

環境応答型蛍光性コレステロールの脂質膜および細胞内発光特性

(群馬大院・工*, 群馬大生調研**, 群馬大学***) ○吉原 利忠*, 荒井 健太郎*, 林 良介*, 追川 竜介*, 穂坂 正博**, 竹内 利行**, 飛田 成史*

【序】コレステロールは生体中に存在する代表的な中性脂質であり、細胞膜の構成成分、胆汁酸やビタミン D などの前駆体として重要な物質である。また、コレステロールは脂質ラフトの形成に大きく関与していることが指摘されており、脂質膜中や細胞内に分布するコレステロールの動態を明らかにすることが重要視されている。近年、生体関連化合物を発光物質で標識し、それらの発光から調べたい化合物の分布や動態を可視化する蛍光イメージング技術の開発が進められており、コレステロールに対しても適用されている。特に、ニトロベンゾフラザン (NBD) 類を蛍光団に有する 22NBDcho (図 1)

は可視光領域に吸収、蛍光を示すため、細胞観察時において細胞への光ダメージを低減させたり、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光イメージングできるなどの利点を有する。また、NBD は蛍光特性が周辺の環境に依存して変化するため、蛍光特性から細胞内において 22NBDcho が分布している周辺の微環境を明らかにすることもできる。しかしながら、近年の研究から 22NBDcho は細胞内において主にミトコンドリアに分布し、コレステロールの動態を反映していないことが指摘されている [1]。

本研究では、コレステロールの特性を保持した蛍光性コレステロールの開発を目指して、コレステロールと NBD を異なる位置で結合させた 24NBDcho (図 1) および NBD のニトロ基をジメチルアミノスルホアミド基に変えた 24DBDcho (図 1) を新規に合成し、それらの発光特性を溶液中、リン脂質膜中および生細胞中で検討した。

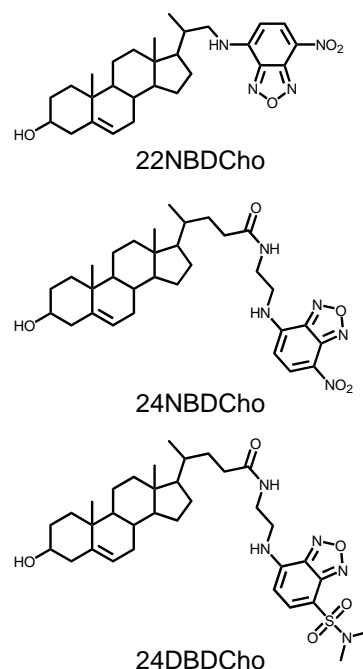


図1 蛍光性コレステロールの構造式

【結果・考察】24NBDcho および 24DBDcho の蛍光極大波長は、ジエチルエーテル中で 518nm, 533nm, アセトニトリル中で 536nm, 561nm であり、溶媒の極性の増加に伴い長波長シフトを示す。また、プロトン性溶媒であるメタノール中では 542nm, 579nm に観測され、水素結合によってさらに長波長シフトを示す。図 2 (a) に DMPC 膜存在下、35°C における 24NBDcho の蛍光スペクトルを、(b) に DMPC 膜濃度に対する 24NBDcho の蛍光積分強度のプロットを示す。膜濃度が増加するにつれて蛍光強度も増加しており、24NBDcho が膜中に取り込まれることがわかる。蛍光極大波長は 547nm であり蛍光団周辺の微環境はメタノール中に近く、蛍光団は膜の親水性領域に位置している。図 2 (b) のプロットを、式 (1) を用いて解析し、得られた分配係数 (K_p) および DMPC 膜 1mM に対する分配率 (α) を表 1 に示す。

$$I = \frac{I_w + K_p \gamma_{\text{DMPC}} [\text{DMPC}] I_{\text{DMPC}}}{1 + K_p \gamma_{\text{DMPC}} [\text{DMPC}]} \quad (1)$$

ここで I_w は $[\text{DMPC}] = 0 \text{ M}$ のときの蛍光強度, I_{DMPC} はすべてのプローブ分子が膜中に存在するときの蛍光強度, γ_{DMPC} は DMPC のモル体積である。24NBDcho および 24DBDcho は 35°C において 90% 以上の分配率を示し、効率的に膜に取り込まれることがわかる。また、 15°C では分配率が少し減少している。これは、 35°C において流動性の高い液晶状態の DMPC 膜が 15°C では流動性の低いゲル状態に相転移するためと考えられる。

一般に生体膜はコレステロールを含有しているため、DMPC-コレステロール複合膜中における 24NBDcho および 24DBDcho の蛍光特性の検討を 35°C , 15°C で行った。24NBDcho は 35°C , 15°C において、コレステロールのモル分率 (χ_{cho}) に対して蛍光極大波長はほぼ一定の値を示した。一方、24DBDcho は 35°C ではほぼ一定であるが、 15°C では χ_{cho} が $0 \sim 0.2$ での蛍光極大波長と比較して、 0.2 以上では大きく短波長シフトを示した。これは蛍光団周辺の極性が減少したことを示しており、得られた蛍光極大波長から考えると蛍光団周辺の誘電率は 4 から 6 程度であることがわかる。

開発した蛍光性コレステロールの生細胞内での分布の検討を行った。図 3 にマウス由来マクロファージ細胞 (Raw264.7 細胞) の培養液に、22NBDcho, 24NBDcho, 24DBDcho を最終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるように添加し、2 時間培養した後の蛍光顕微画像を示す。

22NBDcho と比較して開発した 24NBDcho, 24DBDcho では細胞内局在が異なることがわかる。また、24NBDcho, 24DBDcho では細胞内においてコレステロールエステルが集まる脂質滴が蛍光イメージングされている。これは 24NBDcho, 24DBDcho の 3 位の OH 基が生体内でエステル化されていることを示しており、これらが既存の 22NBDcho よりもコレステロールに近い特性を持つことが明らかとなった。

[1] S. Mukherjee, X. Zha, I. Tabas, and F. R. Maxfield, *Biophys. J.*, 75, 1915 (1998).

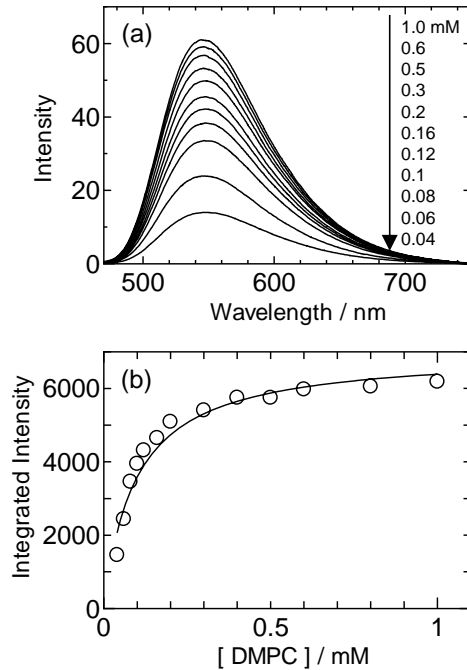


図2 (a)24NBDchoの 35°C におけるDMPC膜濃度に対する蛍光スペクトル (b)DMPC膜濃度に対する蛍光積分強度のプロット

表1 DMPC膜に対する分配係数, 分配率

プローブ分子	温度 / $^\circ\text{C}$	K_p	$\alpha / \%$
24NBDcho	35	1.6×10^4	91
	15	1.1×10^4	87
24NBDcho	35	1.8×10^4	92
	15	0.7×10^4	82

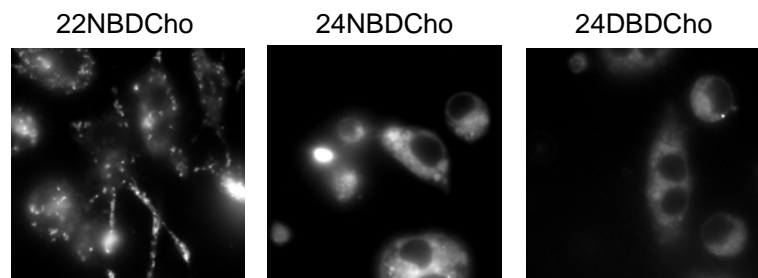


図3 Raw264.7細胞の培養液に蛍光性コレステロールを添加し2時間後に得られた蛍光顕微画像

蛍光タンパク質の蛍光寿命を用いた細胞内 pH の その場検出

(北大電子研¹・北大院先端生命²) ○中林 孝和¹・大下 周吾¹・澄川 亮哉¹・
孫 凡²・金城 政孝²・太田 信廣¹

【序】 顕微鏡を用いた生細胞の蛍光観察において、蛍光強度ではなく、蛍光寿命を画像化することにより、細胞内のイオン濃度および各種刺激に対する細胞内の環境変化の高感度検出を行っている¹⁻⁵。本講演では、蛍光タンパク質の蛍光寿命を用いた細胞内 pH 計測について報告する。我々は、以前に変異型緑色蛍光タンパク質(EGFP)の蛍光寿命イメージングを用いた単一細胞内 pH 計測を提案している⁶。この手法は、EGFP内に存在する発色団がピコ秒の蛍光寿命を持つ中性種とナノ秒の蛍光寿命を持つアニオン種との酸塩基平衡状態にあることを利用しており(Fig. 1a)、アニオン種と中性種の両方を励起し、両方の蛍光が観測される蛍光波長を選ぶと、細胞内 pH の変化による中性種とアニオン種の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。しかし、EGFPのみではなく多くの蛍光タンパク質においても、発色団が酸塩基平衡状態

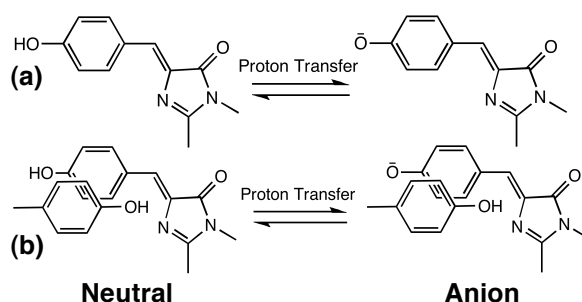


Fig. 1 The neutral and anionic forms of the chromophore of EGFP (a) and EYFP (b).

