

Monitoring cellular environment based on the time-resolved fluorescence measurements

(時間分解蛍光測定による細胞環境のモニタリング)

学位論文内容の要旨

In this thesis, I present the application of the time-resolved fluorescence measurements to monitor the intracellular environments of living cells. Biological entities carry some naturally occurring fluorescent molecules inside it. Fluorescence from these native fluorophores is called autofluorescence. Probing cellular condition by monitoring autofluorescence has been widely used in biological research because it can be applied to living cells under native physiological condition. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FAD) are two important enzyme cofactors and autofluorescent species which play important roles in a number of cell functions. Purpose of this study is to employ the time-resolved autofluorescence of NADH and FAD to monitor the environments around these fluorophores in living cell.

In living cells, NADH is thought to exist in two forms – free and protein bound forms. Fluorescence decay and time-resolved fluorescence spectra of NADH in yeast cells were measured using time correlated single photon counting (TCSPC) method. Results show that fluorescence spectrum of the protein bound NADH is blue shifted from that of the free one, which indicates that free and protein bound forms of NADH can be distinguished by the time-resolved autofluorescence spectra. In most of the studies, functions of NADH have been described in terms of the ratio of free to protein bound NADH. It is reasonable that NADH-protein interactions will be different in different physiological conditions such as disease progressions or due to other perturbations. It has been shown here that the time-resolved autofluorescence spectra of NADH can be employed to monitor NADH-protein interactions.

The applications of the time resolved fluorescence have been extended to human carcinoma (HeLa) cell in that the intracellular pH has been assessed by the fluorescence decay of

endogenous NADH. Fluorescence decays measured by the TCSPC method provide an average value of pH over a population of cells. For monitoring pH in individual cells and cellular organelles, fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) was used. FLIM is an excellent time-resolved technique which measures fluorescence lifetime with spatial resolution. Data obtained both by TCSPC and FLIM methods exhibit that the fluorescence lifetime of endogenous NADH decreases monotonically with the increase of intracellular pH. Time-resolved autofluorescence measurements of endogenous flavin were also applied to monitor the intracellular pH. Fluorescence lifetime images of flavin in HeLa cells were measured at different intracellular pH. Result shows that the flavin autofluorescence lifetime decreases with increasing pH, which suggests that the intracellular pH can also be determined by using FLIM of flavin.

Fluorescence decays of FAD have been measured in solvents with different dielectric constants. FAD exists in two conformations in solution, a nonfluorescent stacked conformation, in which flavin and adenine moiety are in close proximity, and a fluorescent extended open conformation, in which the two aromatic rings are separated from each other. The fluorescence lifetimes of stacked and open conformations are 9 ps and 3 ns respectively. The fluorescence lifetimes of both conformations increase with decreasing dielectric constant. The present study suggests that the polar environment can be analyzed using the fluorescence lifetime of FAD. It is expected that the fluorescence lifetime of FAD can also be applied to detect the polar environment in living system, although additional factors may have to be considered because of the complexity of cells and tissues.

Finally, it can be concluded from the results presented in this thesis that the time-resolved fluorescence measurements are useful in probing cellular conditions.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 太 田 信 廣
副 査 教 授 中 村 博
教 授 坂 入 信 夫
准教授 中 林 孝 和
教 授 金 城 政 孝
(大学院先端生命科学研究院)

学 位 論 文 題 名

Monitoring cellular environment based on the time-resolved fluorescence measurements

(時間分解蛍光測定による細胞環境のモニタリング)

細胞内の環境を調べるために蛍光プローブを導入し、その発光特性を調べることでより評価する方法が用いられる場合が多い。ただし、その場合は細胞内に異物を導入することになるので、真の細胞内環境を調べていることにはならない。本論文は全体で8章からなっており、細胞内に本来存在する発光種からの自家蛍光に着目して時間分解発光測定法を適用する事により細胞内環境のセンシングが可能であることを示している。

第1章は序論であり、本研究を始めるにあたっての動機および目的、さらには生物の研究において自家蛍光の時間分解測定を行う利点と展望が述べられている。また他の全ての章の概要が簡潔に述べられている。

第2章では自家蛍光に関する様々な説明がなされている。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) およびフラビンの自家蛍光のイメージング測定は本研究の大きな課題の一つであるが、これら二つの自家発光種に関しての、生体内の動的挙動や細胞内の機能に対する各々の役割等が述べられている。これら以外の自家発光種に関しても説明がなされている。

第3章は生物試料の調整や測定手法についての説明がなされている。人間の癌細胞に由来するヒーラ細胞や酵母菌が本実験での対象であり、実験室でこれらの細胞を培養するためには特殊な媒体が必要であり、測定の際の取り扱いや注意が詳しく述べられている。また、蛍光寿命のイメージング (FLIM)、蛍光減衰曲線、時間蛍光分解スペクトルの測定の重要性と共に、本研究でこれらの実験手法がどのように使用されているかが述べられている。装置の配置と共にこれらの実験のやり方についても簡潔に述べられている。

第4章は酵母菌の時間分解蛍光測定の結果が述べられている。生体内の代謝過程の

各ステップでNADHと蛋白質の相互作用が非常に重要な役割を果たしている。この章では時間分解蛍光スペクトルに基づいて蛋白質とNADHの相互作用が議論されている。比較のために測定された水溶液中におけるNADHの時間分解蛍光スペクトルも示されている。

第5章はヒーラ細胞中におけるNADHの蛍光寿命測定に基づいた細胞内pHセンシングについて述べられている。種々の細胞内pHにおけるNADHの蛍光寿命を測定し、各寿命に関する比較がなされている。また細胞内pHの調整のやり方が述べられている。ヒーラ細胞内の種々のpHにおけるNADHの自家蛍光の減衰曲線および時間分解スペクトル、そして水溶液中のNADHの種々のpHにおける蛍光減衰曲線および時間分解スペクトルに関しての比較がなされている。蛋白質に結合したNADHおよび結合していないフリーのNADHからの蛍光に基づいてなされた実験結果の解析および説明がなされている。

第6章は、ヒーラ細胞中のフラビンの蛍光寿命イメージング測定に基づいた細胞内pHセンシングについて述べられている。NADHのみならず代謝補酵素として知られるフラビンの蛍光寿命測定が細胞内pHセンシングに応用できることを示している。

第7章はアルコールと水の混合溶媒中におけるフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の蛍光減衰曲線をフェムト秒およびナノ秒時間領域で測定した結果が述べられている。実験結果の解析からFADの蛍光寿命は溶媒の誘電率に依存することが示されている。FADの蛍光寿命の粘度依存性も述べられている。またFADの蛍光寿命測定は生体内の極性の評価に応用できる可能性が指摘されている。

第8章は全体の総括と今後の展望について述べている。

これらの研究を通じて単一細胞内の情報も含めた生体内の環境をモニターするのに発光減衰曲線の測定、時間分解発光スペクトルの測定、蛍光寿命イメージングの測定といった時間分解発光測定が非常に有効であることが示されており、これらの手法が今後ますます発展していくことが期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士(環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。