

3P071

クライオ近赤外1分子イメージングのための蛍光分子の評価

(東工大 物理) ○内藤貴也・田邊大明・虎谷靖泰・藤芳 暁・松下道雄

Characterization of near-infrared fluorescent probe of single-molecule imaging at a few K.

(Department of Physics, Tokyo Institute of Technology) Takaya Naito, Hiroaki Tabe,

Yasuharu Toratani, Satoru Fujiyoshi & Michio Matsushita

【序】量子収率が1に限りなく近い光検出器の発明により、蛍光顕微鏡で一つ一つの分子を個別にイメージングすることが可能になっている。蛍光イメージングと生体試料とは相性が良く、この1分子蛍光イメージングも細胞内部にある個々のタンパク質分子の3次元空間配置を観るために用いられている[1]。しかし、細胞内1分子イメージングには大きく分けて、2つの課題がある。一つは、タンパク質の多くが細胞内を自由に拡散しているため[2]、1分子観察に必須の有限な露光時間の間に、蛍光画像がぼやけてしまうことである。もう一つは、細胞内物質(NADHやフラビン)の自家蛍光[3]により、1分子からの微弱な発光が簡単に隠されてしまうことである。前者の対策として我々は、試料全体をガラス転移温度(135 K)以下に急速凍結し、ガラス化した細胞を測定することで、拡散を完全に止めて観察している[4]。これにより、例えば、外部刺激や細胞周期に合わせて急速凍結することで、凍結する瞬間の状態を長時間かけて観察することが可能である。一方、後者の背景光の問題は、細胞内物質の自家蛍光がすくない近赤外波長で蛍光する色素を用いることで克服しようと考えている。そこで、極低温で使える近赤外色素の探索をおこなっている。本発表では、温度80 KにおけるL細胞の自家蛍光イメージを示した後、市販品の中でも良く使われている近赤外蛍光性色素 Alexa Fluor 750(Alexa750)の室温、80 Kでの1分子蛍光の結果をしめす。

【実験】蛍光顕微鏡には、我々が2014年に開発した反射型三次元共焦点顕微鏡を用いた[5]。この顕微鏡の特長は、反射型であるため色収差が無く、レーザーの広がり角および入射角を変えることで、光の焦点を三次元に空間走査できることにある。対物レンズには、焦点距離が2 mm、開口数が0.53のものを用いた。当該研究では、波長473 nm、と727 nmの半導体レーザーを用いて、それぞれ、L細胞と Alexa Fluor 750 を光励起した。L細胞にはBK7基板上に培養した後、固定化したものを用い、Alexa Fluor 750の測定では、ポリビニルアルコールを1%混ぜた濃度 10^{-11} Mの溶液(リン酸緩衝溶液 pH6.7 または DMSO)のスピコート膜を用いた。

【結果】L細胞の自家蛍光 図1aに、温度80 Kで測定したL細胞の蛍光イメージをしめす。励起波長は473 nmである。画像の中には、10個くらいの細胞が写っている。この細胞の蛍光スペクトルを測定すると、520 nm付近に極大を持つブロードな蛍光が検出された(図1b)。また、図1aを見ると、核にあたる部分の蛍光が弱く、細胞質がより強く蛍光している。これらは、フラビンに由来する自家蛍光の特徴と一致する[3]。よって、この自家蛍光は主にフラビン分子およびフラビタンパク質に由来すると考えられる。このフラビンの1光子励起の吸収端は~500 nmであり、これよりも長波長で光励起できる色素を選ぶことが重要である。

室温(296 K)での Alexa750 の吸収蛍光 フリーおよび抗体 IgG、goat anti-Rabbit IgG (H+L)、に結合した Alexa750 のリン酸緩衝溶液、フリーの Alexa750 の DMSO 溶液における吸収と蛍光スペクトルをしめす。図2aのように、DMSO 中では、緩衝溶液中に比べて、~17 nm 長波長シフトしている。また、フリーと IgG に結合した Alexa750 の吸収を比べると、IgG に結合したものは、700 nm 付近に肩が現れているのが分

