

物理化学概論

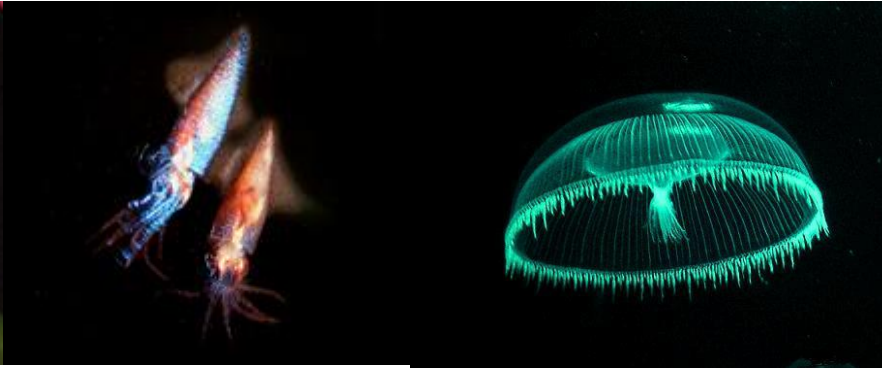
量子化学から色について考える(2)

九州工業大学 竹中繁織

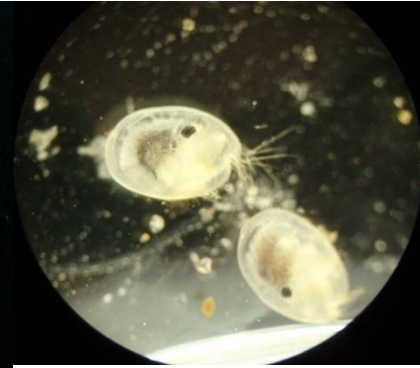
自分自身で光る生き物



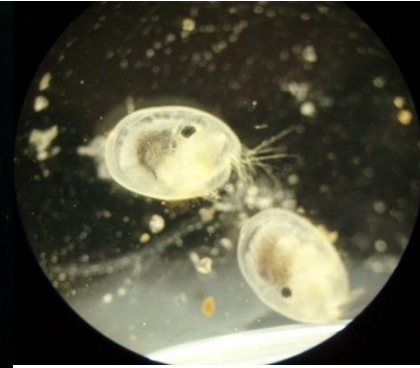
ゲンジボタル



ホタルイカ



オワンクラゲ



ウミホタル



ハダカイワシ



ホタルミミズ



ツキヨタケ

組織の内部に発光バクテリアを住まわせている



アツカサウオ



チョウチンアンコウ

反射光によって光って見える生き物

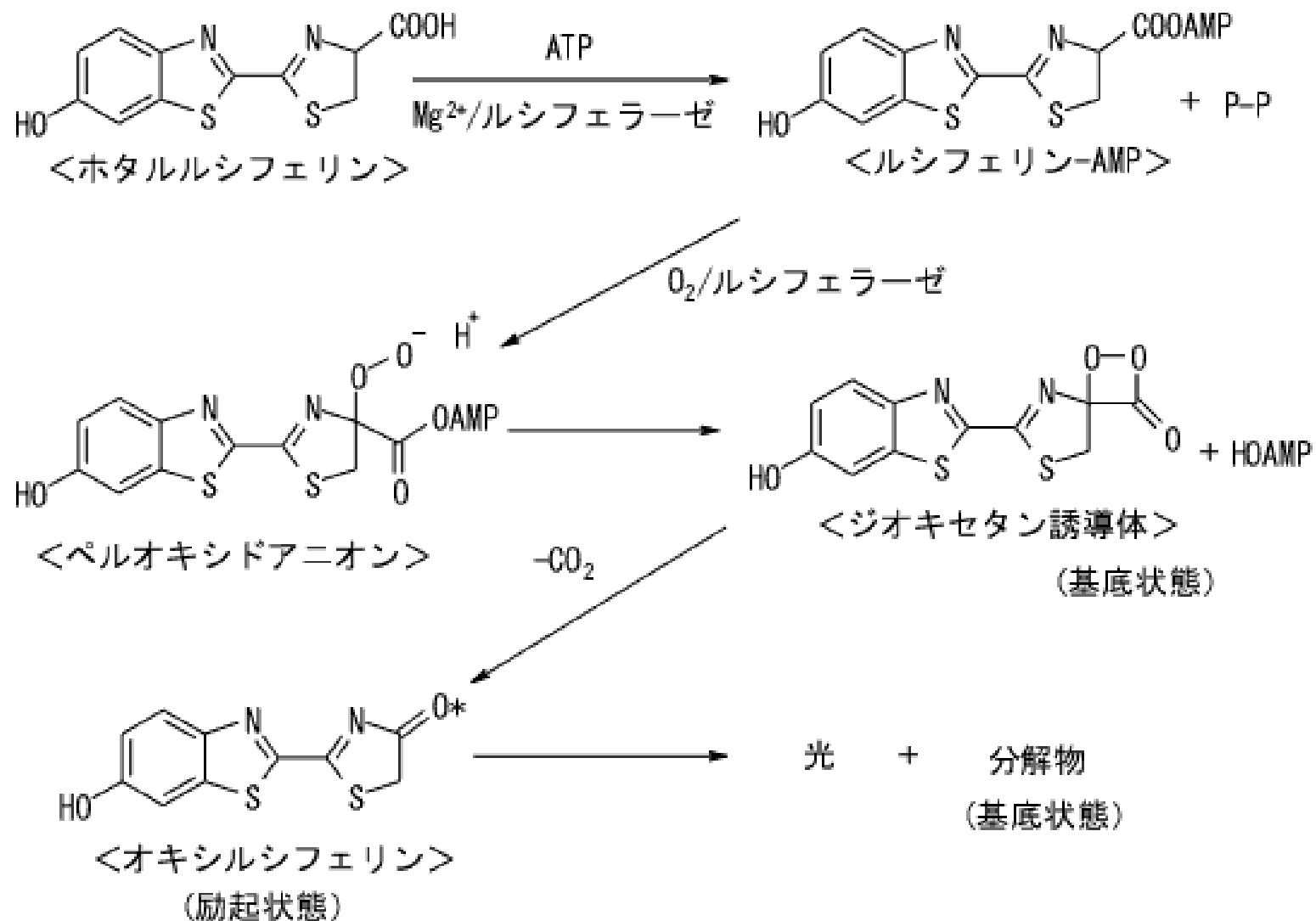


ヒカリゴケ

生物発光の意味

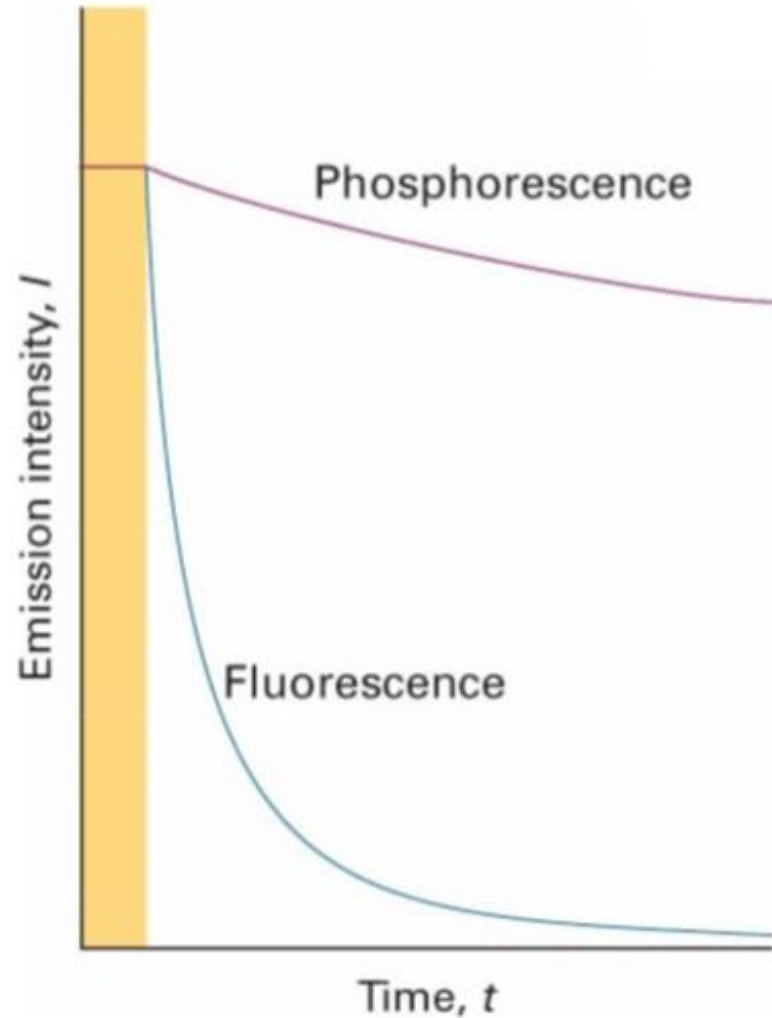
- コミュニケーション
- 威嚇や防御
- 隠蔽(カウンターシェーディング)
- 捕食(餌の誘引)

ホタルの発光メカニズム



蛍光とりん光

蛍光寿命が異なる2つの放射過程がある



りん光(Phosphorescence)

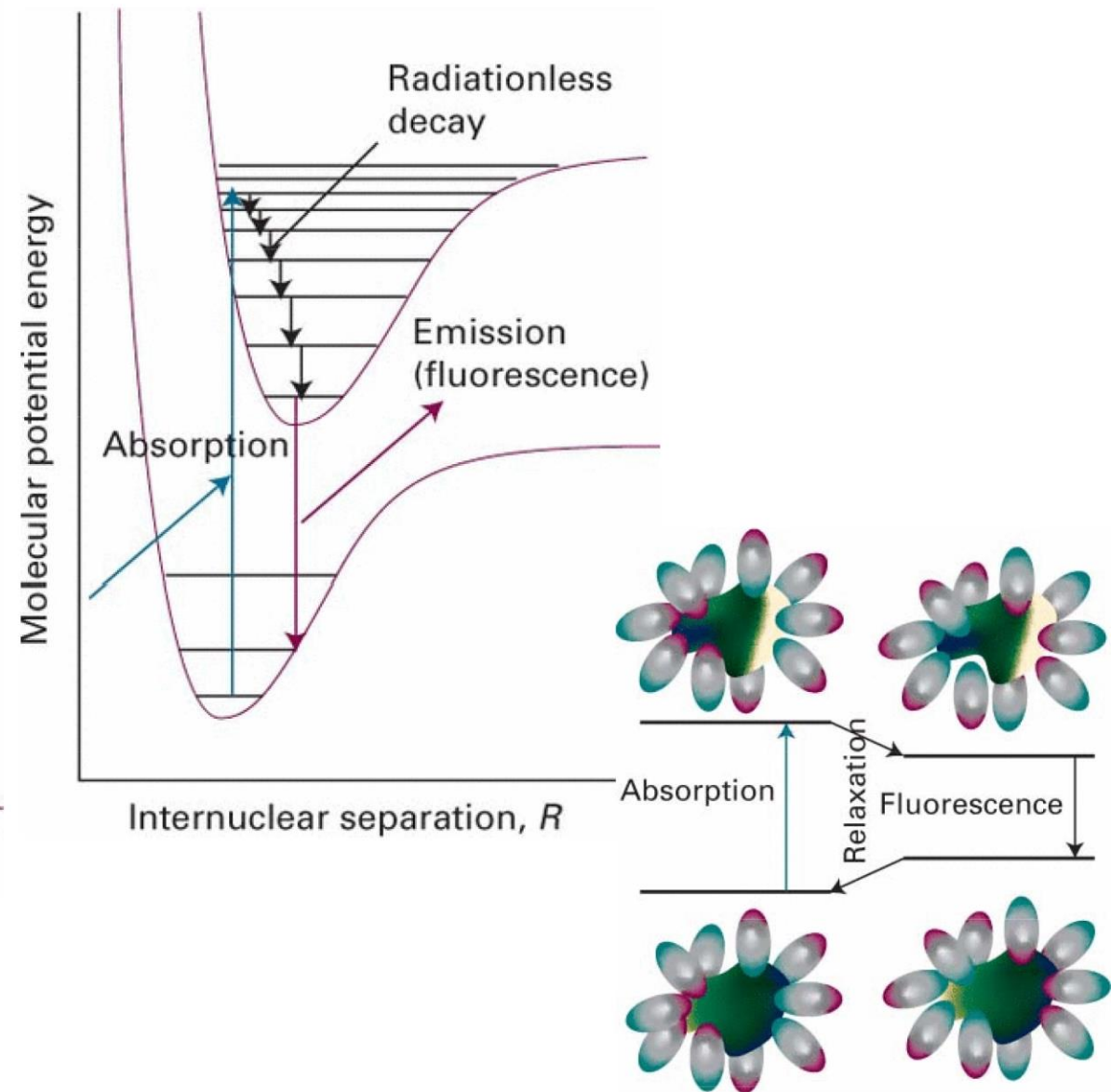
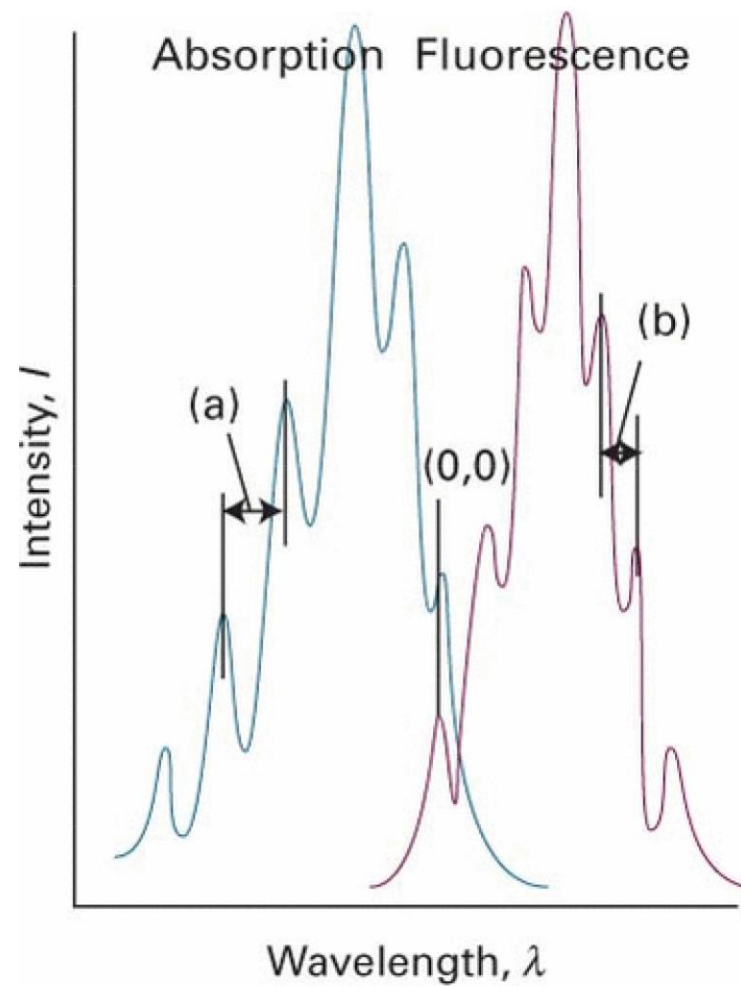
寿命長い

