

1P090

細胞内自家蛍光成分の光励起ダイナミクスの解明(1): 水溶液中における FAD と NADH のフェムト秒-ナノ秒 ダイナミクス

(北大電子研) ○中林孝和・太田信廣

【序】 生体試料の画像観測において、蛍光標識物質によって生体試料を染色することなく、生体組織内に元から存在する蛍光物質の蛍光(自家蛍光)を用いて画像観測を行う方法が注目を集めている¹⁾。自家蛍光を用いることによって、染色による試料への負荷がなくなり、また染色時間を必要としないために迅速な判断が可能となる。しかし、自家蛍光を用いて診断を行うためには、自家蛍光成分の光学過程についての十分な理解が必要である。

我々は、蛍光強度ではなく蛍光寿命をイメージングすることにより、各種刺激に対する細胞内の環境変化について検討している²⁻⁶⁾。蛍光寿命は光退色や励起光強度などに依存しないために、強度測定に比べて定量性が大きく増加する。本研究では代表的な自家蛍光成分であるFAD (flavin adenine dinucleotide)とNADH (nicotinamide adenine dinucleotide)のフェムト秒からナノ秒における蛍光ダイナミクスを測定し、これらの分子の光励起ダイナミクスについて検討した。特に非常に粘性の高いグリセロール(以下Glyと略す)と水との混合溶液を用い、媒質の粘性依存性について検討した。得られた結果をもとに、FADとNADHの蛍光寿命を用いた細胞内の粘性状態の観測の可能性を探った。FADの分子構造をFig. 1Aに示す。

【実験】 フェムト秒からピコ秒領域の蛍光ダイナミクスの測定は、和周波発生法を用いた。フェムト秒チタンサファイアレーザー(~81 MHz)からの出力光を2つに分け、片方は2倍波に変換し励起光に、他方は和周波光を発生させるためのゲート光とした。励起光によって生じた試料からの蛍光とゲート光をBBO結晶に入射し、生じた和周波光をフィルターと分光器によって分光し、光子係数検出した。装置応答関数は約250 fsである。ピコ秒からナノ秒領域の蛍光減衰曲線の測定は、時間相関光子計数法を用いた。検出器としてマルチチャンネルプレート内蔵型光電子増倍管を用い、装置応答関数は約60 psである。試料は光路長1 mmのフローセルにて循環させている。試料濃度は約 1×10^{-4} mol dm⁻³である。

【結果】 Fig. 1B にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中における FAD の吸収および蛍光スペクトルを示す。FAD は可視域に吸収を持ち、可視光励起における自家蛍光の主成分と考えられている。

Fig. 2A に FAD のフェムト秒からピコ秒領域の蛍光ダイナミクスの水-Gly 混合比依存性を示す。励起光と蛍光の波長は、410 nm と 580 nm である。混合比にかかわらず、ピコ秒領域の短い蛍光寿命を持つ成分とナノ秒領域の長い蛍光寿命を持つ成分の大きく 2 成分に分けることができる。FAD は基底状態において、アデニン部分とイソアロキサジン部分が離れた Open form と、これらが近接した Stacked form の 2 つの状態の平衡状態として存在する。Open form はナノ秒の蛍光寿命を持ち、細胞観測に十分な蛍光強度を与えるのに対し、Stacked form の蛍光寿命は、励起されたイソアロキサジン部分とアデニン部分との分子内電子移動による消光のために、約 10 ps と非常に短くなると考えられている^{7,8)}。今回観

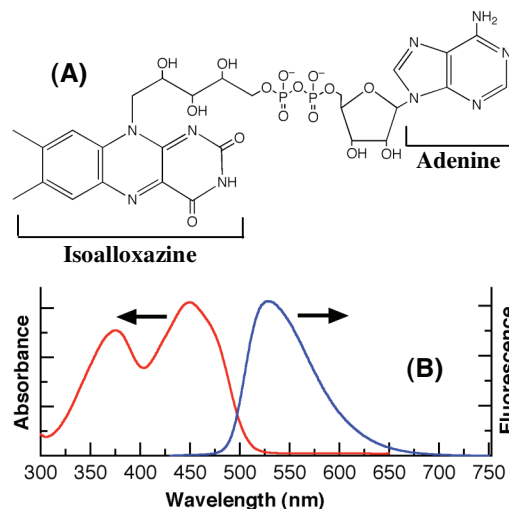


Fig. 1. (A) Chemical structure of FAD. (B) Absorption and fluorescence spectra of FAD in PBS. Excitation wavelength was 410 nm.

