

蛍光寿命を用いたカルシウムイオン濃度定量のための色素の検索

(大阪大学院・機能創成) ○吉木啓介, 東洋喜, 橋本守, 荒木勉

[はじめに]

細胞は外部の刺激に対し様々な応答を示すが、この際細胞内 Ca^{2+} を情報伝達物質として利用している場合が多い。このため、 Ca^{2+} 濃度の分布や動態の観察は細胞の生理機能の解明に有用である。 Ca^{2+} をリアルタイムに可視化する手法として蛍光色素法が広く用いられており、 Ca^{2+} 濃度に応じた蛍光特性の変化から Ca^{2+} 濃度を定量化する。しかし、蛍光強度変化を用いる場合、色素の退色や励起/観測光の減衰によって正確な濃度の定量は難しい。また2波長の強度比を用いて定量化する手法もあるが、この色素の励起には生体に有害な紫外光が必要とされる。本研究では、可視光励起で蛍光寿命の変化から生体内 Ca^{2+} 濃度を非接触、低侵襲に定量評価することを目指し、最適な蛍光色素の検索を試みた。

[実験手法]

Table.1 に今回検索した色素を示す。fluo-3, fluo-4, calcium green(CaGr)-1 は強度変化を利用した観測法に広く用いられ、calcium orange は Nd-YAG レーザーの2倍波と一致した励起波長を持つ色素である。また、CaGr-2, fluo-5N は解離乗数が大きく、高 Ca^{2+} 濃度環境に適した色素である。

各色素の蛍光寿命観測には、Fig.1 に示す時間相関単一光子計測顕微鏡システムを用いて減衰波形の観測を行った。 Ca^{2+} 濃度を 0nM ~ 39000nM まで変化させ、 Ca^{2+} 濃度に応じた蛍光寿命の変化を減衰波形から算出した。

[結果とまとめ]

Ca^{2+} を含まないときの蛍光寿命を1とした場合の、各 Ca^{2+} 濃度に対する蛍光寿命の変化率を Fig.2 に示す。この結果より、 Ca^{2+} 濃度とともに蛍光寿命が増加する CaGr 系と逆に減少する Fluo 系の2系統に分けられることが分かる。実際の生理反応時には細胞内 Ca^{2+} 濃度は 10^2 nM の濃度から増加する。したがって、fluo-3, fluo-4, CaGr-1 等は生理反応の初期段階での微小な細胞内 Ca^{2+} 濃度分布を調べるのに有用である。一方、 10^3 nM 以上の領域で calcium orange, fluo-5N の蛍光寿命は変化し生理反応時の細胞内 Ca^{2+} の定量に適していることがわかった。今後は高濃度の測定に適した色素を用い、蛍光寿命を用いて Ca^{2+} 濃度の動態の可視化を試みる予定である。

Table.1 Characteristics of fluorescence indicators

	MW	Ex (nm)	Em (nm)	K_d (nM)
fluo-3	769.53	506	526	390
fluo-4	927.09	494	516	345
calcium green-1	1147.19	506	531	190
calcium orange	1087.33	549	576	185
fluo-5N	958.06	493	518	90000
calcium green-2	1665.585	503	536	550

: Fluo系
 : Calcium green系
 : 低濃度用
 : 高濃度用

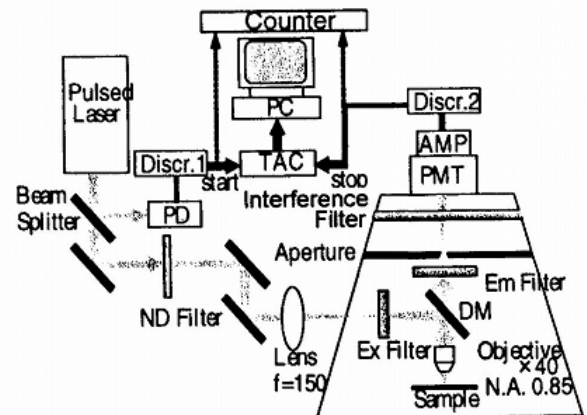


Fig.1 Configuration of time correlated single photon counting microscopy system

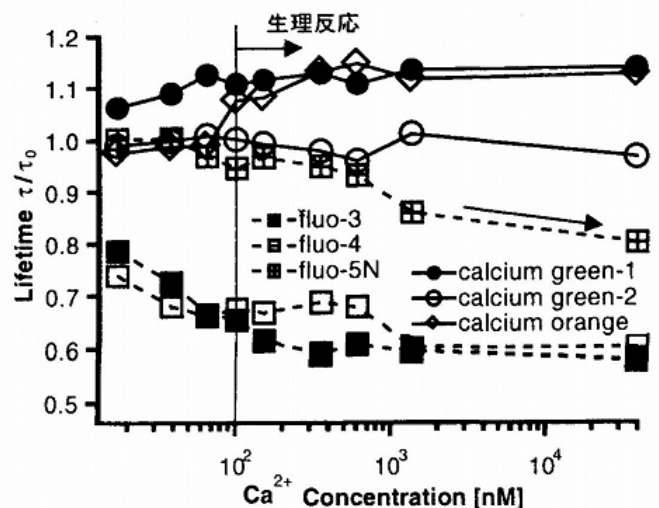


Fig.2 Fluorescence lifetime dependencies on Ca^{2+} concentration of various ion indicators

† Lakowicz JR, Szmajcinski H, Nowaczyk K, Berndt KW, Johnson M. *Anal Biochem.* 202, 2 (1992)