

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25年 5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22350031

研究課題名（和文）フェムト秒時間分解蛍光イメージングを用いた細胞内状態の三次元計測

研究課題名（英文）Construction of a femtosecond time-resolved fluorescence imaging system to observe intracellular environment with z-axis resolution.

研究代表者

中林 孝和 (NAKABAYASHI TAKAKAZU)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：30311195

研究成果の概要（和文）：和周波発生法によるフェムト秒時間分解蛍光分光システムを製作し、倒立型顕微鏡と組み合わせて、生細胞に適用可能な蛍光寿命画像測定について検討した。さらに、細胞内自家蛍光分子である FAD と NADH および蛍光タンパク質のフェムト秒からナノ秒領域の蛍光ダイナミクスの媒質依存性、色素分子の蛍光寿命の金属効果などについて検討を行い、誘電環境や pH などの細胞内環境における蛍光寿命を用いたその場計測について提案した。

研究成果の概要（英文）：We have constructed a femtosecond time-resolved fluorescence system using up-conversion techniques for the purpose of obtaining fluorescence lifetime images with an inverted microscope. From the analysis of fluorescence decay profiles of autofluorescent species such as FAD and NADH and fluorescent proteins in the femtosecond to nanosecond time range, we have proposed that the measurement of the fluorescence lifetime can be used for noninvasive determination of the status of individual cells such as intracellular pH and polar environments. Effect of metal surface on the fluorescence lifetime of dye molecules has also been discussed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：光励起ダイナミクス、蛍光寿命、自家蛍光、金属効果、細胞、和周波発生法、イメージング、フェムト秒レーザー

1. 研究開始当初の背景

細胞内における特定の場所やタンパク質を蛍光標識し、顕微鏡を用いてその蛍光強度を観察する方法は、生命科学において必須の技術である。しかし、蛍光強度は、観測している蛍光分子の濃度のみではなく、光退色や光学系などの多くの要因によっても変化するために、絶対強度による定量評価は相当の

注意が必要となる。

一方、蛍光寿命は蛍光分子の固有の値であるために、蛍光寿命の値は、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り、光退色や光学系などの実験条件には依存しない。そのために、蛍光寿命を画像化する蛍光寿命イメージングは、蛍光強度による画像化に比べて定量性に優れ、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各種反応速度の変化を求めることができる。

申請者は、短パルスレーザーを用いた分子分光学の手法と生体分析とを融合する研究を進めており、時間ゲート法による蛍光寿命イメージングシステムを製作し、様々な生細胞の蛍光寿命画像の測定に成功している。変異型緑色蛍光タンパク質(EGFP)が発現した培養細胞であるHeLa細胞の蛍光寿命画像の測定を行い、単一細胞の細胞内pH及び細胞の活性状態について、EGFPの蛍光寿命を用いてその場計測が行えることを示している(Photochem. Photobiol. Sci. 7 (2008) 668, 671)。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究を発展させ、フェムト秒時間分解蛍光分光システムを製作し、現有の顕微鏡と組み合わせることによって、生細胞に適用可能なフェムト秒時間分解蛍光寿命イメージングシステムを構築することを旨とする。蛍光強度が弱い分子においても、フェムト秒の非常に速い時間領域では、蛍光性分子と同等の蛍光強度を持つ。本研究では、フェムト秒領域の蛍光を測定し、蛍光強度が弱い生体分子の蛍光寿命画像観測および蛍光寿命を用いた細胞内環境のその場計測を目指す。さらに、金属表面の超高速エネルギー移動や光電場増強効果によって、金属表面上または近傍にある蛍光分子の蛍光寿命が減少する。この金属効果による蛍光寿命の減少と今回製作するフェムト秒時間分解蛍光分光システムを組み合わせることによって、表面選択的な蛍光分子検出を目指す。蛍光分子には、細胞内自家蛍光成分または蛍光タンパク質を検討する。自家蛍光成分とは、細胞内に元から存在する蛍光分子であり、NADH(nicotinamide adenine dinucleotide), FAD(flavin adenine dinucleotide), そして芳香環を持つアミノ酸などがある。自家蛍光を用いることによって、色素染色をすることなく、細胞内環境をその場で明らかにすることができる。