異なる「スピン多重度を持つ電子状態間の遷移

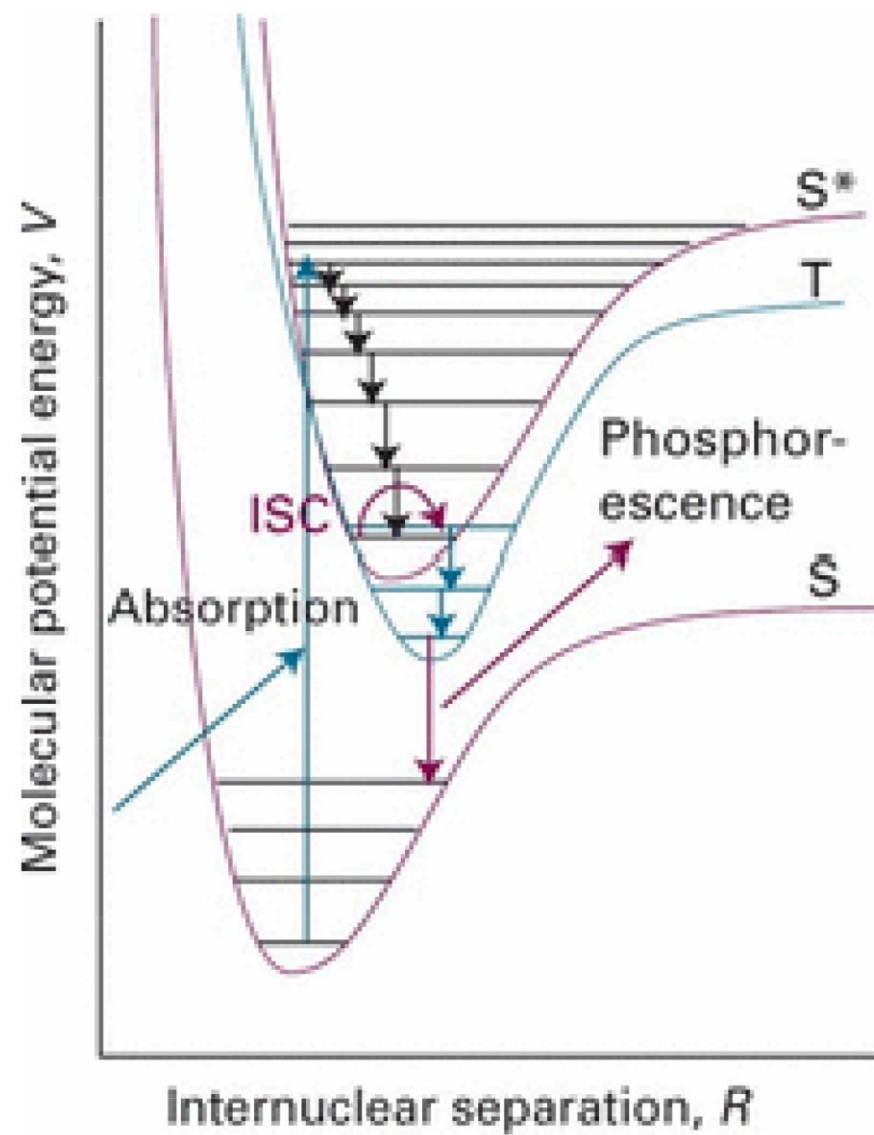
蛍光(Fluorescence)

寿命短い

同じスピン多重度を持つ電子状態間の遷移



系間交差ISC



無放射過程

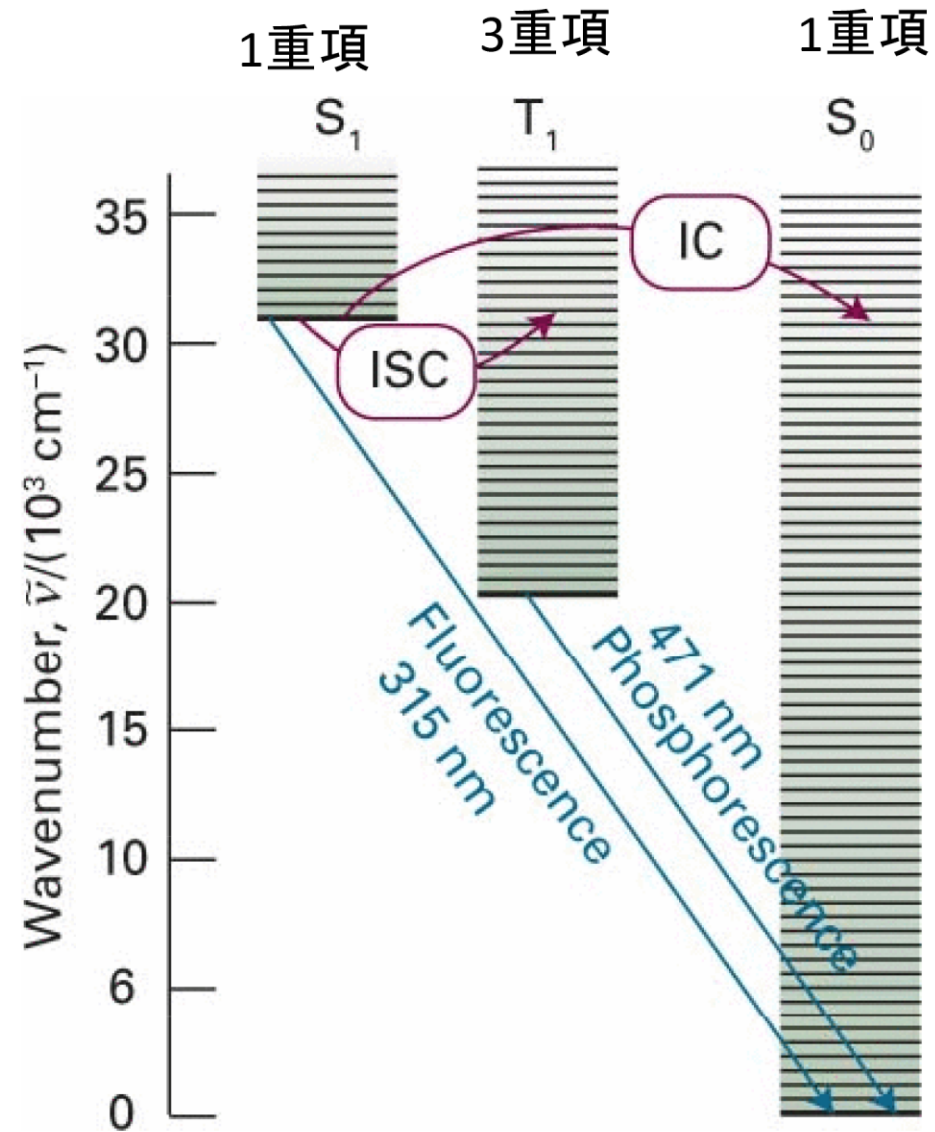
系間交差ISC

異なるスピン多重度を持つ
状態間の遷移
(電子スピンの変化する)
スピン軌道相互作用が原因

内部転換IC

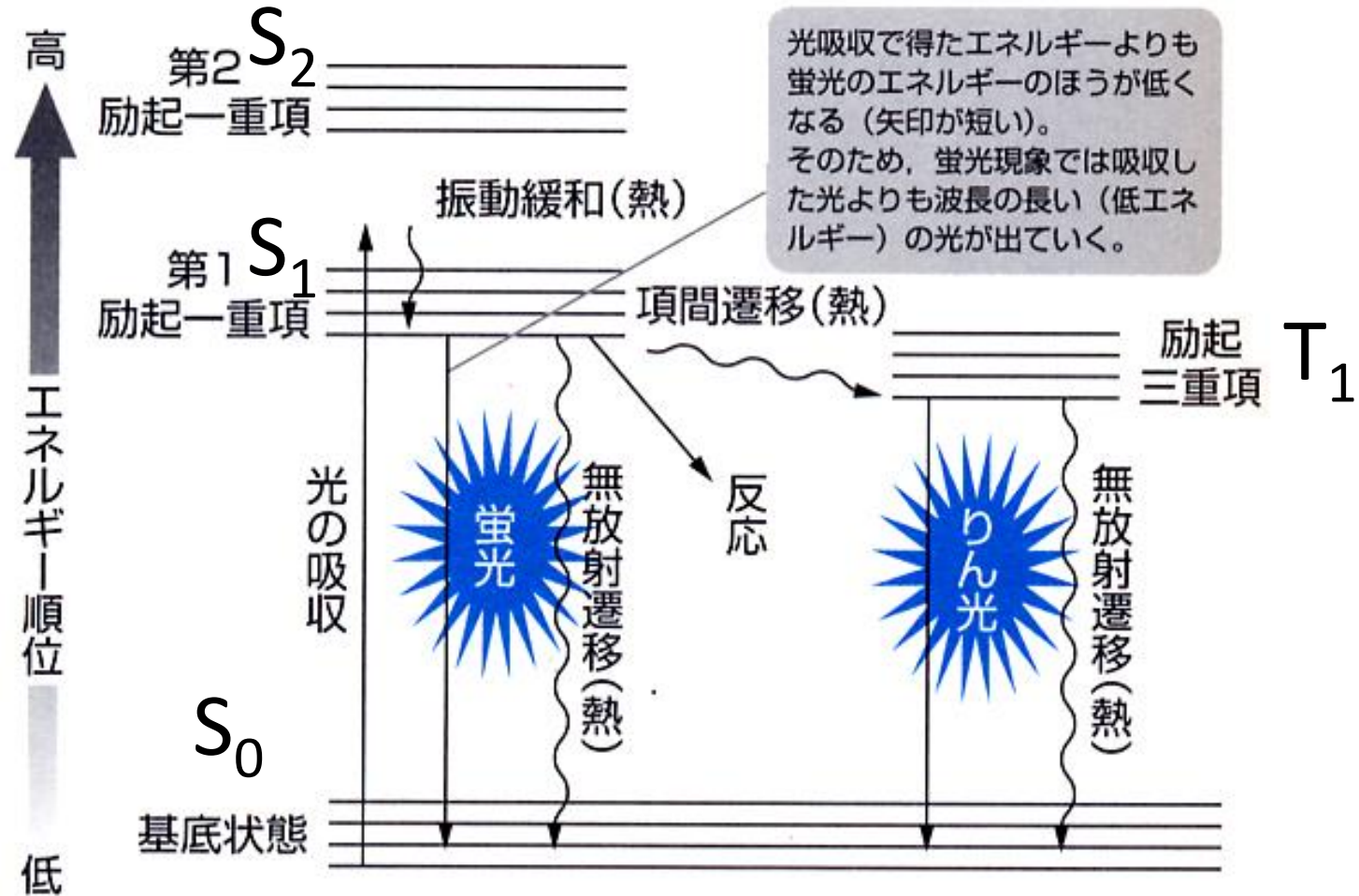
高い電子励起状態から
低い電子基底状態の
高振動状態への遷移

高振動状態は溶液中では
振動緩和する



ジャブロンスキーダイアグラム

ヤブロンスキー図(Jablonski diagram)での各過程

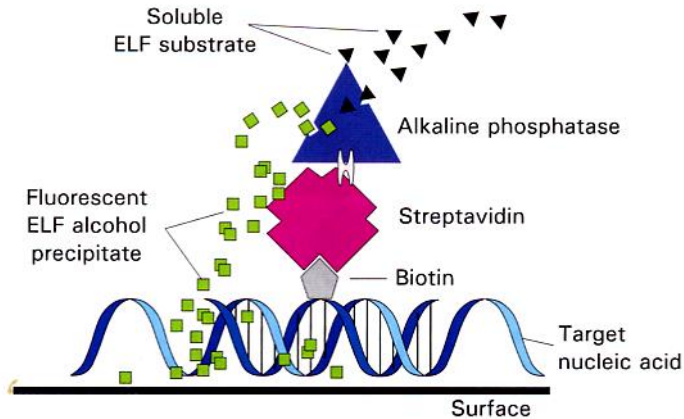


光を吸収する前の分子はエネルギーの低い基底状態(ヤブロンスキー図の S_0 の状態)にいます。分子が光を吸収すると、吸収した光のエネルギーだけ余分のエネルギーをもつことになります。したがって、ヤブロンスキー図の S_1 などのエネルギーの高い状態になります。この S_0 - S_1 などのエネルギーレベルの間隔(エネルギー差)が吸収される光の波長に対応するので、物質によって吸収される光の波長が異なります。

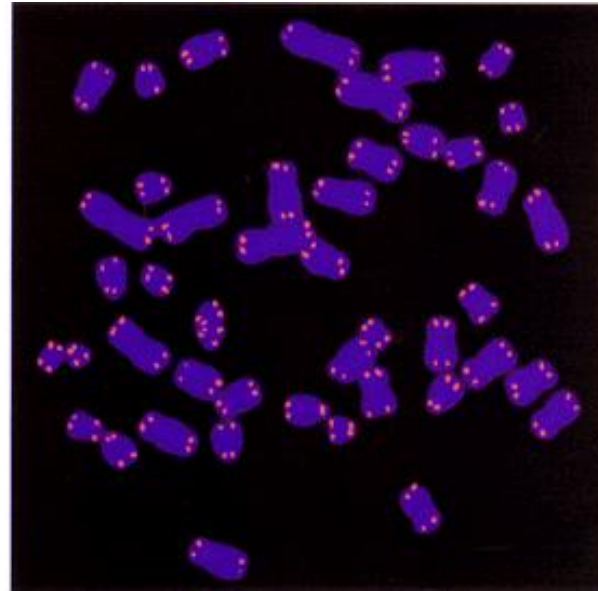
物質がもつエネルギーの高い状態を励起状態といいます。通常の有機化合物ですと、基底状態が一重項状態なので、光を吸収した直後の状態も一重項状態なので、その状態を励起一重項状態といいます。

(FISH) fluorescence in situ hybridizationの例

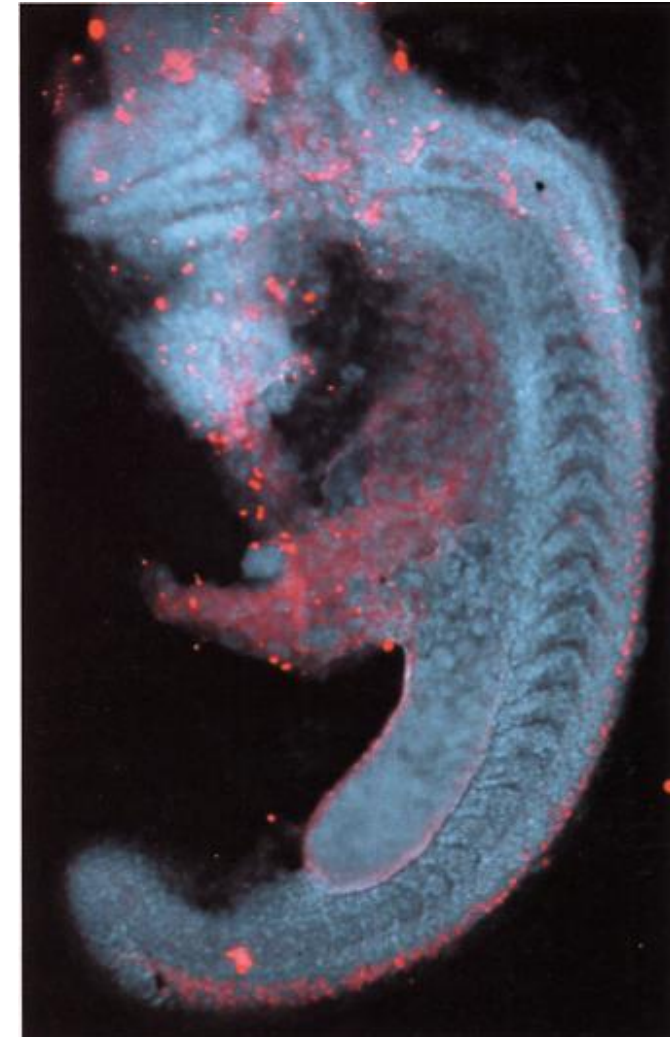
ハイブリダイゼーションの原理



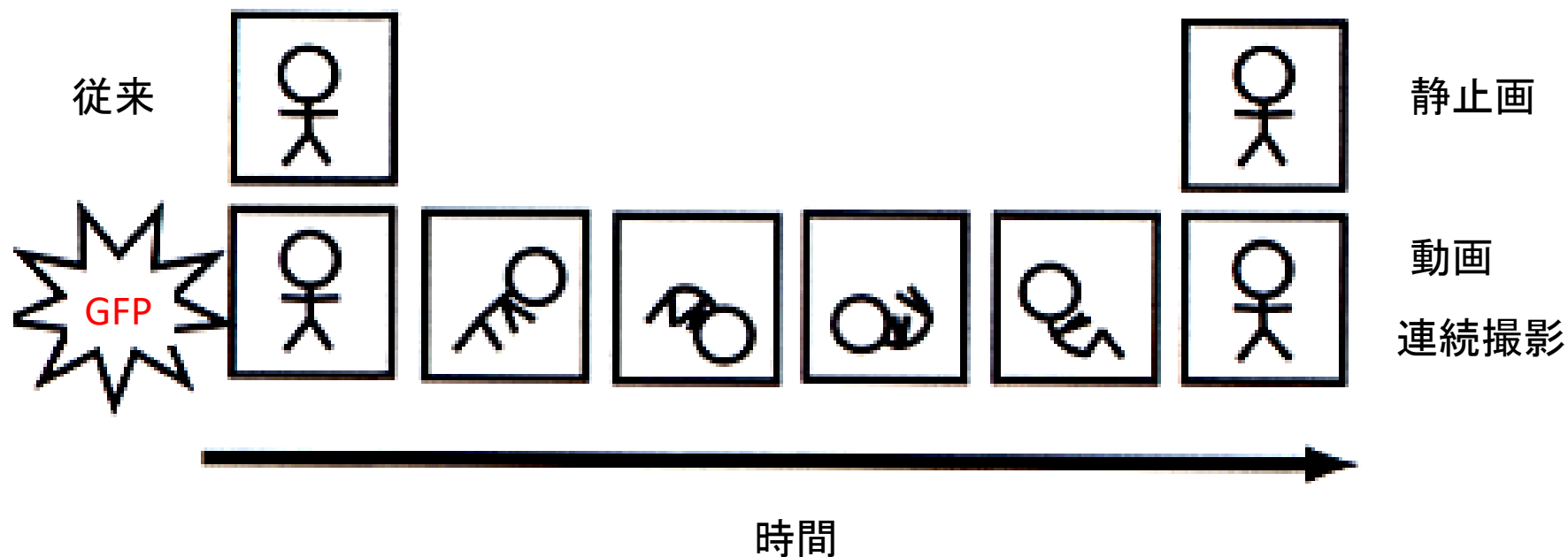
染色体上のテロメア領域の染色



22時間後のゼブラフィッシュにおけるニューロン細胞



GFPによって生きている細胞をビデオのように
に動画として連続観察できるようになった





The Nobel Prize in Chemistry 2008

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"

