自家蛍光寿命イメージングによる細胞観察

中林孝和, 太田信廣

北海道大学電子科学研究所

1. はじめに

蛍光顕微鏡を用いた細胞観察において、蛍光強度ではなく、蛍光のもう 1 つのパラメーターである蛍光寿命を画像化することにより、各種外来刺激に対する細胞内の環境変化を検討している。蛍光強度の画像化によって、細胞内の様々な構造や細胞内での分子・タンパク質の動きを高感度に可視化することができる。しかし、強度をモニターして画像化する場合、得られる蛍光強度は、目的の蛍光物質の濃度や蛍光収率（蛍光寿命）のみではなく、光による蛍光物質の損傷（光退色）、励起光強度、そして光学系などの多くの要因によっても変化を示す。そのために、蛍光強度画像による定量評価は、相当の注意が必要となる。一方、蛍光寿命の値は、光退色、励起光強度、光学系などには依存せず、蛍光分子の種類および蛍光分子の周囲の環境のみで決まる。そのために、蛍光寿命測定は蛍光強度測定に比べて定量性に優れた手法であり、蛍光寿命の僅かな変化から、蛍光分子の周囲の環境変化または蛍光分子の反応速度の変化などを求めることができる。

我々は、フェムト秒パルスレーザーと時間ゲート法を用いた蛍光寿命イメージングシステムを製作し、蛍光タンパク質や染色色素などの蛍光寿命を用いた細胞内 pH およびアポトーシスなどの細胞死過程のその場測定などを報告してきた^{1), 2)}。また最近では、蛍光物質による色素染色を行わずに、生体組織内に元から存在する蛍光物質（自家蛍光物質）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している³⁾⁻⁵⁾。本稿では、細胞内に存在する代表的な自家蛍光物質について概説し、その後、自家蛍光寿命イメージングを用いた我々の結果について紹介する。

2. 自家蛍光物質

細胞や生体組織は、色素染色を行わなくても、細

胞・組織内に元から存在する蛍光物質からの蛍光を示す。このような蛍光を自家蛍光と呼ぶ。色素染色の実験では、この自家蛍光は背景光となり、蛍光画像の信号雑音比 (S/N 比) を低下させる厄介者とされている。しかし、見方を変えて自家蛍光を細胞診断などに用いることができれば、色素の導入による試料の負荷および生理的状態の変化がなくなり、生体本来の生理的環境を保った状態にて測定を行うことができる。また試料の染色に時間と労力を費やすことが多いのに対し、自家蛍光を用いることによって、染色時間がなくなり、たとえば手術などにおいて迅速な判断が可能となる。そのために、自家蛍光と蛍光寿命イメージングを組み合わせた自家蛍光寿命イメージングを行うことができれば、色素で染色することなく細胞内の状態を定量的に評価することができる^{3), 6), 7)}。

代表的な自家蛍光物質の蛍光スペクトルを図 1 に示す。自家蛍光物質は、補酵素、アミノ酸、タンパク質、その他細胞内色素物質の 4 種類に大きく分けることができる。自家蛍光を示す補酵素としては、NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) と FAD (flavin adenine dinucleotide) がある (図 2 を参照)。NADH は最も広く用いられている自家蛍光物質であり、340 nm 付近の紫外域に吸収バンドを持ち、460 nm 付近を中心と

図 1
代表的な自家蛍光物質の蛍光スペクトル

Observation of Living Cells Using Autofluorescence Lifetime Imaging
Takakazu NAKABAYASHI and Nobuhiro OHTA
Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University