にあることが報告されており、蛍光タンパク質の蛍光寿命を用いた細胞内 pH 測定は、多くの蛍光タンパク質に対して適用可能な一般的な手法となり得ることができる。そこで本研究では、変異型黄色蛍光タンパク質(EYFP)の蛍光寿命の pH 依存性について、HeLa 細胞内および緩衝溶液中において検討した⁷。EYFP の発色団も EGFP と同様に酸塩基平衡を示すことが知られている(Fig. 1b)。また酸解離定数(pKa)が7付近にあることから、pH が7付近で蛍光寿命の大きな変化が起きることが予想され、多くの生理現象に対して適用できることが期待される。

【実験】 蛍光寿命イメージングシステムは、フェムト秒レーザーと共焦点顕微鏡を用い、画像の各点において時間ゲート法によって蛍光寿命画像を得る構成とした¹⁻⁵。EYFP を HeLa 細胞に発現させ、様々な pH に調整した緩衝溶液内で培養させて蛍光寿命画像の測定を行った。イオノフォアを用いて細胞内外の pH を等しくさせ、細胞外の pH を測定することによって細胞内の pH の値を得て

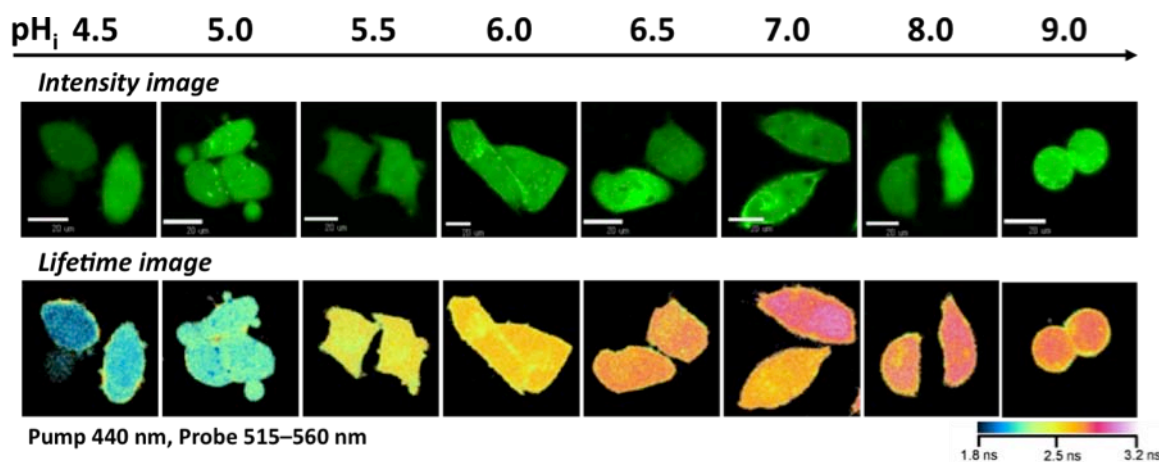


Fig. 2. Fluorescence intensity and corresponding fluorescence lifetime images of HeLa cells expressing EYFP. Intracellular pH is shown on the top of each image. Ionophore was added to equalize intracellular and extracellular pH. Excitation and monitoring wavelengths were 440 and 515–560 nm, respectively.

いる⁸⁾。緩衝溶液中における EYFP の蛍光減衰曲線の測定は、時間相関光子計数法を用いている。EYFP が発現した大腸菌を大量培養し、超音波を用いて大腸菌を破壊した後、Ni カラムにより EYFP を単離精製した。各 pH に調製した緩衝溶液に EYFP を導入し、蛍光減衰曲線を測定した。

【結果】 Fig. 1 に HeLa 細胞内における EYFP の蛍光寿命画像の細胞内 pH 依存性を示す。蛍光寿命は疑似カラーにて示してある。440 nm を励起波長として用い、中性種とアニオン種の両方を励起している。細胞内 pH が小さくなるにつれて蛍光寿命の値が短くなっており、EYFP の蛍光寿命を用いて細胞内 pH をその場で検出できることがわかる。しかし Fig. 2 に示すように、蛍光寿命の細胞内 pH 依存性は pH が 6 以下で単調に変化する挙動を示し、酸塩基平衡に基づく pH が 7 付近での大きな変化は観測されなかった。

Fig. 3 に様々な励起波長を用いて測定した緩衝溶液中での蛍光寿命の pH 依存性を示す。蛍光減衰曲線は Fig. 4 に例を示すように、多成分の減衰定数からなり、その加重平均を蛍光寿命として用いている。中性種を主に励起する 400 nm 励起では、pH7 付近で蛍光寿命が大きく変化しており、発色団の酸塩基平衡を用いて実測値を再現することができた。一方、アニオン種を主に励起する 470 nm 励起およびアニオン種と中性種の両方を励起する 440 nm 励起では、pH が 5.5–6.5 付近で蛍光寿命の変化を示しており、発色団の酸塩基平衡のみでは説明できないことがわかる。さらに、約 130 ps の寿命を持つ成分を新たに加えなければ蛍光減衰曲線を再現することができず、このサブナノ秒の寿命成分が蛍光寿命の pH 変化に対して大きな影響を与えていることがわかる。細胞内の蛍光寿命の pH 依存性(Figs. 1, 2)についても、サブナノ秒の寿命成分が大きな影響を与えていると考えられる。現在、このサブナノ秒成分の同定を検討している。また、EYFP の発色団の pKa 値が塩素イオン濃度に依存することを用いて、EYFP の蛍光寿命を用いた塩素イオン濃度の検出を現在行っている。

1) 中林・太田, 日本レーザー医学会誌 30 (2010) 441.

2) 中林・太田, 分析化学 58 (2009) 473. 3) N. Ohta and T. Nakabayashi, *Molecular Nanodynamics* (Wiley-VCH) (2009) 607. 4) 中林・太田, ナノイメージング (エヌ・ティー・エス) (2008) 245. 5) 中林・太田, ぶんせき (2007) 597. 6) T. Nakabayashi et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 668. 7) N. Ohta et al., *Proc. of SPIE* 7576 (2010) 7576G (invited). 8) J. A. Thomas et al., *Biochemistry* 18 (1979) 2210.

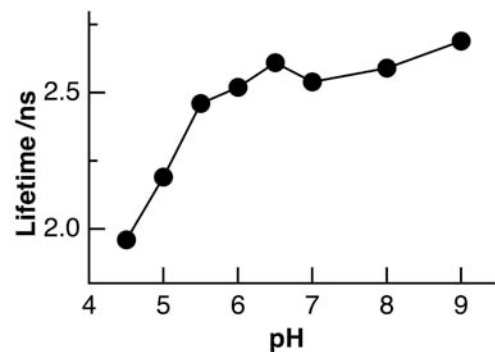


Fig. 2. Plots of the fluorescence lifetime of EYFP in HeLa cells against intracellular pH. Excitation and fluorescence wavelengths were 440 nm and 515–560 nm, respectively.

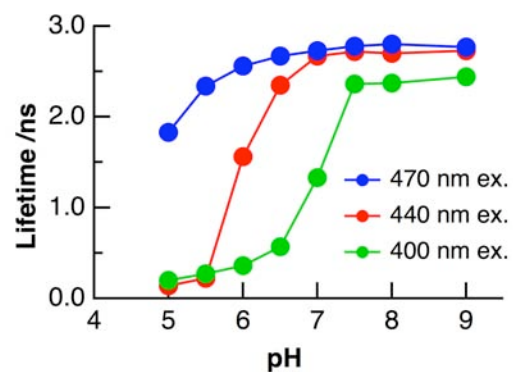


Fig. 3. Plots of the fluorescence lifetime of EYFP in buffer solution against pH. Excitation wavelengths were 400 nm (green), 440 nm (red), and 470 nm (blue), respectively. Fluorescence wavelength was 535 nm.

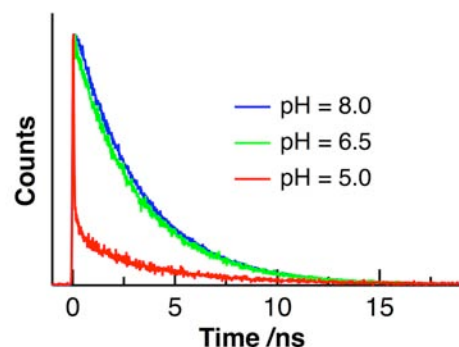


Fig. 4. Fluorescence decays of EYFP in buffer solution at pH of 5.0 (red), 6.5 (green), and 8.0 (blue) at the excitation wavelength of 440 nm. Fluorescence wavelength was 535 nm.

1B14

藍藻アカリオクロリス淡路株における励起エネルギー移動の 励起波長依存性

(神戸大院・理¹, 神戸大・内海域², 神戸大・分子フォト³)

○多田愛¹, 村上明男², 横野牧生³, 福谷通孝¹, 富永圭介^{1,3}, 秋本誠志^{1,3}

【序】 光合成の初期の過程では、チラコイド膜の表面や内部に存在するアンテナ色素複合体によって吸収された光エネルギーが、色素間での励起エネルギー移動を経て反応中心まで伝達される。反応中心ではクロロフィル二量体が関与する電荷分離反応によって光エネルギーが電気エネルギーに変換される。太陽光のエネルギーを広い波長範囲で効率良く集めるため、光合成生物は多様なアンテナ色素を獲得している。藍藻においては、主にクロロフィル、カロテノイド、フィコビリンの3タイプの色素が用いられている。

クロロフィル *a* は全ての酸素発生型光合成生物で主要色素として含まれているが、本研究で用いた藍藻アカリオクロリス淡路株¹は、含有クロロフィルのうち 95%以上がクロロフィル *d* という特異的な藍藻で、光化学系 I、II の両方にクロロフィル *d* が結合している。クロロフィル *d* はクロロフィル *a* に比べ吸収帯が 20 nm 程度長波長側にシフトしている。そのためアカリオクロリス淡路株は可視光に加え近赤外光を効率的に利用した特異な酸素発生型光合成を行うことができる。クロロフィル *d* で構成される光合成系の光合成初期過程におけるエネルギー移動過程を解明することは、光合成の研究において重要な課題である。

アカリオクロリス淡路株にはクロロフィルの他に α -カロテンとフィコビルンが含まれており、 α -カロテンを励起した場合は光化学系 I から、フィコビルンを励起した場合は光化学系 II からの蛍光が優位に観測される²。本研究では α -カロテンとフィコビルンを選択的に励起することによって、光化学系 I と光化学系 II における励起エネルギー移動過程を検討した。

