

## 蛍光寿命イメージングによる単一細胞内の 微視的環境変化の計測

(北大電子研) ○中林孝和・長尾一生・王 会平・金城政孝・太田信廣

【序】蛍光による細胞のイメージングにおいて、蛍光強度ではなく、蛍光寿命をイメージングすることによって、細胞分裂や細胞死過程および各種外来刺激に対する細胞内の様々な現象を解明することを目的とした研究を行っている<sup>1)</sup>。蛍光強度は蛍光分子の濃度や励起光強度に依存するのに対し、蛍光寿命は光退色や励起光強度に依存しない。そのため強度測定に比べて定量性が増加し、発色団周囲の環境変化を高感度に検出できると考えられる。また時間分解測定から細胞内の光励起ダイナミクスを直接観測することができ、“蛍光寿命”というパラメーターから、単一細胞内の様々な現象を明らかにすることができると考えている。本研究では、緑色蛍光タンパク質(GFP)をHeLa細胞に発現させ、細胞死に伴うGFPの蛍光寿命の経時変化について検討した。細胞死に伴いGFPの蛍光寿命は変化し、その機構を明らかにするために、GFPの蛍光寿命の外部電場効果の測定を行った。

【実験】蛍光寿命イメージングは、フェムト秒レーザーと共焦点顕微鏡を用い、マッピングの各点において光子計数検出による蛍光減衰曲線の測定を行う構成とした。蛍光減衰曲線を4分割し、分割された値から蛍光寿命を算出する時間ゲート法を用いている<sup>1)</sup>。時間分解電場蛍光測定は、外部電場が存在するときの光子計数検出による蛍光減衰曲線と電場がないときの曲線を30ミリ秒で交互に測定し、それぞれを積算した<sup>2)</sup>。

【結果】細胞死に伴う蛍光寿命イメージングの変化の一例をFig. 1BとCに示す。試料はHeLa細胞にtudor-GFPを発現させたものを用いている。tudor-GFPは、単量体だけではなく、GFPの凝集体を含んだ顆粒をも形成し、蛍光強度画像では、顆粒部分が明るく観測される(Fig. 1A)。試料調整直後では、GFPの蛍光寿命は顆粒部分に関係なく細胞内で一様であり、蛍光寿命が2.0 nsの細胞と2.5 nsの細胞にわけられた。しかし細胞死に伴い蛍光寿命が増加し、測定開始から約100分後では、両者とも約3.2 nsまでの寿命増加を観測することができた。さらに顆粒部分の蛍光寿命は約2.0 nsにて一定であり、細胞死後の蛍光寿命画像では、顆粒部分を見分けることが

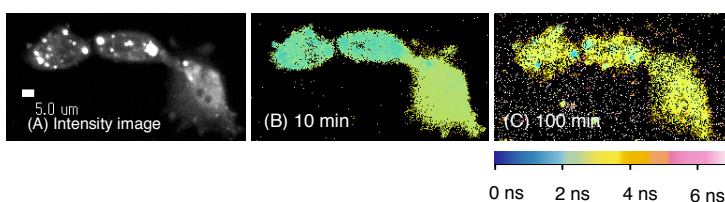


Fig. 1. Fluorescence intensity image of the GFP-fusion *tudor*-protein in HeLa cells (A) and the corresponding fluorescence lifetime images at 10 min and 100 min. Excitation wavelength was 450 nm, and fluorescence in the 515–565 nm region was detected.

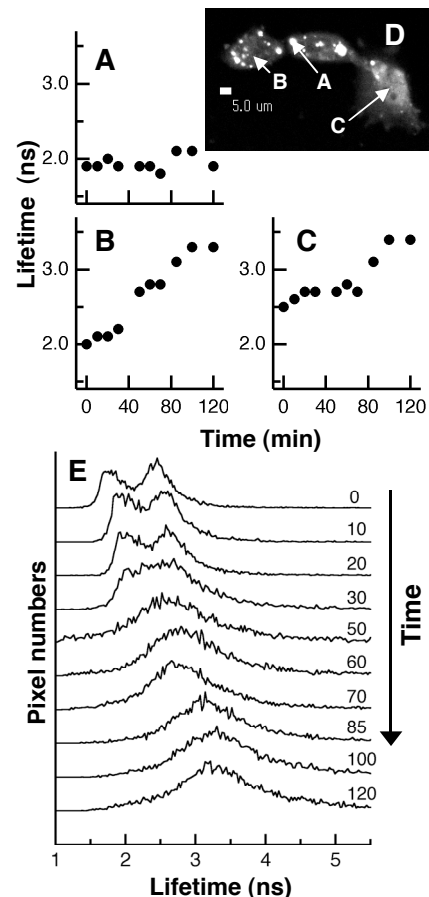


Fig. 2. Time course of the fluorescence lifetime of the GFP-fusion *tudor*-protein in HeLa cells in the region of the granule (A) and other cellular areas (B and C). The positions at which the lifetimes are plotted are given in the fluorescence intensity image of (D). The time course of the distribution of the fluorescence lifetime is shown in (E).