※図 4, 図 5 は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

図 2
NADH と FAD の分子構造

する青色の蛍光を発する。一方、FAD は可視域に吸収を持ち、520 nm 付近を中心とする緑色の蛍光を示す。NADH と FAD は、タンパク質と結合した (protein-bound) 状態と結合していない (free) 状態の 2 つの状態として細胞内では存在する。両補酵素ともにタンパク質と結合すると蛍光寿命が大きく変化し、NADH は、free 状態の蛍光寿命が 0.3-0.4 ns であるのに対し、protein-bound 状態では、2-3 ns となり約 10 倍も長くなる。FAD は逆の挙動を示し、タンパク質と結合することによって、蛍光寿命は短くなる。2 つの状態の蛍光寿命が異なることを利用して、蛍光寿命の測定から、両状態の存在比を定量的に見積もることができる。実際に、free 状態と protein-bound 状態の存在比および蛍光寿命は、細胞内の生理現象と関連があることが示されており、NADH の自家蛍光寿命イメージングを用いて、がん細胞の検出や細胞内状態の変化のその場測定などが提案されている。たとえば、がん細胞において、NADH の free 状態の分布数の増加、または protein-bound 状態にある分布数の減少が、自家蛍光寿命の測定から報告されている⁶⁾⁻⁸⁾。

側鎖に芳香環を持つアミノ酸も自家蛍光物質となる。自家蛍光物質として知られているアミノ酸は、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニンの 3 種類であり、紫外域に吸収と蛍光を示す。発光収率が高いことやアミノ酸の中では長波長側に蛍光を示すことなどから、トリプトワンの蛍光がアミノ酸由来の自家蛍光としてよく用いられている。アミノ酸はタンパク質を構成しているために、タンパク質に紫外光を照射すると、これらのアミノ酸残基からの蛍光が観測される。自家蛍光を示すタンパク質としてよく用いられているコラーゲンやエラスチンなども、構成しているチロシン残基からの蛍光が観測される。しかし、これらのタンパク質は、経年変化などによって生じるアミノ酸残

基同士またはアミノ酸と糖との反応生成物からの蛍光も観測される。このような反応生成物からの自家蛍光を用いて疾病診断のその場測定などが検討されている。その他細胞内自家蛍光物質としては、リポフスチンなど加齢などによって生じる色素、メラニンなどがあり、眼の病理との関係などが議論されている。

3. 自家蛍光寿命を用いた細胞内 pH 観測

我々は自家蛍光寿命を用いて細胞内環境を無染色で画像化・評価できることを提案している。本稿では NADH と FAD の自家蛍光寿命を用いて、細胞内の pH を無染色でイメージングできることを紹介する^{4),5)}。

蛍光寿命の測定では、パルスレーザーで試料を励起し、試料から発せられる蛍光の蛍光減衰曲線を測定する方法が一般に用いられる。得られた蛍光減衰曲線を単一指数関数または複数の指数関数を用いて解析することで蛍光寿命を得る。我々の製作した蛍光寿命イメージングシステムにおいても、フェムト秒レーザーで試料を光励起し、倒立型の共焦点蛍光顕微鏡を用いて、画像の各点において蛍光減衰曲線を得る構成としている。しかし、画像のすべての点で蛍光減衰曲線を測定するには、10 分以上の時間を要することがあり、長時間のレーザー光照射による細胞の損傷が問題になることがある。そこで時間ゲート法を用いて蛍光寿命解析を行うことによって、測定時間の短縮化を行っている^{1),2)}。時間ゲート法では、蛍光減衰曲線を複数の時間領域に分割し、各時間領域の積分強度を時間に対してプロットする。本実験では、蛍光減衰曲線を 0-2 ns, 2-4 ns, 4-6 ns, 6-8 ns と 4 分割している。共焦点顕微鏡で励起レーザー光をスキャンさせながら、検出された蛍光光子信号とトリガーパルスとの間の時間差に応じて、光子信号を 4 つの時間領域に振り分ける。画像の各ピクセルにおいて、蛍光強度の時間変化を単一指数関数を用いて解析し、蛍光寿命画像を得ている。しかし、4 点での解析では蛍光寿命の詳細な検討を行うことができない。そこで、画像測定は行わないが、**時間相関単一光子計数法**を用いて、蛍光減衰曲線の精密な測定も行っている。蛍光寿命イメージングを用いて蛍光寿命の空間分布を測定し、時間相関単一光子計数法によって蛍光寿命の詳細な検討を行う構成とした。

培養細胞として人の子宮頸がん由来の HeLa 細胞を用いた。様々な pH に調整した緩衝溶液内で培養し、自家蛍光寿命の測定を行っている。また細胞内外での挙動の違いを調べるために、自家蛍光物質を緩衝溶液中に溶かし、緩衝溶液中での蛍光減衰曲線の測定も行った。細胞内 pH 依存性の測定では、イオノフォア

図 3 緩衝溶液中 (a) および HeLa 細胞中 (b) における NADH の蛍光減衰曲線の pH 依存性。励起波長 370 nm, 蛍光波長 440-450 nm. Reprinted with permission from ref. 4. Copyright 2013 American Chemical Society.

