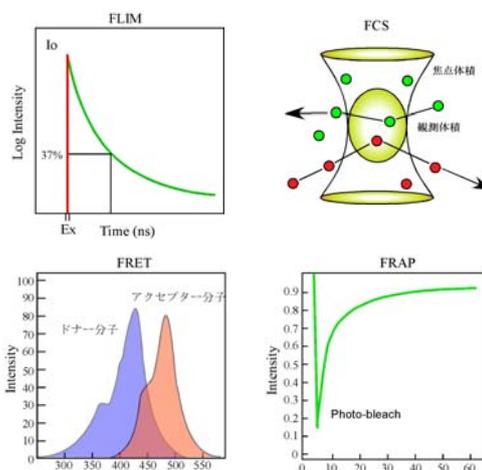


ディビジョン番号	1
ディビジョン名	物理化学

大項目	3. 凝縮系の物性と機能
中項目	3-6. 生物物理化学
小項目	3-6-3. 単一細胞の蛍光分光とイメージング

概要（200字以内）

生物機能、生理活性を解明するためには、単一細胞内の個々の分子の運動および分子間相互作用を分子レベルで解明する必要がある。そのためには、蛍光蛋白を対象に生体分子から直接発する蛍光を観測し、あるいは生体分子に共有結合させたプローブ分子の蛍光や細胞内に取り込んだ量子ドット等の蛍光特性を観測し、空間的かつ時間的に分割したイメージング画像として得られる種々の蛍光分光法を適用していく必要がある。



現状と最前線

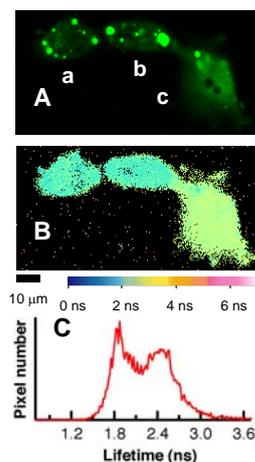
蛍光分光法は一分子計測法としても用いられる高感度分光法であり、対象物質と共有結合で結びついたプローブ分子やGFP等の蛍光蛋白自身の蛍光特性を調べる研究が最近数多くなされている。サイズにより蛍光波長が容易に変えられる発光性量子ドットを細胞内に取り込んだ蛍光測定も行われている。単一細胞内の反応や機能を調べるためには、生きている細胞内蛋白の局在・動態のリアルタイム可視化が有用であり、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージング画像の観測により、対象物質の細胞内局在の空間的情報と経時変化という時間的情報が得られることになる。特にプローブ分子を用いる場合は、温度、pH、粘度、といった物理量や Ca^{2+} 等に敏感な蛍光色素を用いることにより、周囲の環境を詳細に調べることが可能となる。励起エネルギー移動（FRET）を利用して細胞内での分子間距離や分子間相互作用を調べる研究も数多くなされている。例えば、光励起されるドナー分子からアクセプター分子へのエネルギー移動が起こる時、その効率はお互いの分子の距離や配向に依存する。エネルギー移動が起これば、ドナー分子の蛍光は消光し、アクセプター分子の蛍光が観測されることから、お互いの蛍光を観測することによりエネルギー移動速度や分子間距離を求めることができる。また、一光子励起以外に、二光子励起による蛍光イメージング測定も行われている。

マイクロ・ミリ秒の時間領域で起こる分子の拡散運動に関して、例えば蛍光相関分光法 (FCS)

やフォトブリーチング蛍光リカバリー法 (FRAP) 等が用いられている。FCS は共焦点光学系を利用し、極微小領域内における蛍光分子の動きを、蛍光強度の「揺らぎ」を通して観測する方法で、微小領域を出入りする蛍光分子の見積りから拡散速度がわかる。また FRAP は蛍光分子を光励起により退色させ、その回復を見ることによって分子の動態を調べる方法である。

蛍光強度以外に、細胞内に分布する色素分子の蛍光寿命のイメージング画像の測定 (FLIM) も一般化しつつある。この手法により、細胞内のナノ秒以上の速い反応も観測できるようになった。位相法を用いた FLIM が先行したが、最近パルスレーザーを用いる方法も活発に行われるようになってきた。実測例を図に示す。蛍光強度イメージング像からは蛍光分子の分布状態しかわかられないが、FLIM からお互いの細胞の環境の違いをはっきり知ることができる。

FLIM の情報は細胞の受けるストレスや活性度の違い、また細胞の生死に関する情報を与えると予想されるがこれらは今後の課題でもある。また蛍光寿命は、色素分子周囲の電場に依存すると考えられることから、FLIM をより高分解能測定を行なうことにより細胞内電場強度分布に関するイメージング像が測定できる可能性がある。また、蛍光寿命や蛍光の立ち上がりから FRET の速度を定量的に調べることができるが、単に蛍光寿命測定だけではなく、単一細胞内の時間分解蛍光スペクトルを分子サイズの空間分解能で測定できれば、細胞内の分子間相互作用を定量的に議論することが可能となる。またエレクトロポレーションとも関係して、数 MV/cm もしくはそれ以上のナノ秒・フェムト秒パルス電場を細胞に作用させた場合のその後の細胞内変化を蛍光イメージング測定を行ない、超短、高パルス電場作用下の細胞内および核内環境の変化を調べることも今後の重要な課題である。



HeLa 細胞の蛍光強度イメージング (A)、蛍光寿命イメージング (B)、蛍光寿命のヒストグラム (C)。

将来予測と方向性

- ・ 5年後までに解決・実現が望まれる課題
 - 1) 単一細胞内時空間分解蛍光スペクトルの高速測定
 - 2) 細胞内における構造およびダイナミクスへの電場効果の解明
- ・ 10年後までに解決・実現が望まれる課題
 - 1) 細胞内単一分子の並進、回転、振動、電子緩和過程および分子間相互作用の完全解明
 - 2) 細胞内電場強度空間イメージング測定

キーワード

生細胞、時空間分解蛍光スペクトル、蛍光寿命イメージング、細胞内局所電場、電場摂動蛍光イメージング

(執筆者： 太田 信廣)