

蛍光寿命イメージング測定による HeLa 細胞内ダイナミクスの観測

(北大電子研*, 北大院先端生命**)

○伊藤寿之*, 中林孝和*, 孫 凡**, 金城政孝**, 太田信廣*

【序】 蛍光寿命イメージング (fluorescence lifetime imaging, FLIM) は, 蛍光強度そのものではなく, 蛍光強度の減衰過程から得られる蛍光寿命に基づいて観測対象を画像化する手法である¹⁻³⁾. 蛍光強度画像では, 蛍光色素濃度, 光退色, 励起光強度, そして光学系などの影響を考慮しなければならないが, 蛍光寿命は分子固有の値であり, より定量的な評価が可能となる. 我々はこれまで, FLIM を用いて細胞内の微視的な環境変化を高感度に検出できることを報告した^{1,2)}. 本研究では, 変異型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現させた HeLa 細胞において, FLIM を用いてアポトーシス過程にともなう細胞内の光励起ダイナミクスの観測を行った.

【実験】 用いた FLIM 装置の概略図を Fig. 1 に示す. 半導体励起 CW 固体レーザー (Millennia, Spectra-Physics) により励起されたフェムト秒チタンサファイアレーザー (Tsunami, Spectra-Physics) の第二高調波 (440 nm, 81 MHz, ~20 μ W) を励起光源として用いた. シングルモード光ファイバーを用いて励起光を共焦点レーザー顕微鏡 (Eclipse C1, Nikon) のスキャナー部へ導き, 試料からの蛍光はマルチモード光ファイバーと光学フィルター (520-560 nm) を通して FLIM 検出器 (LIMO, Nikon Europe BV) へ入射し測定を行った. 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画像を得た³⁾. ヒト癌細胞である HeLa 細胞に EGFP 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試料として用いた. アポトーシス誘導試薬には, 腫瘍壊死因子 (TNF- α , 0.25 μ g/mL) とシクロヘキシミド (14 μ g/mL) を用いた. 顕微鏡ステージ上の培養装置内に試料を置き, 37 °C, CO₂ 5%の環境下で測定を行った.

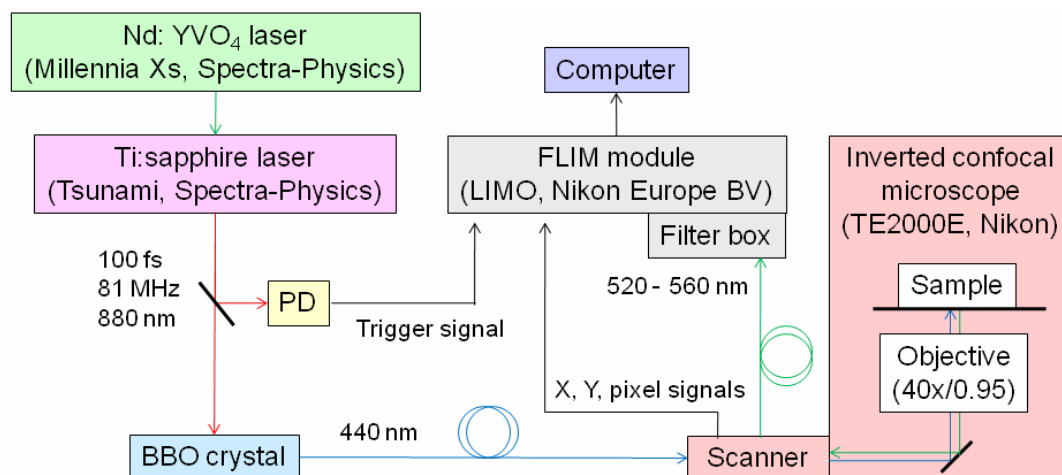
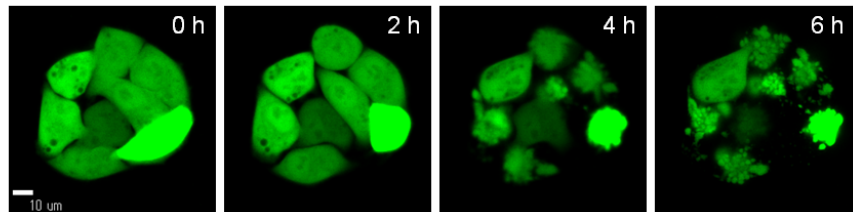


Figure 1. Block diagram of the FLIM measurement system.