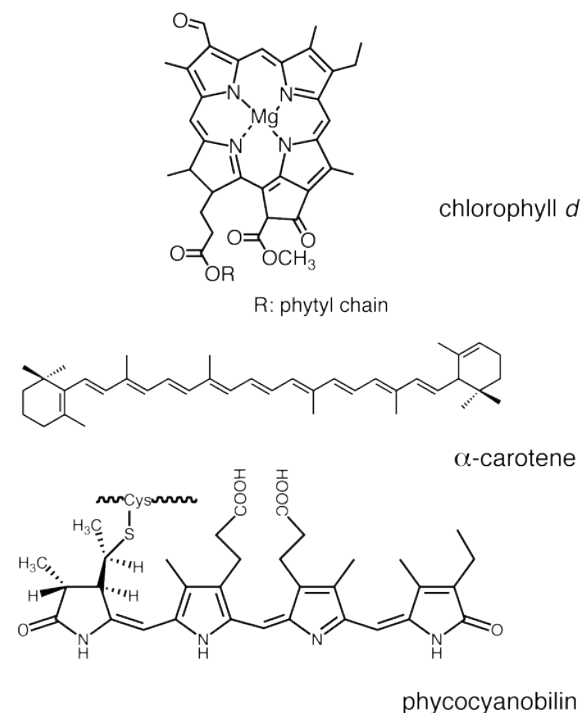


図1 光合成色素の構造。
上：クロロフィル *d* 中： α -カロテン
下：フィコシアノビルン（フィコシアニン構成色素の一種）

【実験】 時間分解蛍光スペクトルは時間相関単一光子計数法で測定した。サンプルは藍藻アカリオクロリス淡路株の生細胞を用い、77 K で測定した。また励起光源にはチタンサファイアレーザーの第二高調波 (400 nm) でポンプされる非同軸光パラメトリック増幅器を用い、 α -カロテン励起時には 520 nm に、フィコビルン励起時には 605 nm に波長を調節した。

【結果と考察】 図1に時間分解蛍光スペクトルを示す。各時間領域において、蛍光強度の

極大値で規格化した。フィコビルリンを励起した場合には、時間初期に 680 nm より短波長側の領域でフィコビルリンからの蛍光が観測される。その減衰にともなって、749 nm で光化学系 II のクロロフィル *d* からの蛍光成分が増加しており、フィコビルリンからクロロフィル *d* へのエネルギー移動が起きていると考えられる。その時定数は、蛍光寿命の値から 40 ps 以内であると考えられる (表 1)。時間後期ではクロロフィル *d* からの蛍光のピーク波長は 746 nm から 750 nm にレッドシフトしており、750 nm に蛍光を発するクロロフィル *d* がエネルギートラップとなっていることが分かる。

α -カロテンを励起した場合には、時間初期に 750 nm 付近と 775 nm 付近に 2 つの蛍光ピークが見られる。時間初期では、775 nm 付近のピークは 750 nm 付近のピークとほぼ同等の強度であるが、時間後期になると 750 nm 付近のピークが優勢となった。775 nm 付近のピークは α -カロテン励起時に顕著に観測されたため、光化学系 I からの蛍光であると判断出来る。775 nm は、報告されている酸素発生型光合成生物のクロロフィル蛍光の中で最も長波長である。また、フィコビルリン励起時とは異なり、750 nm 付近にピークを持つスペクトルは、5 ns 以降では 756 nm にピーク、748 nm に肩を持つ幅広いスペクトルとなった。これらの結果は、光化学系 I のアンテナ複合体が光化学系 II とは異なり様々なエネルギー状態を持つクロロフィル *d* で構成されていることを示している。

【参考文献】

- [1] A. Murakami, H. Miyashita, M. Iseki, K. Adachi, and M. Mimuro, *Science*, 303, 1633 (2004).
- [2] S. Akimoto, A. Murakami, M. Yokono, K. Koyama, T. Tsuchiya, H. Miyashita, I. Yamazaki, and M. Mimuro, *J Photochem Photobiol A: Chem*, 178, 122 (2006).

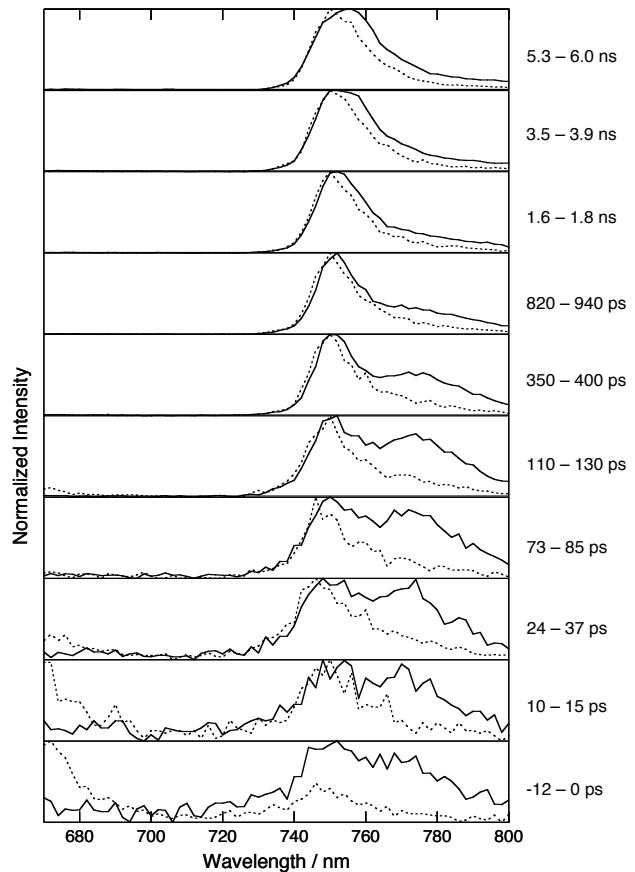


図 2 77 K における時間分解蛍光スペクトル。
 実線：520 nm 励起 (α -カロテン)
 破線：605 nm 励起 (フィコビルリン)

表 1 77 K における 605 nm 励起での蛍光寿命解析の結果。

Wavelength	Pigments	Lifetime	Amplitude
640 nm	PC	17 ps	1.00
650 nm	PC	14 ps	1.00
660 nm	PC, APC	14 ps	1.00
680 nm	APC, Chl <i>a</i>	33 ps	0.87
		260 ps	0.04
		1.3 ns	0.05
		4.6 ns	0.04
740 nm	Chl <i>d</i>	34 ps	-0.86
		130 ps	0.77
		710 ps	0.15
		2.6 ns	0.08

PC: フィコシアニン APC: アロフィコシアニン
 Chl: クロロフィル
 PC と APC はフィコビルリンを構成する色素タンパク質

1064 nm 励起ラマン分光によるシアノバクテリア菌体内光合成色素の

in vivo 状態解析(東大院理^{*}, 愛媛大・無細胞センター^{**}, NCTU 分子科学研究所^{***})○安藤正浩^{*}, 杉浦美羽^{**}, 林秀則^{**}, 濱口宏夫^{***}

【序】顕微ラマン分光法は、前処理を必要とせず、非浸襲で分子レベルの解析を行うことができる等の利点を持ち、生体試料の *in vivo* 解析に応用が進んでいる。試料からの自家蛍光による妨害や、励起光照射による損傷などの問題を軽減するため、生体試料の測定には近赤外励起が有効である場合が多い。これまで我々は、1064 nm 励起マルチチャンネル顕微ラマン分光装置を開発し、生体試料の空間分解測定に応用してきた。本発表では、酸素発生型光合成を行う真正細菌であり、葉緑体の起源としても知られているシアノバクテリアの *in vivo* ラマン測定に応用した結果を報告する。シアノバクテリアは、多種類の光合成色素を含むため、その強い自家蛍光によりこれまで単一菌体内の *in vivo* ラマン分光測定は困難であった。1064 nm の長波長の励起光を用いることで、自家蛍光の妨害を受けることなく、明瞭なスペクトルを得ることができるようになり、さらに光合成色素の菌体内分布情報を得ることが可能となった。

【実験】1064 nm 励起マルチチャンネル顕微ラマン分光装置では、検出器の選定が問題となる。本研究では、指紋領域となる波長域 (1-1.4 μm) で十分な感度を持つ、近赤外イメージンテンシファイア(受光素子 InP/InGaAsP; 浜松ホトニクス)を検出器として用いることで、生細胞などの試料においても十分な S/N のスペクトルが得ることができた。励起光には、Q スイッチ Nd:YAG レーザーからの基本波(1064 nm, 10 kHz, 30 ns)を用い、x100 / NA1.3 の対物レンズを用いて試料に集光した。ラマン散乱光は同対物レンズにより後方散乱光を集めた後、分光器に導入、上述の検出器で検出した。本装置は、共焦点光学配置により、面内 0.7 μm , 奥行き 3.1 μm の空間分解能を有している。また、波数分解能は 10 cm^{-1} である。

試料には、光合成研究に広く用いられている好熱性シアノバクテリア、*Thermosynechococcus elongatus* を用いた。室温条件下で、スライドガラスとカバーガラスに挟むことで菌体を固定し、測定に用いた。励起光を 1 mW 以上照射するとフォトブリーチ等の影響が見られた。測定の際はこれを避けるためサンプル位置で 0.5 mW の強度とした。マッピング測定においては、0.3 μm 間隔で試料を移動させ、各点 10 秒の露光時間で測定した。続く各バンド強度による画像構成においては、特異値分解によりノイズ成分を除去することで各スペクトルの S/N を向上させた後、各ラマンバンドをローレンツ関数でフィッティングすることで面積強度を算出し、マッピング画像を得た。

【結果と考察】シアノバクテリアは、~800 nm の近赤外励起であっても、光合成色素からの強い自家蛍光によりラマン散乱測定は困難であった。今回、1064 nm というより長波長の励起光を用いることで、蛍光の妨害を避け、大きく S/N を向上した測定が可能となった。図 1 a に得られたラマ

ンスペクトルを示す。また、*T. elongatus* の持つ光合成色素である、カロテノイド、クロロフィル a、フィコビルン、各々の代表的な 1064 nm 励起ラマンスペクトルを図 1b に示す。これらスペクトルの比較により、シアノバクテリアの測定で得られた殆ど全てのバンドは、光合成色素の何れかに帰属されることが分かる。すなわち、カロテノイド(1008, 1157, 1523 cm^{-1})、クロロフィル a (1225, 1325 cm^{-1})、フィコビルン(1279, 1369, 1586, 1635 cm^{-1})である。これらの色素は可視領域に電子吸収を持つことから、前期共鳴ラマン効果によって選択的に観測されたものと考えられる。

