

学位論文題名

Studies on fluorescence characteristics of reduced pyridine nucleotides in living tissues by the time-resolved spectrophotometry

(時間分解分光法を用いた生体組織中の還元型ピリジンヌクレオチドの蛍光特性に関する研究)

学位論文内容の要旨

ピリジンヌクレオチド (PN) は、細胞内で営まれる種々の酸化還元反応に関与し、その還元型は、470 nm近傍に蛍光極大を持つが、酸化型は、蛍光を示さない。すなわち、酸化還元状態に依存して、蛍光強度が変化する。よって、従来より、蛍光強度を測定することによって、逆に、PNが関与する生体組織内の種々の酸化還元反応の情報、特に、細胞内の酸素濃度に関する情報を得てきた。ここで得られた蛍光強度変化は、従来より、還元型PNの量の変化と比例するものと考えられている。しかしながら、蛍光強度は、蛍光分子の量変化のみでなく、量子収率の変化にも依存するため、蛍光強度変化は、単純に量変化として解釈することはできない。また、細胞からのPNの全蛍光は、ミトコンドリア内のNADH (β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型)とNADPH (β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸還元型)および細胞質内のNADHとNADPHの蛍光の和と考えられるが、それぞれの強度が、細胞からのPNの全蛍光強度に占める寄与は明らかではない。また、NADHとNADPHの蛍光スペクトルは同一のため、スペクトルよりそれぞれを区別することは不可能である。本研究では、PNの蛍光寿命を時間分解することによって量子収率に関する情報を得、従来の考えの妥当性を評価する。また、ミトコンドリア内のNADHとNADPHおよび細胞質内のNADHとNADPHのそれぞれの蛍光減衰特性を調べ、この特性よりそれぞれを区別する可能性を検討し、さらに、細胞からのPNの全蛍光強度に占めるそれぞれの蛍光強度の寄与について明らかにする。最後に、PNの蛍光寿命測定の生体への応用性についても探る。

蛍光減衰曲線は、レーザーより得られたパルス光 (波長: 362 nm, パルス幅: 数 psec) を励起光とし、時間相関単一光子計数法によって得た。実験より得られた蛍光減衰曲線に対し多重指数関数を仮定し、最小二乗法および最尤法にてfittingを行い、解析した。

最初に、NADHおよびNADPH水溶液を用いて得られた結果と既報の結果とを比較検討し、測定法および解析法の妥当性を調べた。水溶液中でのNADHおよびNADPH両化合物の蛍光減衰曲線は、主に2つの指数関数の和として表すことができ、平均寿命は、0.43 nsecであった。この結果は、既に報告されている結果とほぼ一致した。

ラット肝より調製したミトコンドリアのエネルギー状態および酸素濃度を変化させ、各々の状態での蛍光強度および蛍光減衰特性を調べた。エネルギー状態および酸素濃度の変化に伴い蛍光強度は著しく変化したが、4つの指数関数の和として表せた蛍光減衰特性

は変化しなかった。蛍光平均寿命は、約3.0 nsecだった。この結果より、蛍光強度変化は、量子収率の変化に起因するのではなく、還元型の量の変化に起因するものと結論できた。ミトコンドリアのPNの蛍光平均寿命が水溶液中のNADHおよびNADPHの平均寿命と比べ著しく長くなり、蛍光減衰特性も異なった理由として、既に報告されているPNがタンパク質と結合した際の水溶液中でのスペクトルおよび蛍光減衰特性の結果より、タンパク質との結合が原因として考えられた。よって、検出波長を変え測定した。これは、タンパク質結合型 (bound-form) PNの蛍光ピーク波長が、非結合型 (free-form) PNのものに比べ、低波長側にシフトする蛍光特性を利用したものであり、高波長より低波長で測定した方が、タンパク質との結合による影響がより蛍光減衰曲線に反映するものと期待された。しかしながら、検出波長に依存した蛍光減衰特性の変化は観察できなかった。よって、この結果と bound-form の量子収率が free-form のそれと比べ約10倍である既知の報告から、ミトコンドリアのPNの蛍光は、bound-form の蛍光であり、free-form の蛍光は無視できると結論できた。次に、蛍光減衰特性によるミトコンドリア内のNADHとNADPHの区別の可能性を検討するため、NADPHを選択的に酸化させる α -ブチルパーオキシドを加え、それぞれの蛍光減衰特性を明らかにした。その結果、 α -ブチルパーオキシドによるミトコンドリアのPNの蛍光減衰特性への影響はなく、また、蛍光強度は、約15%減少した。これらの結果より、蛍光減衰特性によって、ミトコンドリア内のNADHとNADPHを区別することはできなかったが、ミトコンドリアのPNの蛍光は、主に bound-form NADHに起因するものであることを示唆できた。