3. 研究の方法

フェムト秒時間分解蛍光分光システムは和周波発生法を用いた。フェムト秒チタンサファイアレーザーからの出力光を2つに分け、片方は2倍波に変換し励起光に、他方は和周波光を発生させるためのゲート光とした。ゲート光は自動ステージ上に設けられた光学遅延路を通り、非線形光学結晶であるBBO結晶に入射される。励起光によって生じた蛍光もBBO結晶に集光され、蛍光とゲート光から生じた和周波光を光子計数検出した。自動ステージを自動掃引して光学遅延路を変化させ、蛍光減衰曲線を得た。装置応答関数は約250 fsである。励起波長は、390 nm から

460 nm まで選択することができる。試料はディッシュ上または光路長1 mmのフローセルにて循環させている。また、現有のステージスキャン型の倒立型顕微鏡上に試料を設置し、試料ステージを移動させることによって画像を得る構成としている。倒立型顕微鏡には、CCD検出器を導入し、CCD検出器の2次元性を用いた画像測定も行えるようにしている。カーシャッター法を用いたフェムト秒時間分解蛍光測定システムは、申請期間内では構築することができなかった。

ピコ秒からナノ秒領域の蛍光減衰曲線の測定は、時間相関光子計数法を用いた。検出器としてマルチチャンネルプレート内蔵型光電子増倍管を用い、装置応答関数は約60 psである。生物試料には、酵母、光合成細菌、培養細胞であるHeLa細胞を用いた。これらの細胞について、自家蛍光または遺伝子操作によって発現させた蛍光タンパク質からの蛍光を測定している。蛍光寿命の媒質依存性の測定は、大腸菌から抽出・精製した蛍光タンパク質またはFADなどの自家蛍光分子を様々な媒質に溶解し、フェムト秒からナノ秒までの蛍光ダイナミクスの測定を行った。

4. 研究成果

(1) 顕微観察用に酵母の培養を行い、酵母細胞内に存在するNADHのフェムト秒からピコ秒領域の蛍光ダイナミクスについて、フェムト秒時間分解和周波発生法を用いて検討した。緩衝溶液中のNADHの蛍光寿命は約200 psであり、0-100 psの領域では、立ち上がり成分や200 psよりも速い減衰成分は観測されなかった。しかし、酵母中においては、5-10 psの時定数で非常に速く減衰する成分とバックグラウンド成分の2成分が観測された。一般に、NADHの蛍光寿命は細胞内では約2 nsと水中に比べて約10倍長くなることが知られており(4.(4)を参照)、細胞内タンパク質と相互作用をしたNADHに由来すると考えられている。酵母内で観測されているバックグラウンド成分も、タンパク質と相互作用をしたNADHの蛍光寿命であると考えられる。5-10 psで減衰する成分は、酵母の細胞内環境を反映する一つのパラメーターになると考えており、定量性を含めて検討中である。申請期間内では、酵母のフェムト秒ダイナミクスの画像測定までには至らなかったが、現在、倒立顕微鏡上に酵母を置き、和周波発生によるNADHの蛍光寿命イメージングについて検討している。蛍光タンパク質や染色色素は光退色による蛍光減少が顕著であるのに対し、自家蛍光分子は、光退色による影響が比較的小さく、長時間測定が必要となる本実験において有用であることがわかった。また光合成細菌およびHeLa細胞についても同様に画像測定を検討している。

(2) 蛍光寿命を用いて細胞内環境を明らかにするためには、用いる分子の蛍光寿命とイオン濃度などの生理的条件との関係をあらかじめ理解しておくことが必要となる。そのため、細胞内自家蛍光成分および蛍光タンパク質の蛍光ダイナミクスを測定し、pHなどの様々な因子に対する光励起ダイナミクスの影響を検討した。特に速い時間領域での減衰成分から細胞内環境を検出する可能性を探った。本研究成果は、蛍光寿命を用いた細胞計測の一つの指針となることができる。