測されているピコ秒領域の蛍光減衰も、Stacked form の電子移動による蛍光強度の減少を観測しているとみなすことができる。ピコ秒領域の減衰部分を拡大した結果を Fig. 2B に示す。

FAD の吸収および蛍光スペクトルの形状は、混合比によって変化しなかった。また溶媒和によると考えられている 1 ps 以下の非常に速い成分の寄与は、580 nm の蛍光を用いることによって十分に小さくすることができる^{7,8)}。Fig. 2B から明らかなように、Gly の濃度増加に伴い、ピコ秒の減衰成分の蛍光寿命が長くなることがわかる。水のみでは約 10 ps の蛍光寿命であるのに対し、Gly が 60 % のときには、蛍光寿命は約 30 ps と増加している。この結果は、Stacked form の分子内電子移動速度が、Gly の増加に伴い減少することを示している。Stacked form の構造揺らぎが分子内電子移動において重要であることを示唆している。またナノ秒の蛍光寿命の成分に対するピコ秒の成分が、Gly の増加に従い減少している(Fig. 2A)。ナノ秒の蛍光寿命を持つ Open form の相対量が、Gly に従い増加することを示している。

Fig.3A に、FAD の蛍光スペクトルの水-Gly 混合比依存性を示す。Gly が増加するにつれて蛍光強度が増加することがわかる。蛍光減衰曲線の測定からも、Open form に由来するナノ秒の蛍光寿命が、Gly の増加に従って長くなっている(Fig. 3B)。Gly の増加による FAD の蛍光強度の増加は、Open form の相対量(Fig. 2A)と蛍光寿命(Fig. 3B)の 2 つ増加に由来することがわかる。細胞内の各種伝達物質の拡散において、細胞内の粘性状態が非常に重要である。今回観測された FAD の蛍光寿命の水-Gly 混合比依存性は、FAD の蛍光寿命を用いて、細胞内の粘性状態を観測できる可能性を示唆している。発表では、様々なアルコールを用いた FAD の蛍光ダイナミクスおよび NADH の蛍光寿命の粘性依存性についても紹介する。

1) D. Chorvat, Jr. et al., *Laser Phys. Lett.* 6 (2009) 175. 2) 中林・太田, *分析化学* 58 (2009) 473 (総説). 3) T. Ito et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 763. 4) N. Ohta et al., *Proc. of SPIE* 7190 (2009) 71900R. 5) T. Nakabayashi et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 668. 6) T. Nakabayashi et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 671. 7) H. Chosrowjan et al., *Chem. Phys. Lett.* 378 (2003) 354. 8) Y.-T. Kao et al., *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 13132.

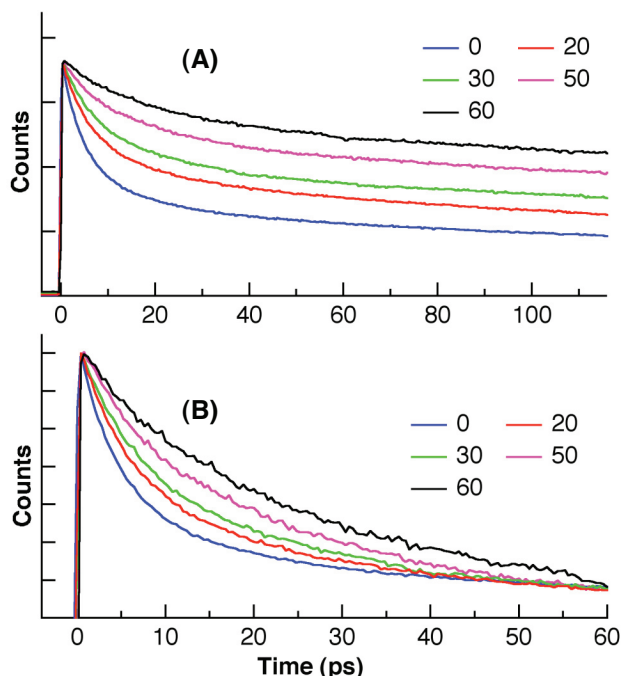


Fig. 2. (A) Normalized femtosecond time-resolved fluorescence decays of FAD in water/glycerol solution. Excitation and probe wavelengths were 410 and 580 nm, respectively. Glycerol percent weight is shown on the right of the figure. (B) Extraction of the picosecond decays of FAD of (A) with removal of the long-time components.

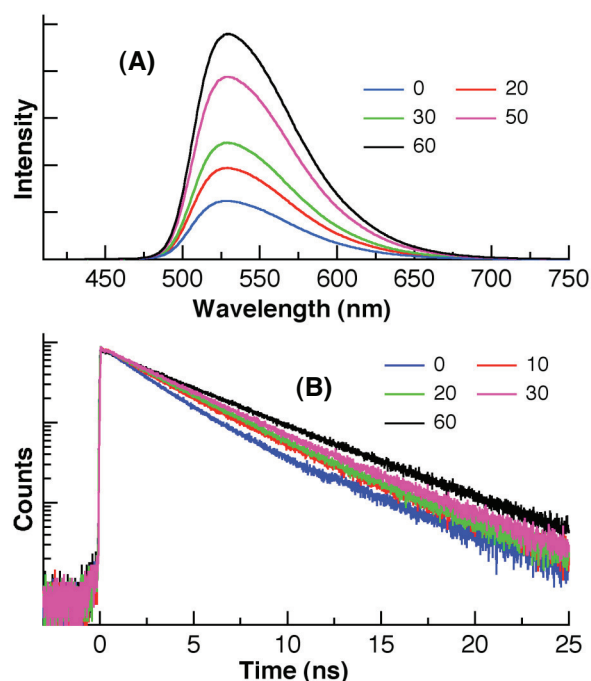


Fig. 3. Fluorescence spectra (A) and normalized nanosecond time-resolved fluorescence decays (B) of FAD in water/glycerol solution. Excitation and probe wavelengths were 410 and 580 nm, respectively. Glycerol percent weight is shown on the right of the figure.