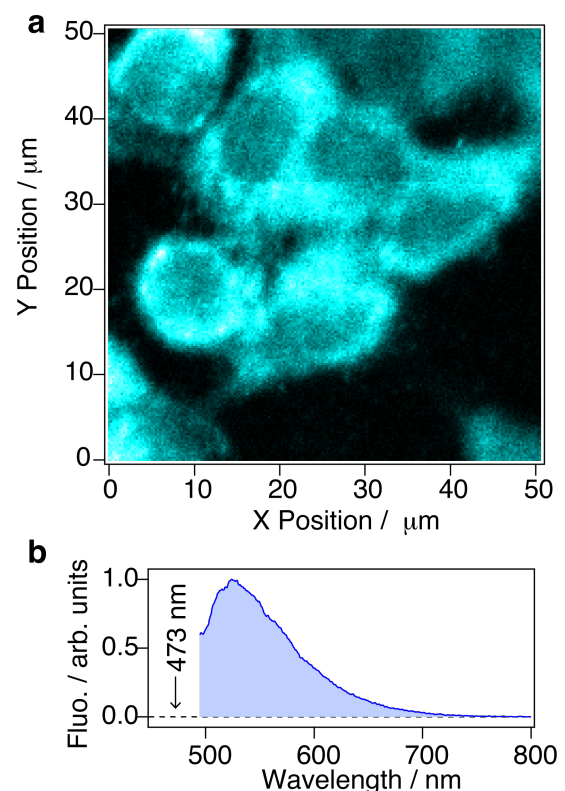


図1. 温度80 KにおけるL細胞の自家蛍光イメージ(a)とスペクトル(b). 励起波長は473 nm.

かる。IgG には平均3個の Alexa750 が結合しており、Alexa750 のような長波長蛍光性のシアニン色素は、色素間の相互作用により短波長シフトした吸収が現れることが知られている[6]。

図 2b の蛍光スペクトルの縦軸は、蛍光強度を励起波長 727 nm における吸光度(～0.02)で割った後に、DMSO の強度で規格化した相対蛍光強度である。蛍光測定における濃度は 10^{-7} M である。蛍光極大は 700 nm よりも長波長であり、図 1b の自家蛍光スペクトルと重なりがなく、細胞内観察用の蛍光色素として有望である。一方、蛍光強度は周囲の環境に大きく依存するため、使用には注意が必要なが分かった。Alexa750 は DMSO 中でもっと良く蛍光し、IgG に結合すると蛍光が消光した。この消光は、吸収スペクトルと同様に、色素間の相互作用によるものと考えられている[6]。1 分子からの信号は本質的に微弱であるため、さらに量子収率が低下すると、検出が不可能になる。よって、免疫染色によって 1 分子観察を行う際には、IgG への平均結合数を 1 個以下にする必要がある。

温度 80 K での DMSO 溶液中の Alexa750 の 1 分子蛍光観察

80 K における Alexa 750 の 1 分子蛍光観察をおこなった。溶媒は最も量子収率の高い DMSO を用いた。励起波長は 727 nm であった。図 3a のように、個々の Alexa750 が個々の輝点として、1 分子ずつ観察できた。一つの Alexa750 分子に焦点を合わせて測定した蛍光強度 I_F の励起光強度依存性 I_{ex} を図 3b、信号対ノイズ(S/N)比を図 3c にしめす。ノイズは、座標(x, y) = (7 μ m, 5 μ m)の輝点が無い場所を選んだ。図のように $I_F = 2000 \text{ s}^{-1}$ で蛍光強度は飽和するものの、その時の S/N 比は 53 であった。例えば 2011 年に報告されたフラビントタンパク質のクライオ蛍光観察[7]では、励起波長が 440 nm であったため、S/N 比は約 1 であった。これに比べ、1 桁以上高い S/N 比である。

