

Fig. (5). Translocation of GR-GFP from the cytoplasm to the nucleus induced by Dex stimulation.

A: LSM images were taken before Dex stimulation (a; Dex-) and at 2, 4, 7, 10, and 13 min (b – f) after the stimulation (Dex+). Two measurement positions are marked as + in the image of (a). One is located in the cytoplasm and the other in the nucleus. Scale bar represents 10 μ m. B: M-FCS measurement was carried out at the two positions simultaneously. The two obtained FAFs are overlaid and exhibited on the right side of each corresponding LSM image. The lines and symbols (open, closed circle) denote FAF in the cytoplasm and nucleus, respectively.

was dependent on the level of ligand stimulation. With a lower concentration of Dex, slower trafficking of GR was observed (data not shown). Interestingly, this transport was reversible, as we could see the reverse transport from the nucleus to the cytoplasm after removing Dex from the medium. However, this transport speed was much slower than that induced by Dex stimulation.

For more detailed investigation with single-molecule sensitivity in this process, we measured FCS simultaneously in the cytoplasm and the nucleus. Fig. 5B (g-l) shows the changes of FAFs at two positions. Each FCS measurement was performed for 24 seconds right after the acquisition of each LSM image. The obtained FAFs (g-l) were aligned on the right side of the corresponding LSM image (a-f). The pre-stimulation value of $G(0)$ in the cytoplasm was smaller than that in the nucleus. The value of $G(0)$ indicates a reverse number of molecules (see equation in Materials and Methods). Therefore, a small $G(0)$ value in the cytoplasm indicates a high density of GR molecules. After the stimulation, the relationship between this value in the cytoplasm and in the nucleus gradually changed. Finally, the value of $G(0)$ in the cytoplasm overtook the value in the nucleus, so that the number of GR molecules in the nucleus was larger than that in the cytoplasm. These data from autocorrelation changes agreed well with the results of LSM images.

To evaluate the obtained autocorrelation function, two component fitting was performed. The time course changes in count rates (CR) and number of molecules (N) are shown in Fig. 6A and 6B, respectively. As we demonstrated from the pattern of correlation changes, values of both CR and N in the nucleus were low before stimulation and these values gradually increased after the Dex stimulation. These graphs indicate that the number of GR-GFP molecules might be same at around 5min after the stimulation. Counts per molecule (CPM) were directly calculated as the ratio of CR and N. The CPM can give us important information about the changes of molecular complexes such as polymerization. In case of dimer formation of GR-GFP, the theoretical value of CPM doubles. However, our results as shown in Fig. 6C, did not show any change of CPM during measurement. This means that no dimer complex was formed after the Dex stimulation. A previous report had suggested a dimer complex in the cytoplasm after stimulation of the same ligand by using FCS [15]. To determine the reason for this discrepancy, we need careful experiments under well controlled levels of GR expression in living cells.

Finally, the diffusion time of GR-GFP was also calculated by two-component fitting. The time course of DT for slower components is plotted in Fig. 6D. In the nucleus, the diffusion time of GR-GFP increased significantly after stimulation with Dex (4.4 msec to 62 msec, closed circle line). Contrastingly, the DT of GR-GFP in the cytoplasm decreased (22.3 msec to 2.7msec, open circle line). This indicates a population with slow diffusion of GR-GFP in the nucleus rather than in the cytoplasm. This might suggest that GR in the nucleus interacts with other molecules such as DNA or other transcription factors. Contrary to the change in the nucleus, dissociation of molecules from the GR complex might be considered based on the decrease of the DT in the cytoplasm after the stimulation. However, it is unclear what other target molecules associate with GR in the nucleus. To

confirm this, a more advanced FCS technique, fluorescence cross correlation spectroscopy (FCCS) is available by using two different fluorescence probes conjugated with each target molecule. This method can be applied to analysis of molecular interactions in living cells with higher sensitivity [17, 18].

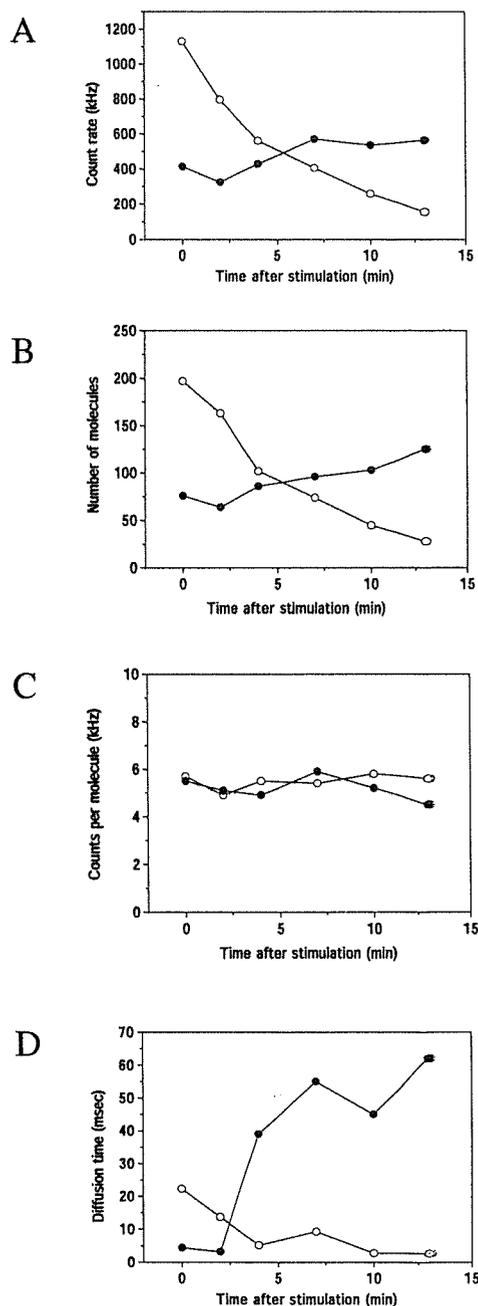


Fig. (6). Time courses in data analysis of FAFs measured in the cytoplasm and nucleus. The changes of values at each point were plotted for pre-stimulation (time 0) and for 13min after stimulation. The lines and symbols (open, closed circle) indicate data in the cytoplasm and nucleus, respectively. A: Count rate (CR), B: Number of molecules (N), C: Counts per molecule (CPM), D: The diffusion time (DT) of the slower component was analyzed by two-component fitting.

