

4A17 自家蛍光寿命イメージング：単一細胞内 pH のその場検出

(北大電子研¹・富士フィルム²・北大院先端生命³) 荻窪 真也²・中林 孝和¹・
足立 貴志²・Md. Serajul Islam¹・吉沢 友和¹・金城 政孝³・太田 信廣¹

Autofluorescence Lifetime Imaging: Detection of Intracellular pH in a Single Cell

(Hokkaido Univ., FUJIFILM) S. Ogikubo, T. Nakabayashi, T. Adachi, Md.
Serajul Islam, T. Yoshizawa, M. Kinjo, N. Ohta

【序】 蛍光による細胞観察において、蛍光強度ではなく、蛍光寿命を画像化することにより、各種刺激に対する細胞内の環境変化を検討している。蛍光強度の画像化は、一般に絶対強度を用いるために、蛍光分子の光退色や光学系の変化などによって定量性が低下するのに対し、蛍光寿命は、蛍光分子の種類および周囲の環境のみで決まり、光退色や光学系などには依存しない。そのために、蛍光寿命は蛍光強度に比べて定量性に優れ、蛍光寿命の僅かな変化は、蛍光分子の周囲の環境変化または反応速度の変化に対応させることができる¹⁻⁶。

本研究では、生体組織内に元から存在する蛍光物質(自家蛍光成分)の蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境計測を提案する。細胞は、色素染色を行わなくても自家蛍光と呼ばれる生体組織内に元から存在する蛍光分子からの蛍光を示し、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、手術などにおいて迅速な判断が可能となる。本発表では、細胞内に存在する NADH(nicotinamide adenine dinucleotide)の自家蛍光寿命を用いて細胞内 pH を無染色でイメージングできることを示す⁷。

【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蛍光顕微鏡を用い、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²⁻⁶。培養細胞としてガン細胞である HeLa 細胞を用い、様々な pH に調整した緩衝溶液内で培養を行い、画像を測定した。緩衝溶液中またはバルクの HeLa 細胞内の NADH の蛍光減衰曲線の測定は、石英セル内に NADH の水溶液または HeLa 細胞を入れ、時間相関光子計数法を用いて測定した。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 の値を得ている。

【結果】 NADH の分子構造を Fig. 1 に示す。NADH は代表的な補酵素であり細胞内に広く存在する。蛍光はニコチンアミド基から発し、細胞に

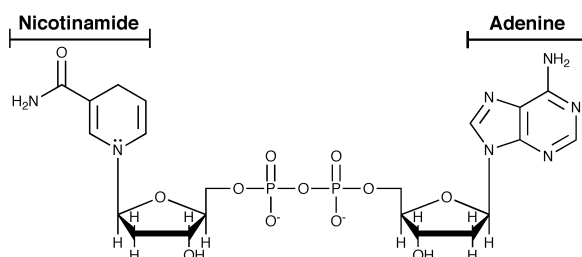


Fig. 1 Chemical structure of NADH

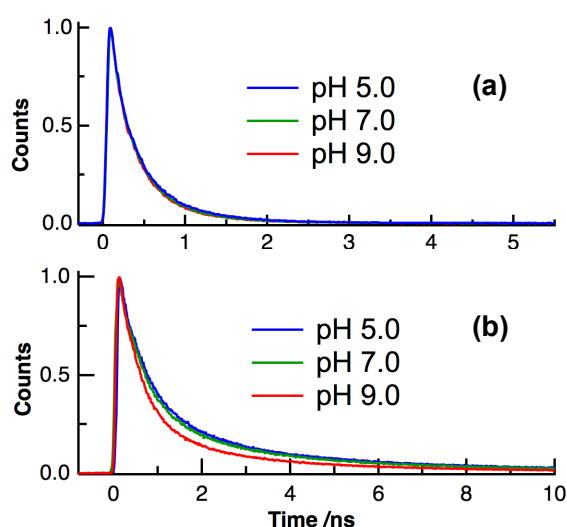


Fig. 2 Representative fluorescence decay profiles of NADH in buffer solution (a) and in HeLa cells (b) at different pH of 5.0, 7.0 and 9.0. Excitation and detection wavelengths were 370 and 440–450 nm, respectively.