図 1 で測定した L 細胞は、京都大学大学院医学研究科の喜井勲博士から提供して頂きました。ここで、改めてお礼を申し上げます。

1. 例えば、Fernandez-Suarez, M. & Ting A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 929-943 (2008).
2. Li G.W., & Xie X.S. Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature*, **475**, 308-315 (2011).
3. Aubin J.E. Autofluorescence of Visible Cultured Mammalian Cells. *J. Histchem. Cytochem.* **27**, 36 – 43 (1979).
4. Inagawa, H. et al, *Sci. Rep.* (2015) in press.
5. Maruo, M., Inagawa, H., Toratani, Y., Kondo, T., Matsushita, M., & Fujiyoshi, S. Three-dimensional laser-scanning confocal reflecting microscope for multicolor single-molecule imaging at 1.5 K. *Chem. Phys. Lett.* **591**, 233-236 (2014).
6. Gruber H.J. et al. Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin. *Bioconjugate Chem.* **11**, 696-704 (2000).
7. S. Fujiyoshi et al. Structural Change of a Cofactor Binding Site of Flavoprotein Detected by Single-Protein Fluorescence Spectroscopy at 1.5 K. *Phys. Rev. Lett.* 106. 078101 (2011).

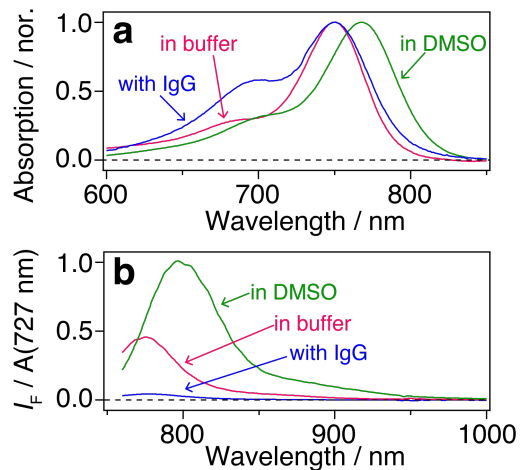


図2. 室温溶液中のAlexa Fluor 750の吸収(a)および蛍光(b)スペクトル. 蛍光スペクトルの励起波長は727 nm.

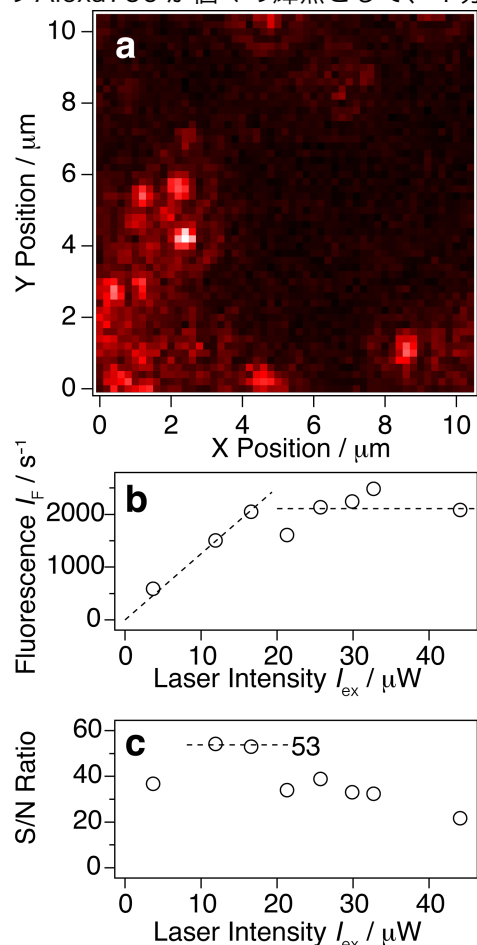


図3. (a) 温度80 KにおけるAlexa750のDMSO溶媒中の蛍光イメージ. (b) 蛍光強度 I_F の励起光強度 I_{ex} 依存性. (c) 信号対ノイズ(S/N)比の I_F 依存性.