

1P-087

## 細胞内フラビンの自家蛍光寿命を用いた単一細胞内 pH 計測

(北大院環境<sup>1</sup>・北大電子研<sup>2</sup>) 本間将人<sup>1</sup>・中林孝和<sup>1,2</sup>・太田信廣<sup>1,2</sup>

### Detection of Intracellular pH in a Single Cell Using Autofluorescence Lifetime of Flavins

(Hokkaido Univ.) Masato Honma・Takakazu Nakabayashi・Nobuhiro Ohta

【緒言】顕微鏡下での蛍光強度イメージング測定は、細胞内の状態を観察する手段として細胞生物学などの分野で広く用いられており、細胞組織を標識する様々な蛍光色素やタンパク質が開発されている。細胞内を蛍光標識することで、細胞内で起こる様々な生理現象の解明が可能になっている。しかし、蛍光色素による染色は、染色に多くの時間を費やすことから、臨床の場における細胞組織の迅速な診断を可能にさせるため、細胞内に元から存在する蛍光物質(自家蛍光)を用いたイメージング測定が注目を集めている[1,2]。本発表では、代表的な自家蛍光成分であるフラビン類の中でもFAD(Flavin Adenine Dinucleotide)の蛍光寿命を用いて、細胞内の pH をその場で観測できることを示す。細胞内の環境の観察には、色素から発せられる蛍光を用いての蛍光強度測定が広く用いられており、高感度の検出が可能、試料の自由度が高い、様々な手法との組み合わせが可能などの利点は多くあるものの、励起光強度や試料濃度、長時間の測定における光褪色などによる強度ゆらぎが引き起こす定量性の低下が問題となる。一方で蛍光寿命は、蛍光発色団に固有の値であるために、蛍光寿命の値は、上述の実験条件に依存しない。そのために、蛍光強度測定のみ比べて高感度に細胞内の環境を反映させることができ、定量性の高い測定を行うことができる。

【実験】pH 5、7、9 に調整した緩衝溶液と、接着性がありヒト由来の細胞株である HeLa 細胞を用いた。緩衝溶液の pH と細胞内の pH を等しくするために、イオノフォアを用いて得られた pH 5、7、9 の細胞を用いて測定を行った。イメージング測定は、励起波長を 455 nm、蛍光波長を 510-560 nm に設定して行った。装置は共焦点レーザー走査型顕微鏡と蛍光寿命解析ユニットを組み合わせることで、蛍光強度と蛍光寿命のイメージングが得られるようになっている。生細胞への応用を勘案し、蛍光寿命解析ユニット内では、四つの時間幅に分解する時間ゲート法を用いることで、蛍光寿命イメージング測定を短時間で行うことができるようになっている[2]。

【結果と考察】Fig.1 に FAD の分子構造を示し、Fig.2 に培養細胞である HeLa 細胞中と水溶液中の FAD の蛍光スペクトルを示す。FAD の蛍光は、イソアロキサジン環から発せられる。細胞中の蛍光スペクトルが水溶液中のスペクトルよりも短波長側にシフトしており、これは細胞内での FAD とタンパク質との相互作用していることに由来する。しかし、HeLa 細胞中、水溶液中の両方共、ピーク波長に pH に伴う変化は観