代表的な自家蛍光成分であるFADのフェムト-ナノ秒領域の蛍光ダイナミクスの媒質依存性について解析を行った。FADはアデニンとイソアロキサジンの2つの芳香環を持ち、基底状態においては、2つの芳香環が離れたOpen formと、これらが近接したStacked formの2つの状態の平衡状態として存在する。Open formはナノ秒の蛍光寿命を持つものに対し、Stacked formの蛍光寿命は、励起されたイソアロキサジンとアデニンとの分子内電子移動による消光のために、約10 psと短くなる。図1aにフェムト秒時間分解と周波数発生法を用いて測定したFADの蛍光減衰曲線を示す。水中およびグリセロール-水混合溶媒(グリセロール:30wt%)中の結果を示す。混合比にかかわらず、ピコ秒領域の短い蛍光寿命を持つ成分とナノ秒領域の蛍光寿命を持つ成分の2成分に分けることができ、それぞれStacked formとOpen formに対応する。グリセロールの濃度増加に伴い、Stacked formのピコ秒の減衰成分の蛍光寿命が長くなり、光励起されたStacked formの分子内電子移動速

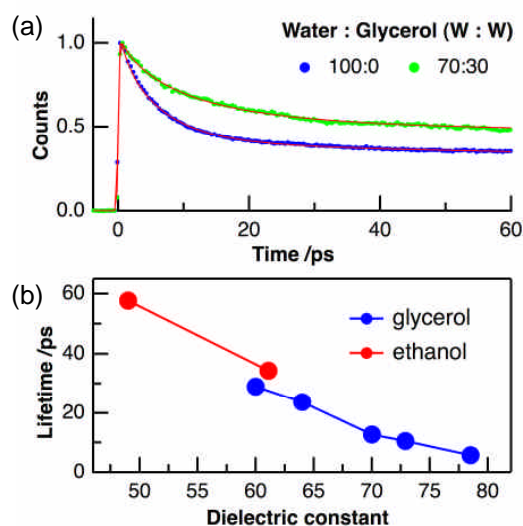


図 1. (a) 水-グリセロール混合溶媒中におけるFADの蛍光減衰曲線。各減衰曲線の計算値を赤で示してある。グリセロール濃度(wt%): 0 (青), 30 (緑)。励起波長, 410 nm; 蛍光波長, 580 nm. (b) ピコ秒減衰成分の蛍光寿命の媒質誘電率依存性
Reprinted with permission from ref. ④. Copyright 2013 American Chemical Society.

度が、グリセロールの濃度増加に伴い減少することを示している。エタノール-水混合溶液中においても同様のStacked formの蛍光寿命の変化が観測された。観測された蛍光減衰曲線は、3成分のピコ秒で減衰する成分とナノ秒のバックグラウンド成分で再現することができた(図1a)。図1bにピコ秒減衰成分の平均蛍光寿命を媒質の誘電率に対してプロットした図を示す。Stacked formのピコ秒の蛍光寿命の変化は、媒質の誘電率と相関があり、実際に蛍光寿命と媒質の誘電率との間に比例関係が観測された。FADのピコ秒領域の蛍光ダイナミクスを用いて、細胞内の誘電環境に関する情報が得られることがわかる。

(3) 我々は、蛍光タンパク質であるEGFPの蛍光寿命を用いて、アポトーシスなどに伴う細胞内の環境変化を計測できることを提案している(Photochem. Photobiol. Sci. 8 (2009) 763など)。しかし、蛍光寿命変化の機構の詳細は明らかにされていない。蛍光タンパク質からの蛍光は、タンパク質内にある発色団構造に由来し、発色団の分子構造および発色団と周囲を取り囲むアミノ酸残基との静電的な相互作用によって、光学特性が変化する。しかしこの発色団構造は、溶液中ではフェムト秒領域の非常に短い蛍光寿命を持ち殆ど光らないことが知られており、タンパク質内での発色機構については十分に理解されていない。我々は、蛍光タンパク質の発色団のモデル化合物として*p*-HBDI(図2a)を合成し、蛍光ダイナミクスと外部電場の印加による蛍光寿命の変化の測定から、発光の機構と蛍光寿命を用いた細胞計測について検討した。

