

# 共焦点非同期サンプリング蛍光寿命顕微鏡による カルシウムイオン濃度イメージング Calcium ion imaging by confocal fluorescence lifetime imaging microscopy with asynchronous sampling

○吉木啓介, 橋本守, 荒木 勉

○Keisuke Yoshiki, Mamoru Hashimoto, Tsutomu Araki

大阪大学大学院 基礎工学研究科

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

E-mail: [yoshiki@sml.me.es.osaka-u.ac.jp](mailto:yoshiki@sml.me.es.osaka-u.ac.jp)

We have developed a confocal microscope for fluorescence lifetime imaging using asynchronous sampling method. This system consists of a fast response photomultiplier, fast sampling modules, a low-pass filter and a confocal microscope. Imaging by laser scanning and detection is asynchronous with laser excitation. We also observed  $\text{Ca}^{2+}$  concentration images of liposome containing  $\text{Ca}^{2+}$  and calcium ion probe.

## 1. はじめに

近年, 様々な細胞内カルシウムイオンプローブが開発され, 細胞内シグナル伝達機構等の動的な情報を実時間で計測する研究が多く行われるようになってきた. しかし, 蛍光強度を観測する一般的な手法では, プローブの濃度や細胞にまで到達する励起光の強度, 観測系における蛍光収集効率等に左右されるため, 単一波長で励起し単一波長を測定するだけでは細胞内物質の濃度を定量的に評価することは難しい. また, 蛍光のスペクトルシフトを利用した多波長励起または, 多波長測光による比色法では  $[\text{Ca}^{2+}]$  の定量が可能であるが, プローブの励起に紫外線が必要なため生体に対して有害であり, また, 自己蛍光の問題も有する.

一方, プローブの蛍光寿命は周囲のカルシウム濃度によって敏感に変化する<sup>1,2)</sup>そこで可視光励起を用いて蛍光寿命を測定することで細胞内カルシウムの定量測定を行うため, 蛍光寿命イメージングが可能な共焦点非同期サンプリング顕微鏡を開発し, カルシウムプローブを用いて実際に蛍光寿命によるカルシウムイオン濃度の測定を行った.

## 2. カルシウムイオンプローブの蛍光寿命と $\text{Ca}^{2+}$ 濃度

溶液中において, カルシウムイオンプローブは  $\text{Ca}^{2+}$  と錯体を形成し, 解離定数( $K_d$ )によって決まる平衡状態にある(解離定数:  $K_d = [\text{Ca}^{2+}][P_f] / [P_b]$ ,  $[P_f]$ : 遊離プローブ濃度,  $[P_b]$ : 結合プローブ濃度). 遊離プローブと結合プローブは, それぞれ異なった蛍光寿命( $\tau_b, \tau_f$ )の蛍光をもち, 全体の蛍光減衰曲線は式(1)に示すような2重指数関数で表される.

$$I(t) = \alpha_f \exp(-t/\tau_f) - \alpha_b \exp(-t/\tau_b) \quad (1)$$

ここで,  $R_\alpha = \alpha_b / \alpha_f$  はカルシウム濃度に依存し,  $k_b, k_f$  を結合プローブと遊離プローブの吸光定数,  $Q_b, Q_f$  を結合プローブと遊離プローブの蛍光における量子効率とすると,  $[\text{Ca}^{2+}] = R_\alpha K$  より,

$$R_f = \frac{I(t_1)}{I(0)} = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \exp(-t_1/\tau_b)}{[\text{Ca}^{2+}] + K} \quad \text{ただし,} \quad K = K_d \frac{1}{C_{SS} \tau_f}, \quad C_{SS} = \frac{k_b Q_b}{k_f Q_f} \quad (2)$$

と表され, 時間分解された2点の蛍光強度比  $R_f$  はカルシウムイオン濃度に関係する.

## 3. 非同期サンプリングによる蛍光寿命顕微鏡

$[\text{Ca}^{2+}]$  をイメージング行うために, Fig.1 に示す蛍光寿命の変化から  $[\text{Ca}^{2+}]$  の値を高速に取得する共焦点蛍光寿命顕微鏡を開発した. このシステムの特徴は, レーザーによる励起とデータの取り込みタイミングを同期させる必要がない非同期サンプリング法を用いている点であり, 制御が容易であり, 市販の顕微鏡にそのまま設置することができるという利点を持つ. また, 市販の共焦点蛍光顕微鏡と同等のフレームレートで蛍光寿命マッピングを得ることができる.

Fig.2 に非同期サンプリングの動作原理を示す. I は取得した蛍光減衰波形, II は励起後  $t_1$  で蛍光強度  $I(t_1)$  を切り出した信号を示す. 切り出しは蛍光減衰波形とゲート信号の積算を行うことで行われ, 蛍光信号とゲート信号の重なり合う部分の信号, すなわち  $I(t_1)$  に対応したパルス信号が得られる. また, III は II のパルス波高をサンプリング回路によって, 矩形信号に変換したものであり, IV は III をローパスフィルタで平滑

化することで通常の AD ボードで取り込み可能な連続したアナログ信号に変換したものである。よって、レーザーパルスのタイミングに関係なく、どの時点でサンプリングしてもよく、レーザー走査とパルス発振は無関係に行うことができる。

実際の装置では、フェムト秒チタンサファイアレーザーの第2高調波(400nm)を光源とし、光ファイバを通して蛍光を取得することで共焦点効果を得ている。ゲート信号はディレイジェネレーターで時間差  $t_1$  をもつ2系統の独立したパルス信号として生成し、それぞれ PMT で得られた蛍光減衰波形と高周波ミキサーで積算し、異なる時間における蛍光強度  $I(0)$ ,  $I(t_1)$  を1回の励起で同時に取得することができる。

