

Studies on the change in photoexcitation dynamics of NADH in living cells with
intracellular environment

(RIES, Hokkaido Univ.) OT. Nakabayashi, Md. Serajul Islam, N. Ohta

【序】 生体内に元から存在する蛍光物質(自家蛍光物質)の蛍光寿命を用いた細胞内計測を進めている¹⁻⁶. 細胞は、色素染色を行わなくても自家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、また染色時間が無いために、手術などにおいて迅速な判断が可能となる. 特に補酵素である還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH, Fig. 1)の蛍光寿命を用いた細胞計測を進めており、細胞内pHを無染色で画像化できることなどを示している⁵. この結果は、NADHの蛍光が周囲の環境によって大きく変化することを用いており、例えば、細胞内の蛍光スペクトルは水溶液中に比べて約10 nm短波長シフトし、細胞内の蛍光寿命(1-2 ns)は水溶液中(約0.3 ns)より数倍長くなる. この細胞内外での蛍光挙動の違いについて、NADHはタンパク質と結合した状態として細胞内では主に存在し、タンパク質との相互作用によって、スペクトルが短波長シフトし、寿命が長くなることが提案されている. しかし、タンパク質との相互作用による蛍光変化の機構は全く不明であり、定量的な考察を行うことができない. 本研究では、NADHの吸収および蛍光の外部電場効果および媒質依存性の測定から、細胞内外でのNADHの蛍光挙動の変化の機構を考察した.

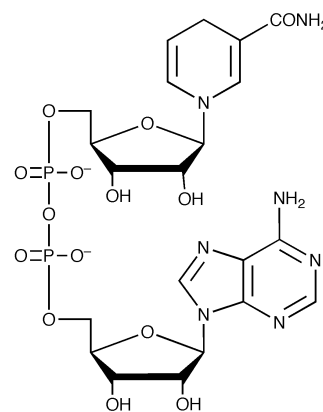


Fig. 1 The structure of NADH.

【結果】 Fig. 2に酵母内に存在するNADHの時間分解蛍光スペクトルを示す. 時間と共に短波長シフトし、2-5 nsの時間領域のスペクトルは、水溶液中のスペクトルより約10 nm短波長シフトしている. この結果は、細胞内のNADHには、フリーの状態とタンパク質と結合した状態の2つの状態が存在し、蛍光寿命の短い前者からの蛍光が速く減衰し、短波長シフトしたタンパク質と結合した状態からの蛍光が、2-5 nsの遅い時間領域に観測されることで説明できる.

様々な溶媒中でNADHの蛍光スペクトルと蛍光寿命を測定し、蛍光寿命と蛍光位置について、溶媒の極性パラメーターである $E_T(30)$ でプロットした結果をFig. 3aとbにそれぞれ示す. 蛍光位置には重心法で得られた値を用いている. 溶媒の極性が増加($E_T(30)$ が増加)するにつれて、蛍光寿命は短くなり、極性環境がNADHの無輻射緩和速度を増加させることがわかる. また、蛍光位置は極性の増加によって長波長シフトす

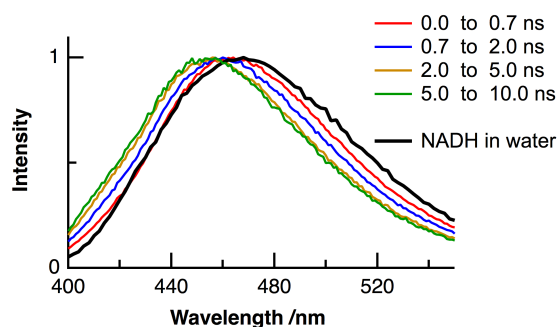


Fig. 2. Normalized time-resolved fluorescence spectra of NADH in yeast cells and static fluorescence spectrum of NADH in aqueous solution (thick-solid line) following excitation at 370 nm.