続いて、単一菌体のマッピング測定をした結果を図 2a に示す。全長約 5 μm の菌体内部において、各光合成色素の分布情報が

明瞭に可視化されている。同一色素に帰属したバンドはどれも類似した強度分布を示しており、これは上述の帰属を裏付ける結果である。また、各色素同士の分布を比較すると、カロテノイドの分布が他の 2 種と大きく異なっていることが分かる。これに合わせ、C=C 伸縮振動に当たる $\sim 1523 \text{ cm}^{-1}$ バンドのピーク位置をプロットした結果と比較すると(図 2b)、カロテノイド濃度の高いところで低波数側にシフトしていることが分かる。このバンドは、カロテノイドの会合により低波数シフトすることが知られており、それを示唆するものではないかと考えられる。

以上のように、1064 nm 近赤外光を用いることで、これまで困難であった光合成試料の空間分解ラマン分光測定が可能となった。カロテノイドは強光阻害の防止剤としての機能が知られており、今回得られた知見はその機構解明につながるものと期待される。

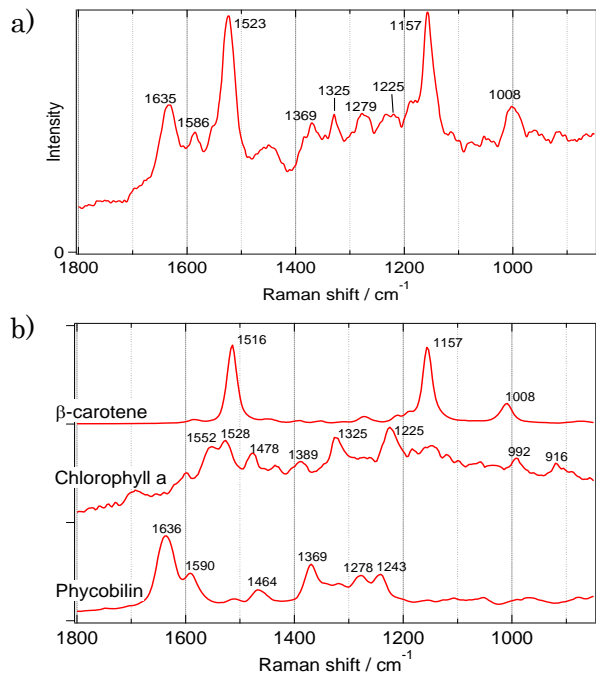


図 1. *T. elongatus* (a) および光合成色素 (b) の 1064 nm 励起ラマンスペクトル

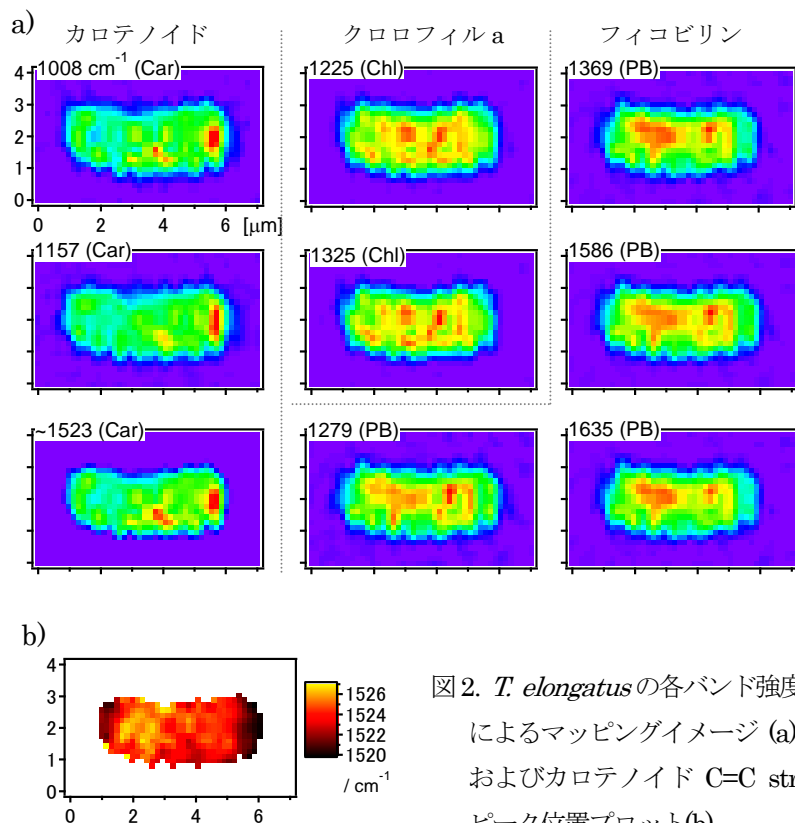


図 2. *T. elongatus* の各バンド強度によるマッピングイメージ (a), およびカロテノイド C=C str. ピーク位置プロット(b).

Inorganic phosphate dynamics and starvation induced necrosis in yeast cells by Raman Microspectroscopy

Yasuaki Naito¹, Venkatesh Kaliaperumal¹, and Hiro-o Hamaguchi^{1,2*}

¹Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1 Bunkyo-ku Tokyo, 113-0033, Japan and ²Institute of Molecular Science and Department of Applied Chemistry, National Chiao Tung University, 1001 Ta Hsueh Road, Hsinchu 300, Taiwan

Inorganic phosphates (Pi) are indispensable for life as many biological processes involve formation or breaking down of phosphate ester bonds. Pi exist in different forms inside cells depending on the pH of the cellular compartment, transport proteins and enzymatic activities. For instance, the vacuolar compartment usually has an acidic pH and harbours dihydrogen phosphate (H_2PO_4^-), whereas the mitochondria have an alkaline pH and possess monohydrogen phosphate (HPO_4^{2-}). Raman microspectroscopy is able to detect these two forms of phosphates in living yeast cell vacuole and mitochondria respectively. In addition, the vacuole is also found to contain polyphosphates (polyP) which has its characteristic Raman bands¹. In this study we report dynamical changes in the intracellular Pi concentration during starvation induced stress and cell death in a single yeast cell. To our knowledge, we are the first to report the feasibility of detecting subcellular Pi changes in single cells.

Based on Raman microspectroscopic images we have divided the yeast starvation response into three phases (Fig.1). In the early phase of starvation there occurs a decrease in the vacuolar polyP concentration (b-1 to b-2). One of the functions of polyP is to provide energy in the form of ATP during nutrient deprived conditions. The hydrolysis of polyP to form ATP leads to a decrease in the aqueous polyP Raman band at 1150 cm^{-1} during the initial phase of nutrient starvation.

In the intermediate phase of starvation there is a complete decline in the mitochondrial activity inferred from the Raman band at 1602 cm^{-1} (a-3). This is associated with the appearance of a crystalline polyP granule inside the vacuole with its characteristic peak at 1160 cm^{-1} (b-3). Divalent cations like calcium and magnesium lead to formation of insoluble polyPs. Under normal growth conditions

long chain aqueous PolyPs are known to sequester divalent cations in soluble form. We presume that the hydrolysis of polyP during the early phase of starvation leads to an increase in the free divalent cation and phosphate concentrations in the cytoplasm which affects the mitochondria. Complete loss of mitochondrial integrity is likely to further increase the cytoplasmic cation and phosphate concentrations. Excess of divalent cations and low levels of polyP tend to produce the insoluble form of polyP inside the vacuole during this phase.

In the late phase response to starvation there is loss of cellular structure leading to cell death (b-4 to b-6, c-4 to c-6). Excess of divalent cations are likely to damage the membranes causing this effect. Thus, by Raman microspectroscopic mapping we could observe dynamical changes in the Pi concentrations at subcellular level and explain the sequence of molecular events occurring during necrotic cell death induced by starvation.

1. Naito, Y., Toh-e, A. & Hamaguchi, H. In vivo time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell. *Journal of Raman Spectroscopy* 36, 837-839 (2005).

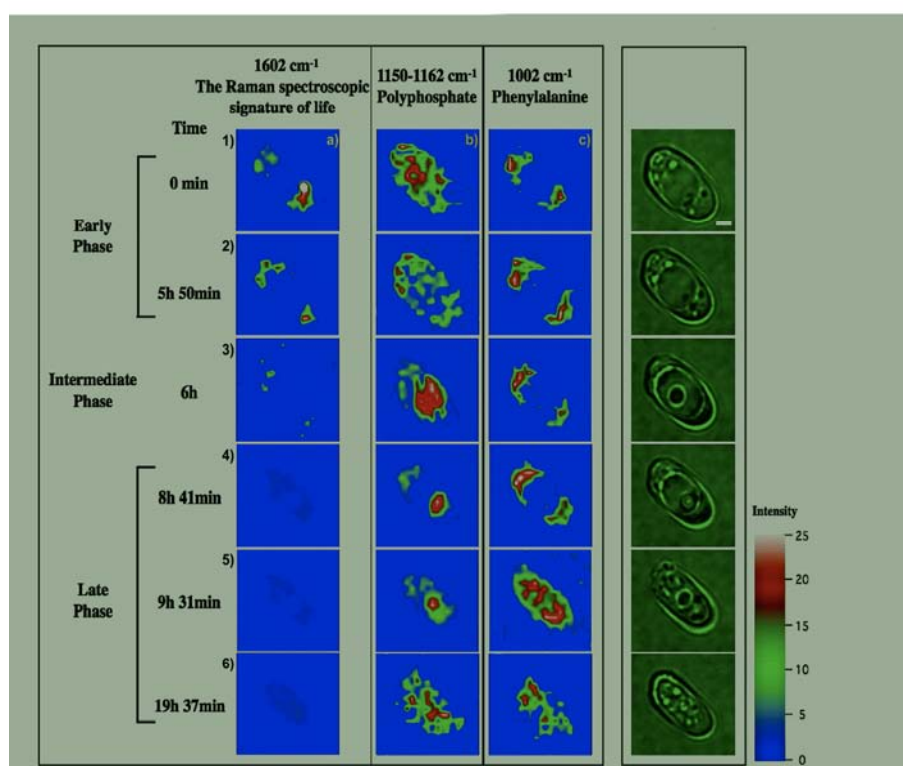


Fig.1
Raman mapping of characteristic Raman peaks during starvation and corresponding optical images

