

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22760036

研究課題名（和文） 多成分蛍光寿命測定による細胞イオン濃度定量測定法の開発

研究課題名（英文） Development of measurement of intracellular ion concentration using a phase-resolved fluorescence lifetime method for multicomponent

研究代表者

居波 渉 (INAMI WATARU)

静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点・特任助教

研究者番号：30542815

研究成果の概要（和文）：位相分解蛍光寿命測定法を用いてカルシウムイオン濃度を測定した。蛍光色素には Calcium Orange を用いた。細胞内のカルシウムイオン濃度 10～2000nM で、本手法が適用できることが分かった。さらに、カルシウムイオン測定におけるタンパク質の影響を測定した。細胞内のタンパク質濃度（65-90mg/g）において、蛍光寿命は、タンパク質の濃度に依存して変化しないことが分かった。

研究成果の概要（英文）：Calcium ion concentration was measured with phase-resolved fluorescence lifetime method. Fluorescence dye Calcium Orange was used. The fluorescence lifetime was changed when the concentration of calcium ion was varied from 10 to 2000nM. In order to improve the quantitativity of the calcium ion measurement, we investigated a fluorescence lifetime of calcium orange in calcium ion solution including protein. As a result, the fluorescence lifetime does not depend on the protein concentration range from 40 to 80 mg/ml, which is same as that in a cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・光学基礎：応用光学・量子光工学

キーワード：光計測, 蛍光寿命, 位相分解蛍光寿命測定法, カルシウムイオン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の各種イオン濃度やその分布は、生体の活動を調べる上で非常に重要である。なぜなら、これらのイオンは細胞の機能の調整を行っているからである。例えば、カルシウムイオン濃度は、細胞の情報伝達機構を制御しており、神経の興奮、筋収縮、受精、細胞分裂、細胞死等を引き起こす。また、各種イオンの結合によって機能を調節されるタン

パク質が存在し、その濃度や分布も細胞の機能を解明する上で重要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、多成分の蛍光寿命測定による細胞内イオン濃度の定量測定法の開発である。細胞内で蛍光プローブは、イオンと結合した、イオンと結合していない、イオンとタンパク質と結合した状態になる。したがって、検出

される蛍光強度は、状態の異なる蛍光プローブの発光の足し合わせになる。それぞれの成分を分離するために、蛍光寿命測定を用いる。それぞれの状態にある蛍光プローブの蛍光寿命は異なる。蛍光寿命を測定し、それぞれの成分を分離することにより、イオン濃度の定量測定精度を向上させることが可能となる。さらに、各種イオンの結合したタンパク質の濃度も測定可能になる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 位相分解多成分蛍光寿命測定によるイオン濃度測定法の確立

蛍光寿命測定の精度、時間分解能や測定時間の検証を行う。非常に高速なシステムとなるため、ノイズや信号の歪みが問題になると考えられる。ノイズや信号の歪みが蛍光寿命測定に与える影響について検討し、最適なシステムを構築する。

#### (2) カルシウムイオン濃度を測定するための蛍光プローブの探索

カルシウム蛍光プローブ Calcium Orange, Rhod-2, Fura Red, Fura2 などを用いて、実際に蛍光寿命を測定し、カルシウムイオン濃度が測定できることを検証する。そして、カルシウムイオン濃度測定に最も適した蛍光プローブを探索する。

#### (3) 細胞内のタンパク質による蛍光寿命の変化

タンパク質がイオン濃度の測定に与える影響について検討する。細胞内にはタンパク質が存在している。例えば、脳各部位のタンパク質濃度は、65-90mg/g である。このタンパク質によって、蛍光寿命が変化すると、高い精度でイオン濃度を測定することができない。そこで、タンパク質による蛍光寿命の変化を測定する。さらに、これにより細胞内タンパク質の濃度を測定することもできる。