を培養液に入れて細胞内外の pH を等しくさせており、細胞外の pH を測定することによって、細胞内の pH を求めることができる⁹⁾。

図 3 に緩衝溶液中と細胞内における NADH の蛍光減衰曲線の pH 依存性を示す⁴⁾。緩衝溶液中では NADH は free 状態として存在し、細胞内では protein-bound 状態にある NADH を主に観測している。緩衝溶液中においては、pH による蛍光減衰曲線の変化は小さく、free 状態の NADH の蛍光寿命は pH にほとんど依存しないことがわかる。しかし細胞内では、細胞内 pH に応じて NADH の蛍光減衰曲線が変化し、細胞内の pH の増加に伴い蛍光寿命の値が減少することがわかった。細胞内では、タンパク質との相互作用に

よって NADH の蛍光寿命は長くなっており、観測された蛍光寿命の細胞内 pH 依存性は、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。

図 4a は、HeLa 細胞中における NADH の蛍光寿命イメージングの細胞内 pH 依存性である。上が HeLa 細胞中の 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す。蛍光強度画像では、細胞内の様々な構造を見ることができる。これは NADH の濃度が細胞内小器官ごとに異なることが原因であり、強く光っている領域が高濃度であるミトコンドリア、強度が弱い円形の領域が低濃度の核に対応する。蛍光寿命画像においても、蛍光寿命に位置依存性があり、また細胞内 pH が大きくなるにつれて、蛍光寿命の値が短くなることがわかった。ミトコンドリアと核の領域での NADH の蛍光寿命の細胞内 pH 依存性を図 4b に示す。細胞内 pH の増加に対して、両領域の蛍光寿命が単調に減少していることがわかる。また、核の領域の蛍光寿命が、ミトコンドリアの領域の蛍光寿命よりも短くなっており、pH による蛍光寿命の変化量も核の領域の方が大きい。構成しているタンパク質が両領域で異なることが、蛍光寿命の位置依存性を与えていると考えている。我々は、NADH の蛍光寿命の媒質依存性から、NADH 周囲のアミノ酸残基の極性（局所電場）およびその立体効果が、蛍光寿命に大きな影響を与えることを提案している。

イオノフォアを用いて図 4b 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。次

図 4 (a) HeLa 細胞中における NADH の蛍光強度画像 (上) と蛍光寿命画像 (下) の細胞内 pH 依存性。細胞内 pH は各図の上に示してある。(b) ミトコンドリアと核の領域での蛍光寿命の細胞内 pH 依存性。励起波長 370 nm, 蛍光波長 417-477 nm. Reprinted with permission from ref. 4. Copyright 2013 American Chemical Society.

図 5

(a) pH 7 における HeLa 細胞中の FAD の蛍光強度画像 (左) と蛍光寿命画像 (右). (b) 蛍光寿命画像の全領域における蛍光寿命ヒストグラムの細胞内 pH 依存性. 励起波長 450 nm, 蛍光波長 515-560 nm⁵⁾.

に、対象とする細胞の蛍光寿命を求めることによって、細胞内 pH を蛍光色素で染色することなく定量イメージング測定が行えることを示している。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はじめての例となる。