図2にPMMA高分子膜中にドープされた*p*-HBDIの蛍光減衰曲線(b)とその外部電場効果(cおよびd)を示す。溶液中の蛍光寿命はサブピコ秒(図2b, 点線)であるのに対し、PMMA中においては蛍光寿命の顕著な増加が観測された。多成分解析による平均蛍光寿命は約80 psであった。発色団の無輻射緩和過程が、高分子の立体障害によって阻害されることを意味している。GFPの高い蛍光収率が、ポリペプチド鎖の立体障害に起因するというモデルを支持する。

外部電場がONとOFFのときの減衰曲線の強度差(c)と強度比(d)は、外部電場によって蛍光寿命が増加することによって再現し、1.1 MV cm⁻¹の電場印加に対して約0.1%の蛍光寿命の増加を見積もることができた。電場との静電的な相互作用によって、*p*-HBDIの無輻射緩和速度が減少することを示している。

蛍光タンパク質は、ポリペプチド鎖の円筒の内部に発色団が存在する構造を持ち、発色団と周囲を取り囲むアミノ酸残基との静電的な相互作用の大きさは、10 MV cm⁻¹のオーダーであることが示唆されている。外部電場による変化量は電場の大きさの2乗に比例す

ることから、本結果は、アミノ酸残基との静電的な相互作用が、タンパク質内の発色団の蛍光ダイナミクスに大きな影響を与えることを示している。アポトーシスなどによるEGFPの蛍光寿命の変化は、発色団周囲の局所電場の変化に由来することが示唆される。(4) NADHの蛍光寿命が細胞内環境に敏感であることを用いて、NADHの自家蛍光寿命を用いた細胞内環境計測を検討している(4.(1)を参照)。NADHの蛍光寿命は緩衝溶液中では200–300 psであるのに対し、細胞内では約2 nsと10倍にも増加する。また、蛍光スペクトルが緩衝溶液中に比べて、細胞内では短波長シフトする。この細胞内外での蛍光挙動の違いについて、細胞内でのNADHとタンパク質との相互作用が原因であることが示唆されているが、その機構は不明である。我々は、フェムト秒からナノ秒領域におけるNADHの蛍光ダイナミクスの媒質依存性を測定し、NADHの周囲の極性が低いほど、蛍光スペクトルは短波長シフトし、蛍光寿命は長くなることを示した。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し、NADHの周囲の環境は、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

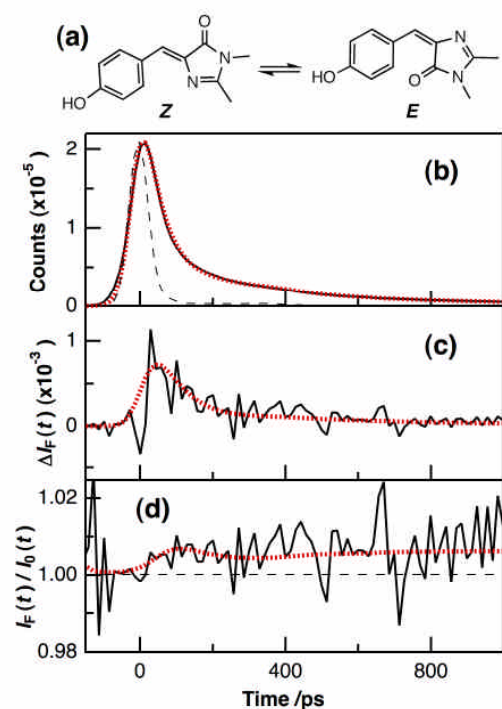


図 2. (a) *p*-HBDI の分子構造. (b) PMMA 高分子膜中(実線)とエタノール中(破線)における *p*-HBDI の蛍光減衰曲線. (c, d) PMMA 中における電場が ON と OFF における蛍光減衰曲線の強度差(ON-OFF, (c))と強度比(ON/OFF, (d)). 実測値を黒、計算値を赤で示す。印加電圧 1.1 MV cm⁻¹. 励起波長, 379 nm; 観測蛍光波長, 450 nm. Reprinted with permission from ref. ②. Copyright 2013 American Chemical Society.