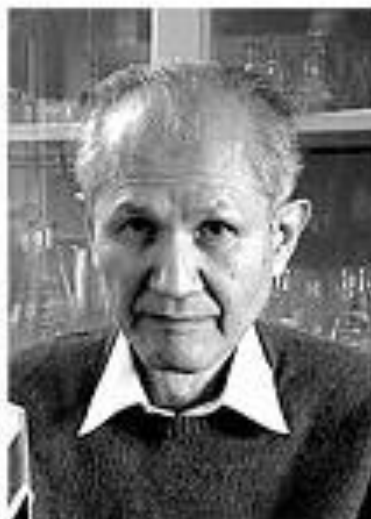


Photo: J.
Henriksson/SCANPIX

Osamu Shimomura

🕒 1/3 of the prize

USA

Marine Biological
Laboratory (MBL)
Woods Hole, MA, USA

b. 1928



Photo: J.
Henriksson/SCANPIX

Martin Chalfie

🕒 1/3 of the prize

USA

Columbia University
New York, NY, USA

b. 1947



Photo: UCSD

Roger Y. Tsien

🕒 1/3 of the prize

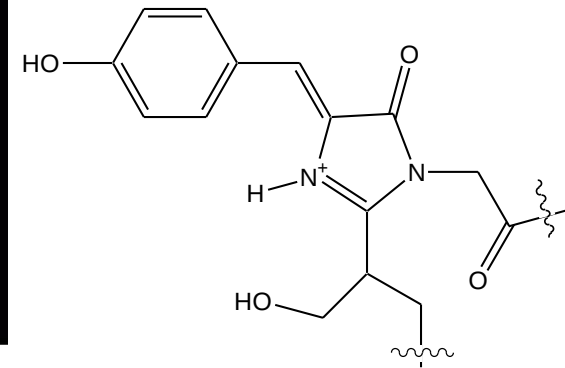
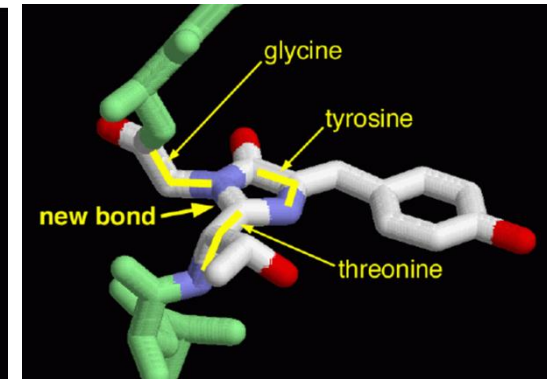
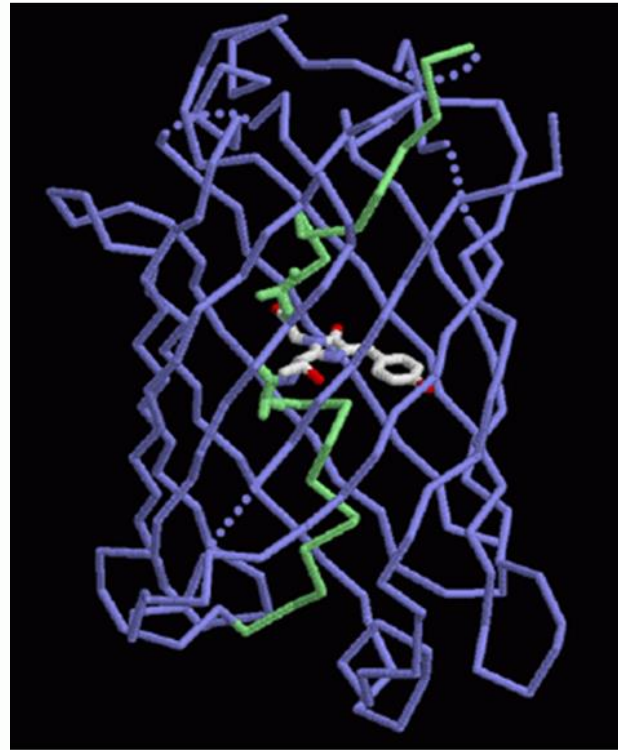
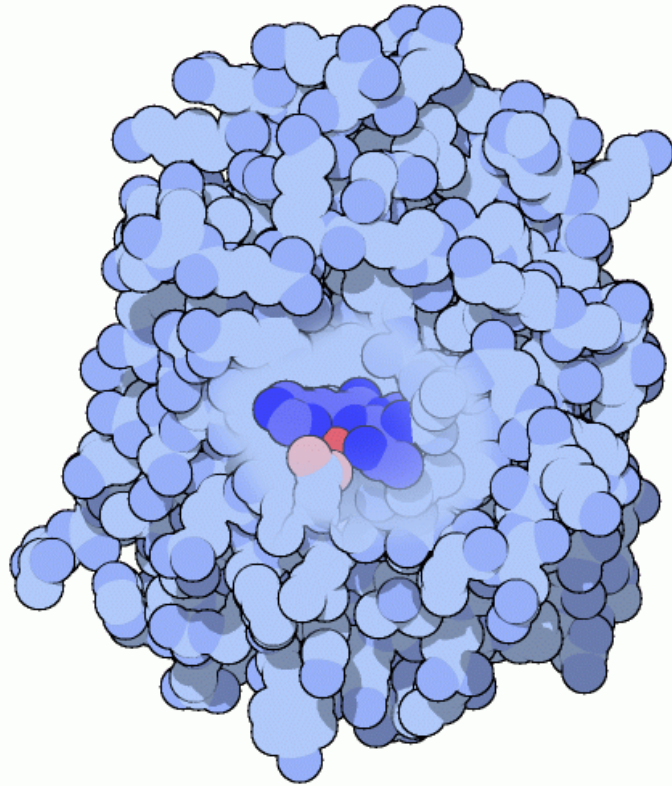
USA

University of California
San Diego, CA, USA

b. 1952

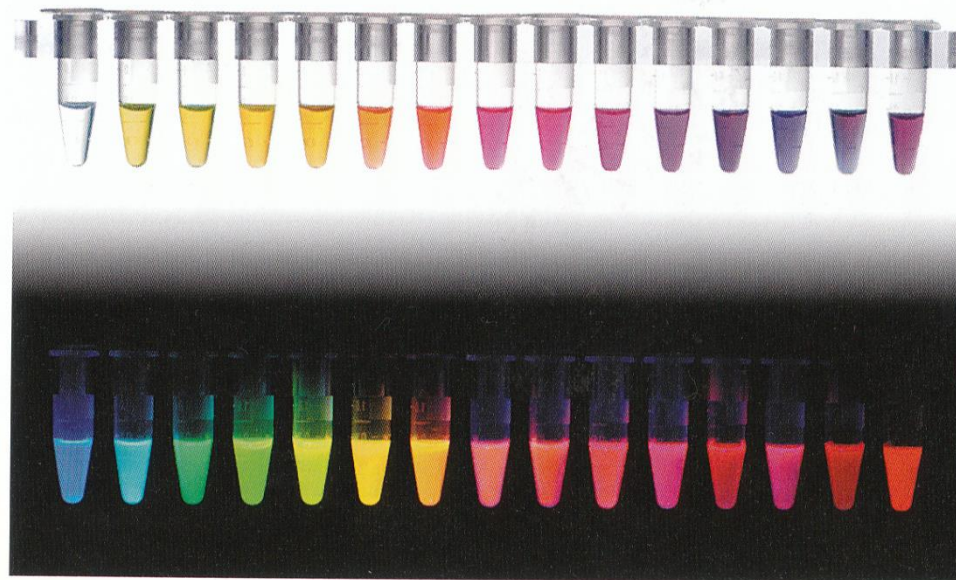
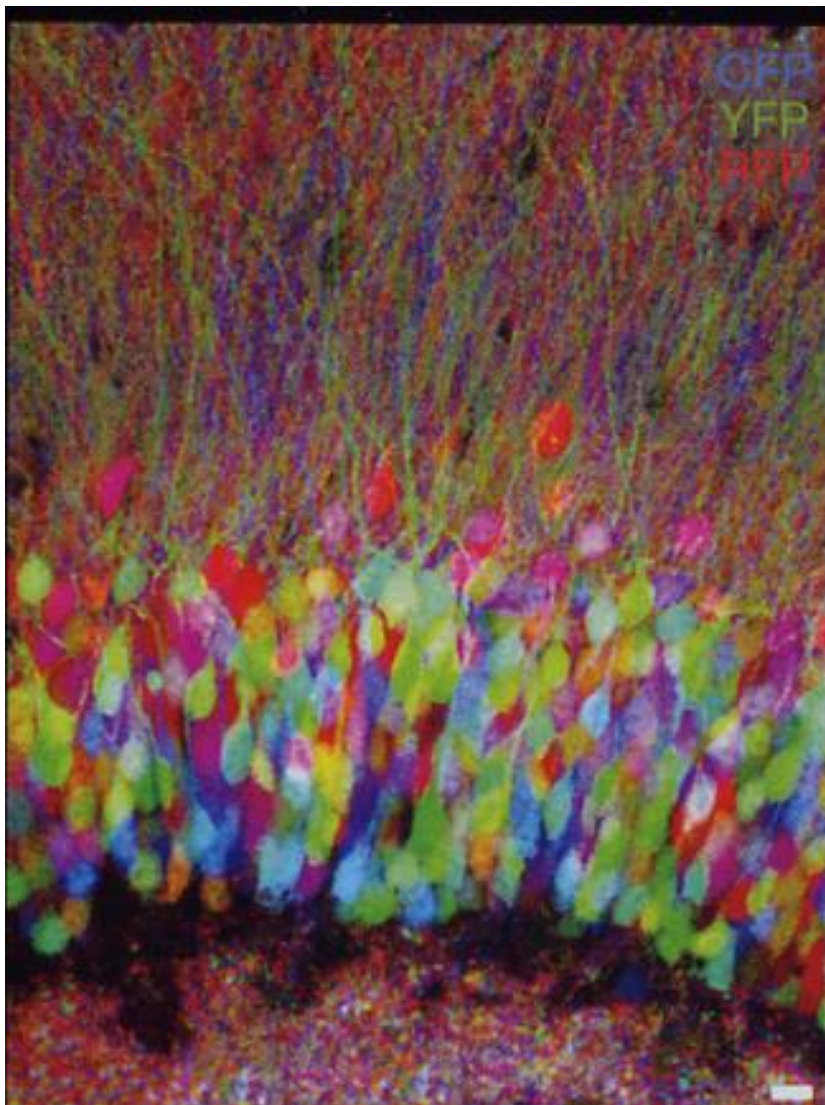
緑色蛍光蛋白質

(Green Fluorescent Protein, GFP)



GFPの発色団

虹色に神経細胞が光っている



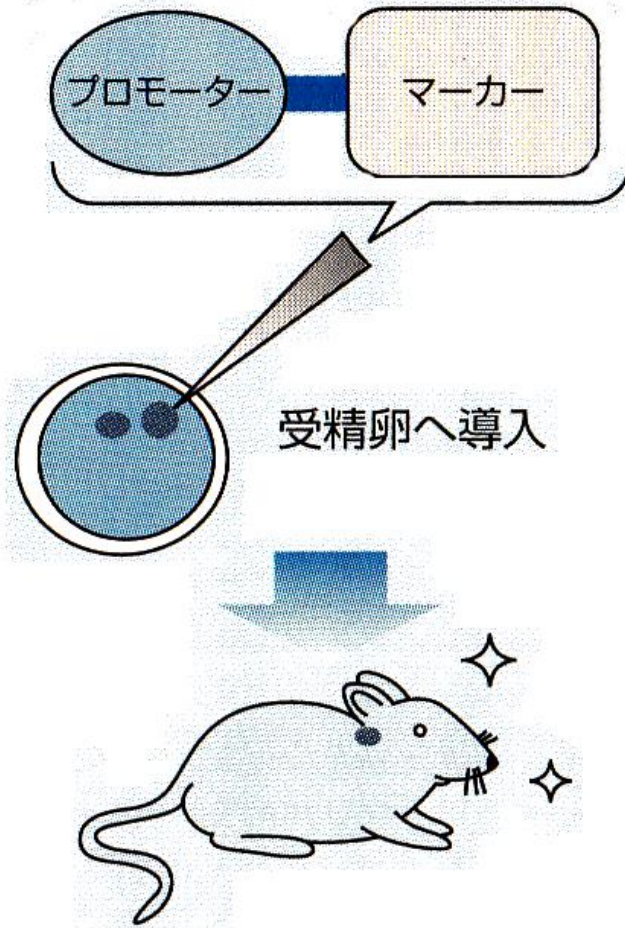
多色の蛍光タンパク質写真。上は自然光、下は紫外線で見た蛍光の色。青から赤までの蛍光を放つ。(Courtesy of Roger Y. Tsien)

GFPで光った線虫の神経細胞



Science, 263, cover (1994).

トランスジェニックマウスを用いた イメージング法



遺伝子の発現を促すプロモーターとマーカータンパク質GFP遺伝子をつないだDNAを受精卵へ導入し、発現させる。これによって神経・シナプス等が安定して可視化できるようになった。



トランスジェニックマウス作成風景(左)とDNA注入中の卵(右)