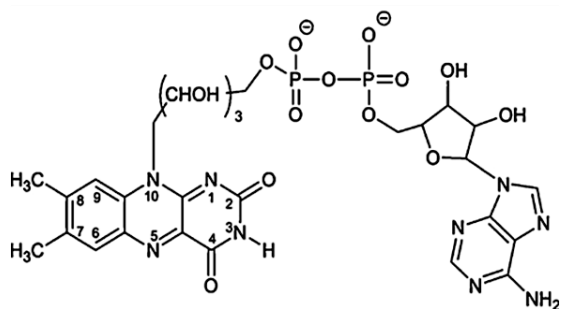


Fig.1. FAD の分子構造

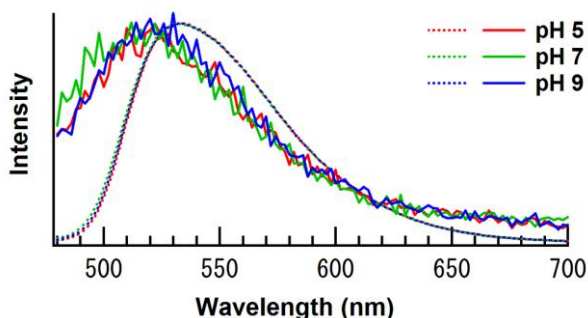


Fig.2. 細胞内(実線)、水溶液中(点線)で得られる FAD の蛍光スペクトル

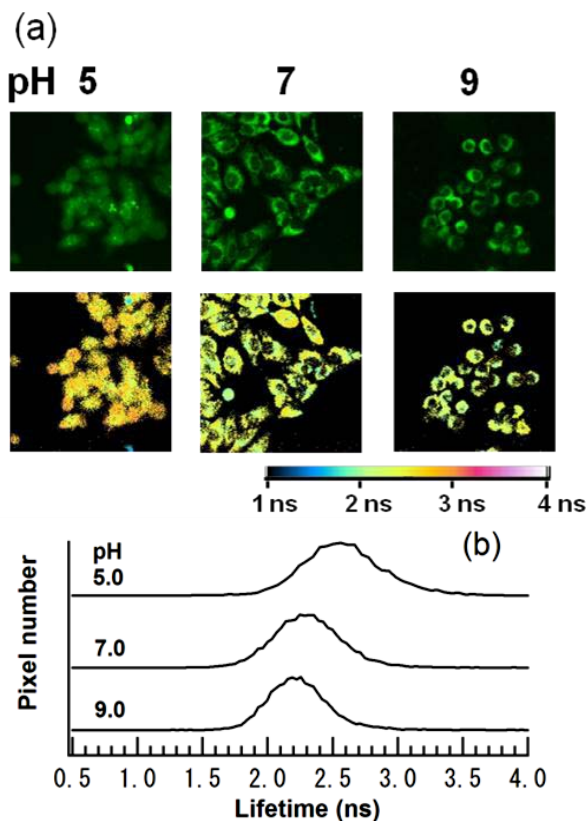


Fig.3. (a) 蛍光強度イメージング(上)および蛍光寿命イメージング(下)、(b) 蛍光寿命イメージング測定より得られた蛍光寿命のヒストグラム

測されなかった。Fig.3(a)に細胞内の pH が 5、7、9 で得られる蛍光強度イメージング画像と蛍光寿命イメージング、Fig.3(b)に蛍光寿命イメージング測定で得られた蛍光寿命のヒストグラムを示す。蛍光寿命のピーク位置は、細胞内の pH が 5、7、9 においてそれぞれ 2.61、2.32、2.26 ns であった。これは細胞内の pH の増加に伴い、蛍光寿命が減少することを示している。また、HeLa 細胞中での FAD のバルクでの蛍光減衰測定も行い、その解析から同様の結果が得られた。また、水溶液中の FAD の蛍光寿命は pH が 5、7、9 で変化しないことを観測しており、蛍光寿命の変化の原因の可能性として細胞内の FAD とタンパク質の相互作用が pH によって変化することが考えられる。本研究から、イオノフォアを用いて調製した細胞内の pH と得られた蛍光寿命についての検量線を作成することで、FAD の蛍光寿命を用いて細胞本来の環境を保ったまま細胞内の pH をその場で可視化できることがわかる。このことは、本手法が従来の蛍光強度イメージング測定の場合と比較して、非侵襲で定量性に優れた細胞内環境測定のためのイメージング法であることを示している。

[1] 中林孝和,太田信廣, *光化学*, 2011, **42**, 52–59.

[2] S. Ogikubo *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 10385–10390.