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。NADHの蛍光寿命と蛍光スペクトルを用いて、NADH周囲の誘電環境の情報が得られることが示唆された。

(5) 蛍光分子の蛍光寿命に対する金属ナノ構造の効果調べることを目的として、蛍光分子であるフラボン誘導体と金ナノ粒子をメチレン鎖で結合させた化合物を合成し、蛍光寿命を測定した(連携研究者 日野和之)。フラボン-金ナノ粒子複合体の蛍光減衰曲線は、数ピコ秒以内で減衰する非常に短い蛍光寿命を持つ成分とナノ秒の蛍光寿命を持つ成分に分けられる。非常に速い減衰は、フラボンから金ナノ粒子への励起エネルギー移動によると考えられる。フラボン-金ナノ粒子複合体には様々なコンフォーマーが存在し、数ピコ秒以内で減衰する成分は、フラボンと金ナノ粒子が近接した構造を持つコンフォーマーに対応し、ナノ秒の蛍光寿命成分は、フラボンと金ナノ粒子が離れたコンフォーマーに対応すると考えられる。蛍光寿命を用いて、金属表面に近接している蛍光分子と離れた蛍光分子を識別できることがわかる。

(6) 変異型黄色蛍光タンパク質であるEYFP内の発色団は、数ピコ秒の蛍光寿命を持つ中性種とナノ秒の蛍光寿命を持つアニオン種との酸塩基平衡状態にある。我々は、EYFPの蛍光減衰曲線および蛍光寿命イメージングの細胞内pH依存性を測定し、EYFPの観測される蛍光寿命が細胞内pHによって変化することを示した。細胞内pHの変化による発色団の中性種とアニオン種の平衡状態の変化を蛍光寿命の変化として観測することによって、EYFPの蛍光寿命から細胞内pHが測定できることがわかった。また、EYFPの蛍光寿命は銅イオン濃度に応じて変化し、EYFPの蛍光寿命を用いて銅イオン濃度を検出できることを提案した。

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)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 中林孝和, 太田信廣,
自家蛍光寿命イメージングによる細胞観察(総説),
生物物理, 53(3), (2013), 印刷中(査読有)
- ② Takakazu Nakabayashi, Kazuyuki Hino,
Yuka Ohta, Sayuri Ito, Hirofumi Nakano,
Nobuhiro Ohta,
Electric-Field-Induced Changes in
Absorption and Fluorescence of the Green
Fluorescent Protein Chromophore in a

PMMA Film,
The Journal of Physical Chemistry B,
115(26), 8622-8626, (2011) (査読有)
DOI: 10.1021/jp203090e

- ③ 中林孝和, 太田信廣,
自家蛍光寿命イメージングの基礎と展
開 (総説),
光化学, 42(2), 52-59, (2011) (査読無)
- ④ Takakazu Nakabayashi, Md. Serajul Islam,
Nobuhiro Ohta,
Fluorescence Decay Dynamics of Flavin
Adenine Dinucleotide in a Mixture of
Alcohol and Water in the Femtosecond
and Nanosecond Time Range,
The Journal of Physical Chemistry B,
114(46), 15254-15260, (2010) (査読有)
DOI: 10.1021/jp1063066

[学会発表] (計 14 件)