The development of a research tool to examine the dynamics in the living cell with high spatial and temporal resolution is needed. In particular, a high-speed monitoring and detection system can be useful for observing biophysical process with high mobility of molecules. Because these bio-processes are usually very fast, the detector should observe many events simultaneously in a target. In this sense, the simultaneous FCS measurement at four points by our M-FCS is not sufficient to fully elucidate the events in a wide area of the cell. Several unique FCS technologies have been proposed for multipoint detection systems. One approach is scanning fluorescence correlation spectroscopy (SFCS), and this can be applied for studying slow events in protein-membrane interactions [19]. Another one is an FCS setup using a diffractive-optical-design [20], and this simultaneous multi-laser scanning technique is a potential high throughput detection system in conjunction with a CMOS single photon avalanche detector [21]. Currently, our M-FCS can measure FCS at only four points simultaneously, and more measurement points are essential for the future development of a two-dimensional (2D) imaging FCS system.

In conclusion, we have developed a new FCS system that can measure the dynamic mobility of molecules simultaneously at 4 points in the living cell. This can be used in studies of kinetic processes of protein interactions for pharmacological applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. T. Shimi and Dr. T. Haraguchi (Kansai Advanced Research Center, Kobe, Japan) for the GFP stable HeLa cell line.

This research was supported by a grant from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), Japan, 2003, and partly supported by JSPS, KAKENHI, Grand-in-Aid for Scientific Research (B) (15370062).

ABBREVIATIONS

FCS	=	Fluorescence correlation spectroscopy
M-FCS	=	Multipoint FCS
LSM	=	Laser scanning microscopy
FRAP	=	Fluorescence recovery (or redistribution) after photobleaching
GFP	=	Green fluorescence protein
Rh6G	=	Rhodamine 6G

GR	=	Glucocorticoid receptor
Dex	=	Dexamethasone
FAF	=	Fluorescence autocorrelation functions
DT	=	Diffusion time
CR	=	Count rates
N	=	Numbers of molecules
CPM	=	Counts per molecule

REFERENCES

- [1] Lippincott-Schwartz, J., Patterson, G.H. (2003) *Science*, **300**(4), pp. 87-91.
- [2] Misteli, T. (2001) *Science*, **291**(2), pp. 843-847.
- [3] Elbi, C., Walker, D.A., Romero G., Sullivan, W.P., Toft, D.O., Hager, G.L., DeFranco, D.B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(9), pp. 2876-2881.
- [4] DeSmedt, S.C., Remaut, K., Lucas, B., Braeckmans, K., Sanders, N.N., Demeester, S.J. (2004) *Adv. Drug Del. Rev.*, **57**, pp. 191-210.
- [5] Kamada, A., Nagaya, H., Tamura, T., Kinjo, M., Jin, H-Y., Yamashita, T., Jimbow, K., Kanoh, H., Wada, I. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**(20), pp. 21533-21542.
- [6] Lellig, C., Wagner, J., Hempelmann, R., Keller, S., Lumma, D., Hartl, W. (2004) *J. Chem. Phys.*, **121**(14), pp. 7022-7029.
- [7] Schmiedeberg, L., Weisshart, K., Diekmann, S., Hoerste, G.M., Hemmrich, P. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, pp. 2819-2833.
- [8] Eigen, M., Rigler R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, pp. 5740-5747.
- [9] Hausteine, E., Schwille, P. (2004) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, pp. 531-540.
- [10] Saito, K., Ito, E., Takakuwa, Y., Tamura, M., Kinjo, M. (2003) *FEBS Lett.*, **541**, pp. 126-131.
- [11] Watanabe, K., Saito, K., Kinjo, M., Matsuda, T., Tamura, M., Kon, S., Miyazaki, T., Ueda, T. (2004) *BBRC*, **324**, pp. 1264-1273
- [12] Weisshart, K., Jungel, V., Briddon, S.J. (2004) *Curr. Pharmaceut. Biotech.*, **5**(2), pp. 135-154.
- [13] Schoneveld, O.J.L.M., Gaemers, I.C., Lamers, W.H. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1680**, pp. 114-128.
- [14] Nishi, M., Tanaka, M., Matsuda, K., Sunaguchi, M., Kawata, M. (2004) **24**(21), pp. 4918-4927.
- [15] Nomura, Y., Tanaka, H., Poellinger, L., Higashino, F., Kinjo, M. (2001) *Cytometry*, **44**, pp. 1-6.
- [16] Dunder, M., Misteli, T. (2001) *Biochem. J.*, **356**, pp. 297-310.
- [17] Kim, S.A., Heize, K.G., Waxham, M.N., Schwille, P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **6**(101), pp. 105-110.
- [18] Saito, K., Wada, I., Tamura, M., Kinjo, M. (2004) *BBRC*, **324**, pp. 849-854.
- [19] Ruan, Q., Cheng, M.A., Levi, M., Gratton, E., Mantulin, W.W. (2004) *Biophysical. J.*, **87**, pp. 1260-1267.
- [20] Blom, H., Johansson, M., Hedman, A.S., Lundberg, L., Hanning, A., Hard, S., Rigler, R. (2002) *Appl. Opt.*, **41**(16), pp. 3336-3342.
- [21] Gösch, M., Serov, A., Anhut, T., Lasser, T., Rochas, A., Besse, P.A., Popovic, R.S., Blom, H., Rigler, R. (2004) *J. Biomed. Opt.*, **9**(5), pp. 913-921.