【結果と考察】 アポトーシス誘導試薬を添加した後、一定時間ごとに測定した HeLa 細胞の蛍光強度画像を Fig. 2(a)に示す. 時間の経過とともに細胞の収縮が見られ, 4 時間以降では細胞形状に著しい変化が認められることから, これらの細胞でアポトーシス過程が進行していることがわかる. 各時間で得られた蛍光寿命画像を Fig. 2(b)に示す. 時間の経過とともに蛍光寿命が徐々に短くなるのが認められた. アポトーシス誘導試薬添加直後 (0 h) と 6 時間後の蛍光寿命画像 (Fig. 2(b)) から得られた, 蛍光寿命の分布 (ヒストグラム) を Fig. 3(a)に示す. 試薬添加直後ではピーク値が 2.32 ns であった蛍光寿命が, 6 時間後では 2.27 ns へ短くなるのが観測された. また, 蛍光減衰を 4 分割した各ゲートにおける蛍光強度の時間変化 (Fig. 3(b)) から, 試薬添加直後より 6 時間後の方が速く蛍光強度が減衰することが確認できた. 得られた蛍光寿命変化は, アポトーシス過程にともない EGFP の発色団周囲の環境が変化したこと起因していると考えられ, この結果は FLIM を用いてアポトーシス過程を識別できることを示している.

(a) Intensity images



(b) Lifetime images

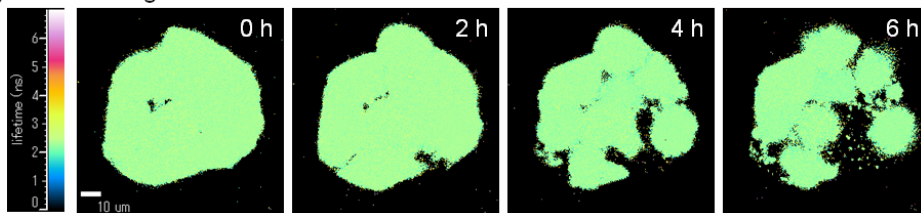


Figure 2. (a) Fluorescence intensity and (b) fluorescence lifetime images of HeLa cells expressing EGFP obtained at 0, 2, 4 and 6 h after injection of apoptosis inducer.

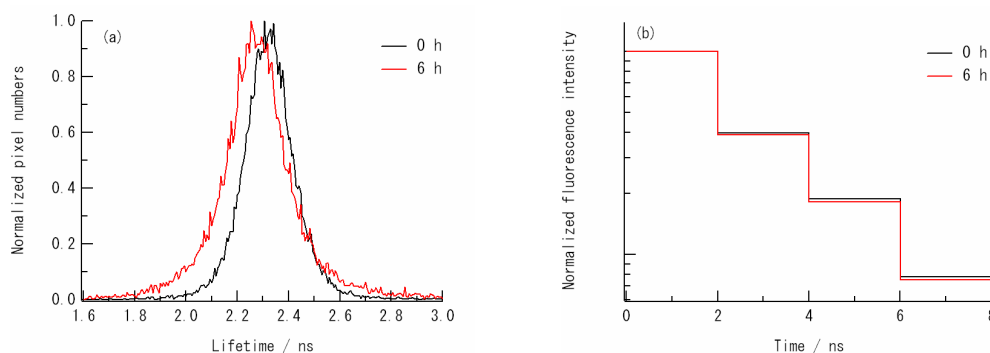


Figure 3. (a) Distributions of fluorescence lifetime and (b) plots of the fluorescence intensity against time. These were obtained at 0 and 6 h after injection of apoptosis inducer.

【参考文献】

1) T. Nakabayashi et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 668. 2) T. Nakabayashi et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 671. 3) H.-P. Wang et al., *Chem. Phys. Lett.* **2007**, 442, 441.