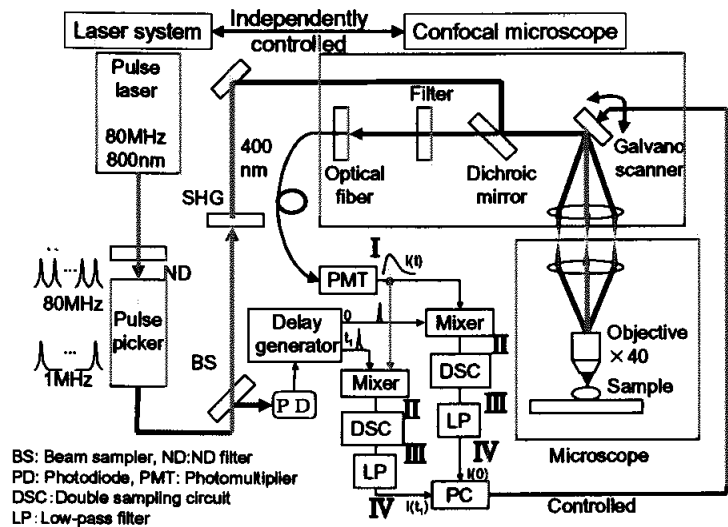


Fig.1 Experimental setup of asynchronous sampling imaging microscope

#### 4. カルシウム濃度イメージング

装置の性能評価のため、calcium green-2 を封入したリポソームの  $[Ca^{2+}]$  イメージングを行った。その結果の一例を Fig.3 に示す。(a)  $[Ca^{2+}]=0nM$ , (b)  $[Ca^{2+}]=1360nM$  に調製し、 $200 \times 200$  pixel の  $[Ca^{2+}]$  イメージを 1frame/sec で取得した。その結果、カルシウムの濃度を反映したイメージを得ることができた。

#### 5. おわりに

本研究では模擬細胞において  $[Ca^{2+}]$  を取得することで性能評価を行った、今後は実際の細胞に対して  $[Ca^{2+}]$  の測定を行っていく。

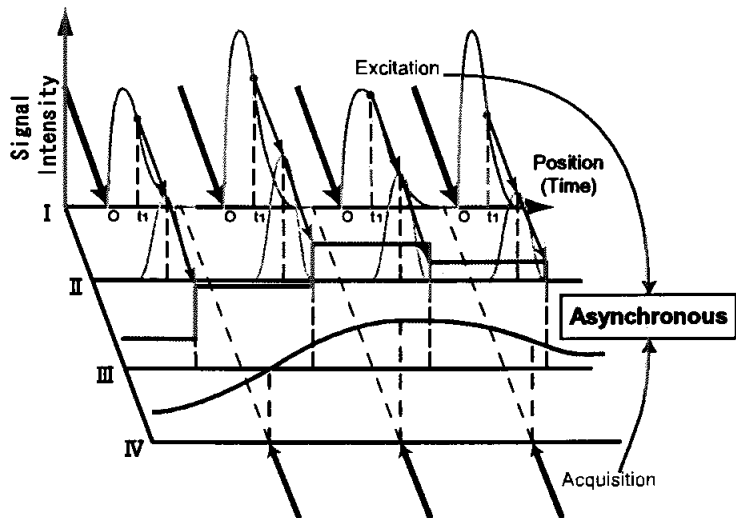


Fig.2 Asynchronous sampling

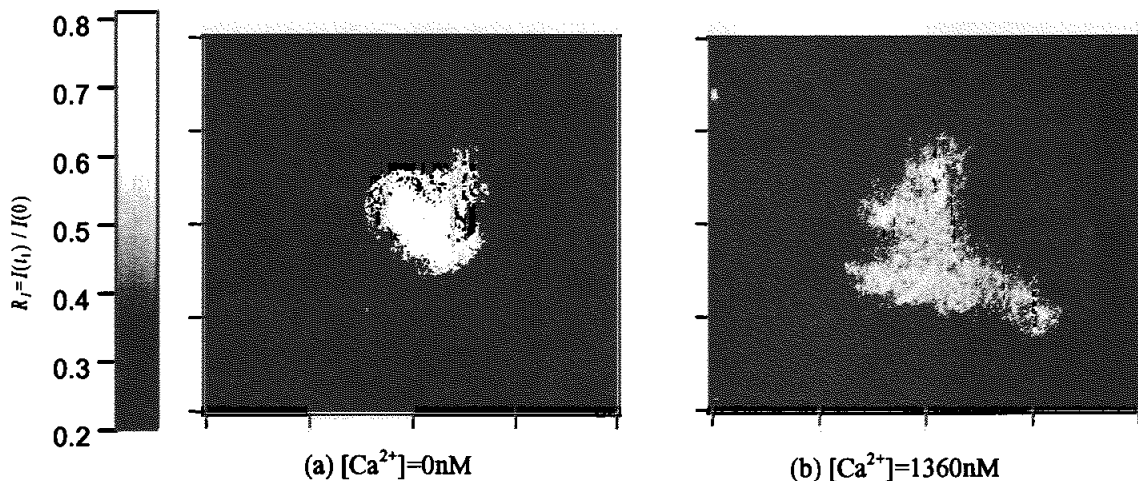


Fig.3  $[Ca^{2+}]$  image of liposome

#### 文献

- 1) Lakowicz J R, Szmajcinski H, Nowaczyk K and Johnson J L : Fluorescence lifetime imaging of  $Ca^{2+}$  using visible wavelength excitation and emission *Proc. SPIE* 1640 (1992) 390
- 2) R Sanders, H C Gerritsen, A Draaijer, P M Houp and Y K Levine : Fluorescence lifetime imaging of free calcium in single cells *Bioimaging* 2 (1994)131