.9 ns の蛍光寿命を持つ細菌(点線)の蛍光寿命のヒストグラムを示す。ヒストグラムの位置は明らかに異なり、異なる蛍光寿命を持つ 2 種類の細菌が存在することを示している。細胞内 pH のみでは、このような蛍光寿命の違いを説明することは難しい。BCECF の蛍光強度は外部電場に大きく依存することから、細菌内における BCECF の静電的環境の違いを反映していると考えられる。また高度好塩菌に外部電場を印加すると、細菌がその形状を保ったまま会合体を形成することがわかった。しかし会合体を形成しても蛍光寿命は変化せず、寿命の速い成分は印加前と同様に観測された。

1) 中林他, *分光研究* 55 (2006) 31. 2) T. Nakabayashi et al., *Chem. Lett.* 36 (2007) 206. 3) H.-P. Wang et al., *Chem. Phys. Lett.* 442 (2007) 441. 4) A.A. Heikal, et al. *Chem. Phys.* 274 (2001) 37.



**Fig. 2.** Plot of the intracellular pH against the fluorescence lifetime of EGFP in HeLa cells. The simulated curve is shown by solid line. Excitation and monitoring wavelengths were 405 and 510 nm, respectively.



**Fig. 3.** (A) Fluorescence lifetime image of BCECF-loaded *Hb. salinarum*. (B) The histograms of the fluorescence lifetime for the cells indicated by solid square and dotted square and for the whole cells are shown by solid, dotted, and chain lines, respectively. Excitation wavelength was 450 nm and the fluorescence in the 515-560 nm is detected.