

細胞内の蛍光スペクトル変化に基づく細胞状態評価手法の開発

Evaluation of Cellular States Based on Fluorescence Spectral Changes inside Cells

奈良先端大物質, °安國良平, 井出敬佑, 山田壮平, 岡野和宣, 細川陽一郎

Div. Mat. Sci. NAIST, °Ryohei Yasukuni, Keisuke Ide, Sohei Yamada, Kazunori Okano,

Yoichiroh Hosokawa

E-mail: r-yasukuni@ms.naist.jp

細胞は生体内外からの様々な刺激に曝されており、細胞はこれらの刺激に応答して発生や分化などの機能調整を行っている。刺激の中でも特に機械刺激に対する細胞の生理応答を調べる手法として、我々は水中に集光されたフェムト秒レーザーが誘起するマイクロメートルスケールの微小爆発と周囲に伝搬する衝撃力の利用を提案しており、これまでにレーザー誘起衝撃力の細胞への作用の一つとして細胞膜の機械受容チャネルを介したカルシウムイオンシグナルの誘導を報告している。この場合、細胞内のカルシウムイオン濃度は、添加した指示薬の蛍光強度によりモニターしているが、複雑な分子ネットワークで構成される分子応答の全体像を理解し制御するためには、分子選択的な細胞応答の評価に加えて、包括的な細胞状態の変化を考慮することが重要である。そこで本研究では細胞内環境に依存して変化する蛍光色素の蛍光スペクトル形状に基づき、レーザー誘起衝撃力の作用による個々の細胞状態の変化を評価する手法を開発する。

フェムト秒チタンサファイア再生増幅器(130 fs, 800 nm, 150 nJ/pulse)のシングルパルスで倒立顕微鏡に導入し、20 倍対物レンズ(NA=0.5)を用いてガラスボトムディッシュに培養した細胞近傍の液中に集光した。発生した衝撃力を細胞へ作用させ、その影響をレーザー照射前後における蛍光色素の蛍光スペクトル変化により評価した。

蛍光色素として低分子の pH 指示薬である SNARF-1AM ($\lambda_{ex} = 488$ nm)を用い、波長 640 nm と 587 nm における SNARF-1 の蛍光強度比からレーザー誘起衝撃力の作用を評価したところ、衝撃力によって細胞内の pH が変動し、衝撃力に応答にして細胞状態が変化することが示唆された。また同じレーザー照射条件における比較において、その影響は個々の細胞の初期状態に依存する傾向が観測された。

また包括的な細胞状態を反映する指標として、その蛍光スペクトル形状が細胞内の pH、活性酸素濃度、タンパク質濃度など複数の環境要因に依存する蛍光タンパク質が有望である。蛍光タンパク質を細胞に発現させ、様々な刺激に対する微小な蛍光スペクトル変化の類似性から、加えた衝撃力が細胞に与える影響の評価手法を提案する。