ChemComm

Chemical Communications

www.rsc.org/chemcomm

REPRINT

*With the compliments
of the Author*

Registered Charity No. 207890

RSC | Advancing the
Chemical Sciences

Calixarene-coated water-soluble CdSe–ZnS semiconductor quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution

Takashi Jin,^{*a} Fumihiko Fujii,^b Hiroshi Sakata,^b Mamoru Tamura^a and Masataka Kinjo^a

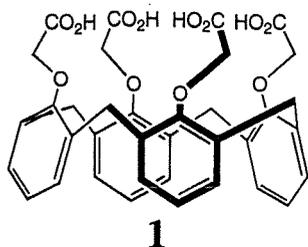
Received (in Cambridge, UK) 4th March 2005, Accepted 8th April 2005

First published as an Advance Article on the web 21st April 2005

DOI: 10.1039/b503178h

A simple method for the preparation of highly fluorescent and stable, water-soluble CdSe–ZnS quantum dots is reported using calix[4]arene carboxylic acids as surface coating agents; the coating of the surface with the calixarene and the conjugation of antibodies to the quantum dots are confirmed by fluorescence correlation spectroscopy.

Colloidal semiconductor quantum dots (QDs) have great potential as a new class of fluorophores for biological and biomedical imaging because of high brightness, long-term photostability and single-light source excitation for multi-colored QDs.¹ The syntheses of monodispersed fluorescent QDs are generally performed in organic solvents with surface passivation by alkyl phosphine oxides such as trioctylphosphine oxide (TOPO).² The resulting QDs are soluble only in nonpolar solvents, making them difficult to use for biological application. So far, many synthetic methodologies for the preparation of water-soluble QDs have been developed by surface modifications with amphiphilic compounds including thiols,^{1,3} polymers,⁴ and phospholipids.^{5a} For example, thiol compounds such as mercaptopropionic acids (MPA) or mercaptoundecanoic acids (MUA) have been widely used as surface coating agents for the preparation of water-soluble CdSe–ZnS QDs.^{1,3} However, thiol coating of the CdSe–ZnS QDs causes a significant decrease in the quantum yield of QD fluorescence,⁶ and the resulting QDs show poor stabilities in water.^{3c,6} Surface coating with polymer and lipids can preserve the quantum yield of QD fluorescence, but the size of the QDs tends to be much larger than that of the initial QDs.^{4b,5} The large size of QDs is not suitable for use in fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based research.⁷ Here, we report a very simple method for the preparation of water-soluble semiconductor CdSe–ZnS QDs using calix[4]arene carboxylic acids as surface coating agents. The calixarene coating secures the high emission efficiency (ca. 30%), the smaller size of QDs (<10 nm in diameter), and the coupling of biomolecules to the surface of the QDs.



Calixarene-coated CdSe–ZnS QDs were prepared by mixing calix[4]arene carboxylic acids⁸ (**1**) and TOPO capped CdSe–ZnS QDs^{2b,c} in tetrahydrofuran at room temperature. After deprotonation of the carboxylic groups of the calixarene, water-soluble CdSe–ZnS QDs could be obtained.⁹ Fig. 1 shows the fluorescence spectra of water-soluble CdSe–ZnS QDs coated by **1**, MPA, and MUA. The **1**-coated QDs exhibit higher emission efficiency compared to the MPA- and MUA-coated QDs by a factor of 3.5–20. The quantum yields are estimated to be 0.28 and 0.34 for the **1**-coated QDs with emission peaks at 575 nm and 610 nm, respectively.¹⁰ It is well known that the calix[4]arene **1** can selectively bind Na⁺ cations.⁸ We checked the effect of Na⁺ and K⁺ cations on the fluorescence intensity of **1**-coated QDs (610 nm emission) in water. The fluorescence intensity was almost constant up to 10 mM NaCl (or KCl), and significant effects of the cations on the fluorescence spectra of **1**-coated QDs were not observed. However, in the presence of large amounts of Na⁺ or K⁺ (100 mM), fluorescence quenching of ca. 10% was observed.

To estimate the Stokes–Einstein hydrodynamic size of the QDs, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was used. FCS measures the fluorescence autocorrelation function $G(\tau)$ ¹¹ which gives the diffusion rates of fluorescent molecules in solution. The $G(\tau)$ curves are measured by using a compact FCS system (C9413, Hamamatsu Photonics K. K., Japan). Fig. 2 shows the $G(\tau)$ of **1**- and thiol-coated QDs which have an emission peak at 610 nm in tetraborate buffer. For comparison, a $G(\tau)$ curve for green fluorescent protein (GFP) is also shown. All of the $G(\tau)$ curves are fitted using a simple one-component model.¹² The diffusion time¹² of the **1**-, MUA- and MPA-coated QDs, and GFP was

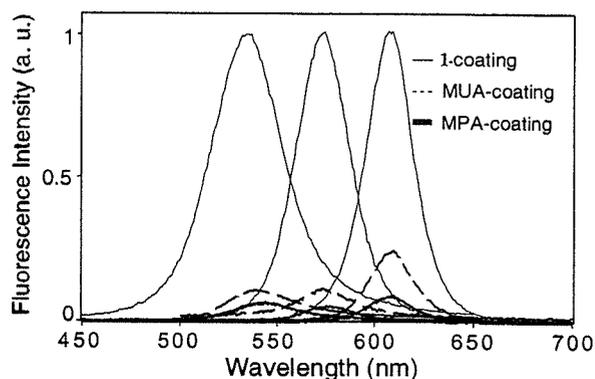


Fig. 1 Fluorescence spectra of **1**- and thiol-coated CdSe–ZnS QDs in water. The QDs are prepared from TOPO capped QDs with emission peaks at 535, 575, and 610 nm. The absorbance at excitation wavelengths (440 nm for 535 nm emission, or 480 nm for 575 and 610 nm emission) is adjusted to be 0.05 for all QDs.