る。この結果は、細胞内でのNADHの蛍光挙動の変化は、NADH周囲の誘電環境によることを示唆している。細胞内でタンパク質と結合したNADHは、周囲をタンパク質のアミノ酸残基で取り囲まれた構造を示す。そのため、NADH周囲の環境は、極性の低い疎水性溶媒と同様の環境になる。このいわゆる溶媒効果のために、タンパク質と相互作用しながらも、スペクトルは短波長シフトし、蛍光寿命は増加したと考えられる。

媒質依存性の結果は、吸収・蛍光スペクトルの外部電場効果の測定からも支持される。Fig. 4にPVA高分子膜中におけるNADHの吸収スペクトルの外部電場による変化成分(電場吸収スペクトル)を示す。電場吸収スペクトルは、吸収スペクトルの0次、1次、そして2次微分の線形結合で表すことができ、1次および2次微分の項から、光励起に伴う分子分極率および双極子モーメントの変化量をそれぞれ求めることができる。電場吸収スペクトルは、吸収スペクトルの2次微分の形を示し、光励起に伴う双極子モーメントの変化($\sim 4D$)が支配的であった。励起状態は基底状態と比べてCT性の大きな状態であることがわかる。Fig. 5に、PVA中におけるNADHの蛍光スペクトルの外部電場による変化成分(電場蛍光スペクトル)を示す。電場吸収スペクトルとは異なり、450 nm付近に極大を示す蛍光バンドの強度が、外部電場の印加によって減少した。無輻射緩和速度が外部電場との相互作用によって増加することがわかる。この結果は、蛍光寿命の媒質依存性の結果と一致し、励起状態のCT性によって、静電的な相互作用による蛍光変化が観測されたと考えられる。

細胞内でのNADHの蛍光変化に、NADH周囲の誘電環境変化が原因の一つになることがわかった。NADHの自家蛍光測定によって、細胞内環境変化に伴うNADHとタンパク質との相互作用の変化・誘電環境の変化を検出することができる。

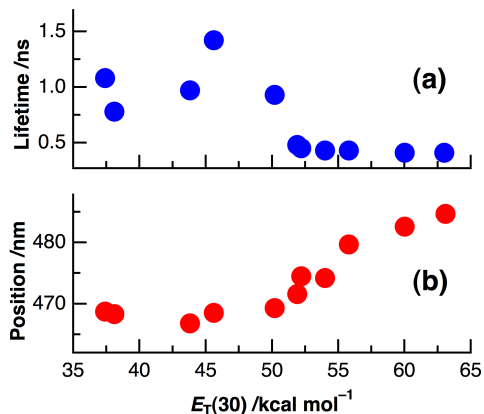


Fig. 3. Plots of fluorescence lifetime (a) and fluorescence position (b) of NADH against $E_T(30)$. The first moment was used as fluorescence position.

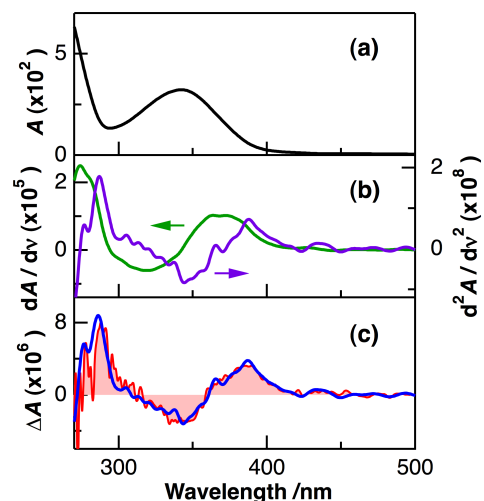


Fig. 4. (a) Absorption spectrum of NADH in PVA, (b) the first (green) and second (purple) derivative spectra of the absorption spectrum, (c) electroabsorption spectrum (shaded red line) and the fitted one (blue). The applied field strength was 0.7 MV cm^{-1} .

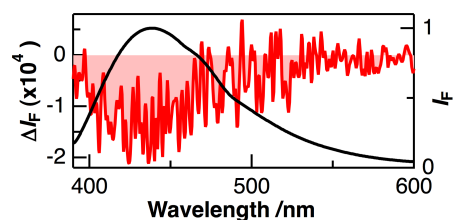


Fig. 5. Fluorescence (black) and electrophotoluminescence (shaded red line) spectra of NADH in PVA with an excitation wavelength of 360.5 nm . The applied field strength was 0.7 MV cm^{-1} .

1. 中林, 太田 *日本レーザー医学会誌* 30 (2010) 441.
2. 中林, 太田 *光化学* 42 (2011) 52.
3. 中林, 太田 *生物物理* 53 (2013) 166.
4. T. Nakabayahi, et al. *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 15254.
5. S. Ogikubo, et al. *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 10385.
6. Md. S. Islam, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 1952.