- ① 本間将人, 中林孝和, 太田信廣,
NADH の自家蛍光寿命を用いた細胞診
断の機構の解明,
化学系学協会北海道支部 2013 年冬季
研究発表会, 2013. 01. 29-30,
札幌 (北海道大学)
- ② 中林孝和,
蛍光寿命イメージングを用いた細胞計
測の展開 (招待講演),
日本分光学会平成 24 年度生細胞分光
部会シンポジウム, 2013. 01. 25,
札幌 (北海道大学)
- ③ 中林孝和, 太田信廣,
蛍光寿命イメージングを用いた細胞内
pH のその場計測,
平成 24 年度日本分光学会年次講演会,
2012. 11. 27-29, 東京 (東京工業大学)
- ④ Takakazu Nakabayashi, Nobuhiro Ohta,
Sensing of intracellular environments using
fluorescence lifetime microscopy,
7th Asian Photochemistry Conference 2012,
2012. 11. 12-15, Osaka (Osaka Univ.)
- ⑤ Takakazu Nakabayashi, Nobuhiro Ohta,
Application of Fluorescence Lifetime
Imaging (FLIM) to Measure Intracellular
Environments (Invited talk),
RIES-CIS Joint Symposium, 2012. 10. 25,
Sapporo (Hokkaido Univ.)
- ⑥ 中林孝和, 本間将人, Md. Serajul Islam,
太田信廣,
自家蛍光寿命イメージングを用いた
細胞内環境のその場測定,
2012 年光化学討論会, 2012. 09. 12-14,
東京 (東京工業大学)
- ⑦ 中林孝和, 日野和之, 太田有香, 伊藤沙
由里, 中野博文, 太田信廣,
ポリマー中に分散された GFP 発色団の
モデル化合物の構造と光学過程の外部
電場効果,
第 5 回分子科学討論会, 2011. 09. 20-23,
札幌 (札幌コンベンションセンター)
- ⑧ Md. Serajul Islam, Takakazu Nakabayashi,
松本 仁, 保田 昌秀, 太田信廣,
Sensing Cellular Metabolic States by
Time Resolved Fluorescence of NADH,
第 5 回分子科学討論会, 2011. 09. 20-23,
札幌 (札幌コンベンションセンター)
- ⑨ Takakazu Nakabayashi, Ryoya Sumikawa,
Fun Sun, Masataka Kinjo, Nobuhiro Ohta,
Copper Ion Sensing Based on the
Fluorescence Lifetime of Enhanced Yellow
Fluorescent Protein,
2011 年光化学討論会, 2011. 09. 06-08,
宮崎 (宮崎市コンベンションエリア)
- ⑩ Md. Serajul Islam, Takakazu Nakabayashi,
Jun Matsumoto, Masahide Yasuda,
Nobuhiro Ohta,
Monitoring Changes in Cellular
Environment of Yeast Cells Based on the
Time-Resolved Fluorescence Spectra of
NADH,
2011 年光化学討論会, 2011. 09. 06-08,
宮崎 (宮崎市コンベンションエリア)
- ⑪ 中林孝和,
蛍光寿命を用いた細胞のその場観察
(招待講演),
分子研シンポジウム 2011,
2011. 05. 27-28, 岡崎 (分子科学研究所)
- ⑫ 中林孝和,
蛍光寿命イメージングを用いた単一
細胞計測の展開 (招待講演),
分子研研究会「分光学が係わる
クラスター科学および機能性ナノ構造
体科学の将来展望」,
2011. 01. 07-08, 岡崎 (分子科学研究所)
- ⑬ Takakazu Nakabayashi,
Measurements of Intracellular Environments
by Fluorescence Lifetime Imaging
Microscopy, (Invited talk)
Symposium on Advanced Spectroscopy,

2010. 10. 08, Sapporo (Hokkaido Univ.)

- ⑭ Takakazu Nakabayashi, Md. Serajul Islam,
Nobuhiro Ohta,
Time-Resolved Fluorescence Decays of
FAD in a Mixture of Alcohol and Water
in the Femtosecond and Nanosecond Time
Range,
2010 年光化学討論会, 2010. 09. 08-10,
千葉 (千葉大学)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中林 孝和 (NAKABAYASHI TAKAKAZU)
北海道大学・電子科学研究所・准教授
研究者番号：3 0 3 1 1 1 9 5

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

日野 和之 (HINO KAZUYUKI)
愛知教育大学・教育学部・准教授
研究者番号：6 0 3 6 2 3 0 7