GFPを注入したマウス初期胚



GFPを発現したマウス初期胚



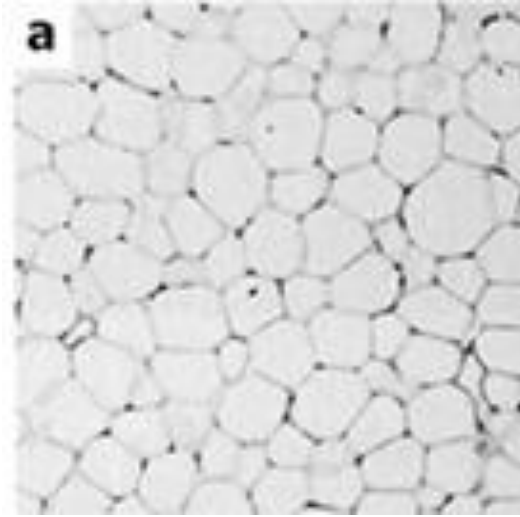
GFPを発現したマウス胎児



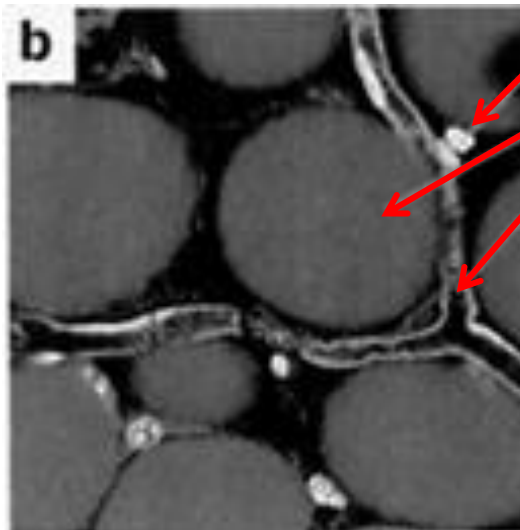
GFPを発現したマウス新生児と対照正常マウス



バイオイメーjing手法で見る脂肪組織



従来の観察手法

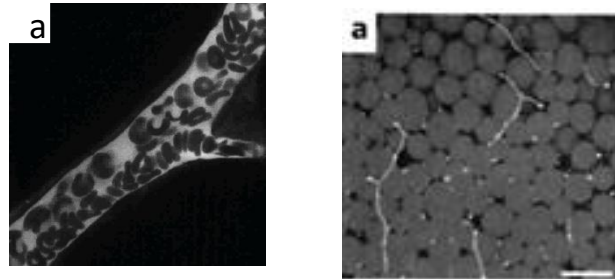


核
脂肪
血管

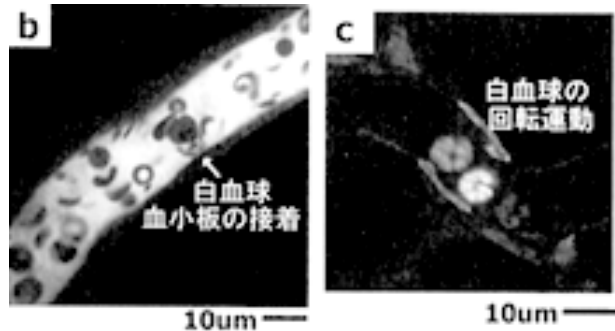
バイオイメーjing
の手法

肥満した細胞組織で慢性炎症が起きている

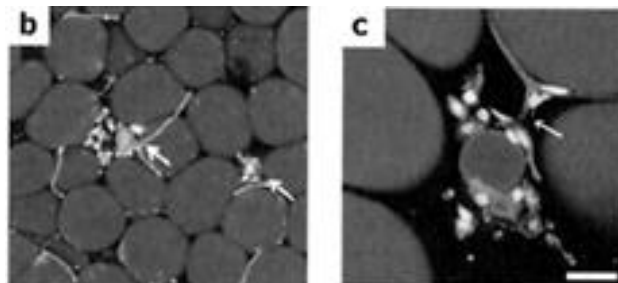
やせ型



肥満型

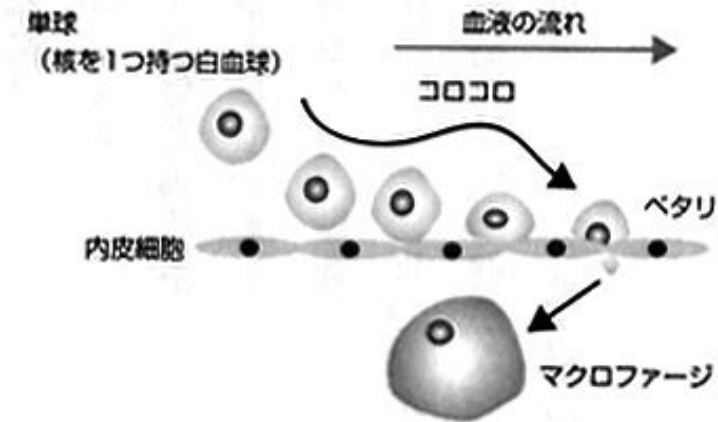


白血球, 血小板の
回転運動や付着と
いった炎症の初期
像が観察された。

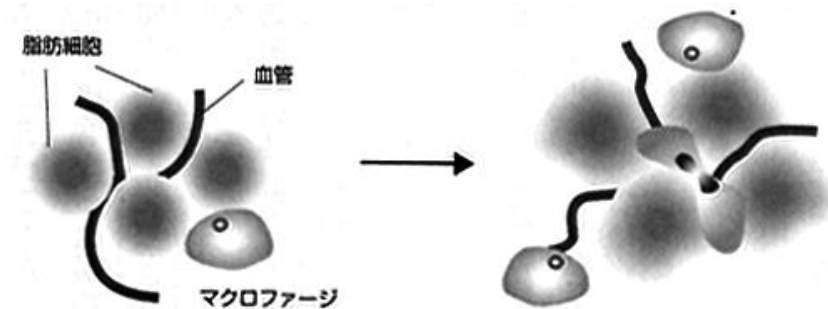


脂肪細胞の数も増
え矢印の部分で血
管が枝分かれし、
周囲に炎症性の細
胞が集まっている。

マクロファージの生成過程



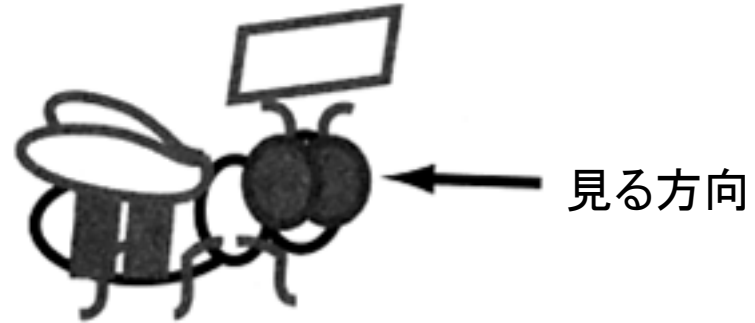
脂肪組織にマクロファージが集まる。



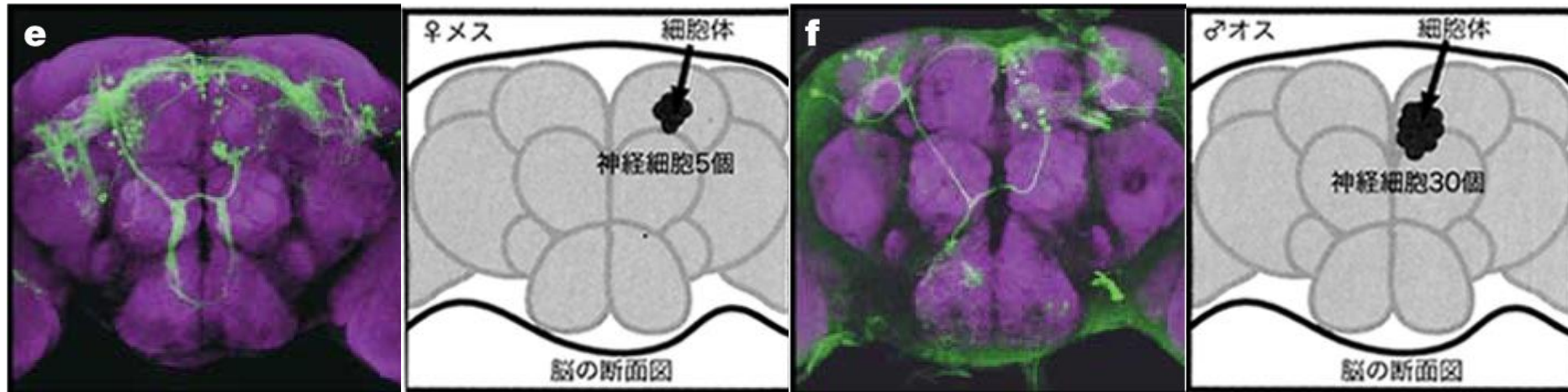
肥満初期、肥満後期、脂肪細胞が死んでいく壊死の過程
において重要な役割を果たす。

オスなのにオスに求愛してしまうハエの変異体 (satori)

ショウジョウバエの脳の断面図



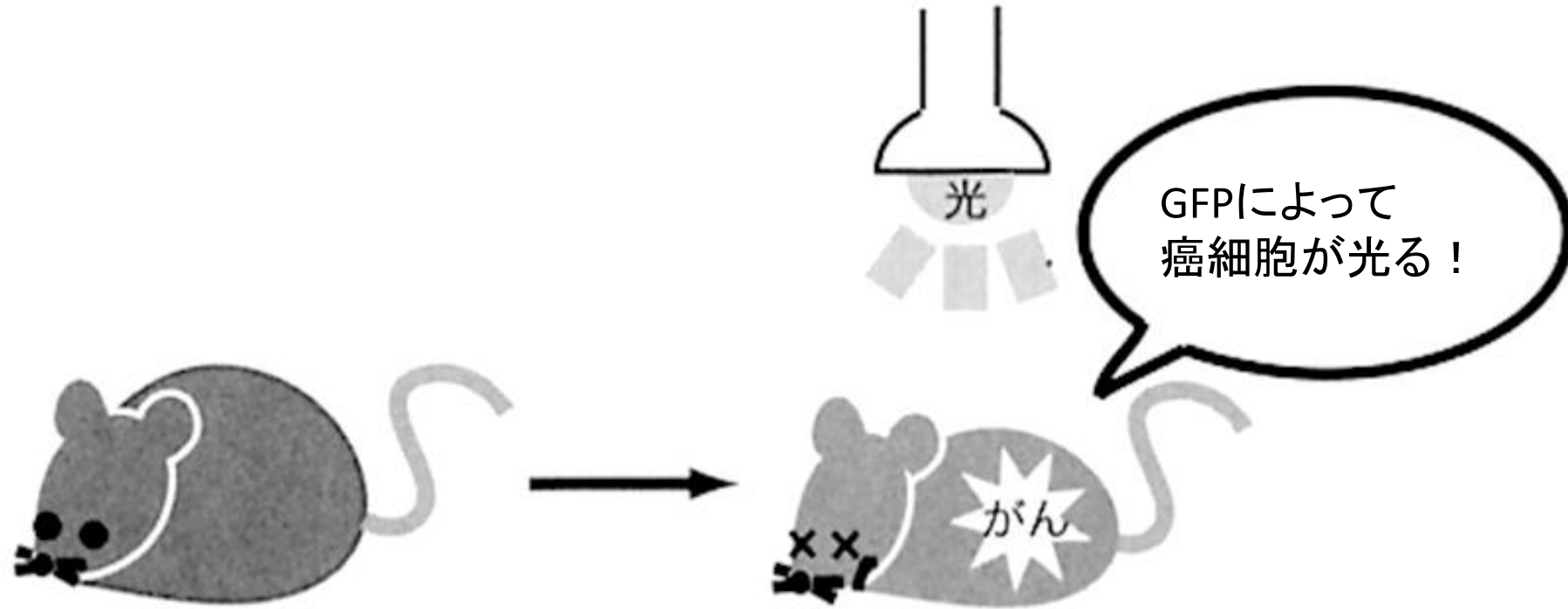
数と形が雄雌で異なる神経細胞集団を染色した象。



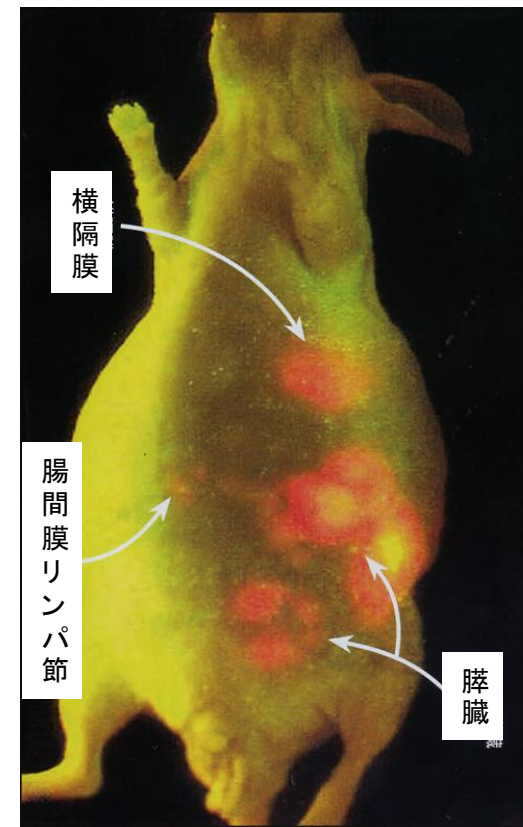
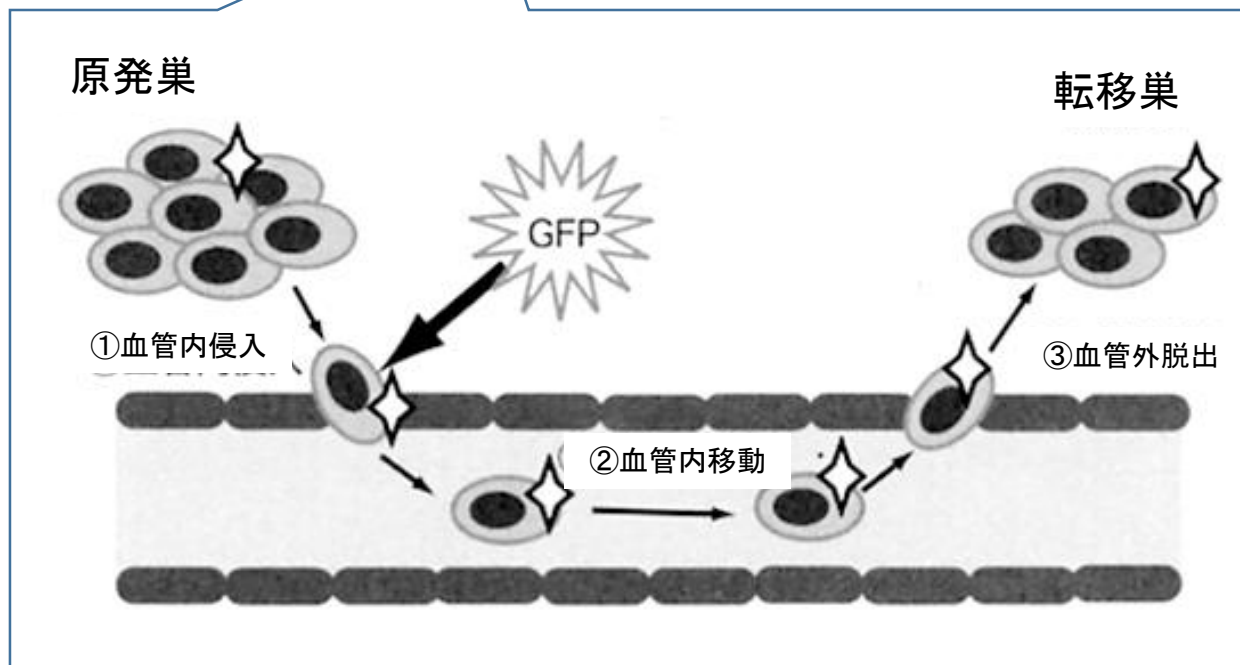
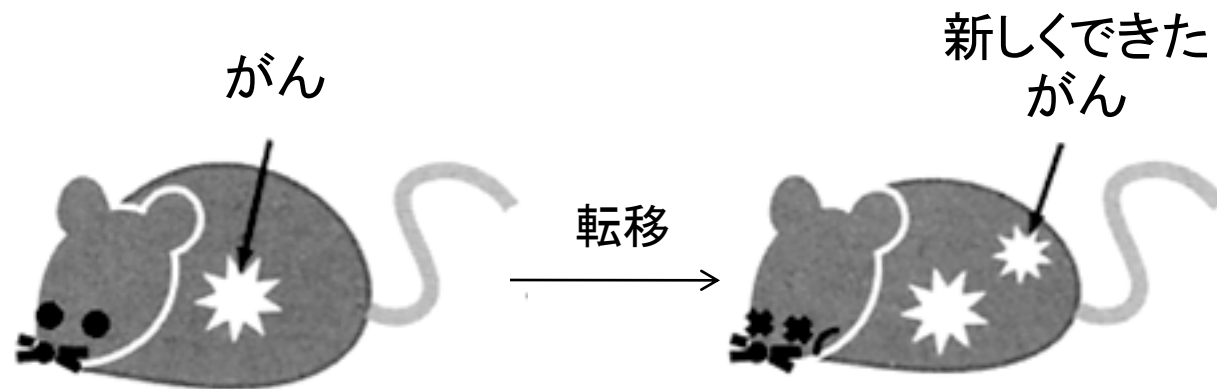
雄の脳