多焦点共焦点ラマン分光顕微鏡の開発

(東大院・理*、NCTU**) ○奥野将成*、濱口宏夫**

【序】顕微ラマン分光法は、非染色・非侵襲で生体試料の分子情報を取得することのできる手法として、昨今大きな注目を集めている。顕微ラマン分光法は上記以外にも多くの利点を持っているが、信号強度が微弱であるために、ラマン分光イメージの取得に多大の時間を要し、生体の動的挙動の研究に活用されにくいのが現状である。通常の顕微ラマン分光法では、ラマン分光イメージの取得時間を短くするために試料への照射レーザー光を強くすると、生体試料への光・熱ダメージが顕著になってしまう。そこで我々は、単位面積当たりの照射レーザー光強度を低く抑えたまま、試料に多点でのレーザー照射を行うことで、試料から一挙に複数のラマンスペクトルを得ることができる、多焦点共焦点ラマン分光顕微鏡を開発し、ラマン分光イメージングの高速化を目指した。

【実験装置】図1に我々が開発した、多焦点共焦点ラマン分光顕微鏡の装置図を示す。レーザー光をマイクロレンズ・アレイによって多焦点化し、それぞれのレーザー・ビームをピンホール・アレイへと集光し、通過させた。ピンホール・アレイを通過した後、それぞれのレーザー・ビームは平行光として対物レンズの瞳に集光された。これらのビーム束を対物レンズにより試料へと集光することによって、試料へのレーザー光の多焦点照射を実現した。本実験では適切な光学素子を用いることにより、試料下で焦点の間隔を $2\ \mu\text{m}$ 、焦点の数を 64 点(8 x 8)とし、また、それぞれの焦点を回折限界近傍まで集光することができた。発生したラマン散乱光は、入射レーザーと同じ対物レンズで集光され、ピンホール・アレイを通過させた。このとき、それぞれの焦点について、共焦点効果によって、光軸方向の分解能を得、焦点以外からの信号・背景光を排除することができる。ラマン散乱光は、ピンホール・アレイを通過した後、エッジ・フィルタを通過し、レイリー散乱光の除去後、ファイバ・バンドルへと集光された。このファイバ・バンドルは、顕微鏡側の一端が 8 x 8 の正形状に、分光器側の一端が 1 x 64 のライン形状となっており、分光器スリットに直接取り付けられた。

このようなファイバ・バンドルを用いることで、3次元情報(2次元位置情報+スペクトル情報)を2次元情報(1次元位置情報+スペクトル情報)へと変換し、CCDカメラでの検出を可能にした。分光器へと導かれたラマン散乱光は、分散され、CCDカメラで検出された。このよう

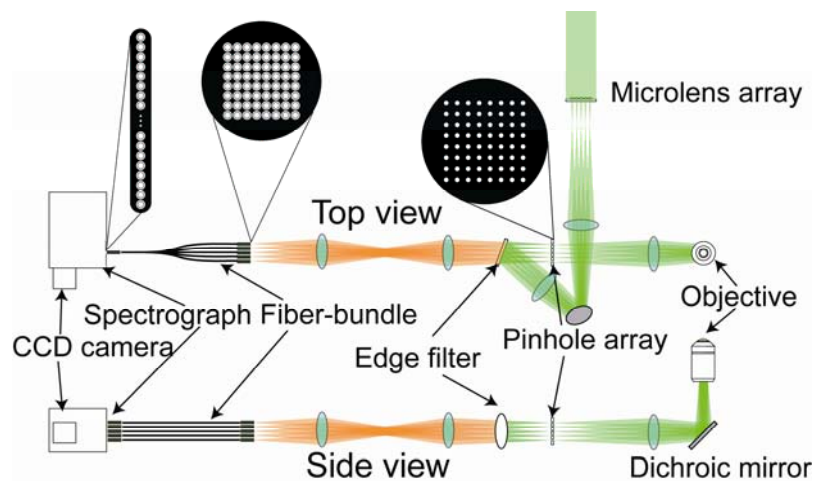


図1 多焦点共焦点ラマン分光顕微鏡の装置図。

に、マイクロレンズ・アレイ、ピンホール・アレイ、及びファイバ・バンドルを用いることによって、高い空間分解能を持って、広い領域のラマンスペクトルを一度に測定することができる装置を開発した。空間分解能は実測で面内:<350 nm、光軸方向:<1.2 μm であった。

【実験結果】図2に出芽酵母生細胞を測定した例を示す。(a)は一度の露光によって得られた、CCD上のイメージである。一度の露光によって、48個のラマンスペクトルが同時に得られた。縦軸の番号がそれぞれ試料下での各焦点に対応している(b)。(c)及び(d)に、(a)における、異なる二点(27)および(30)から得られたラマンスペクトルを示した。これら二点は全く異なったスペクトルを与えており、試料上の異なる二点が、CCD上で空間分解されて複数のスペクトルが得られることが確かめられた。

図3は出芽酵母生細胞を測定した結果を、ラマン分光イメージとして再構成したものである。レーザー照射は各焦点あたりおよそ1 mWである。これらのイメージは16 x 12 μm (32 x 24 ピクセル)からなり、露光時間は1 sec/ 48 ラマンスペクトル、全体のイメージ取得時間は20秒である。このような短い取得時間で、明瞭なラマン・イメージを得ることに成功した。それぞれ(a) 1446 cm^{-1} , (b) 1583 cm^{-1} , (c) 1602 cm^{-1} , (d) 1655 cm^{-1} のラマン分光イメージであり、各ラマンバンドはそれぞれ

れCH変角振動、シトクロムcのポルフィリン環のC=C伸縮振動、”生命のラマン分光指標”¹、amideI and/or C=C伸縮振動である。48個のスペクトルを1秒で得ることは、1スペクトルを20ミリ秒で得ることに相当する。通常のラマン分光顕微鏡ではこのような短時間で生細胞のラマンスペクトルを取得するのは非常に困難である。このように、多焦点共焦点ラマン分光顕

微鏡の開発により、従来の単焦点のラマン分光顕微鏡と比較して、数10倍のイメージング速度を実現した。

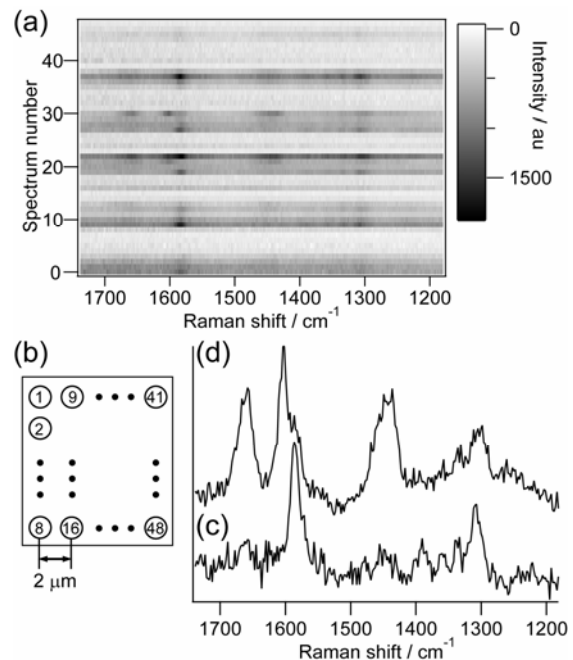


図2 本装置によって、出芽酵母細胞を測定した結果。(a) 一度のCCDの露光で得た、CCDのイメージ。(b) 試料下での焦点と(a)の縦軸との対応。(c),(d) (a)の2点におけるラマンスペクトル。

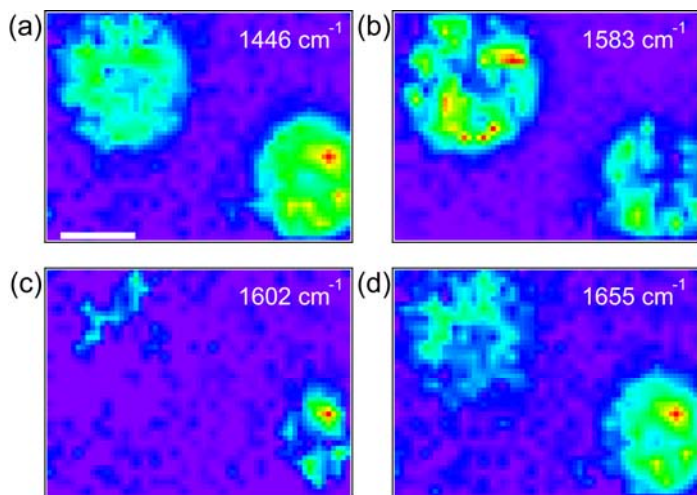


図3 本装置で得た、出芽酵母細胞のラマン・イメージ。(a) 1446 cm^{-1} , (b) 1583 cm^{-1} , (c) 1602 cm^{-1} , (d) 1655 cm^{-1} . スケールバーは4 μm 。

¹ Y-S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto and H. Hamaguchi, *Biochemistry* **44**, 10009-10019 (2005).

1B18

内部で増幅した DNA を含むベシクルの分裂におけるカスケードダイナミクス

(東大院・総合) ○栗原顕輔、鈴木健太郎、豊田太郎、菅原正

【序】

ホスト/ゲストの化学に起因する超分子化学は、細胞を模倣したダイナミクスを発現する最小細胞を人工的に構築させるほどに発展してきた。両親媒性分子が水中で形成する中空状の分子集合体ベシクルにより構築される最小細胞は、細胞モデルや細胞の起源を解明する上で重要な役割を果たすであろうと、ソフトマター物理や化学の観点から期待されている。我々は化学的なアプローチに基づき非生物学的な分子を用いることで、細胞とほぼ同じサイズを持つ自己生産するジャイアントベシクル(GV)を構築してきた

[1,2] (図1)。ベシクルを構成する膜分子(V)としては、親水部にカチオン性の4級アンモニウム塩、疎水部末端にアルデヒド基、疎水部にアルキル基を持つ二本鎖型両親媒性分子を用意する。ベシクルに含まれる触媒分子(C)としては、一本の長鎖アルキル基をもつイミダゾール塩酸塩を用いる。膜分子前駆体(V*)は、水溶性の必要があるため双頭極性型とし、極性を持つ電解質分子をイミン結合で連結させる。この膜分子前駆体を、GV 分散液に添加すると、ベシクルに含まれる酸触媒の作用によりイミン結合が加水分解を受け、生じた膜分子(V)がベシクルに取り込まれると肥大し、電解質(E)により表面が不安定化しほぼ、等割に近い分裂を起こすことを実験的に確認している[3, 4]。