*jin@imd.es.hokudai.ac.jp

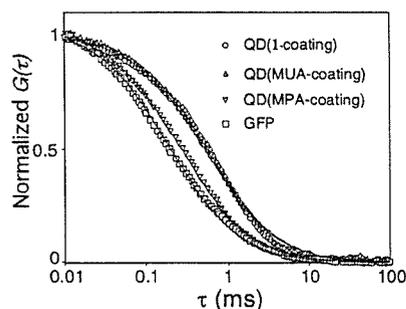


Fig. 2 Fluorescence autocorrelation curves for the water-soluble QDs with an emission peak at 610 nm and GFP in tetraborate buffer (pH = 9.2). The correlation curves are fitted by using one-component model (ref. 12c).

found to be 0.52, 0.53, 0.25, and 0.17 ms, respectively. By using the value of the diffusion time (0.74 ms) measured for 14 nm fluorescent latex beads (Molecular Probes, Inc. USA), the hydrodynamic sizes are calculated¹³ to be 9.8, 10, 4.7, and 3.2 nm in diameter for 1-,¹⁴ MUA- and MPA-coated QDs, and GFP,¹⁵ respectively. The difference in the size of the MPA- and MUA-coated QDs suggests the ligand-exchange of TOPO molecules with the thiols. The size of 1-coated water-soluble QDs is similar to that of MUA-coated QDs and is two-times larger than that of MPA-coated QDs, indicating that the calix[4]arene carboxylic acids form a bilayer structure with TOPO molecules that stabilize the surface of QDs. The high emission efficiency of 1-coated QDs may result from the surrounding of the QD surface by the benzene units of the calixarene. The hydrophobic benzene layer would make a high shield towards the access of water molecules to the QD surface. As a result, surface quenching of excitons in the QD can be reduced.^{3d}

The colloidal stability of the 1-coated QDs in tetraborate buffer is estimated by fluorescence intensity after surface coating as a function of time at 25 °C, as shown in Fig. 3. The fluorescence intensity of the 1-coated QDs gradually increases and becomes constant after *ca.* 100 h. It should be noted that the spectral widths (the full width at half maximum) of the 1-coated QDs are almost constant (29 nm) over time. This indicates that no surface deterioration and aggregation occurs in the 1-coated QDs, and these QDs are stable in aqueous solution. For thiol-coated CdSe-ZnS QDs, poor stabilities resulting from the aggregation and

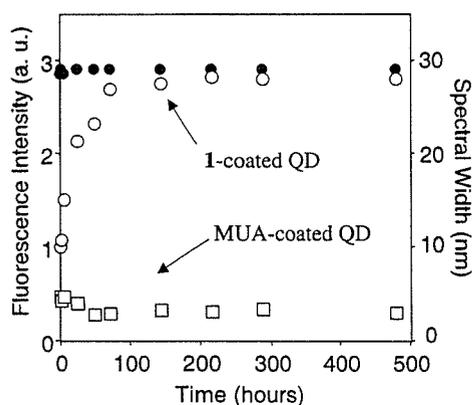


Fig. 3 Changes in fluorescence intensity (open circles and squares) of water-soluble CdSe-ZnS QDs (610 nm emission) after surface coating in tetraborate buffer (pH = 9.2). For 1-coated QDs, changes in spectral widths are also shown (closed circles).

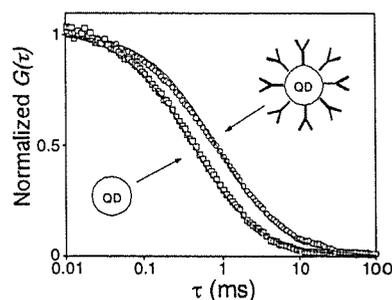


Fig. 4 Fluorescence autocorrelation curves for 1-coated water-soluble CdSe-ZnS QDs with an emission peak at 610 nm before (open squares) and after (open circles) the addition of GFP antibody (PBS buffer, pH = 7.4) in the presence of EDC.

precipitation of the QDs have been reported in aqueous solution.^{3c,6} In fact, it was observed that fluorescence intensity of the MUA-coated QDs gradually decreases and loses 37% of its initial fluorescence intensity after 4 days (Fig. 3).

To test the utility of calixarene-coated QDs for biological application, the coupling of antibodies to the calixarene-coated QDs was performed using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC).¹⁶ Fig. 4 shows the fluorescence autocorrelation curves of 1-coated QDs before and after the addition of GFP antibody (Mouse monoclonal IgG to GFP, Abcam Ltd, UK). Upon addition of the antibody, the autocorrelation curve of the 1-coated QD immediately shifts to the right and the curve becomes stationary within 10 min. The diffusion time of the 1-coated QDs changes from 0.52 ms to 1.0 ms. This change in the diffusion time indicates that the size of the antibody-labeled QD increases to be about twice that of the initial QD. From the value of the diffusion time, the size of the antibody-labeled QD can be estimated as *ca.* 20 nm in diameter, suggesting that the antibodies bind to the surface of the QD and form a single monolayer.

In conclusion, we have presented a simple and convenient method for the preparation of biocompatible CdSe-ZnS QDs using calix[4]arene carboxylic acids as surface coating agents. The calixarene-coated QDs have high emission efficiency and long-term stability in aqueous solution. In addition, the size of the calixarene-coated QDs is relatively small (<10 nm in diameter) in comparison with the water-soluble QDs earlier reported.^{5b} In the calixarene-coated QDs, calixarene molecules are bound to TOPO capped QDs by hydrophobic interaction. To avoid possible disintegration of the calixarene-coating in the case of interaction with the cell membrane (lipid bilayer), cross linking between the intramolecular carboxylic groups at the QD surface should be necessary. So far, many kinds of amphiphilic calixarene derivatives attaching sugars, peptides, chiral residues, and so on, have been designed.¹⁷ We believe that calixarenes will offer a variety of new functions for the surface architectures of colloidal semiconductor QDs.