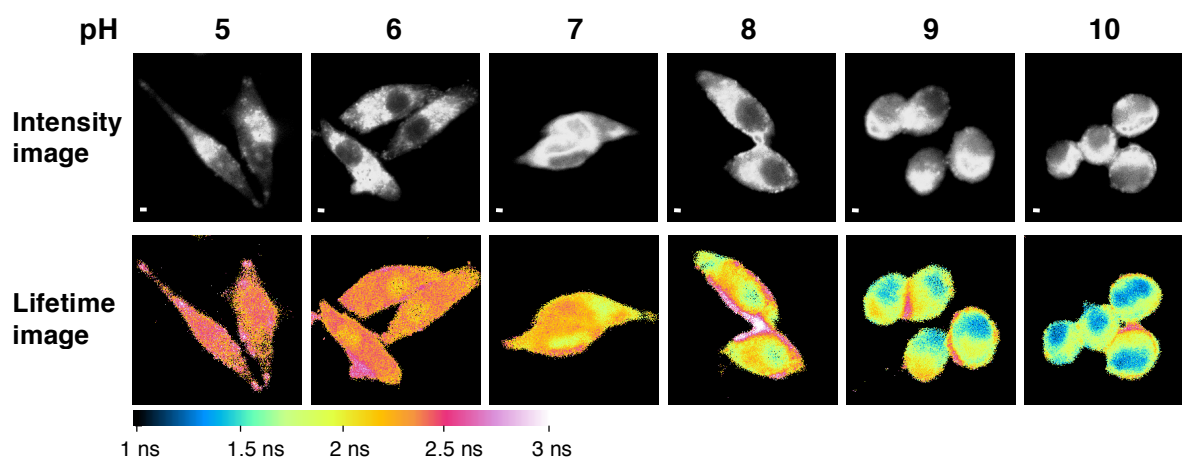


Fig. 3 Fluorescence intensity images (upper) and corresponding fluorescence lifetime images (lower) of autofluorescence of HeLa cells at the intracellular pH indicated at the top. Excitation and detection wavelengths were 370 and 417–477 nm, respectively.

350–400 nmの光を照射すると、440 nmをピークとしたNADHの蛍光が観測される。Fig. 2にNADHの蛍光減衰曲線のpH依存性を示す。緩衝溶液中においては、NADHの蛍光減衰曲線の形状はpHによって変化せず、緩衝溶液中ではNADHの蛍光寿命はpHに依存しないことがわかる。しかしFig. 2bに示すように、細胞内では、細胞内pHに応じてNADHの蛍光減衰曲線が変化し、細胞内pHの増加に伴い蛍光寿命の値が減少している。観測された蛍光寿命の細胞内pH依存性は、細胞内でのNADHとタンパク質との分子間相互作用のpH変化を観測していると考えられる。細胞内での蛍光減衰曲線は3成分の指数関数にて再現され、すべての成分の蛍光寿命が細胞内pHの増加に対して減少することがわかった。

実際に、HeLa細胞内におけるNADHの蛍光寿命イメージングの細胞内pH依存性を測定した結果をFig. 3に示す。Fig. 3において、上がHeLa細胞内のNADHの蛍光強度画像、下が対応する蛍光寿命画像である。細胞内pHは強度画像の上に示してある。蛍光強度画像では、NADHの細胞内濃度に応じて蛍光強度に細胞内位置依存性があり、強く光っている領域がミトコンドリア、強度が弱い円形の領域が核に対応する。一方、蛍光寿命画像では、細胞内pHが小さくなるにつれて、蛍光寿命の値が長くなっている。ミトコンドリアと核内でのNADHの蛍光寿命の細胞内pH依存性をFig. 4に示す。細胞内pHの増加に対してNADHの蛍光寿命が単調に減少している。また、蛍光寿命には細胞内位置依存性があり、核内のNADHの蛍光寿命が、他の領域よりも短くなっている。イオノフォアを用いてFig. 4のようなNADHの蛍光寿命と細胞内pHとの間の検量線を作成することによって、細胞内pHを蛍光色素で染色することなく無染色で定量イメージング測定が行えることがわかる。我々の知る限りでは、細胞内イオン濃度を無染色でイメージングした初めての例となる。

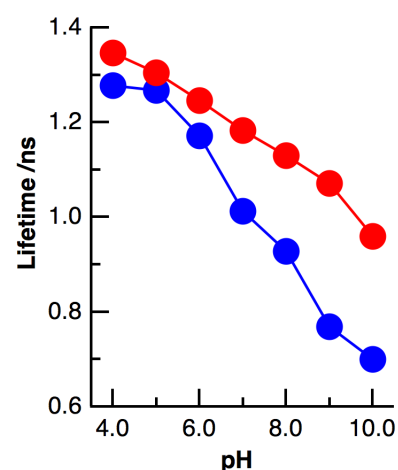


Fig. 4 Plots of the fluorescence lifetimes as a function of pH using the values obtained at mitochondria (red) and at nuclei (blue).

1. 中林, 太田 光化学 42 (2011) 52.
2. 中林, 太田 日本レーザー医学会誌 30 (2010) 441.
3. N. Ohta, T. Nakabayashi *Molecular Nanodynamics* (Wiley-VCH) (2009) 607.
4. 中林, 太田 分析化学 58 (2009) 473.
5. 中林, 太田 ナノイメージング (エヌ・ティー・エス) (2008) 245.
6. 中林, 太田 ぶんせき (2007) 597.
7. S. Ogikubo, et al. *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 10385.