FAD の自家蛍光を用いた細胞内 pH の測定も行っている⁵⁾。細胞を可視光で励起すると、FAD に由来する緑色の蛍光が観測される。細胞内 pH が 7.0 のときの HeLa 細胞中における FAD の蛍光強度画像、蛍光寿命画像、細胞内 pH が 5.0, 7.0, 9.0 における蛍光寿命の値の分布 (ヒストグラム) を図 5 に示す。HeLa 細胞中の FAD の蛍光寿命ヒストグラムのピーク位置は、細胞内 pH が 5.0, 7.0, 9.0 においてそれぞれ 2.53, 2.32, 2.22 ns であった。この結果は、細胞内 pH の増加に伴い FAD の自家蛍光寿命が減少することを示している。緩衝溶液中の FAD の蛍光寿命は、pH が 5.0-9.0 の領域では変化をしなかった。よって、FAD の自家蛍光寿命の pH 変化は、細胞内でのタンパク質と FAD との相互作用の pH 変化を観測していると考えられる。FAD の自家蛍光寿命を用いても、細胞内 pH を観測できることが示唆される。

FAD の蛍光寿命については、FAD のピコ秒領域の蛍光ダイナミクスを用いて、細胞内の極性環境に関する情報が得られることも示している¹⁰⁾。

4. 自家蛍光寿命測定の留意点

図 1 に示すように、細胞内には様々な吸収・蛍光波長を持つ自家蛍光物質が複数存在する。そのために、適切な励起・検出蛍光波長を用いて、測定したい自家蛍光物質を選び、そして選択的に観測することが、自家蛍光測定の重要な要素となる。しかし、選択的に観測するためには、用いる細胞内にはどのような自家蛍光物質が存在し、その自家蛍光物質はどのような吸収および蛍光波長を持つのかを理解しておくことが肝要である。また、自家蛍光物質の蛍光寿命が、どのようなパラメーターによって変化するのかを系統的に知ることによって、細胞内での生理現象および局所電場などの詳細を明らかにできると考えている。色素染色の実験では厄介者の自家蛍光も、その光学的な性質を理解することによって、無染色での細胞センシングとして大きな可能性を秘めていることがわかる。

本稿で紹介した筆者らの研究は、原著論文記載の共著者の方々との共同研究により行われたものであり、深く感謝申し上げる。

文 献

- 1) Ohta, N., Nakabayashi, T. (2009) Molecular Nanodynamics, pp. 607-621, Wiley-VCH, Weinheim.
- 2) 中林孝和, 太田信廣 (2010) 日本レーザー医学会誌 **30**, 441-448.
- 3) 中林孝和, 太田信廣 (2011) 光化学 **42**, 52-59.
- 4) Ogikubo, S. *et al.* (2011) J. Phys. Chem. B **115**, 10385-10390.
- 5) Islam, Md. S. *et al.* (2013) Int. J. Mol. Sci. **14**, 1952-1963.
- 6) Berezin, M. Y., Achilefu, S. (2010) Chem. Rev. **110**, 2641-2684.
- 7) Georgakoudi, I., Quinn, K. P. (2012) Annu. Rev. Biomed. Eng. **14**, 351-367.
- 8) Skala, M. C. *et al.* (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**, 19494-19499.
- 9) Thomas, J. A. *et al.* (1979) Biochemistry **18**, 2210-2218.
- 10) Nakabayashi, T. *et al.* (2010) J. Phys. Chem. B **114**, 15254-15260.

中林孝和

中林孝和 (なかばやし たかひろ)

北海道大学電子科学研究所准教授
1993 年東京大学理学部卒業, 97 年同大学大学院理学系研究科博士課程中退, 同年分子科学研究所助手, 2002 年より現職。

研究内容: 分子分光学的手法を用いた細胞観測システムの開発, 時間分解分光法を用いた細胞内分子・タンパク質の光励起ダイナミクスの解明・制御
連絡先: 〒001-0020 北海道札幌市北区北 20 条西 10 丁目

E-mail: takan@es.hokudai.ac.jp

太田信廣

太田信廣 (おた のぶひろ)

北海道大学電子科学研究所教授
1972 年東北大学理学部卒業, 77 年同大学大学院理学研究科博士課程修了, 同年マサチューセッツ大学博士研究員, 78 年北海道大学応用電気研究所助手, 92 年同大学工学部助教授, 98 年より現職。

研究内容: 光と電場による構造・ダイナミクスの制御と新規光機能物性, 光誘起超伝導の創出, 蛍光寿命イメージングによる細胞内ダイナミクスおよび機能と電場効果

E-mail: nohta@es.hokudai.ac.jp