雌の脳

GFPでがん細胞を見る

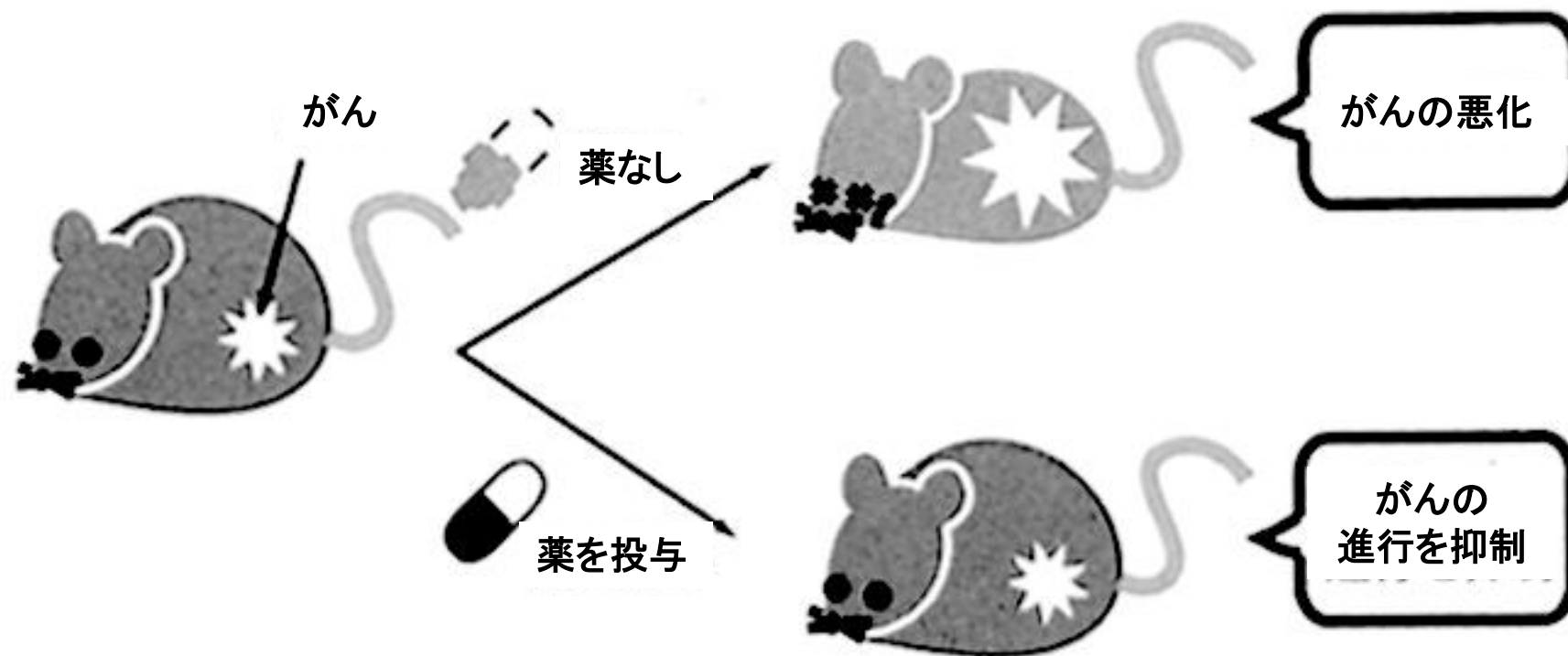


GFPでがん細胞の転移を見る

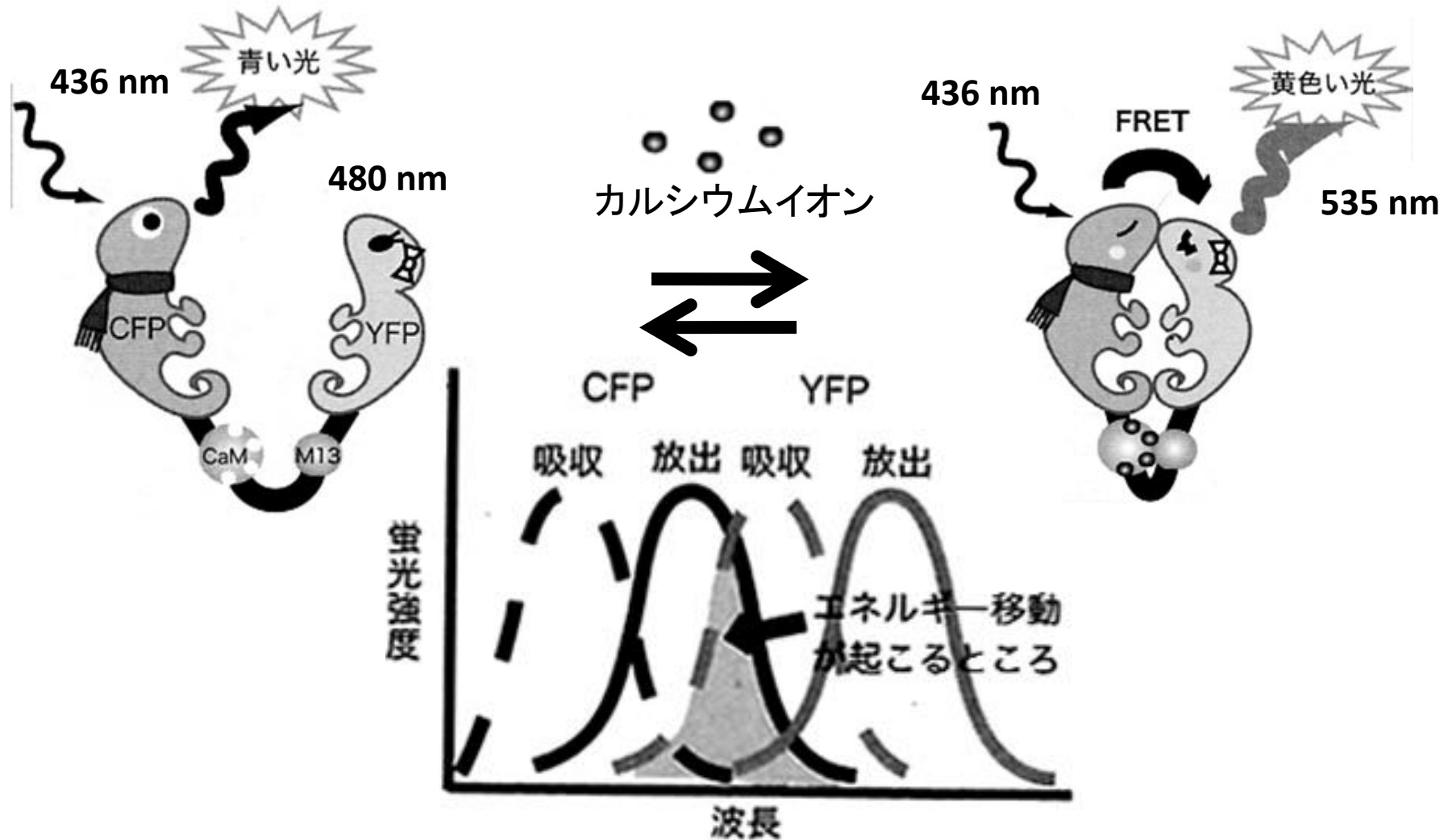


マウスの対内にできた
がんのイメージング

GFPで治療薬の効果を見る



カメレオン(カルシウム濃度に応じて青緑色から黄色へと蛍光色が変化する)



Förster Resonance Energy Transfer, FRET

この過程を化学量論的に記載したのが図4.1.1c(1)式である。蛍光量子収量、すなわち励起状態の発色団のエネルギーのうち蛍光に転換される割合は(2)式で表され、蛍光時定数(蛍光寿命ともいう)は(3)式で表される。プローブの性能等を記載する際によく使われるFRET効率は、励起状態のドナー発色団のエネルギーのうちアクセプター発色団に移動する割合のことで(4)式で表せる。本式からわかるように、FRET効率はドナー発色団とアクセプター発色団との間の距離(r)の6乗の関数である。また、FRETの起こりやすさを示すフェルスター距離(R₀)は(5)式で表されるように、ドナーとアクセプター発色団の配向(κ²)および屈折率(n)さらにはドナーとアクセプターの波長特性(J)に依存する。生物学の実験においてFRETをプローブとして使用する場合、考慮に入れる必要があるのはフェルスター距離、配向因子、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸光スペクトルの重なりの3つである。

図4.1.1c

$$-\frac{d[S]}{dt} = (k_f + k_{FRET} + k_{nr})[S] \quad \text{--- (1)}$$

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{FRET} + k_{nr}} \quad \text{--- (2)}$$

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{FRET} + k_{nr}} \quad \text{--- (3)}$$

$$E = \frac{k_{FRET}}{k_f + k_{FRET} + k_{nr}} = \left[1 + \left(\frac{r}{R_0} \right)^6 \right]^{-1} \quad \text{--- (4)}$$

$$R_0 = [8.8 \times 10^{23} \kappa^2 n^{-4} Q_d J]^{1/6} \quad \text{--- (5)}$$

S: 励起状態のドナー発色団

k_f: 蛍光の速度定数:

k_{FRET}: FRETの速度定数

k_{nr}: 振動緩和や項間交差などの速度定数の和

φ: ドナーの蛍光量子収量

τ: 蛍光寿命

E: FRET効率

r: ドナーとアクセプターの発色団の間の距離

R₀: フェルスター距離

κ²: 配向因子

n: 屈折率

Q_d: ドナーの量子収量

J: ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸光スペクトルの重なり

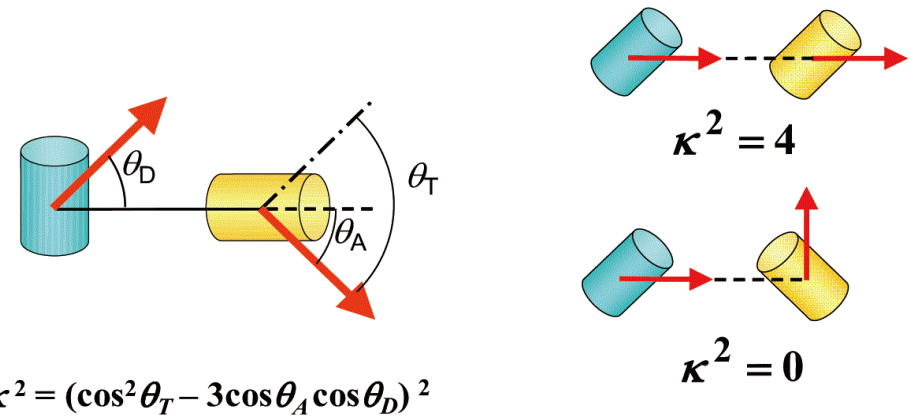
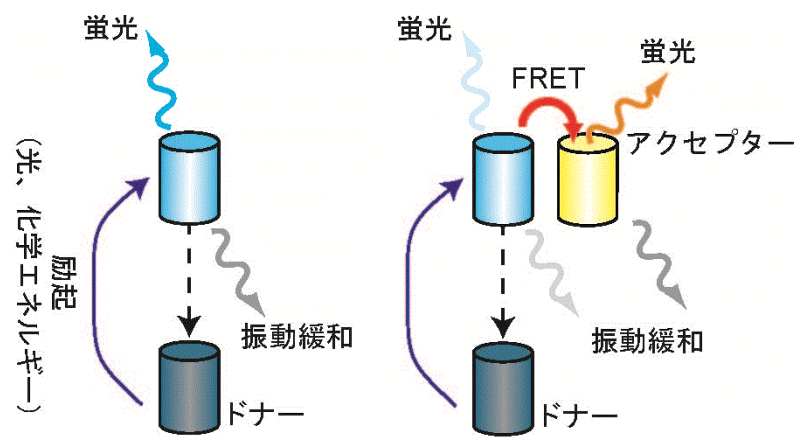
Förster Resonance Energy Transfer, FRET

R0: フェルスター距離

(4) 式から自明のように、ドナー発色団とアクセプター発色団の距離がフェルスター距離のときにFRET効率は50%になる。生物学実験で用いる多くの発色団の場合では3-10nm程度、蛍光タンパク質をドナーとアクセプターに用いる場合は5 nm前後である。

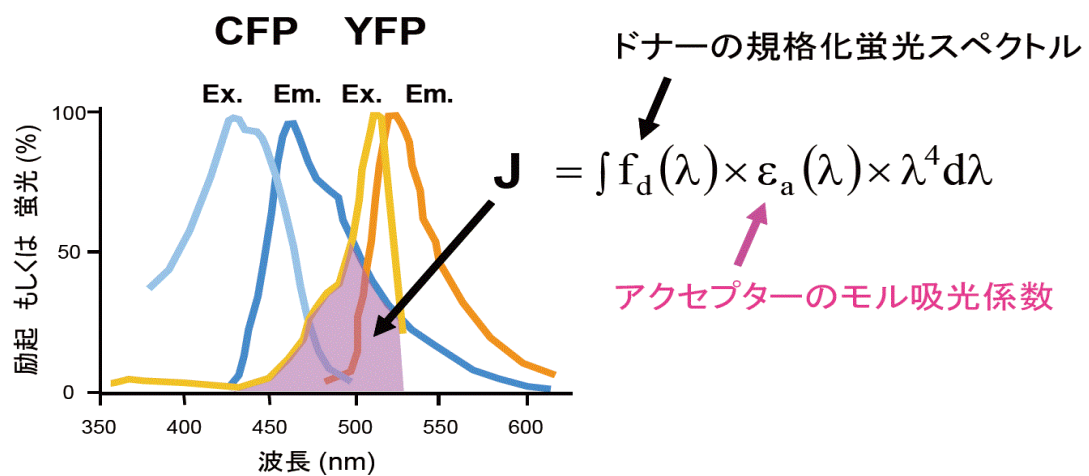
κ2: 配向因子

フェルスター距離(R0)は配向因子(κ2)にも依存している。配向因子はドナー発色団とアクセプター発色団の遷移モーメントのトポロジーを表す定数で、同軸上で平行であれば4、直交すれば0の値をとり、自由に動く場合は平均値2/3をとることが知られており、上記のフェルスター距離(R0)は、κ2=2/3として計算していることが多い。図には配向因子(κ2)の計算式を示してある。θTはドナー発色団とアクセプター発色団の遷移モーメント間の角度、θAおよびθDはドナー発色団とアクセプター発色団の遷移モーメントが、両発色団を結ぶ線と間になす角度である。配向因子(κ2)はドナー発色団とアクセプター発色団が直交すれば最小値0を、平行で同軸上であれば最大値4をとる。