Takashi Jin,^a Fumihiko Fujii,^b Hiroshi Sakata,^b Mamoru Tamura^a and Masataka Kinjo^a

^aSection of Intelligent Materials and Devices, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Sapporo, 060-0812, Japan. E-mail: jin@imd.es.hokudai.ac.jp; Fax: +81-11-706-4964; Tel: +81-11-706-2886

^bInnovation Plaza Hokkaido, Japan Science and Technology Agency, Sapporo, 060-0819, Japan. Fax: +81-11-708-1614; Tel: +81-11-708-1614

Notes and references

- (a) M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos, *Science*, 1998, **281**, 2013; (b) W. C. W. Chan and S. Nie, *Science*, 1998, **281**, 2016; (c) M. E. Åkerman, W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia and E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 12617.
- (a) C. B. Murray, D. J. Norris and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 8706; (b) M. A. Hines and P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 468; (c) B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen and M. G. Bawendi, *J. Phys. Chem.*, 1997, **101**, 9463; (d) X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich and A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 7019; (e) M. Green and L. P. O'Brien, *Chem. Commun.*, 1999, 2235; (f) L. Qu and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 2049; (g) D. J. Crouch, P. O'Brien, M. A. Malik, P. J. Skabara and S. P. Wright, *Chem. Commun.*, 2003, 1454; (h) W. J. Jin, M. T. Fernández-Arguëlles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Chem. Commun.*, 2005, 883.
- (a) G. P. Mitchell, C. A. Mirkin and R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 8122; (b) H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12142; (c) S. Pathak, S.-K. Choi, N. Arnheim and M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 4103; (d) D. Gerion, F. Pinaud, S. C. Williams, W. J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss and A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 8861.
- (a) X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale and M. P. Bruchez, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 41; (b) D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise and W. W. Webb, *Science*, 2003, **300**, 1434; (c) X. Gao, Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung and S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, 2004, **22**, 969; (d) E.-C. Kang, A. Ogura, K. Kataoka and Y. Nagasaki, *Chem. Lett.*, 2004, **33**, 840.
- (a) B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou and A. Libchaber, *Science*, 2002, **298**, 1759; (b) T. Nann, *Chem. Commun.*, 2005, 1735.
- S. Kim and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 14652.
- The rate of FRET depends strongly on the donor-acceptor distance r , being inversely proportional to r^6 .
- The calix[4]arene carboxylic acid **1** was synthesized according to the literature methods: (a) A. Arduini, A. Pochini, S. Reverberi and R. Ungaro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, 981; (b) S.-K. Chang and I. Cho, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1986, 211.
- 1 mg of the TOPO capped CdSe-ZnS QDs was dispersed in 1 mL of tetrahydrofuran and 30 mg of calix[4]arene carboxylic acids **1** was added. After the mixed solution was sonicated for 30 s using a bath type sonicator, 3 mL of dimethylformamide was added. Then, 30 mg of potassium *tert*-butoxide was slowly added for the deprotonation of the carboxylic groups of the calix[4]arene. The resulting precipitate consisting of the QDs coated by **1** was separated using a centrifuge. The sedimented precipitate was then dispersed in 20 mL water. The aqueous QD dispersion was sonicated for 5 min and filtered using a 0.2 μm disposal filter.
- The quantum yield of the **1**-coated QDs with an emission peak at 535 nm is not estimated because the absorption of the QDs does not show a distinct peak.
- $G(\tau)$ is defined as $G(\tau) = \langle \delta I(\tau) \delta I(0) \rangle / \langle I(\tau) \rangle^2$, where $I(\tau)$ is the fluorescence intensity at the time τ , and $\delta I(\tau) = I(\tau) - \langle I(\tau) \rangle$. The brackets denote ensemble average.
- (a) S. Björling, M. Kinjo, Z. Földes-Papp, E. Hagman, P. Thyberg and R. Rigler, *Biochemistry*, 1998, **37**, 12971; (b) M. Kinjo, G. Nishimura, T. Koyama, Ü. Mets and R. Rigler, *Anal. Biochem.*, 1998, **260**, 166; (c) N. Yoshida, M. Kinjo and M. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **280**, 312; (d) T. Takagi, H. Kii and M. Kinjo, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2004, **5**, 199.
- Assuming a spherical body of fluorophores, the size of the fluorophores can be evaluated by the following relationship: $r_1/r_2 = \tau_1/\tau_2$, where r_i and τ_i are the radius and diffusion time of the fluorophore i .
- For the **1**-coated QDs with emission peaks at 535 nm and 575 nm, the hydrodynamic size was determined to be 6.2 nm and 7.9 nm in diameter, respectively.
- The GFP molecule forms a nearly perfect cylinder 4.2 nm long and 2.4 nm in diameter. See: M. Ormò, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien and S. J. Remington, *Science*, 1996, **273**, 1392.
- 10 μL of an aqueous dispersion of the QDs (ca. 1 μM) coated by **1** was diluted to 80 μL by addition of 70 μL PBS buffer (pH = 7.4) and 10 μL of EDC aqueous solution (5 mg mL⁻¹) was added. Then 10 μL of GFP antibody (5 μM) was added to the QDs aqueous solution and coupling reaction was allowed to proceed at room temperature. From the measurements of fluorescence autocorrelation curves of the QDs, it was found that the reaction was completed within 10 min. For the coupling reaction using EDC, see: G. T. Herrmannson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, New York, 1996.
- Z. Asfari, V. Böhmer, J. Harrofield and J. Vicens, *Calixarene 2001*, Kluwer Academic Publishers, London, 2001.