#### (4) 生きた細胞のイオン濃度測定

細胞のカルシウムイオン濃度の変化を測定する。神経細胞 NG108-15 にブラジキニンを投与し、細胞内のカルシウムイオン濃度がどのように変化するかを測定する。ブラジキニンは、神経細胞に作用して痛みを発生させる。ブラジキニンが神経細胞に到達すると、すぐにカルシウム濃度が高くなり、その後減少すると考えられる。これにより、位相分解蛍光寿命測定により生きた細胞のイオン濃度を測定できることを実証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 位相分解蛍光寿命測定システムの構築

位相分解蛍光寿命測定法のための光学系を構築した。図 1 にその光学系を示す。光源

には、高速に光強度を変調可能な青色半導体レーザー（中心波長 488nm）を用いた。半導体レーザーからのレーザー光は、蛍光励起用と参照信号測定用にビームスプリッターで分離した。励起光は、ダイクロイックミラーで反射させ、蛍光プローブとカルシウムイオンを混合したサンプルに照射した。発生した蛍光と励起光は、ダイクロイックミラーとフィルターで分離した。分離した蛍光は、光電子増倍管で検出した。オシロスコープを用いて、参照信号と蛍光信号の位相遅れと強度を検出した。参照信号光と蛍光は、検出系による位相の変化が起こらないように全く同じ検出系で検出した。さらに、コンピュータで発振器とオシロスコープを制御できるシステムを構築した。半導体レーザーの変調周波数を走査し、データを取得できる。

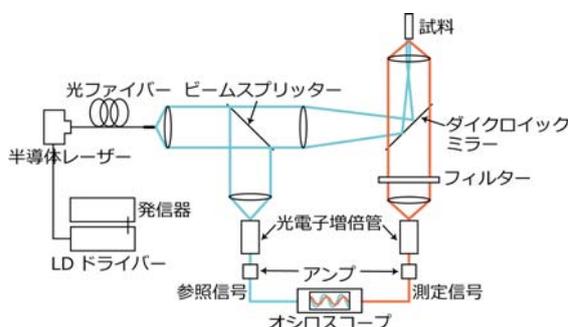


図 1. 位相分解蛍光寿命測定システム

#### (2) カルシウムイオン濃度を測定するための蛍光プローブの探索

カルシウム蛍光プローブとカルシウムイオンを混合して標準サンプルを作製した。構築した光学系を用いて蛍光寿命を測定し、蛍光寿命とカルシウムイオン濃度との関係を取得した。次に、タンパク質を導入したサンプルを作製し、イオン濃度とタンパク質に結合したイオンの濃度の測定を行った。カルシウムイオン濃度の調整には、Calibrated Calcium Buffer Kit II (Molecular Probes 社製) を用いた。カルシウムイオン濃度は、0~39  $\mu\text{M}$  とした。これは、細胞内のカルシウム濃度に近い濃度である。蛍光プローブは、Calcium Orange である。標準サンプルを作製し、参照信号と測定信号との位相差を測定し、カルシウムイオン濃度と蛍光寿命の関係求めた。蛍光プローブの蛍光寿命  $\tau$  と励起光と蛍光の位相差  $\phi$  の関係は、 $\tau = (1/\omega) \tan \phi$  で書ける。 $\omega$  は、励起光の変調周波数である。励起光源の強度を周波数 120MHz の正弦波で変調し、各種カルシウムイオン濃度のサンプルにおいて、位相遅れを測定した。図 2 にカルシウムイオン濃度と Calcium Orange の蛍光寿命との関係を示す。位相差の変化は、46 から 73 度であった。上式を用いてこの位

相差から蛍光寿命を求めた。カルシウムイオン濃度が 10~200nM のときに、位相差が大きく変わっていることが分かる。カルシウムイオン濃度が低い場合、蛍光寿命が短く、カルシウムイオン濃度が高くなると、蛍光寿命が長くなることが分かった。