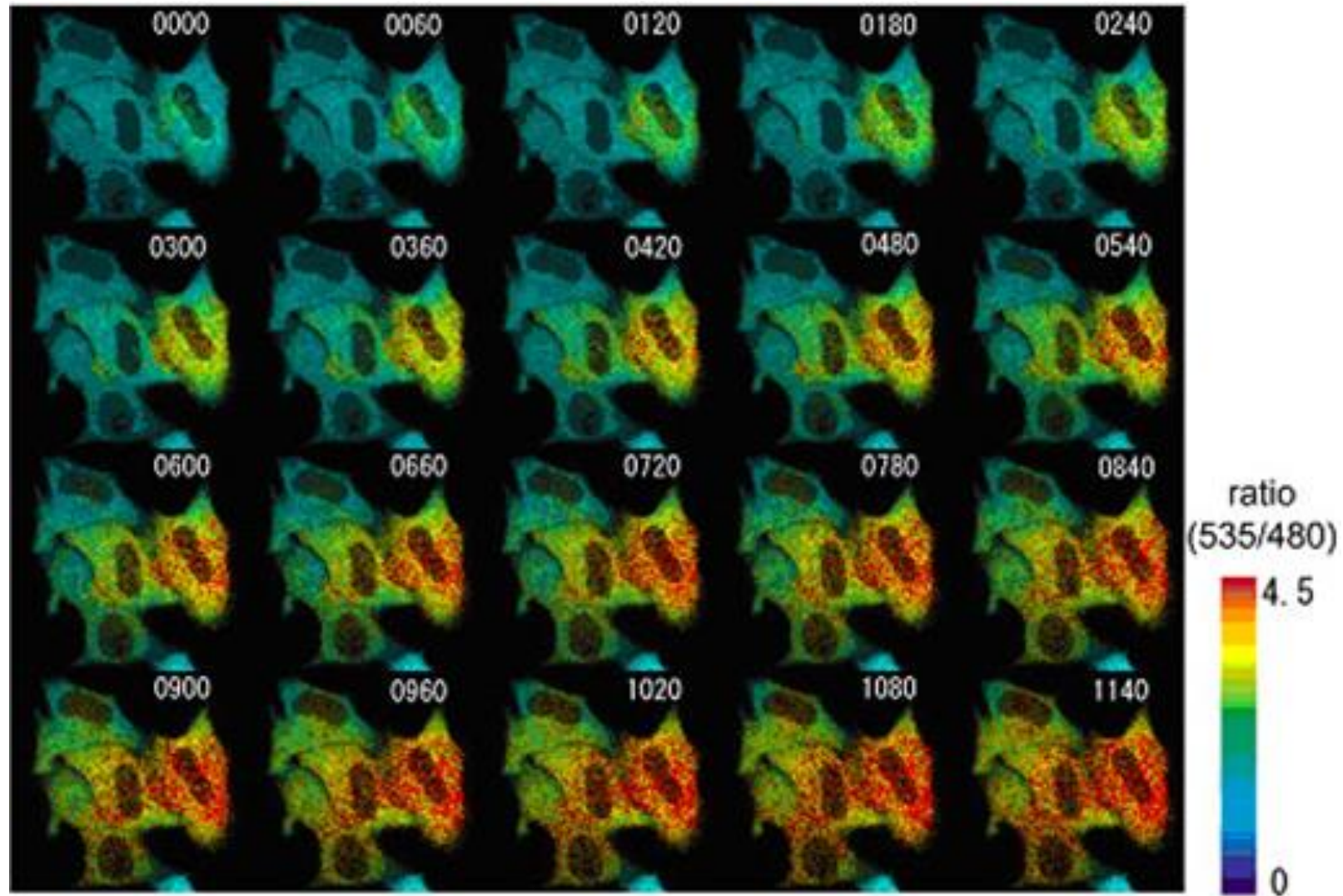


J: ドナー蛍光とアクセプター吸光のスペクトルの重なり

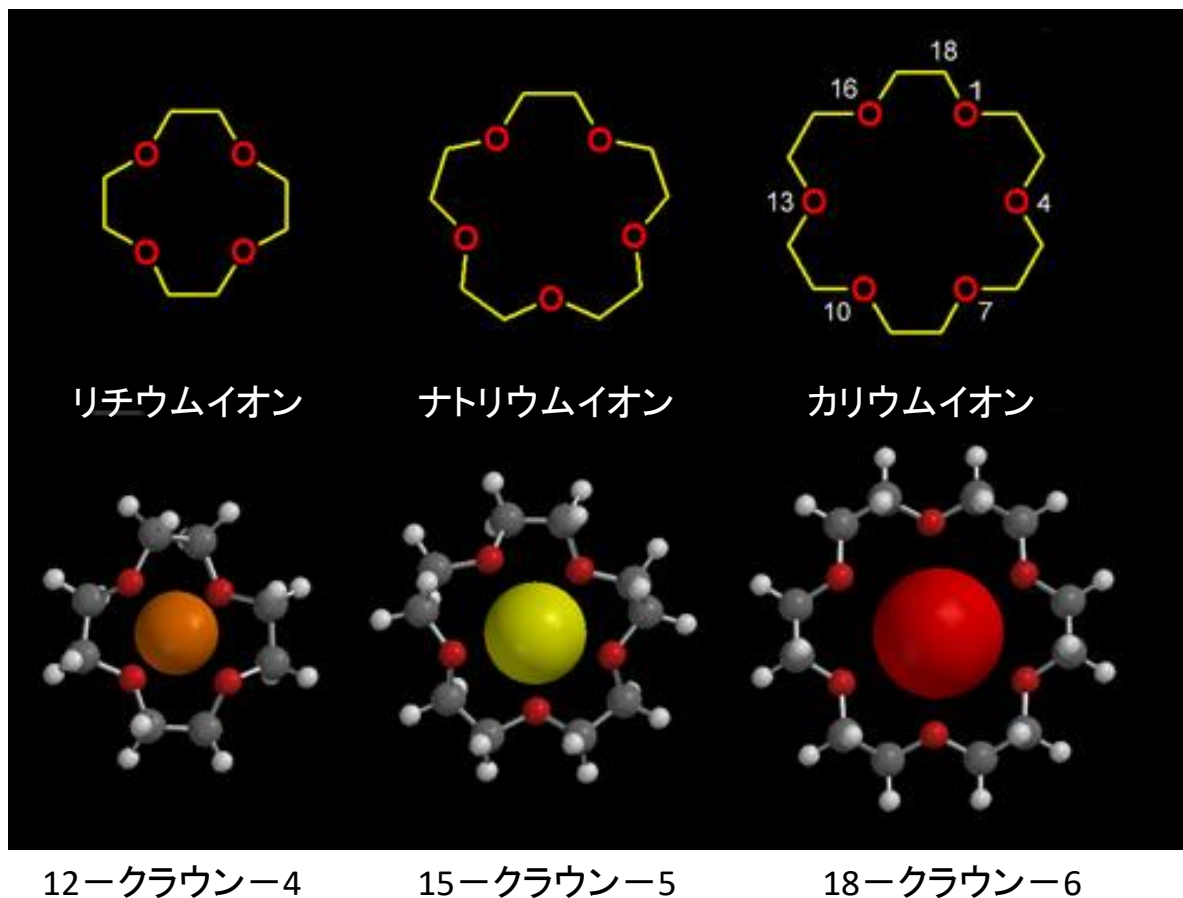
図3Bにはシアン蛍光タンパク質(CFP)と黄色蛍光タンパク質(YFP)のJの計算方法を示している。ドナーの蛍光プロフィールがアクセプターの吸収スペクトルと重なる部分が大きければよりJが大きくなり、従ってフェルスター距離が小さくなって、FRETがおきやすくなる。現在、もっとも広く使われているドナーとアクセプターのペアは、いずれもGFP由来のシアン色および黄色の変異体である。スペクトルの重なり(J)は、企画化したドナーの蛍光スペクトルとアクセプターのモル吸光係数との重なり積分値で与えられる。



ATP刺激による細胞のカルシウム濃度変化。66ミリ秒ごとの画像を
モンタージュしてある。赤いほどカルシウム濃度が高い



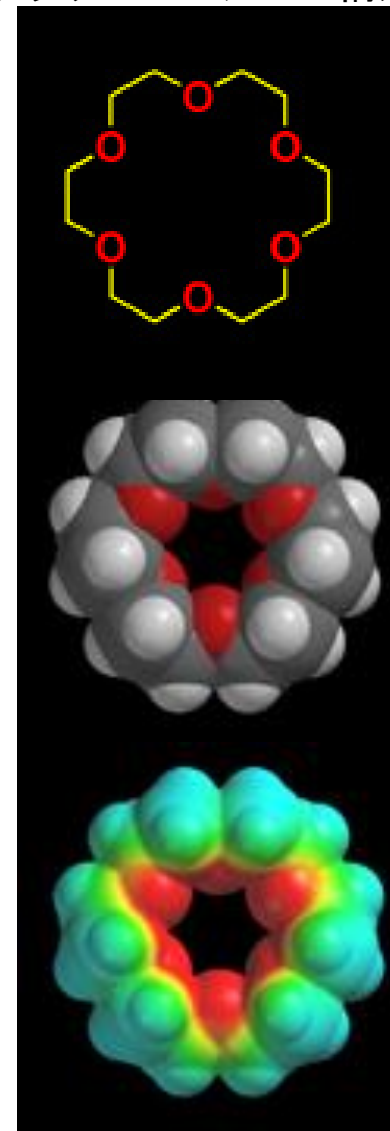
クラウンエーテルとは？



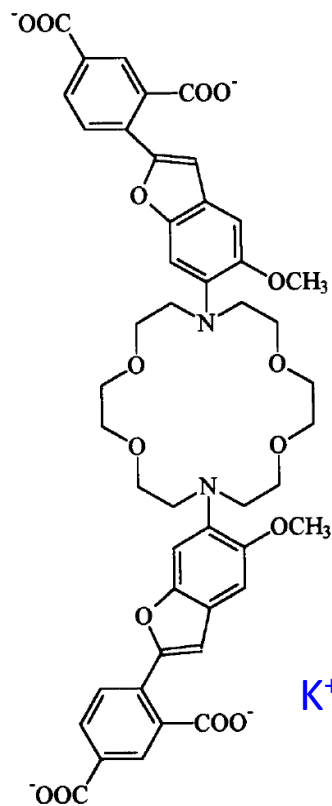
外側は親油性で、内側は親水性であるクラウンエーテルは、“穴”の大きさに合うアルカリ金属イオンや遷移金属イオンなどの様々な金属イオンを「選択的に補捉(?)」するに閉じ込めることができる。

発見者のPedersenは1987年にノーベル化学賞を受賞

クラウンエーテルの構造



K⁺ プローブ

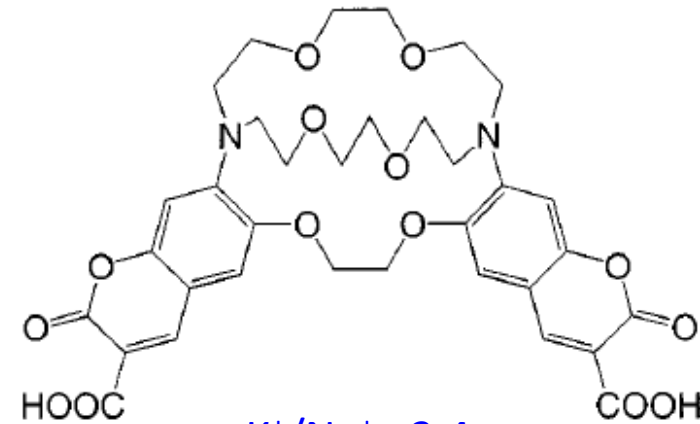


PBF1

K⁺/Na⁺ : 2.6

A. Minta, R. Y. Tsien,
J. Biol. Chem., **264**, 19449-19457 (1989)

CD222



K⁺/Na⁺ : 3.4

R. Croosley et al.,
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1615 (1994).

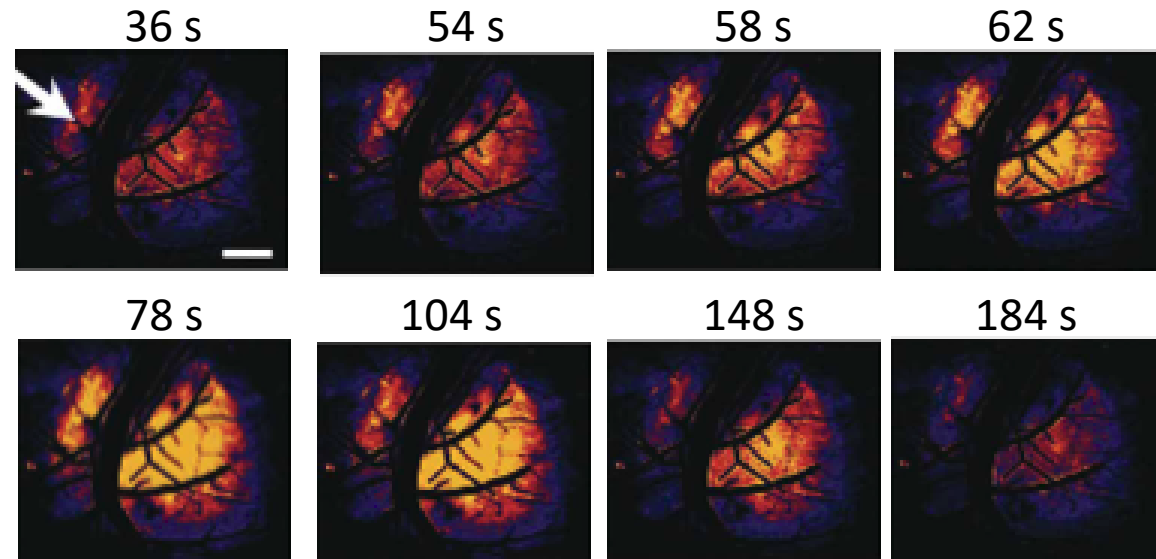
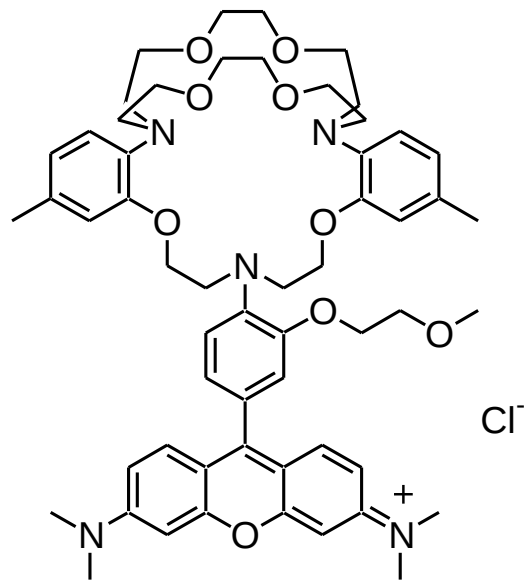
Table. 細胞内 or 細胞外 金属イオン濃度

金属イオン	細胞内濃度(mM)	細胞外 (mM)
Na ⁺	5 ~ 15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	0.5	1 ~ 2
Ca ²⁺	10 ⁻⁴	1 ~ 2

K⁺ プローブ

大脳皮質の神経伝播における
K⁺ウェーブの蛍光イメージング

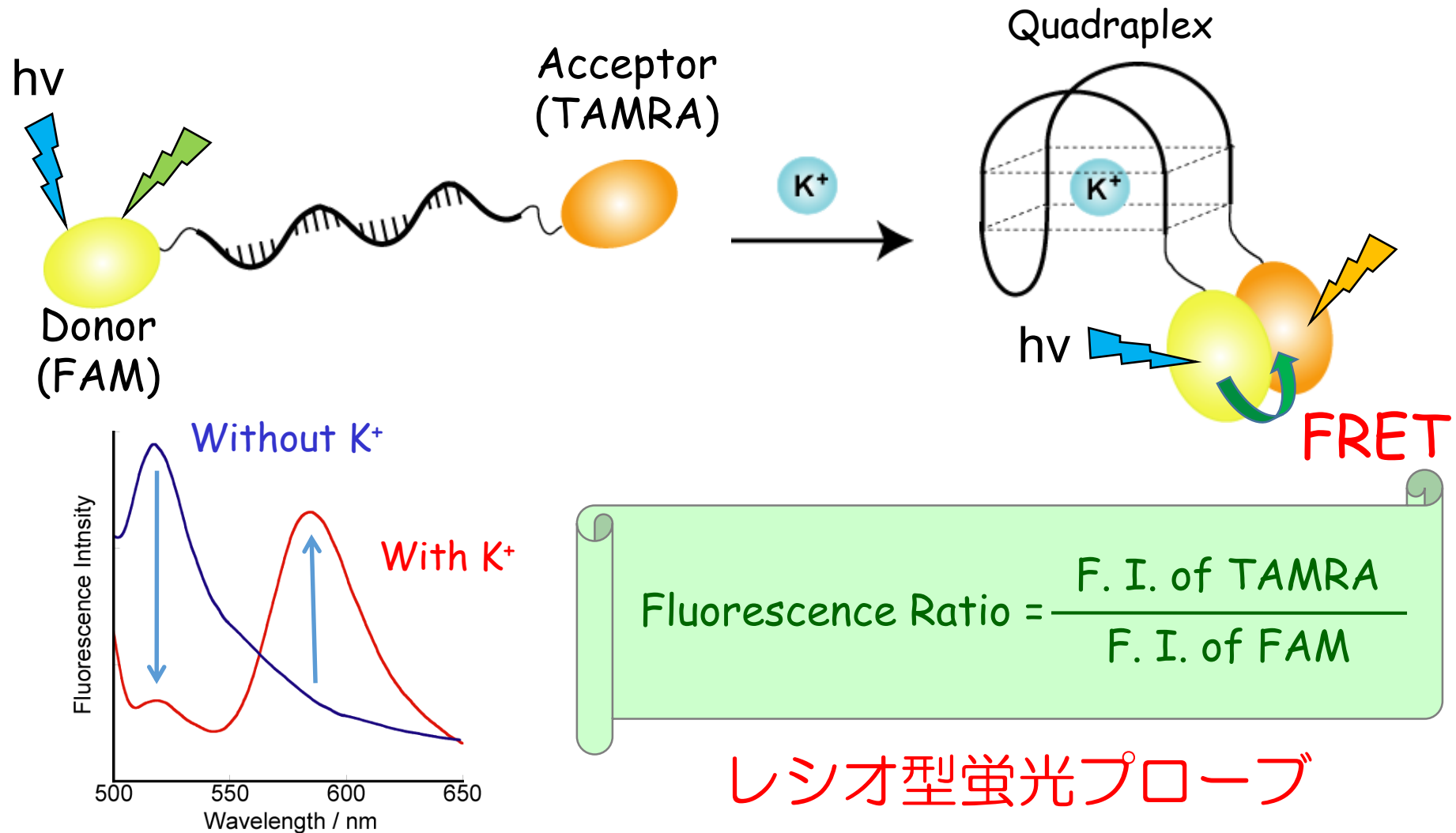
TAC-Red



蛍光強度のみでの評価 → プローブ濃度に応じた相対量での評価

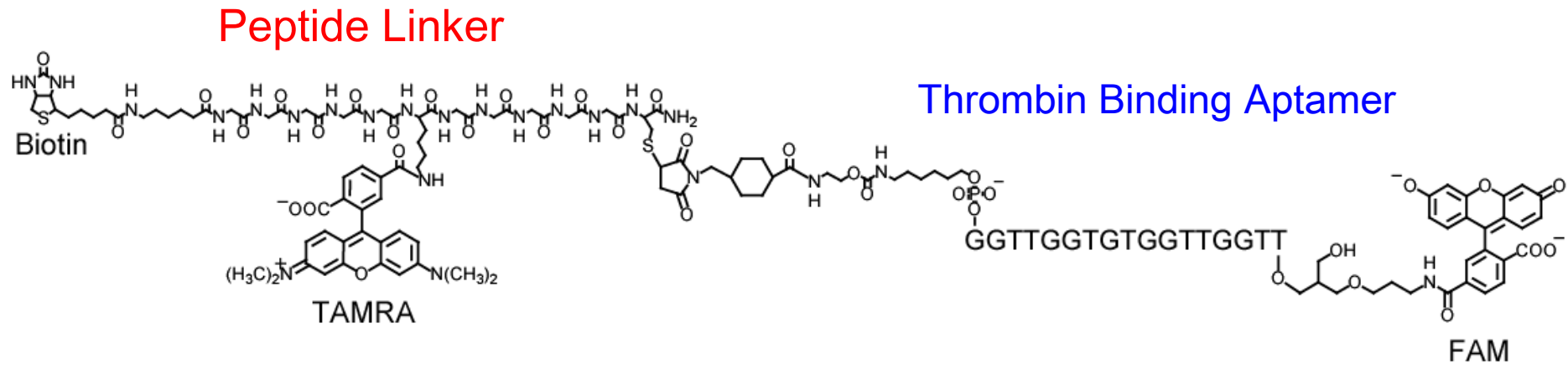
レシオ型蛍光プローブでない。

Potassium Sensing Oligonucleotide (PSO)