できる。Fig. 2A–CにHeLa細胞のある特定の領域における蛍光寿命の継時変化を示す。各領域はFig. 2Dの蛍光強度画像に示してある。Aは顆粒領域、BとCは調整直後の蛍光寿命が2.0 nsの細胞内と2.5 nsの細胞内にそれぞれ対応する。BとCの領域において、細胞死に伴い蛍光寿命が緩やかに増加し、測定開始から100分後では、両者とも3 ns以上の値を示していることがわかる。一方、顆粒部分の蛍光寿命(Fig. 2A)は一定である。Fig. 2Eは、256×256点の画像内におけるGFPの蛍光寿命の分布(ヒストグラム)の継時変化である。初めに2.0 nsと2.5 nsの2つのピークを持つ蛍光寿命の分布が、細胞死に伴って長寿命の方向に移動し、3.3 nsにピークを持つ分布に変化する様子がわかる。以上より、顆粒以外の部分のGFPの蛍光寿命が、細胞死に伴い増加することが結論される。

観測された蛍光寿命の変化は、細胞死に伴い GFP の中にある発色団の周囲の環境が変化したことに起因する。GFP は、 $\beta$ シートのポリペプチド鎖で覆われた円筒の内部に、蛍光を発する発色団分子(Fig. 3A)が存在する構造を持つ。発色団分子の主要な無輻射緩和経路は、分子内電荷分離状態を中間状態とする構造変化である。この構造変化を $\beta$ シートが作る空洞内で効率良く行うことができないために、GFP は強い蛍光を発することが知られている。さらに空洞内には、周囲を取り囲むアミノ酸残基によって、大きな局所電場が存在し、発色団分子の無輻射緩和過程に大きな影響を与えていると考えられる。電荷分離速度は外部電場によって大きな影響を受けることから<sup>3,4</sup>、細胞死に伴う発色団の周囲の局所電場の変化が、無輻射緩和速度の変化を誘起していると考えられる。

そこで我々は GFP を PVA 高分子膜中に埋め込み、GFP の蛍光寿命の外部電場効果について、実際に測定を行うことに成功した(Fig. 3B–D)。PVA 膜中での GFP の蛍光寿命は約 300 ps であった(Fig. 3B)。外部電場によって蛍光寿命は減少し、0.5 MV cm<sup>-1</sup>の外部電場に対して、蛍光寿命が約 0.3 %減少することで、外部電場が存在するときと存在しないときの蛍光減衰曲線の強度差(Fig. 3C)と強度比(Fig. 3D)の両方を再現することができた。細胞死の過程では、蛍光寿命の値は最大で約 50 %変化している。蛍光寿命の変化は外部電場の 2 乗に比例することから、空洞内の外部電場が最大で約 6 倍変化していると思われることができる。

GFP の発色団の無輻射緩和速度が、外部電場によって増加することがわかった。この結果は、細胞死に伴う蛍光寿命の増加が、空洞内の外部電場が細胞死に伴って減少したことに起因することを示唆している。細胞死に伴い空洞がわずかに構造変化を起こして拡がり、外部電場が減少したのではないかと考えられる。蛍光寿命イメージングは、細胞内の様々な現象を調べる重要な道具になると考えている。

1) 中林他, 分光研究 55 (2006) 31. 2) M. Tsushima et al., *Rev. Sci. Instrum.* 75 (2004) 479. 3) T. Nakabayashi et al., *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 7041. 4) N. Ohta, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 75 (2002) 1637.

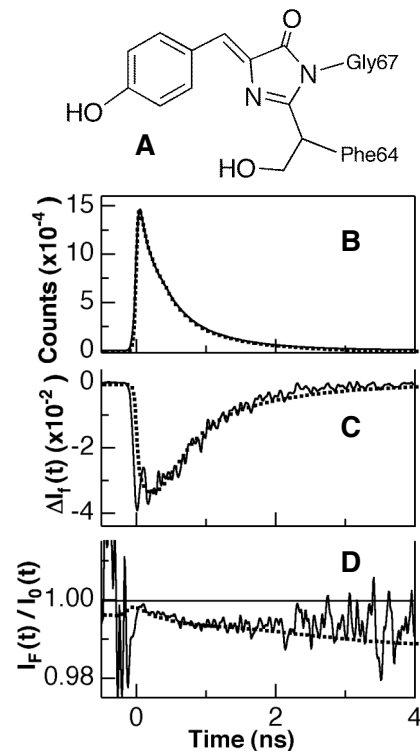


Fig. 3. (A) Schematic structure of the chromophore of GFP. (B) Fluorescence decay (solid line) of GFP in a PVA film at zero field, together with the simulated curve (dotted line). Excitation and monitoring wavelengths were 440 and 515 nm, respectively. (C) The difference (solid line) between the decays observed at 0.5 MV cm<sup>-1</sup> and at zero field, together with the simulated one (dotted line). (D) The ratio of the decay observed at 0.5 MV cm<sup>-1</sup> relative to that at zero field (solid line), together with the simulated one (dotted line).