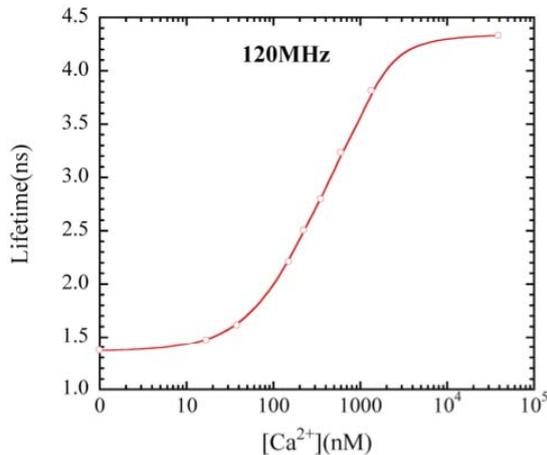


図 2. 測定結果：カルシウムイオン濃度と蛍光寿命の関係(Calcium Orange)

これらの測定から、本手法を用いることでカルシウムイオン濃度を測定できることが分かった。蛍光プローブ Calcium Orange を用いることで、生体のカルシウムイオン濃度を高感度に測定可能である。蛍光プローブ Calcium Orange の蛍光寿命が大きく変化する濃度 10~200nM は、生体のカルシウムイオン濃度と同程度である。また、Rhod-2, Fura Red, Fura2 の蛍光プローブを用いて同様の実験を行ったが、Calcium Orange のカルシウムイオン濃度測定感度が、最も高いことが分かった。

### (3) 細胞内のタンパク質による蛍光寿命の変化

ウシ血清アルブミン(BSA)を含む緩衝溶液中で蛍光寿命と蛍光寿命の関係性を測定した。図 3 に BSA を加えた場合のカルシウムイオン濃度と蛍光寿命の関係性を示す。BSA の濃度は、0, 26.7, 40, 80 mg/ml である。図 3 より、タンパク質を加えない場合とタンパク質を加えた場合を比較すると、タンパク質を入れることで蛍光寿命が変化していることが分かる。BSA がある場合、カルシウムイオン濃度 231nM 以下では、蛍光寿命が長くなり、カルシウムイオン濃度 231nM 以上では、蛍光寿命が短くなっている。また、BSA 濃度 26.7, 40, 80 mg/ml では、カルシウムイオン濃度と蛍光寿命との関係は、BSA 濃度に依存していないことが分かる。実験でのタンパク質濃度は、細胞内のタンパク質濃度 65-90mg/g と同じである。したがって、Calcium Orange 蛍光体の蛍光寿命を用いた細胞内カルシウムイオン濃度測定は、タンパク質濃度変化の影響を受

けないことが分かった。

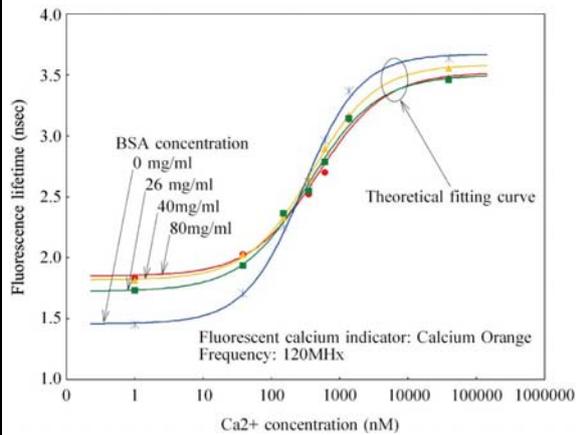


図 3. BSA を加えた場合のカルシウムイオン濃度と蛍光寿命の関係

### (4) 生きた細胞のイオン濃度測定

実際に生きた細胞のカルシウムイオン濃度を測定した。図 4 に構築した光学系を示す。生物細胞で測定するため、倒立顕微光学系を構築した。対物レンズを試料の下に配置している。細胞を培養容器のまま観察できる。さらに、上からマニピュレーターで試薬を投与することができる。また、細胞を観察するために、LED ランプと CCD カメラを設置した。これらにより、細胞の位置とレーザー光の照射位置を合わせる。光源は、波長 488nm の半導体レーザーを用いた。レーザー光は、対物