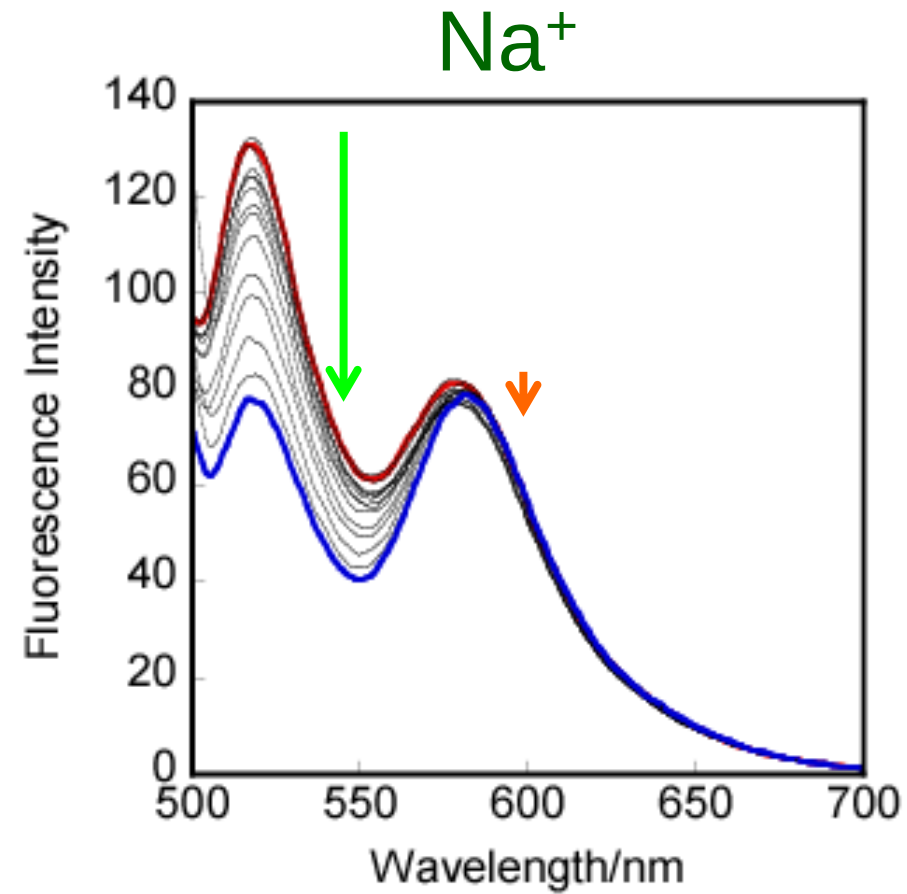
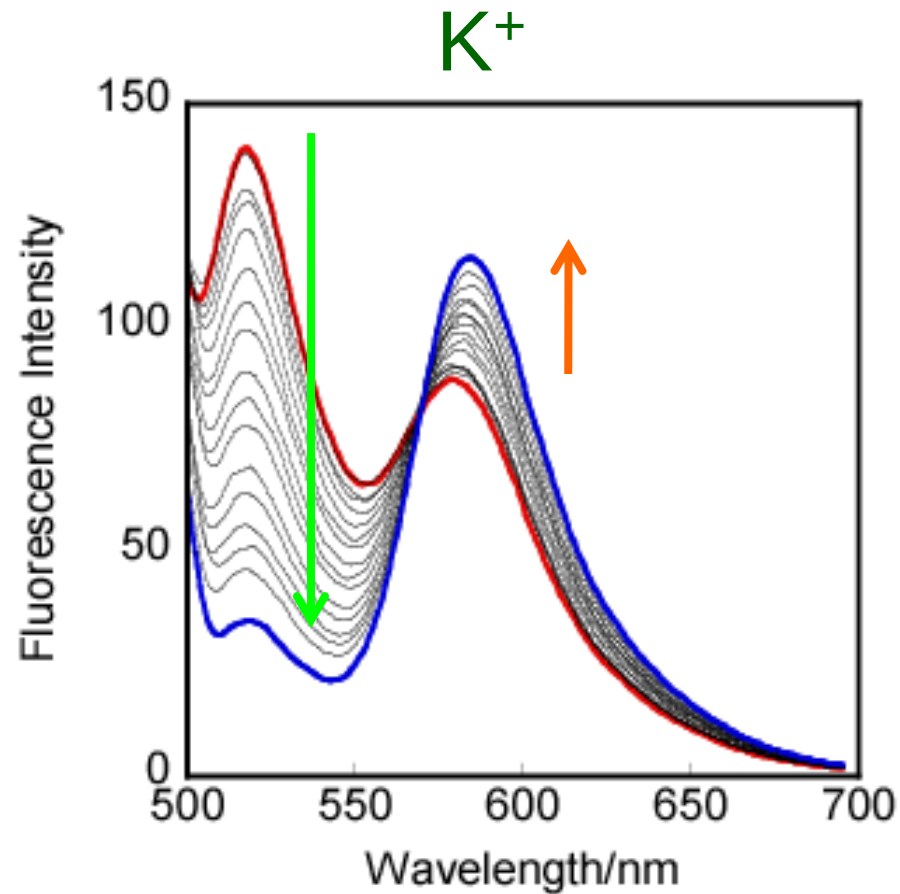


PSO-5

- ①カリウムイオンに対する親和性を保持しつつ、ドナー・アクセプター間距離を離す
- ②四本鎖構造形成後、ドナー・アクセプター間相互作用 (Static Quenching) を防ぐ



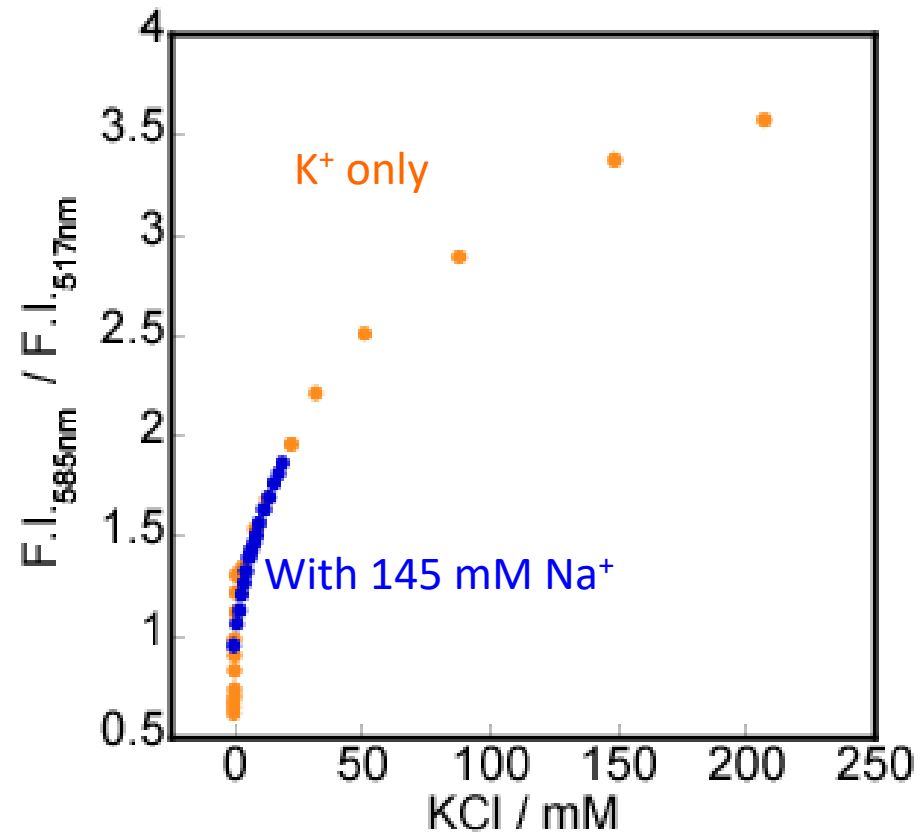
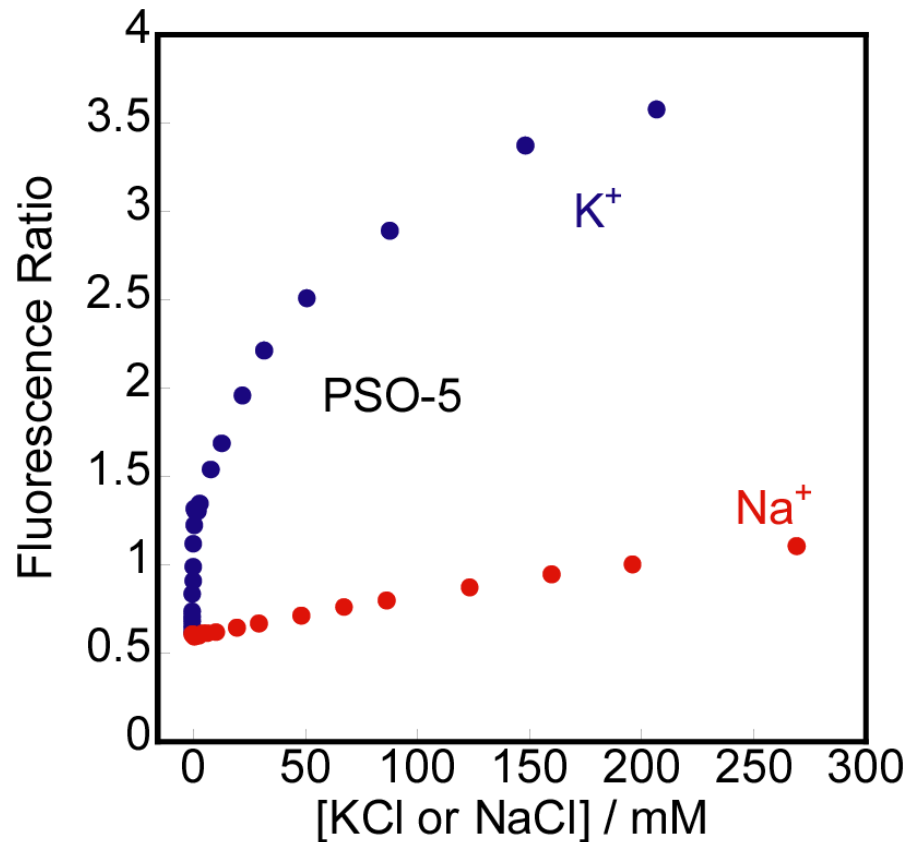
K^+ , Na^+ 添加に伴う蛍光スペクトル変化



0.2 μ M PSO-5, 0.2 μ M streptavidin, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), Ex: 495 nm

K^+ 選択的にアクセプター蛍光強度が上昇
特異的な四本鎖構造形成によるFRET効率の上昇

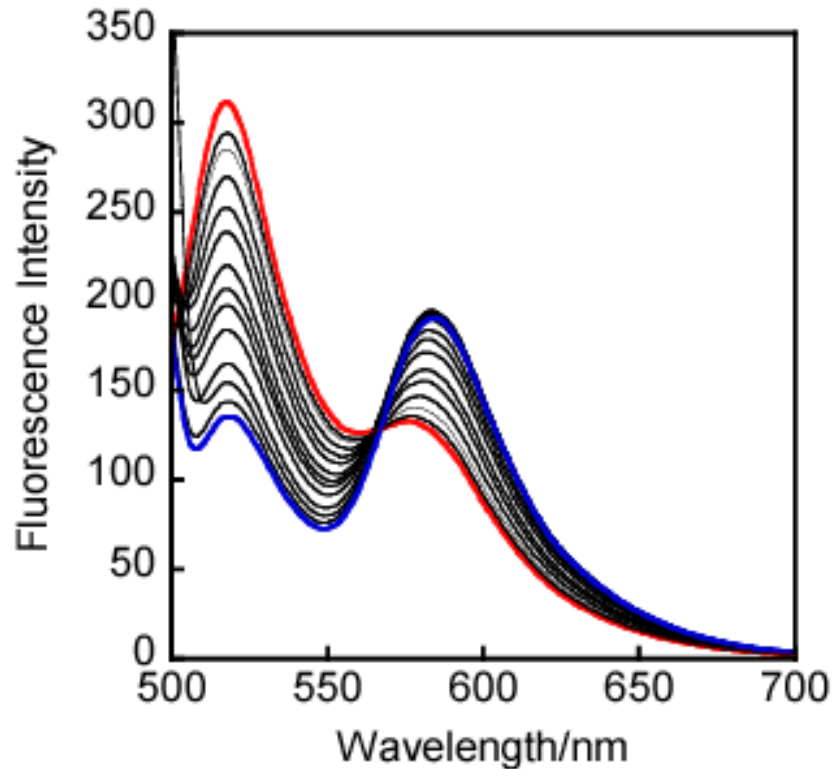
K^+ , Na^+ 添加に伴う蛍光レシオ値変化



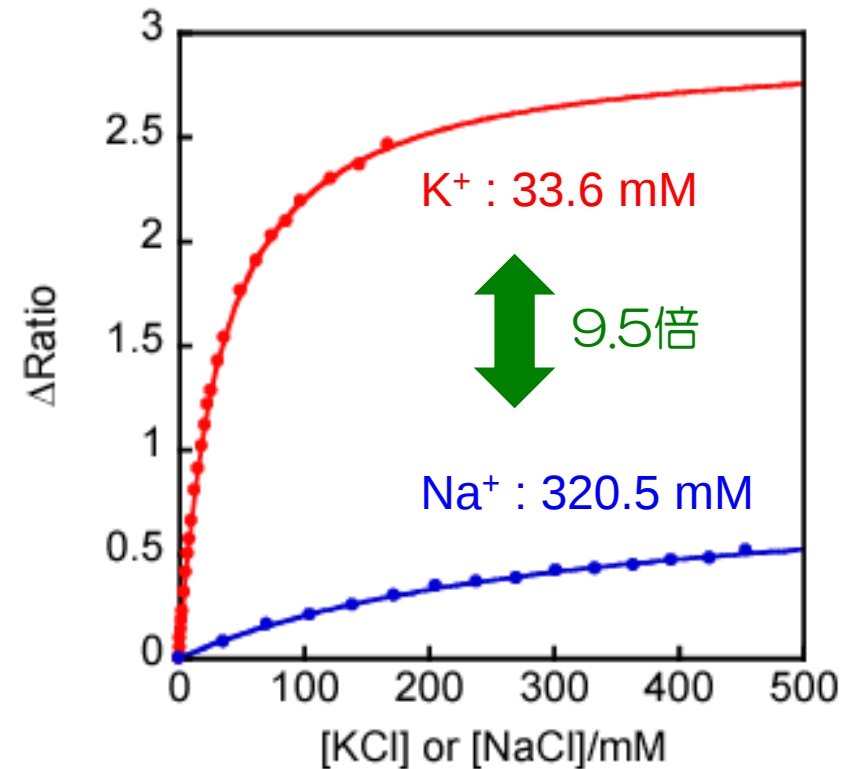
K^+ 選択的に蛍光レシオ値が変化
細胞外 Na^+ 濃度 145 mM存在下でも K^+ を定量可能

K⁺添加に伴うPSO-5の蛍光スペクトル変化(37°C)

蛍光スペクトル変化



蛍光レシオ値変化率プロット

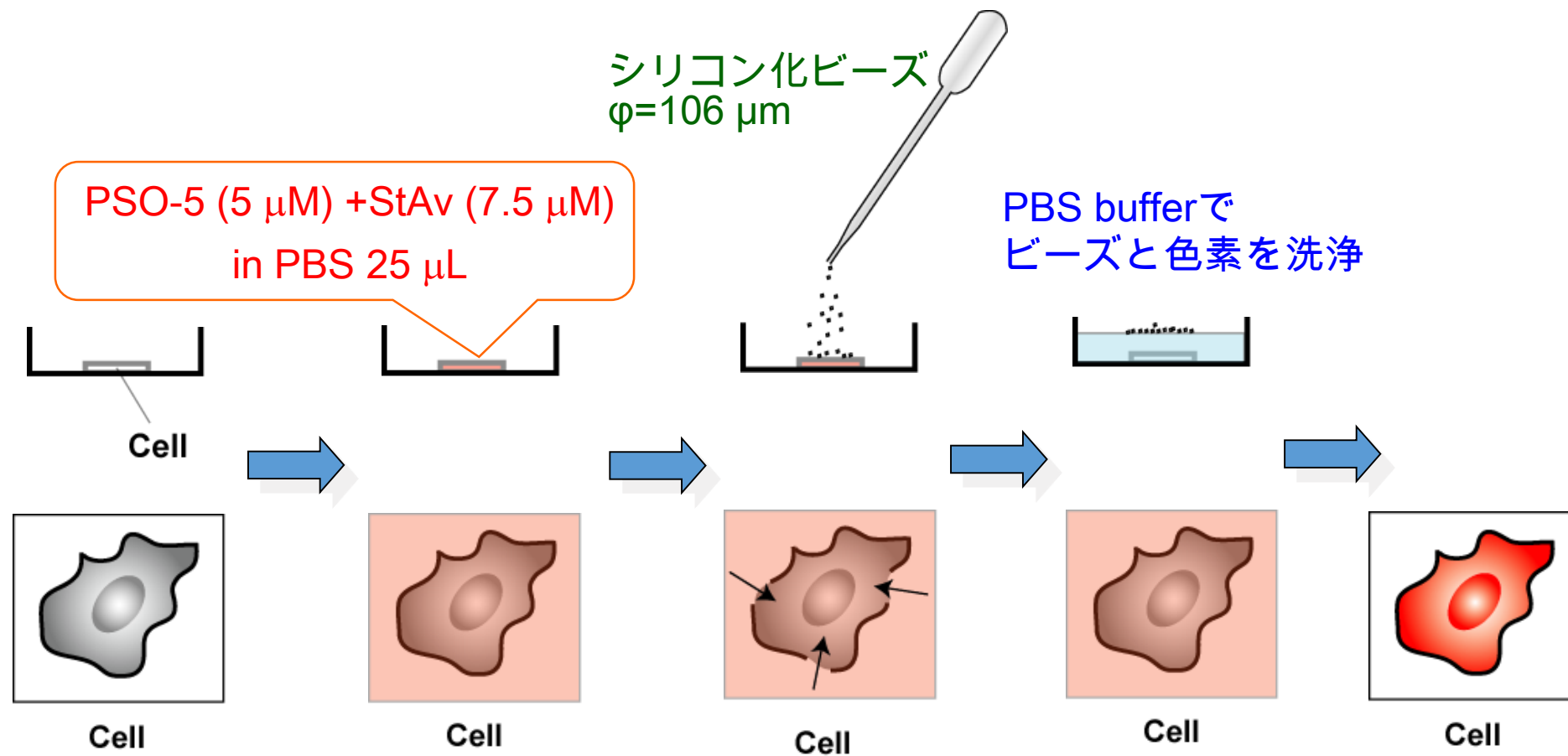


0.2 μ M PSO-5, 0.2 μ M streptavidin, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), Ex: 495 nm.