ラット肝遊離細胞および灌流肝を用いて、細胞質に含まれているPNについて調べた。生理的条件下では、細胞質のPNの蛍光減衰特性は、ミトコンドリアのものと一致した。よって、細胞質のPNの蛍光は、bound-form のものと考えられる。この仮説をより確かなものとするために、灌流液中の乳酸塩とピルビン酸塩の濃度の比を変え、細胞質に含まれるNADHの bound-form の量を約30倍まで増加させた。その結果、蛍光強度は、24%増加したが、蛍光寿命特性は変化しなかった。よって、細胞質のPNからの蛍光は、bound-form に起因するものと結論した。さらに、生理的条件下の細胞におけるPNの全蛍光に対する細胞質のNADHの蛍光の寄与は、Bücher らが提案した式を用い約6%と見積ることができ、ほとんど無視できることを示した。次に、細胞質内のNADHとNADPHを蛍光減衰特性から区別することを試みるために、 α -ブチルパーオキシドを灌流液に加えた。その結果、 α -ブチルパーオキシドによる蛍光減衰特性の変化はなく、蛍光強度は、約70%減少した。この結果より、細胞質のPNの蛍光は、主にNADPHの bound-form によるものと示唆できた。しかしながら、蛍光減衰特性から、細胞質のNADHとNADPHを区別することはできなかった。また、遊離細胞に乳酸を加え生じた酸性条件下 (非生理的アシドーシス) では、生理的条件下の蛍光減衰特性とは異なり、著しく蛍光平均寿命がのびた。この結果より、蛍光減衰特性が、生体の細胞死の診断の指標になることを見い出した。最後に、本研究で試料として用いた単離ミトコンドリア、遊離細胞および灌流肝は、散乱体であるが、蛍光減衰特性に、この散乱の影響は、観察されなかった。この結果より、従来、散乱体系での蛍光測定による定量解析は不可能とされてきたが、蛍光を時間分解することにより、定量解析が可能であることを明らかにした。

結語：本研究は、生体組織中のPNの蛍光強度の変化は、量子収率の変化ではなく、還元型の量の変化であることを明らかにした。しかしながら、蛍光減衰特性から、ミトコンドリア内のNADHとNADPHおよび細胞質内のNADHとNADPHを区別することはできなかった。PNの蛍光寿命が、生体の細胞死の診断の指標になることを見い出し、*in vivo*における蛍光寿命測定の実用性の可能性を示した。散乱体系での蛍光法を用いた、定量解析が可能であることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守
副 査 教 授 谷 口 和 彌
副 査 教 授 矢 沢 道 生
副 査 教 授 下 村 政 嗣

学位論文題名

Studies on fluorescence characteristics of reduced pyridine nucleotides in living tissues by the time-resolved spectrophotometry

(時間分解分光法を用いた生体組織中の還元型ピリジンヌクレオチドの
蛍光特性に関する研究)

ピリジンヌクレオチド (PN) は、生体系における種々の酸化-還元反応に関与し、360nm で励起した際、470nm に蛍光発光の極大を示す。この蛍光は還元型にのみ存在し、酸化型は発光しない。従って、この蛍光強度の測定から、PNが関与する生体組織内の酸化-還元反応、特に細胞内の酸素濃度に関する情報を得てきた。従来よりここで得られた蛍光強度変化は還元型PNの量の変化と考えられてきたが、一方、量子収率の変化にも依存することがよく知られている。従って、蛍光強度変化を単純に量の変化として解釈することは不十分である。また、細胞内のPNは二種類あり (NADHとNADPH)、また、その存在部位も細胞質 (サイトゾール) とミトコンドリアに局在し、これらを相互に区別することは現在まで不可能と考えられてきた。

本研究は、新たに蛍光寿命測定を生体組織に導入し、上記の種々の問題に対してその解決を試みた。蛍光減衰曲線は、モードロック色素レーザーから得られたパルス光 (波長: 362nm、パルス幅: 数ピコ秒) を励起光として、時間相関単一光子計数法によって得た。得られた曲線は、多重指数関数を仮定し、最小二乗法及び最尤法でfittingを行い、解析した。

最初にNADH及びNADPH水溶液を用い、free-formの寿命特性を求め、その結果を既報のそれと比較検討した。水溶液でのNADH及びNADPH両化合物の蛍光減衰曲線は主に二つの指数関数の和として表すことができ、平均寿命は430ピコ秒であった。この結果は従来の報告と一致しており、我々の解析法の妥当性を示した。

ラットより調製したミトコンドリアのエネルギー状態及び酸素濃度を変化させ、各々の状態での蛍光強度及び蛍光減衰特性を調べた。エネルギー状態及び酸素濃度の変化に伴い、蛍光強度は著しく変化したが、4つの指数関数の和として表せた蛍光減衰特性は変化しなかった。この際、平均蛍光寿命は約3.0nsecだった。この結果より蛍光強度変化は量子収率の変化に起因するのではなく、還元型の量の変化に起因するものと結論できた。また、

ミトコンドリア中のNADHは蛋白質に結合した状態で存在していると結論した。

次にラット遊離肝細胞及び灌流肝を用いて、細胞質に存在するNADH及びNADPHの蛍光減衰特性を検討した。その結果、細胞質中のPNは、ミトコンドリアと同様な蛋白質結合型で存在し、その特性は結合蛋白質が異なっているにもかかわらず、同じであった。このことは、PNの蛋白質での環境はほぼ同じであると結論できた。

以上、申請者は、新たに蛍光寿命計測法を生体系に導入することにより、長年の生化学的問題に明解な結論を与えたものであり、本手法は生体系への蛍光測定に幅広く利用できると結論した。

よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。