分子の探索からシステムの解明へ —アルツハイマー病研究に想う神経科学の今後への私感

From Molecules to Systems-A Private Opinion on Future Neuroscience¹⁾

星 美奈子

1. はじめに

30年前はまだ小学生でしかなかった自分が、「30年後の脳科学」を語るというのにはどうにも荷が重く、正直なところ困り果てた。しかしながら、これはアルツハイマー病研究をとおして体感してきた神経科学の現状と今後を整理する良い契機かもしれないと思い、あくまで私感としてはあるがここに述べることにする。

神経科学最大の学会は、何といっても秋に合衆国で開催される the Society for Neuroscience の年会である。年々参加者が増え、2004年はずいに31000人を突破(研究者25000人、それ以外6000人)、6日間で16000を越える演題が、複数チャンネルで行われる15分刻みのスライドセッション、ないしは巨大会場で午前午後に分けて展示されるA-ZZまであるポスターセッションに分けて展開される。アルツハイマー病に関連する演題は軽く1000を越え、気力体力の限界を試される訳だが、学生・ポスドクに混じってポス達も興味あるポスターには自ら足を運び議論する学会であり、研究動向の目に見えない「雰囲気」をつかむには最適の場である。サブタイトルに挙げた Neurodegenerative Disorders, Neuroscience of Mental Illness & Stem Cell Research は2005年の焦点として President が掲げた分野である。これを見て感じることは、Kandel 博士がノーベル賞受賞決定直後の2002年の年会で断言したとおり、Life Science においてはもはや基礎も応用もない、ということである。そして、その結果、今まで以上に質の高い Concrete な成果が求められるようになってきている。合衆国においては、アルツハイマー病患者は500万人、年間10万人がこの病気で亡くなっており、2040年には患者数は1400万人に達するとされている。神経症(鬱病、統合失調症など)につい

ては、致死病でこそないが、疾病が社会の生産性に与えた損失が790億ドル、治療やケアに必要な費用が690億ドルと2003年に算定されている。また、確立された幹細胞を臨床応用に用いることに対しては、2005年のアンケートで58%が肯定するなど社会的理解もある。この状況に学会としても正面から向き合わざるを得ないことが良く伝わってきた。実は、数年前にふとしたことで類似の経験をしたことがあったからである。筆者は、「高次な生命現象を物質(タンパク質)の物理化学的な変化で説明する」という視点から研究に取り組み、この何年間かは、未だ謎が多いβアミロイドの神経細胞死機構の問題に取り組んでいる。そして、研究の過程で見出した新たな球状の構造体がとても強い神経毒性を持つことから「アミロスフェロイド」と名付け論文にまとめる機会を得た。その論文が契機となり、一般の方からの生の声が今もって定期的に届き、さらにアナリストの方々から自らの研究を語るという貴重な経験をすることとなった。これによって社会的要請を文字通り肌身で感じただけではなく、現実には治療や予防ということを考えて時、基礎研究としては具体的にはどこまでを明らかにすれば「わかった」と言えるのか、そして自分の研究はどこに位置しているのか、ということをしつぱし思い巡らすようになった。その結果、応用に至ることが出来る基礎研究、「使える」研究というのは、likely や possible ではダメで、その段階で可能なことを全て終わらせ完結していないといけなく、つまり、より高いハードルと責任があるということがわかった次第である。

2. 「物」「概念」「手法」

研究の novelty は、「物」「概念」「手法」のいずれかによることが多いが、脳・神経科学の場合、20世紀初頭までは組織の解剖学的・病理学的解析や動物の行動解析ないしは疾患の臨床解析から得られた「マクロな知見」のみであったものが、電気生理学と分子生物学の台頭によってミクロなレベルでの研究が可能になった。上記の3つに関しては、神経変性疾患については、関連分子が解明されつつあることで、それぞれの疾患において完全ではないながらも疾患モデル動物が作られてきたことが第一に挙げられ、具体的に治療戦略を考えるところまで進行している。神経症については、発症機序についてはむしろ治療薬の作用機序を手掛かりに解明が進んでいることと、作用機序が

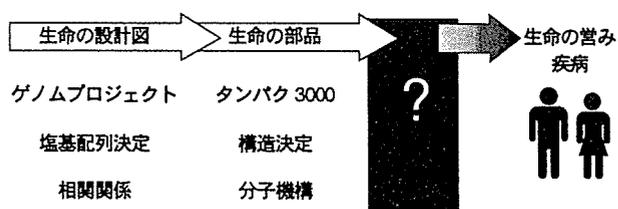
1) Neurodegenerative Disorders, Neuroscience of Mental Illness & Stem Cell Research



Minako M. Hoshi
三菱化学生命科学研究所・東京工業大学
大学院生命理工学研究科リーダー・連携
助教授 理学博士
〒194-8511 東京都町田市南大谷11号
E-mail: minhoshi@libra.ls.m-kagaku.co.jp
〈専門〉神経科学
〈趣味〉庭仕事

わからないためにモデル動物がなかった現状を、最近開発されつつある非侵襲的脳活動の可視化法が打破しつつあることがあげられる。そして幹細胞については、分化転換についての基礎的研究が進んだ結果、様々な know-how が蓄積したことが挙げられるであろう。このように新たな手法が新たな地平線を拓いてきたといっても過言ではない。アルツハイマー病を初めとする神経変性疾患の場合も、共通の病態として異常な蛋白質の蓄積が認められており、それが疾患の原因ともされている。しかしながら、本来、生化学・構造化学は均一でピュアな集団を扱うことに長けており、同じアミノ酸配列を持ちながら、様々な会合状態を取ったものの混合物で、しかも NMR で扱えるサイズを遙かに超えたものなど想定外であり、それぞれの疾患の原因蛋白質の会合過程を解析するために、多くの研究者が知恵を絞っては、ダイナミックな平衡状態にあるものを部分的に取り出しては観察していたのが現状であった。 β アミロイドの場合も全く同じ状況で、是非とも β アミロイドがアミロスフェロイドになる過程を解明したいと考えた筆者は、新たな解析手法を物理・化学・医学の分野横断研究で構築しようとしている。なぜなら、その後の研究から、アミロスフェロイドはヒト脳にも存在することが明らかになってきたため、アミロスフェロイド形成過程を解明することでアルツハイマー病発症の最初期を解明することが出来るからである。現在、手法の構築は順調に進んでいるが、その過程で見えたことは、手法というのは単独で成立するものではなく、何を知りたいか、何を見たいか、それがあって初めて成立するということであった。今年の学会、そして自らの些少な経験を踏まえて考えるに、今後はその研究の結果、何を見たいか、何を知りたいかということを含め、以上に意識した target-oriented な研究がますます増え、それに物理・化学・数学などの分野の研究者が参入し活躍するようになるのではないかと思う。分子を探索する 20 世紀は終わり、分子同士が構築するシステムを発見する時代、今までで→でつないでいた矢印の中味が問われる時代になったのである。