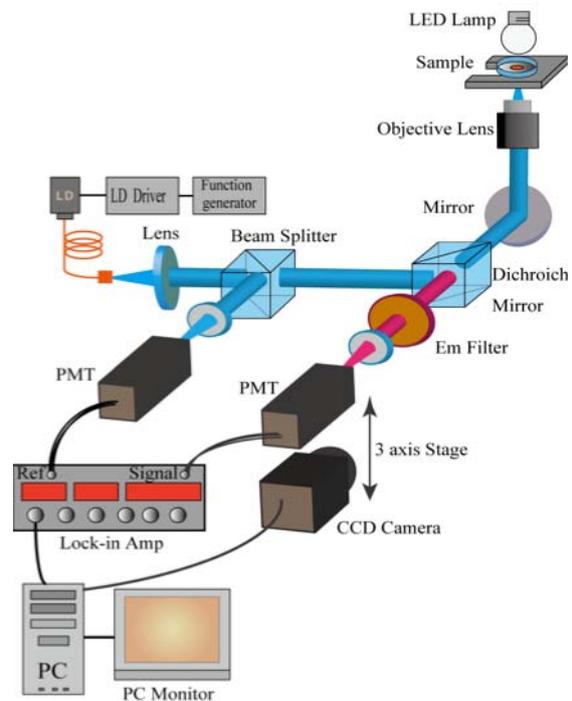


図 4. 細胞内のカルシウムイオン濃度測定用顕微光学系

レンズにより一つの細胞のみに集光して照射した。レーザーにより励起された蛍光は、光電子増倍管により検出した。この測定信号と参照信号から、ロックインアンプを用いて蛍光寿命を測定した。

あ 細胞には、神経細胞 NG108-15 を用いた。まず、細胞をガラスセルディッシュで培養した。5%新生子牛血清を含む DMEM 培養液中、5%CO<sub>2</sub>, 37°C の条件(インキュベーション)で 3 日培養した。そして、蛍光プローブ Calcium Orange を細胞に導入した。培養液を 1ml の Calcium Orange/AM を含むレコーディングメEDIUMと交換し、1 時間インキュベーションし、蛍光プローブを細胞に導入した。余分な蛍光プローブを取り除くために、Calcium Orange/AM を含まないレコーディングメEDIUMで交換した。この交換を 3 回繰り返して、1 時間インキュベーションした。さらに、残っている Calcium Orange/AM を除くために、レコーディングメEDIUMの交換をさらに 3 回行った。図 5 に培養した神経細胞 NG108-15 を光学顕微鏡で観察した結果を示す。図 5(a) は位相差顕微鏡像、図 5(b) は蛍光顕微鏡像である。これより、細胞を培養することに成功したことが分かる。また、図 5(b) より、蛍光プローブにより細胞だけが染まっていることも確認した。この細胞を用いて、カルシウ