本研究では、自己生産する GV に封入した DNA に対してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことで、ベシクル内部で DNA が増幅することに成功した。さらに、このベシクル系に対して、ベシクルを構成する膜分子の前駆体分子を外部的に添加すると、増幅した DNA を含むベシクルが急速的にかつ連続的に自己生産することを示した。

【結果・考察】

1) PCR 可能な耐熱・耐高イオン強度ベシクル系の構築

本研究で用いる自己生産するベシクル系は、PCR に必要な高温、高イオン強度条件に耐えるように、リン脂質である POPC と POPG を、POPC : POPG : V : C = 6 : 2 : 2 : 1 の割合で調合した混合脂質を用いて調製した。アニオン性リン脂質 POPG は、POPC と同様にベシクル膜を強固にすると共に、カチオン性膜分子を電氣的に中和し、DNA と脂質の複合体を形成するのを防ぐ目的で混合した。実際、POPG が含まれるベシクル系は、PCR と同程度の水温 (95°C)、高イオン強度 (150 mM 食塩水相当) 条件でも安定に存在することを確認した。

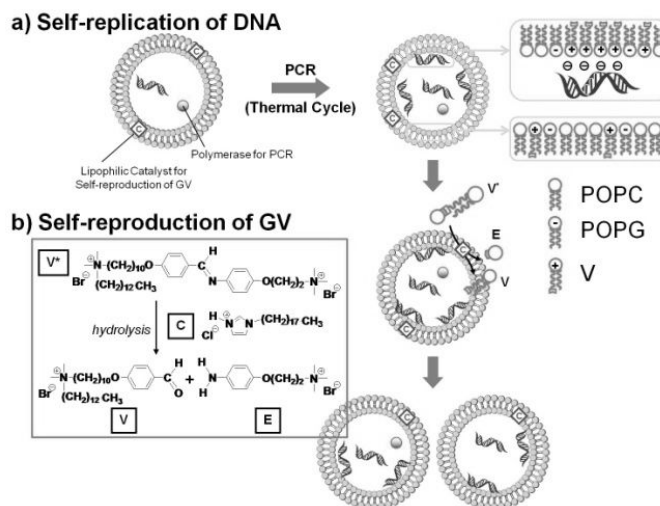


図1. 内部で DNA が増幅し、自己生産するベシクル系の模式図

2) PCR によるベシクル内 DNA の増幅

図 2 に示す蛍光顕微鏡観察像より、PCR 処理前のベシクルでは、2 本鎖 DNA を検出する SYBR Green I (SG) に基づく蛍光は観測されないが、鋳型 DNA を内包したベシクルに対して PCR を行うと、増幅した二本鎖 DNA と SG の複合体が発する蛍光を検出することができた。またフローサイトメトリー計測により、系全体の約 20% で PCR が進行したことが分かった。

3) 増幅した DNA を持つジャイアントベシクルの自己生産ダイナミクス

PCR を 20 サイクル行って DNA を増幅させた GV に、前駆体 V^{*} を添加することで、ベシクルの自己生産ダイナミクスを引き起こすことに成功した。これを微分干渉顕微鏡で観察した連続写真を図 3 に示す。増幅した DNA を含むベシクルは、膜分子前駆体を添加してから数分間で数回の GV の分裂があったが、一方で DNA を含んでいないものの PCR による増幅処理を行っていないベシクルでは、分裂が遅いことがわかり、分裂の機構が異なることを示唆させた。本系では全体としてベシクル膜の電荷は中和されているが、部分的にポリアニオン性の DNA と相互作用する膜分子のクラスターが生じ、DNA がベシクル二分子膜のうち内側の膜に取り込まれる際に、相対的に外側の膜分子が多くなるので外膜の曲率が大きくなり変形を起こすと考えられる。さらに蛍光顕微鏡観察では、分裂後のベシクルも蛍光が観測されたので、分裂したベシクルにも増幅した DNA が分配されていることが明らかになった。

4) 自己生産速度の PCR サイクル依存性

PCR のサイクル数を変えることで、内部 DNA の量が異なる GV (膜は疎水性の蛍光プローブで染色してある) を用意し、それぞれに膜分子前駆体を添加し、FCM 計測により分裂の速度を比較すると、10 サイクルまでは分裂速度が遅かったが、15 サイクルを超えると速くなる傾向が見えた。これは、特に光学顕微鏡で見えるサイズ (>1 μm) のベシクルの消滅速度に明らかな PCR 回数依存性があることを意味しており、急速な自己生産ダイナミクスを起こす DNA 量に閾値があることを示唆する。PCR の熱サイクル数を変えると 15 サイクル程度から分裂速度が速くなってきたことから、PCR によりベシクル内部 (特に、外膜の内側) に蓄積した DNA が、外水相に添加したカチオン性の膜分子前駆体と連携することで、カスケード的に分裂挙動を加速させていると解釈できる。

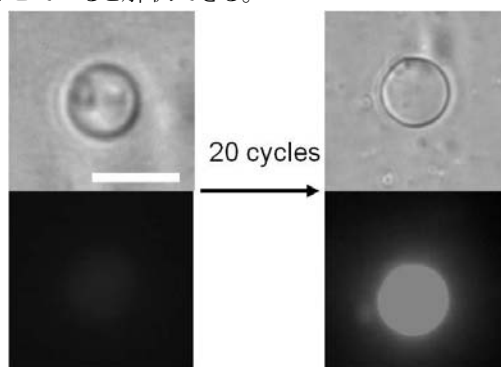


図 2. PCR 前後のベシクルの微分干渉顕微鏡像
上:明視野像 下:蛍光野像 (bar=10 μm)

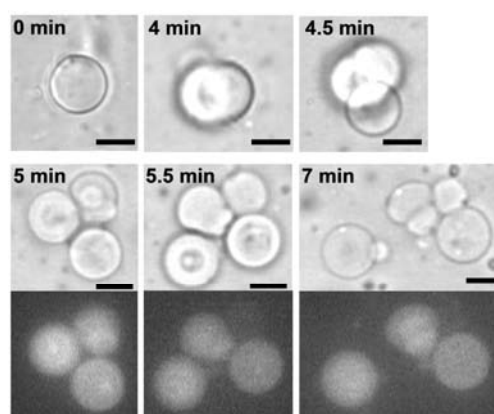


図 3. DNA を内包するベシクルの自己生産ダイナミクスの微分干渉顕微鏡像 (bar=10 μm)

【引用文献】

1. Takakura, K. & Sugawara, T. *Langmuir* **20**, 3832-3834 (2004).
2. Suzuki, K., Toyota, T., Takakura, K. & Sugawara, T. *Chem. Lett.* **38**, 1010-1015 (2009).
3. Toyota, T. *et al. Langmuir* **24**, 3037-344 (2008).
4. Kurihara, K. *et al. Soft Matter* **6**, 1888-1891 (2010).

ヘテロダイン電子和周波発生分光法を用いた タンパク質トポロジー決定法の開発

(東邦大・理¹, 理研・田原分子分光², 福井大・医³, 東邦大学複合物性研究センター⁴)

○細井晴子¹・山口祥一²・田林沙織¹・双木泰斗¹・上村康裕¹・渡邊総一郎^{1,4}・

清水啓史³・田原太平²

【序】タンパク質の立体構造を知ることは、生体内におけるタンパク質の機能発現や制御機構を解明する上で非常に重要である。X線結晶構造解析法や核磁気共鳴法によって、タンパク質のほぼ全原子に関して精密な構造情報が得られる。しかし、結晶化しにくい膜貫通タンパク質や分子量が巨大となるタンパク質複合体では、精密な構造情報を得ることは通常難しい。そのような場合、リボンモデルやトポロジー図のような“完全ではないが役に立つ”構造情報だけでも重要な情報となる。

われわれは二次非線形分光を利用して、完全な構造情報を得るのが困難なタンパク質に対して、“完全ではないが役に立つ”構造情報を与える新しい方法の開発を進めている。われわれがこれまでに開発したヘテロダイン検出電子和周波発生 (HD-ESFG) 分光法は、界面の分子の上下の向きを決定できるユニークな方法である¹。この HD-ESFG を、例えば図1のような膜タンパク質のセグメントごとに適用することが出来れば、膜配向性をはっきりと決定できる。

この新しいアプローチは、次の3つの過程から構成される。まず、(1) タンパク質の特定のセグメントだけを HD-ESFG アクティブとし、(2) タンパク質の配向膜を作製して、(3) HD-ESFG 測定によりセグメントの上下の向きを決定する。われわれは以前、このアプローチの有効性を報告した²が、(1)の過程により、決定された向きにあいまいさが残ることが分かってきた。

アミノ酸には HD-ESFG の観測波長範囲 (350–470nm) に吸収帯がないため、通常タンパク質は HD-ESFG 信号を与えない。そこで、タンパク質中の目的セグメントだけを HD-ESFG アクティブな色素でラベルして色素の向きを決定し、色素の向きをセグメントの向きとする。われわれは以前、目的セグメントを構成するアミノ酸の一つをシステインに置換し、システイン側鎖と特異的に反応するマレイミド基を持つ色素を結合させることで、セグメントを HD-ESFG アクティブとした。しかし、セ

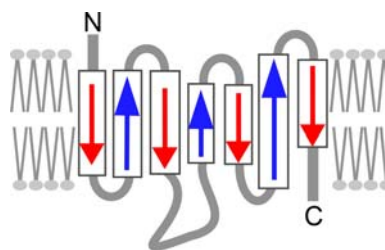


図1 タンパク質のトポロジー図

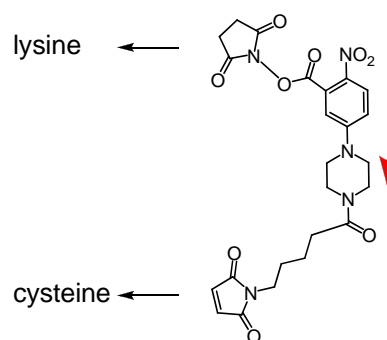


図2 クロスリンカー色素の構造と向き

グメントと色素は一ヶ所でのみ結合しているため、色素の向きとセグメントの向きが平行になる保証はなかった。

そこで、確実にセグメントと色素の向きを平行にするためには、セグメントと色素を二ヶ所で結合させればよいと考えた。本発表では、新規の色素を用いることにより色素の向きを制御し、より精度の高いトポロジー決定が可能になったことをモデルタンパク質で実証したので報告する。