遺伝子と生命の営み (疾病) の間をつなぐ



3. 時間の流れ—老化とは

上記のような新たな流れを生み出した一つの要因はゲノ

ムプロジェクトによってヒトゲノムの全塩基配列が決定されたことである。これにより人類は 35 億年という進化の過程で培われてきた「生命の設計図」の解読に成功したこととなる。しかし、これで人体における生命の営み、その営みが異常になった疾患というものを全て説明出来るようになった訳ではない(図)。次の標的として、設計図に基づき作られ、生体内での機能を担うタンパク質の機能動態の解明が精力的に進められている。タンパク 3000 などの巨大プロジェクトによる構造ゲノム科学は、生命の営みを司る主なタンパク質の立体構造を全て明らかにすることでこれに迫らんとしており、それはいわば、設計図から部品を組み立てる段階に相当する。この流れを受け、遺伝性疾患の研究においても、原因遺伝子を明らかにする相関関係の解明から、遺伝子で作るタンパク質がどのように働き(あるいは働かないこと)で疾患を起こすかを、具体的に明らかにする分子機構への発展が望まれている。これは、将来的に X 線結晶構造解析が新規タンパク質の特許要件になることにも明確に表れており、学術研究においても、企業研究としても、疾病研究は物質科学としての新たな局面を迎えたと言える。それでは、アルツハイマー病を初めとする、遺伝性が明らかではなく、頻度の高い神経変性疾患の発症機序はどのようにして解明されていくのであろうか？これに関しては、前述したとおり、この何年間かの医学研究、特に分子遺伝学・生化学・神経病理学のクロストークから、「異常構造タンパク質の凝集」が共通の病態であり、かつ病因であることが明らかになりつつある。しかしながら、それぞれの疾患において病因となるタンパク質が、なぜ生理的役割をはなれて病因となるのか、それはどのような構造変化を伴い、その結果神経の機能がなぜ阻害されるのかはまだ十分には理解出来ていないのが現状である。現時点で言えることは、いずれの場合もヒトが年を取ることと密接な関係にあるということである。従って、ヒトが老化する中で遺伝子(産物)がいかに変わるかが重要な課題となる。このように、生命の設計図、生命の部品と過去には想像もつかなかった勢いで解明されており、新たな局面が開けつつあるが、生命の営み全体を説明し、それが誤動作している疾患を克服するためには未だ大きな？が残されており、多くの研究者が独自の系と独自の観点からそれに挑戦している。筆者は蛋白質の機能は、実は life stage に応じて構造と共に変わりうるポテンシャルを持っているのではないかと夢想しており、この変遷に勝手に構造代謝と名付けている。我々の研究はまだ一步を踏み出したところだが、アミロスフェロイドを入り口に、いずれは老化という現象を物理化学的に解明出来たら本望である。本執筆の機会を与えていただいた赤池先生に感謝をいたします。

蛍光寿命イメージングシステムの製作と生体試料
および高分子試料への応用

中林孝和・飯森俊文・金城政孝・太田信廣

蛍光寿命イメージングシステムの製作と生体試料 および高分子試料への応用

中林 孝和・飯森 俊文・金城 政孝・太田 信廣

北海道大学電子科学研究所 北海道札幌市北区北12条西6丁目 (〒060-0812)

(2005年11月24日 受理)

Construction of a Fluorescence Lifetime Imaging System and
its Application to Biological Systems and Polymer Materials

Takakazu NAKABAYASHI, Toshifumi IIMORI,
Masataka KINJO, and Nobuhiro OHTA

Research Institute for Electronic Science (RIES), Hokkaido University, Sapporo 060-0812

(Received November 24, 2005)

We have constructed a fluorescence lifetime imaging (FLIM) system to study the photo-induced dynamics of living cells. The output from a femtosecond mode-locked Ti: sapphire laser is frequency-doubled and focused onto the sample with an objective lens of a confocal microscope. The fluorescence decay of the sample is measured at each pixel of a scanning image. Each fluorescence lifetime is evaluated quickly using time-gating electronics, and the fluorescence lifetime image can be obtained within several minutes. We have combined the FLIM system with a picosecond time-correlated single-photon counting system in which a microchannel-plate photomultiplier is used for detection, so that the value of the fluorescence lifetime at a position can be analyzed quantitatively. A high contrast light-scattering image of a polymer film is also found to be obtained with the FLIM system.

Keywords: Fluorescence, Lifetime, Imaging, Living Cell, Polymer Film

1. はじめに

生きた細胞内における特定の場所や機能タンパク質について蛍光標識を行い、顕微鏡を用いてそれらを観察することが、分子生物学、細胞生物学などの分野において必須の技術となっている。近年の蛍光指示薬の発達、特に発光クラゲに由来する緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) から始まる種々の蛍光標識タンパク質の発展により、細胞内のカルシウムイオン濃度や pH および細胞の分化、分裂などに関わる様々な細胞内の事象を生きた細胞一個一個において簡便に観察できるようになった^{1,2)}。さらに共焦点レーザー走査顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) の普及によって、通常の光学顕微鏡では得ることができない高解像度・高コントラストの画像、そして細胞試料の3次元構造を容易に得ることができるようになっている。また CLSM は、単色の励起光を用い、幅の狭いバンドパスフィルターを用いて蛍光検出を行うことができるため、蛍光スペクトルが漏れて混