37°CにおいてもK⁺添加に伴いFRET効率が上昇

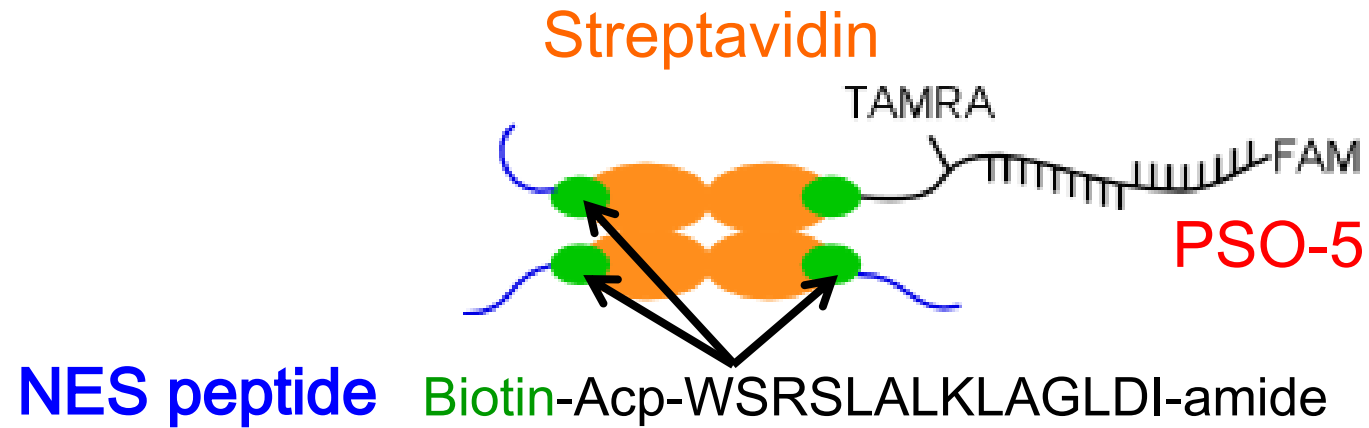
K⁺/Na⁺選択性は9.5倍

ビーズロード法によるプローブの細胞内導入



PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 (pH 7.4).

プローブの核排出について



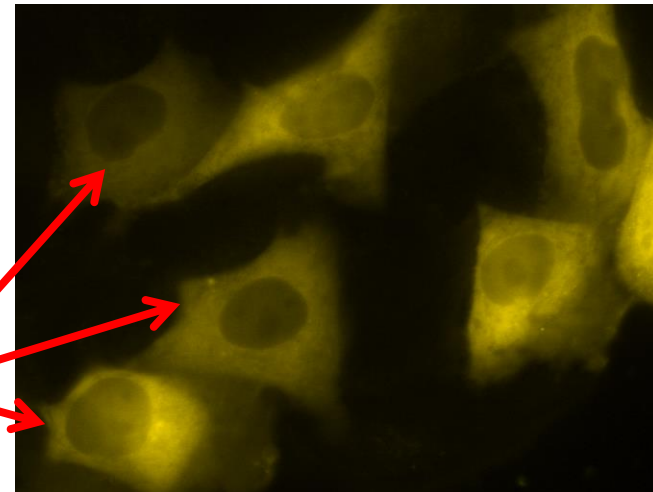
W. Wen et al., *Cell*, **82**, 463 (1995).

5 μ M PSO-5, 7.5 μ M StAv, 22.5 μ M NES peptide
混合溶液 25 μ Lビーズロードして導入した
HeLa細胞の蛍光画像を撮影

(PSO-5 : StAv : NES = 1 : 1.5 : 4.5)

Ex. filter 482/35, Em. filter 585/40 .

核内への移行は防がれ、細胞質のみ染色された。
細胞毒性の消失



PSO-5導入HeLa細胞の細胞内カリウムイオンの 薬剤添加による濃度減少を蛍光イメージング

1) Beads-load of PSO-5 into HeLa cells

5 μ M PSO-5, 22.5 μ M NES, 7.5 μ M ストレプトアビジン 25 μ L in PBS (pH 7.4)

2) Incubation 4 hrs in 10% CO₂ incubator at 37°C

3) Fluorescence Imaging for 5 hrs

薬剤添加後、蛍光画像を10分おきに撮影

Excitation: 488 nm (Ar レーザー)

ダイクロイックミラー: 405/488

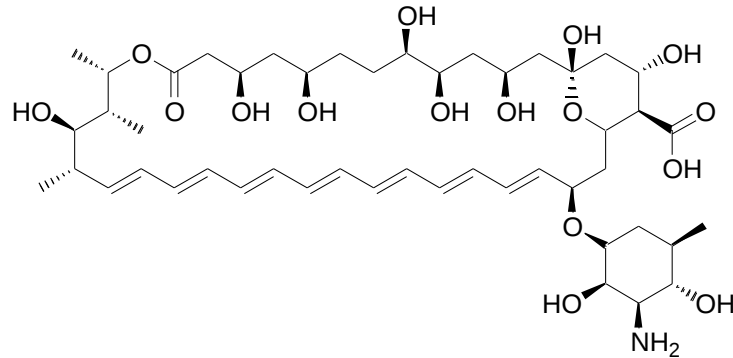
Laser: 10.8, SiHV: 127, Pinhole: 6.5 μ m



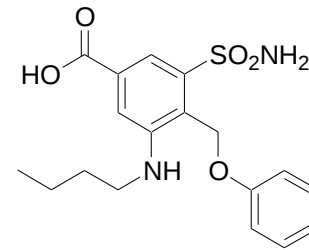
共焦点レーザー顕微鏡システム (A1)
Nicon Imaging Center @ Hokkaido Univ.

細胞内カリウムイオン濃度を減少させる為に使用した薬剤

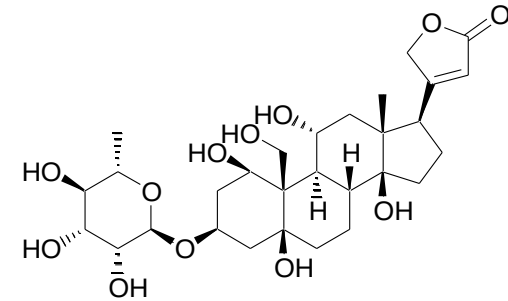
Amphotericin B



Bumetanide



Ouabain



Amphotericin B: 細胞膜のエルゴステロールと結合して細胞膜透過チャネルを形成する。**K⁺の細胞外への流失を促進。**

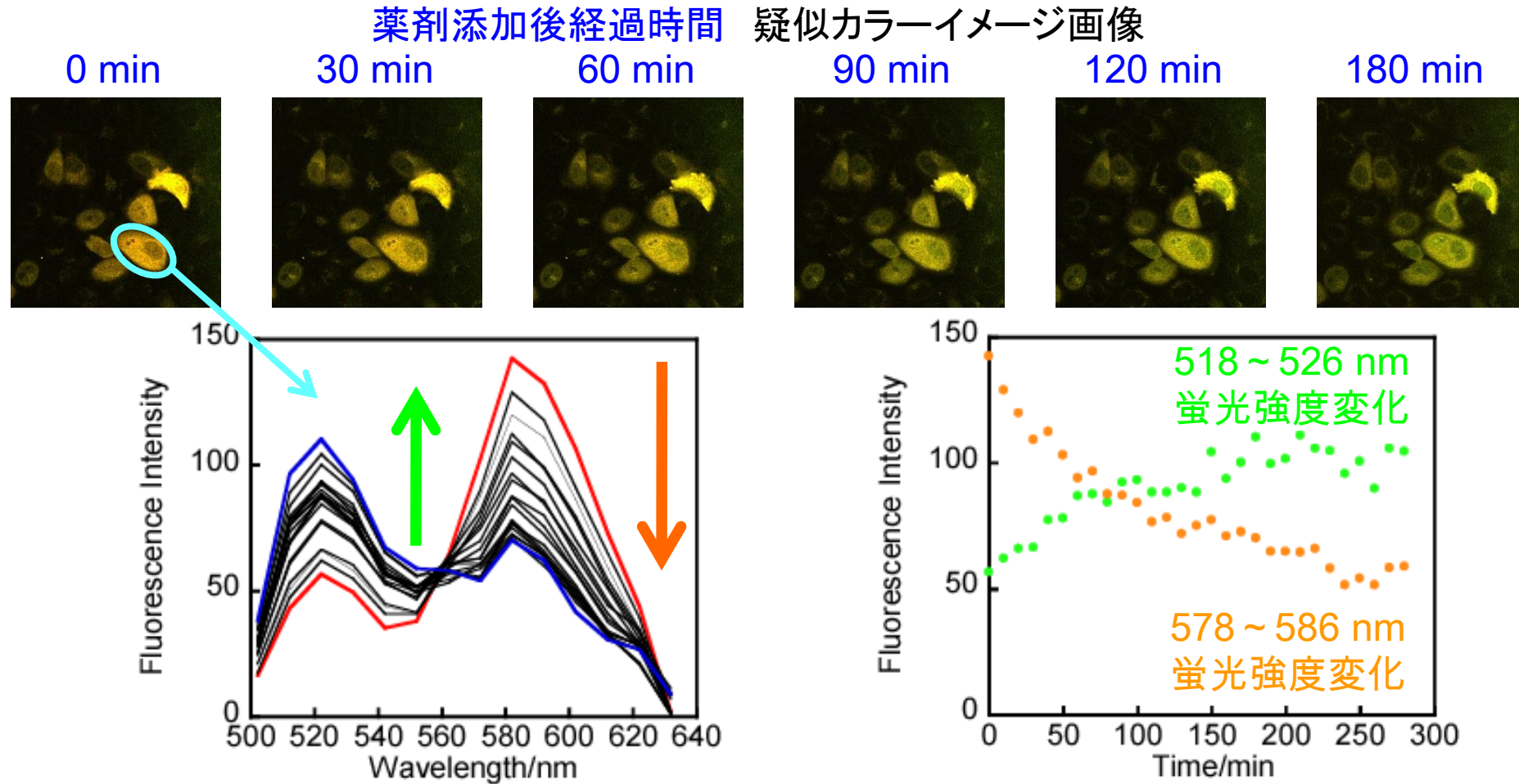
Bumetanide: Na⁺/K⁺/2Cl⁻ 共輸送体阻害剤。**K⁺の細胞内流入を阻害**

Ouabain: Na⁺/K⁺-ATPase 阻害剤。**K⁺の細胞内流入を阻害**

B. Andersson et al., *Toxicology in Vitro*, **20**, 986(2006).

10 μ M Amphotericin B, 10 μ M Bumetanide, 10 μ M Ouabain /DMEM (-), 10% FBS.
500 μ Lを添加して、蛍光イメージングを行った。

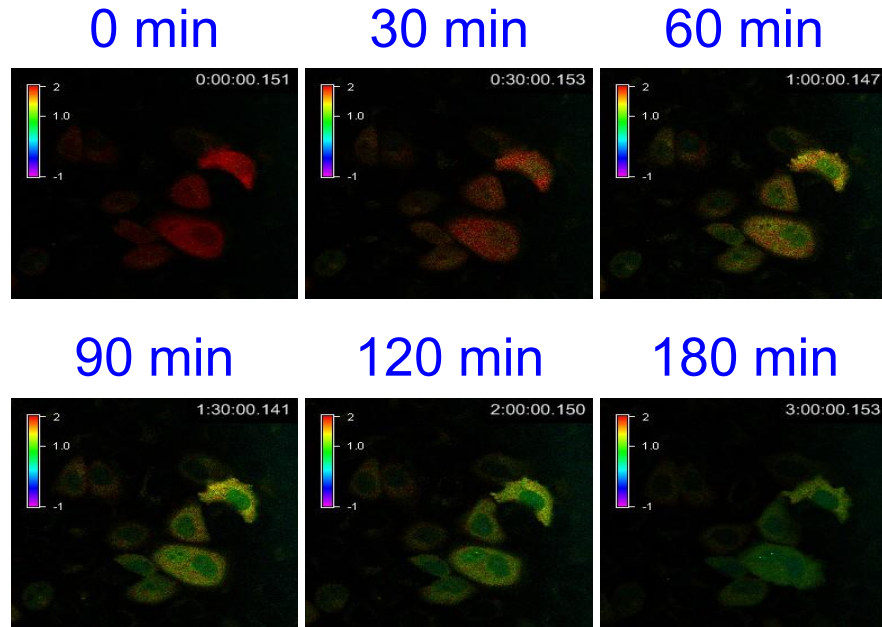
薬剤添加後の蛍光イメージング結果



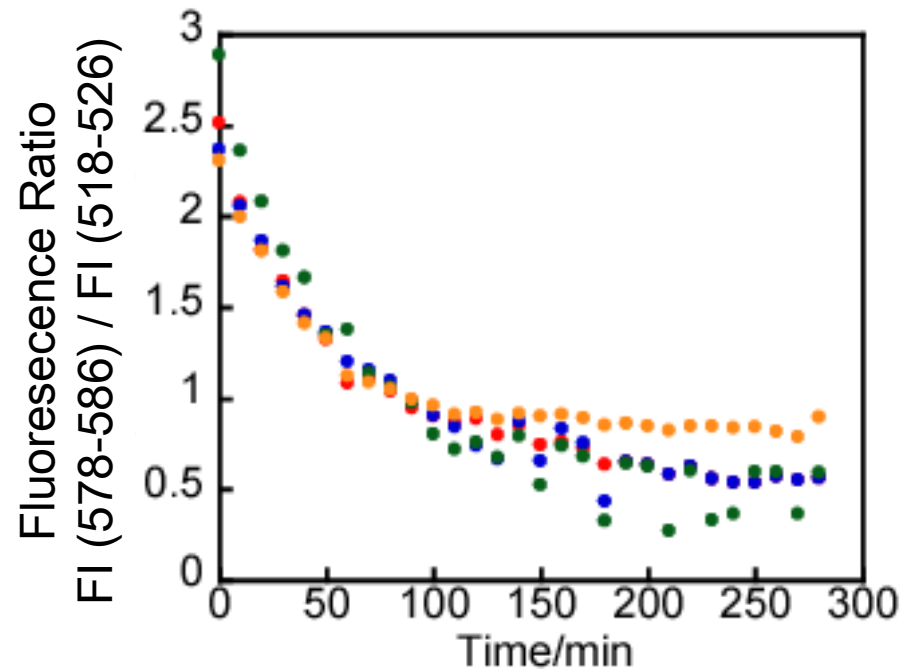
FAM,TAMRA由来の蛍光強度がレシプロカルに変化した。
カリウムイオン濃度減少に伴う、PSO-5のFRET効率の減少

薬剤添加後の蛍光レシオ値変化

薬剤添加後の経過時間ごとの
蛍光レシオイメージング



左図中、4つの細胞のイメージング結果
から算出した蛍光レシオ値の経時変化



細胞内カリウムイオン濃度は2時間程度かけ、各細胞で一様に減少することが示された。

薬剤に対するカリウムイオン減少速度は過去の報告例 (肺中皮腫 [P31]、肺ガン[U-1690]細胞株)と同程度であった。

B. Andersson et al., *Toxicology in Vitro*, **20**, 986(2006).

課題レポート

以下の問いに答えよ。

- (1) 最初の赤色の光を吸収した遷移から、青い蛍光を得ることは不可能である。その理由を述べよ。
- (2) スピン許容過程であることを示す蛍光の性質は何か。その性質はまた、りん光がスピン許容でないことを説明できるか。

まとめ

- 1) 蛍光、りん光について理解する。
- 2) ほとんどの分子は光で励起しても熱拡散でエネルギーは失われる。励起エネルギーを効果的に光として放出できる分子が蛍光、りん光を示す分子として知られている。
- 3) ヤブロンスキー図を理解する。
- 4) 緑色蛍光たんぱく質(GFP)について理解する。
- 5) アルカリ、アルカリ土類金属イオンの重要性を理解する。