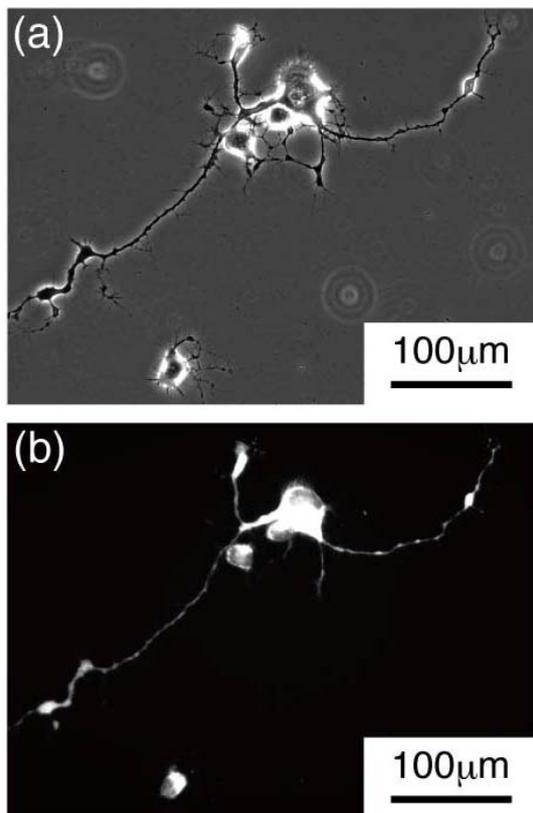


図 5. 培養した神経細胞の光学顕微鏡像。(a)位相差像、(b)蛍光像

ム濃度の測定を行った。

染色した神経細胞 NG108-15 にブラジキニンを投与し、細胞内のカルシウムイオン濃度がどのように変化するかを測定した。ブラジキニンは、神経細胞に作用して痛みを発生させる。図 6 に、神経細胞 NG108-15 にブラジキニンを投与した後のカルシウムイオン濃度の測定結果を示す。横軸は時間、縦軸はカルシウムイオン濃度である。青線がタンパク質を考慮しない校正曲線から求めたカルシウムイオン濃度、赤線がタンパク質濃度 80mg/ml のときの校正曲線から求めたカルシウムイオン濃度である。タンパク質を考慮しないと、カルシウムイオン濃度が 50nM 程度も高く見積もられてしまうことが分かる。また、ブラジキニンが神経細胞に到達すると、

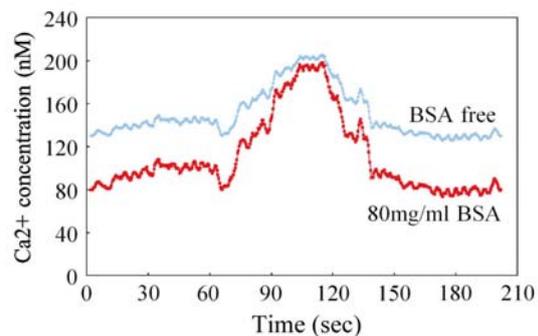


図 6. ブラジキニンを投与した神経細胞のカルシウムイオン濃度の測定結果。横軸は時間、縦軸はカルシウムイオン濃度。

すぐにカルシウムイオン濃度が高くなっていることが分かる。これは、神経細胞の小胞体からのカルシウムの放出や細胞外からのカルシウムの流入を示している。細胞は情報を伝達するために、カルシウムイオンを使っている。カルシウムイオン濃度は、ピークを超えると、その濃度は減少した。その実験結果より、刺激前の Ca<sub>2+</sub>濃度 80nM、刺激後の Ca<sub>2+</sub>濃度 200nM であることが分かった。

#### (5) まとめ

位相分解蛍光寿命測定法によりイオン濃度を測定可能であることを実証した。レーザーダイオードを用いたコンパクトな測定装置を構築した。蛍光プローブ Calcium Orange, Rhod-2, Fura Red, Fura2 でカルシウムイオン濃度を測定した。その結果、Calcium Orange が最も位相分解蛍光寿命測定法に適していることを見いだした。蛍光プローブ Calcium Orange の蛍光寿命が大きく変化するカルシウムイオン濃度は、10~2000nM であった。この濃度は、生体のカルシウムイオン濃度と同程度である。そのため、生体のカルシウムイオン濃度の測定に最適である。また、タンパク質の影響についても検討した。その結果、

タンパク質により蛍光プローブの蛍光寿命が変化してしまうが、細胞の測定では問題にならないことが分かった。さらに、実際に生きた生物細胞のカルシウムイオン濃度を測定した。神経細胞 NG108-15 をブラジキニンに投与したときの、カルシウムイオン濃度の時間変化を測定できた。位相分解蛍光寿命測定法は、顕微鏡観察下においても、生きた神経細胞のイオン濃度に応用できることを実証した。本手法は、カルシウムイオン濃度だけでなく、マグネシウム、ナトリウム、カリウムなどのイオン濃度の測定にも適用することができる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

・居波 渉, グエン フー ヴェト, 宮川 厚夫, 川田 善正, "位相分解蛍光寿命測定法を用いた細胞内イオン濃度の定量測定", 第 72 回応用物理学会学術講演会, (2011/9/1), 山形大学.

・グエン フー ヴェト, 居波 渉, 宮川 厚夫, 川田 善正, "位相分解蛍光寿命測定法を用いた細胞内カルシウムイオン濃度の測定", 第 71 回応用物理学会学術講演会, (2010/9/16), 長崎大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

居波 渉 (INAMI WATARU)

静岡大学・若手グローバル研究リーダー育成拠点・特任助教

研究者番号 : 30542815