【実験】新規のクロスリンカー色素（図2）を設計・合成した。この色素は、ESFG アクティブである *p*-nitroaniline 構造をもち、また、システインと結合するマレイミド基と、リシンと結合するスクシイミジルエステル基をもつため、セグメント中のシステインとリシンの二ヶ所で共有結合することができる。また、モデルタンパク質として、 α -helix 構造をとる、システインとリシンを含む二種類の 30 アミノ酸ペプチド、EIAALE**CE**IAALE**KE**IAALERHHHHHHHHH (“Up”)と、EIAALE**KE**IAALE**CE**IAALERHHHHHHHHH (“Down”) を作製した。“Up”と“Down”の違いはシステイン(C)とリシン(K)の位置が入れ替わっているだけである。9 個のヒスチジン (H) は、タンパク質をガラス基板に配向させるタグとして付加した。この二種類のモデルタンパク質のそれぞれにクロスリンカー色素を反応させた。また、ガラス基板表面にヒスチジンタグと特異的に結合するニッケル修飾を行った。得られた二種類のタンパク質-色素複合体をニッケル修飾ガラス基板に配向させて試料とし、HD-ESFG 測定を行った。

【結果】HD-ESFG 測定によって得られた“Up”と“Down”の二次非線形感受率 ($\chi^{(2)}$) スペクトルの実部と虚部を図3に示す。 $\chi^{(2)}$ スペクトルの虚部の符号は、分子が上を向いているか下を向いているかを表す。虚部の符号は“Up”では正、“Down”では逆に負となっている。これは、“Up”と“Down”ではシステインとリシンの位置が逆になっているため、クロスリンカー色素が逆向きに結合していることに対応している。つまりこの結果は、クロスリンカー色素を用いることによって、色素とセグメントの向きを完全に制御することが可能になり、より確実にセグメントの向きを決定できることを意味している。本手法は、ただちに膜貫通タンパク質に適用することが可能であり、他にも、タンパク質複合体を構成するドメイン間の相対配向決定にも有効であると考えている。

【参考文献】 [1] S. Yamaguchi and T. Tahara, *J. Chem. Phys.* **129** (2008) 101102. [2] 第2回分子科学討論会, 3C17, 2008年9月.

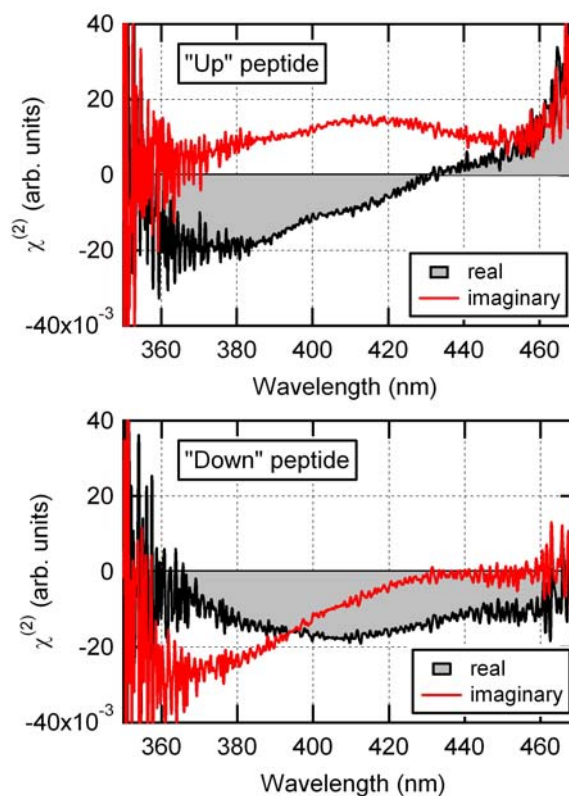


図3 二種類のモデルタンパク質配向膜の $\chi^{(2)}$ スペクトル

1B20

タンパク質の赤外吸収の単一分子観測：

色素の光熱サイクルに対する考察

(東工大物理¹・総研大学融合センター²・総研大先端科学³)

○藤芳 暁¹・古屋 陽¹・伊関 峰夫²・渡辺 正勝^{2,3}・松下 道雄¹

可視光および近赤外光を用いた単一分子蛍光分光法は、生体内の一つ一つのタンパク質の空間位置やその時間変化を個別に決定する方法として確立している。この位置情報に加えて、個々のタンパク質の構造情報を得ることができれば、生理機能の理解がさらに深まるはずである。赤外光を用いた吸収分光法はタンパク質の立体構造および機能を理解するために広く用いられており、単一分子の構造情報を得るための有力な候補である。しかし、中赤外吸収分光は単一分子レベルの感度を有していなかった。そこで、我々は新しい光学課程（赤外誘起蛍光回復）を発見し、これを利用することで約5桁の感度向上に成功した。その結果、単一タンパク質の赤外振動分光を世界で初めて実現した[1]。本講演では、発見した色素 Alexa Fluor 660 (A660) の赤外誘起蛍光回復の結果を示し、議論を行う予定である。

【装置】図1に装置の概要を示す。励起光には、量子カスケードレーザーの出力（波長 6000 – 6400 nm）とヘリウムネオンレーザーの出力（波長 633 nm）とを用いた。これらの光を同軸に合わせた後、電動ミラーと2枚の凹面ミラーを通し、温度 1.5 K の恒温槽にある対物レンズ（開口数 0.6、フッ化カルシウム製）によって、試料に照射した。

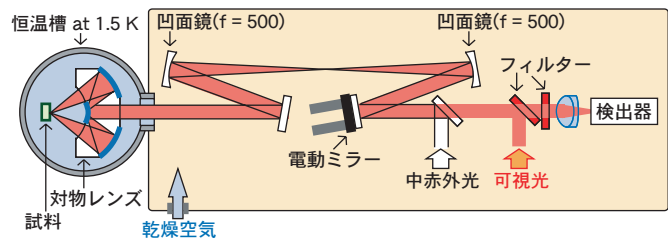


図1. 温度1.5 Kの中赤外-可視顕微鏡.

この配置では、電動ミラーの角度を変えると、試料上の二つの励起光の相対位置を変えずに、絶対位置を走査することができる。色素から放出された可視蛍光は、励起光と同じ経路を通り、フィルターを通過し、光検出器によって観測した。試料には、A660 をラベルした牛血清アルブミン (A660-BSA) の重水緩衝溶液を用いた。

【A660-BSA の赤外誘起蛍光回復】図1の装置を用いて、A660-BSA の可視蛍光イメージとその赤外応答を測定した。結果を図2にしめす。位置 $x = 6 \mu\text{m}$, $y = 10 \mu\text{m}$ にある A660-BSA は可視光のみでは発光せず、赤外光を加えると発光することが分かった。これが発見した A660 の赤外誘起の蛍光回復である。一方、 $x = 10 \mu\text{m}$, $y = 5 \mu\text{m}$ の A660-BSA は赤外照射に関係なく発光していた。

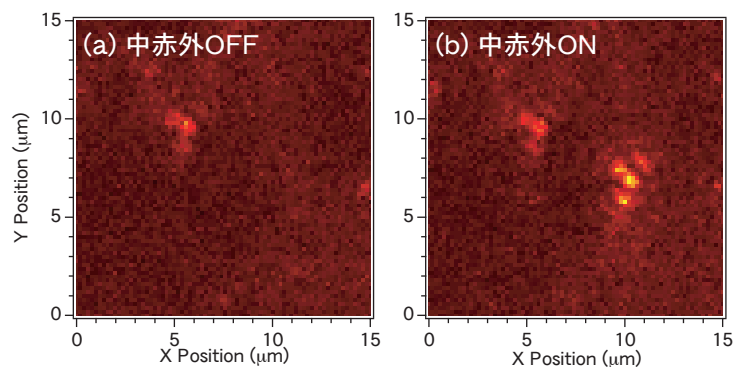


図2. 温度1.5 KのA660-BSAの可視蛍光画像。(a) 中赤外照射前、(b) 中赤外照射後. 可視光の波長は633 nm、強度は 60 Wcm^{-2} 、中赤外光の波長は6060 nm、強度は 3000 Wcm^{-2} であった。

これは、赤外照射によって無蛍光状態にある A660-BSA は蛍光状態へと変化するが、蛍光状態の A660-BSA には影響を及ぼさないためである。実際に、 $x = 10 \mu\text{m}$, $y = 5 \mu\text{m}$ のような蛍光状態にある A660-BSA を可視光照射により無蛍光状態にした後に、赤外光照射を行うと、7割の A660-BSA の蛍光が回復した (50 個中 34 個)。

【赤外誘起蛍光回復の強度依存性】 赤外誘起蛍光回復現象を用いて赤外作用スペクトルを測定するために、単一 A660-BSA の蛍光回復の赤外強度依存性 (図 3) を測定した。各測定を開始する前に、可視光照射により A660-BSA を無蛍光状態にした。可視光は、30 秒間、連続的に照射しながら、赤外光は時間 0 から 10 秒の間だけ照射した。強度 400 W cm^{-2} の赤外光を照射すると A660-BSA の蛍光は瞬間的に回復した。赤外光照射中の蛍光強度は一定であり、赤外光を止めた後、数秒で無蛍光状態になった。これに対して、一桁弱い強度 30 W cm^{-2} では、蛍光の回復に数秒かかり、また、照射中に数回、消光-回復を繰り返している。このように、赤外の応答時間には強度依存性があるために、蛍光回復量の赤外光強度依存性を測定すると (図 3b)、強度の弱いところでは正の傾きを持ち、約 300 W cm^{-2} から飽和した。よって、以下の測定では、赤外光強度を 100 W cm^{-2} 以下にした。

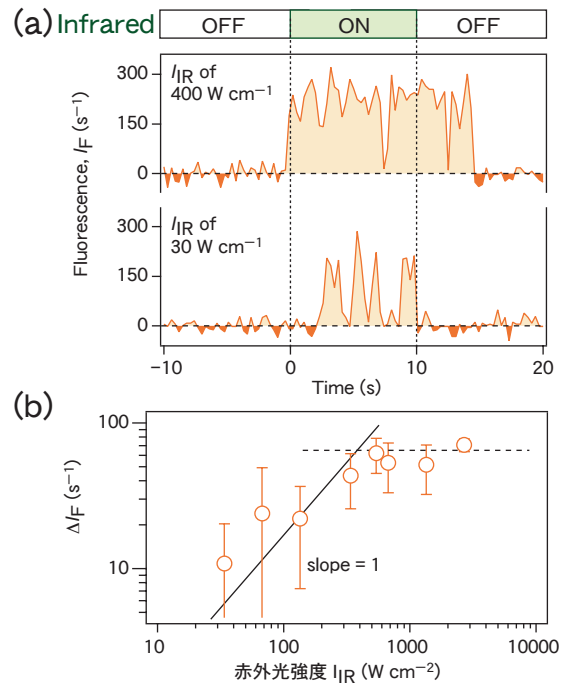


図3. (a) 中赤外光に対するA660-BSAの蛍光強度の時間変化. (b) 中赤外誘起の蛍光回復の中赤外光強度依存性.

【単一 BSA の赤外作用スペクトル】 図 4a の黄色に、単一 A660-BSA の赤外誘起蛍光回復の赤外波数依存性 (いわゆる赤外作用スペクトル) を示し、図 4b に 11 個の異なる A660-BSA からの作用スペクトルの平均 (赤) を示す。また、それぞれの図に黒の実線で、BSA のフーリエ変換赤外 (FTIR) スペクトルを示す。単一 A660-BSA の作用スペクトル (図 4a) および 11 個の平均のスペクトルの形状 (図 4b) は FTIR スペクトルと良く一致する。よって、図 4a の赤外作用スペクトルが単一 BSA の赤外吸収に由来すると結論した。

さらに、得られた作用スペクトルが A660 自身の赤外吸収ではないことを確認するために、重水緩衝溶液中の (タンパク質を結合していない) A660 の測定を行った。図 4c に結果を示す。重水は 1600 cm^{-1} 付近に弱い赤外吸収を持つ (図 4c、黒線)。図 4c のように、重水中の A660 に対して図 4a と同じ実験をすると、重水に由来する赤外作用スペクトルが得られた (青)。図 4b と 4c のスペクトルは明らかに異なり、BSA と重水の FTIR スペクトルに一致する。よって、A660 自身の赤外吸収ではなく、その周囲の赤外吸収によって、A660 の蛍光が回復したことを確認した。

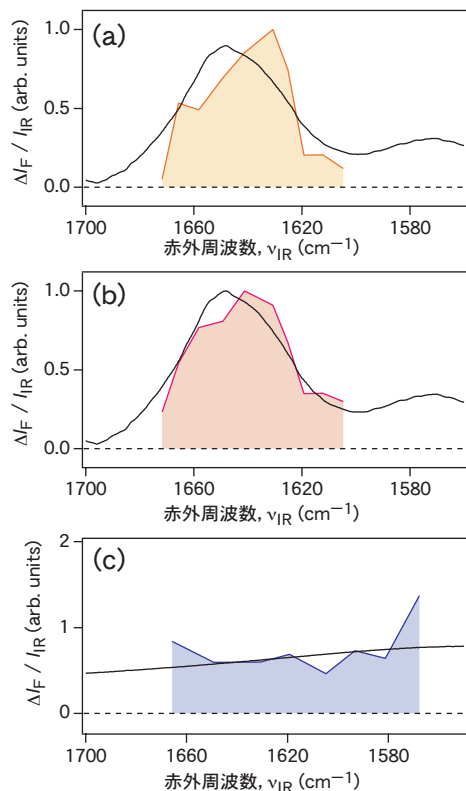


図4. (a) 単一A660-BSAの赤外作用スペクトル. (b) 11個の異なるA660-BSAの平均. (c) 11個のA660から得られた重水の赤外作用スペクトルの平均.

蛍光寿命相関分光法による生体高分子の構造揺らぎの観測：

DNAヘアピン構造の形成ダイナミクス

(理研・田原分子分光) ○石井 邦彦, 田原 太平

【序】我々は蛍光性プローブ分子の蛍光寿命の不均一性を通して複雑分子系の自発的な構造揺らぎを観測するための新しい相関分光法の開発を行っている[1,2]。これまでに、蛍光寿命の重みを付けた相関関数を利用して静的な蛍光寿命の不均一性を検出できることを報告した(蛍光寿命相関分光法) [1]。本研究では、この方法を生体高分子の自発構造揺らぎの問題に適用し、時間変化する蛍光寿命の不均一性＝蛍光寿命の時間揺らぎを初めてとらえることに成功した。今後、蛍光寿命というパラメータが持つ情報を利用して生体高分子の構造揺らぎについてのさらなる知見を得る有力な手段となる可能性がある。

【実験】蛍光相関関数の測定はフェムト秒パルスレーザー(Coherent Mira 900-F)と時間相関光子計数ボード(Becker & Hickl SPC-140)を組み合わせた自作の蛍光相関分光計で行った。蛍光寿命の重みを付けた相関関数 $G_L(\Delta T)$ は時刻 T での蛍光強度 $I(T)$ と蛍光寿命 $t(T)$ を使って

$$G_L(\Delta T) = \frac{\langle t(T)I(T)t(T+\Delta T)I(T+\Delta T) \rangle}{\langle t(T)I(T) \rangle^2}$$

と定義される。この $G_L(\Delta T)$ と通常の蛍光強度相関関数

$$G_I(\Delta T) = \frac{\langle I(T)I(T+\Delta T) \rangle}{\langle I(T) \rangle^2}$$

を同時測定して比較することで、並進拡散信号の寄与を除いた形で蛍光寿命の揺らぎを議論することができる[1]。

測定対象としては、ヘアピン構造を取る一本鎖 DNA オリゴヌクレオチドを使用した(図1)。この分子は塩基対を形成しないループ部および相補的な塩基配列からなるステム部を持ち、一般の DNA/RNA のループ構造形成や相補的な二本鎖形成の初期過程を理解するための単純なモデル化合物である。このオリゴヌクレオチドの両末端を FRET ペアとして機能する蛍光色素で標識し、FRET ペア間の共鳴エネルギー移動効率の変化を測定することでヘアピン構造の形成・解離をモニターすることができる。

本研究では FRET ペアのドナー側の蛍光寿命の揺らぎを $G_L(\Delta T)$ として測定した。FRET 標識 DNA オリゴヌクレオチドはリアルタイム PCR 用プローブとして市販されているものを利用した (1:6-FAM-5'-TTAACC(T)₁₈GGTT-3'-TAMRA、北海道システムサイエンス)。

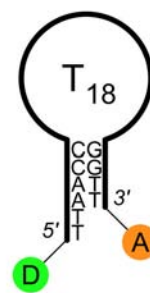


図1 1の構造。

【結果と考察】図2に **1** の定常蛍光スペクトルの塩濃度依存性を示す。塩濃度の上昇に伴いヘアピン構造の解離平衡が相補鎖形成側に移動し、ドナー蛍光強度が減少している。このドナー蛍光の波長 505–540 nm の成分を切り出し、 $G_L(\Delta T)$, $G_I(\Delta T)$ を測定した (図3a, NaCl 濃度 0.5 M)。その結果、これら2つの相関関数の間には明らかな差異が見られ、蛍光寿命の不均一性の存在が示された。並進拡散信号の寄与を除くためにこれらの相関成分の比を取ったもの (図3b) を見ると、約 100 マイクロ秒の遅延時間で比の値が~1.3 から~1.5 へと明確に遷移していることが分かる。これは、ヘアピン構造の何らかの変化によりドナー - アクセプター間距離が約 100 マイクロ秒の時定数で揺らいでいることを示唆している。DNAヘアピン構造の形成ダイナミクスは2状態的ではなく中間状態が存在するという報告もあり[3]、蛍光寿命を利用する我々の方法では FRET 効率を通して揺らいでいる分子の構造についての情報も得られることから、今回の測定結果が反応モデルの決定に利用できるのではないかと考えている。講演では観測された揺らぎと遅い時間まで残る不均一性の帰属のために調べている塩基配列依存性の結果についても議論する。

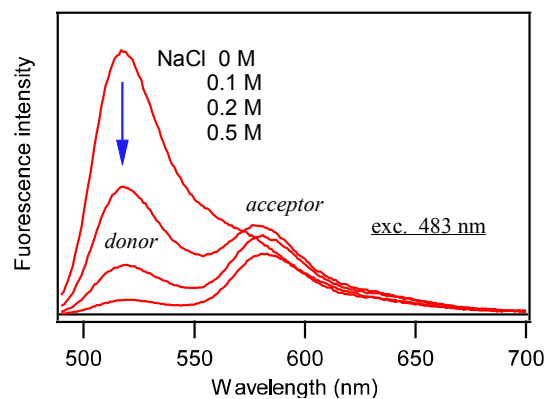


図2 **1** の定常蛍光スペクトルの塩濃度依存性。

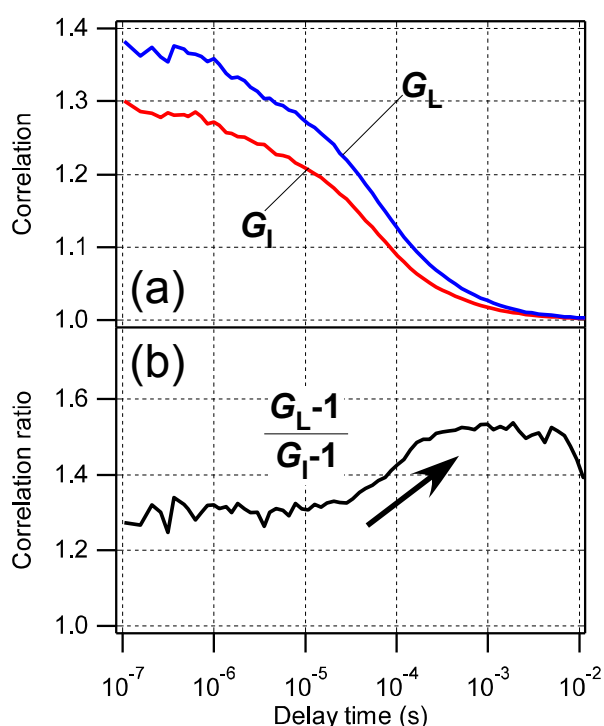


図3 **1** の蛍光相関測定結果。(a)通常相関関数 (G_I) と蛍光寿命重み付き相関関数 (G_L)。 (b)相関関数の比。

[1] 石井邦彦・田原太平, 日本化学会第 89 春季年会, 2E5-46(2009); K. Ishii and T. Tahara, “Resolving inhomogeneity using lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy”, submitted for publication.

[2] 石井邦彦・田原太平, 第3回分子科学討論会, 4P091(2009).

[3] A. V. Orden and J. Jung, Biopolymers 89, 1 (2008).