ざり合うクロストーク現象の少ない画像を得ることができる。

CLSM は蛍光観察と相性が良く、様々な蛍光観測技術と組合せることができる。特に蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) と組合せることによって、タンパク質-タンパク質間などの生体分子間相互作用を画像化することができ、分子が細胞内のどこで相互作用をしているのかという空間情報を得ることができるようになった^{1,2)}。FRET により光励起された蛍光分子 (ドナー) から励起されていない他の蛍光分子 (アクセプター) へ励起エネルギーが移動し、結果としてドナー分子からの蛍光強度が減少し、アクセプター分子からの蛍光強度が増加する。従って FRET はドナーとアクセプターが近接したときのみ起こる現象であり、2種類の蛍光性タンパク質や一分子内にドナーとアクセプターを有する生体分子の FRET を観測することによって、2分子間の相対的な距離を求めることができる。FRET の測定においては、単色の励起光を用い、クロストークの少な

い CLSM が有用な道具となる。Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)³⁾ または Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)⁴⁾ と組合せることによって、時空間における分子の挙動や相互作用に関する詳細な情報も得ることができる。

CLSM と様々な蛍光観測技術との組合せは非常に盛んに行われている。しかしその定量性については、しばしば問題になることがある。上で述べたように FRET に伴う蛍光強度の変化から、ドナーとアクセプター間の距離などを計算することができる。しかし、FRET のドナーとアクセプターのお互いの吸収とお互いの蛍光にはそれぞれ重なり領域があり、ドナーを光励起してもある割合でアクセプターも励起する、またアクセプターの蛍光を観測してもある割合でドナーの蛍光も含まれるといった場合が多い。また蛍光強度は蛍光物質の濃度や励起光強度に依存し、さらにレーザー光照射による退色があるため、絶対強度による定量評価は相当の注意を必要とすることになる。基板や不純物からの発光によって信号雑音比を大きく下げってしまう場合もある。

そこで強度解析の欠点を補うものとして、蛍光強度ではなく、蛍光寿命をイメージングする手法 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) が提案されている⁵⁻⁹⁾。蛍光強度は蛍光分子の濃度や励起光強度に依存するのに対し、蛍光寿命は分子固有の値であり、特殊な場合を除けば濃度、光退色および励起光強度に依存しない。また蛍光寿命は分子によってそれぞれ異なるため、蛍光波長が重なっていても、見たい蛍光分子と他の蛍光成分とを分離することができる。さらに強度測定では、蛍光強度の変化が蛍光種の濃度変化と蛍光種の蛍光寿命変化のどちらが原因であるのか判別できないのに対し、寿命測定では、蛍光強度の変化の原因を特定することが可能となる。さらに時間分解測定から細胞内の光励起ダイナミクスを直接測定することができる。このように FLIM は、分子細胞生物学の研究において新たな発展をもたらしてくれるものと期待されている。

FLIM による単一細胞の観測は90年代の初頭からすでに指摘されている⁵⁾。しかし FLIM を生細胞、特に生きた動物細胞に適用するためには、蛍光寿命の画像化を数分で終了しなければならず、さらに試料に損傷を与えないように励起光強度をかなり低く抑える必要があり、十分な応用を行うことができなかつた。しかし近年の固体パルスレーザーおよび光検出技術の大幅な向上から、画像の各点において蛍光減衰曲線を測定し、蛍光寿命を求め、それらを画像化する手法が生細胞にも適用されるようになってきた。

生細胞の FLIM 測定には、時間ゲート法がしばしば用いられている。時間ゲート法とは迅速に寿命解析を行うための方法であり、蛍光減衰曲線を2から12分割の window に分け、各 window の積分強度を時間に対してプロット

し、単一(または2成分の)指数関数の減衰を仮定して寿命を求める簡便な方法である。高い信号雑音比であればゲートを使わない場合とほぼ同じ時定数を得ることができる。しかし多成分の減衰や立ち上がり成分が存在するときには、大きく異なった時定数を算出する可能性がある。一方ゲート法を用いずに、画像のピクセルごとに時間相関単一光子計数法による蛍光減衰曲線を測定し、細胞の蛍光寿命画像を得た報告例もある。この場合は蛍光減衰曲線に仮定を設ける必要はないものの、測定には数十分程度の長い時間が必要となる⁸⁾。

我々は、「蛍光寿命」というパラメーターから、単一細胞内における様々な相互作用および動的情報を得ることを目的とした研究を行っている。本稿では、我々が製作した FLIM 測定装置について、その概要について述べる。FLIM 測定は時間ゲート法を用いているが、時間ゲート法による欠点を補うために、ピコ秒時間相関光子計数システムを FLIM システムに組合せている。時間ゲート法による FLIM のみではなく、CLSM によって形態像をとらえた後、特定の地点における蛍光減衰曲線および時間分解蛍光スペクトルを時間相関光子計数法により測定することができる。時間ゲート法による FLIM によって、蛍光寿命の定性的な値とその空間分布を得ることができ、時間相関光子計数法によって、特定の地点における蛍光寿命の定量的な値を得ることができる。また光散乱によって高分子薄膜のモルフォロジー像を高感度に検出することができること、FLIM によってこの光散乱画像と蛍光画像とを同時に測定できることがわかった。本稿では FLIM の高分子試料への応用の有用性についても述べる。

2. 装置

2.1 蛍光寿命イメージングシステム

今回製作した時間ゲート法による FLIM システムでは、蛍光観察の励起光源として、半導体励起 cw 固体レーザー (Spectra-Physics, Millennia) によって励起されたフェムト秒チタンサファイアレーザー (Spectra-Physics, Tsunami, 770-980 nm, 80 fs, 80 MHz) を用いた。BBO 結晶 (0.5 mm) によって2倍波を発生させた後、基本波と2倍波を複数の誘電体蒸着ミラーにて分け、2倍波のみを取り出す。2倍波をコリメートした後、ファイバーケーブル (Five Lab, MU-401A) を通してコア径 4 μm のシングルモード光ファイバーに導入する。最大で約50%の入射効率を得ることができ、ND フィルターによって光ファイバーに導入されるレーザー光強度を調整する。2倍波の光ファイバーからの出力を約1 mW に調整し、FLIM 測定の励起光源に用いる。本実験では励起波長として410 nm および440 nm を用いている。

共焦点レーザー走査顕微鏡には、Nikon 製の Digital Eclipse C1 を用いた。顕微鏡は倒立顕微鏡 (Nikon,

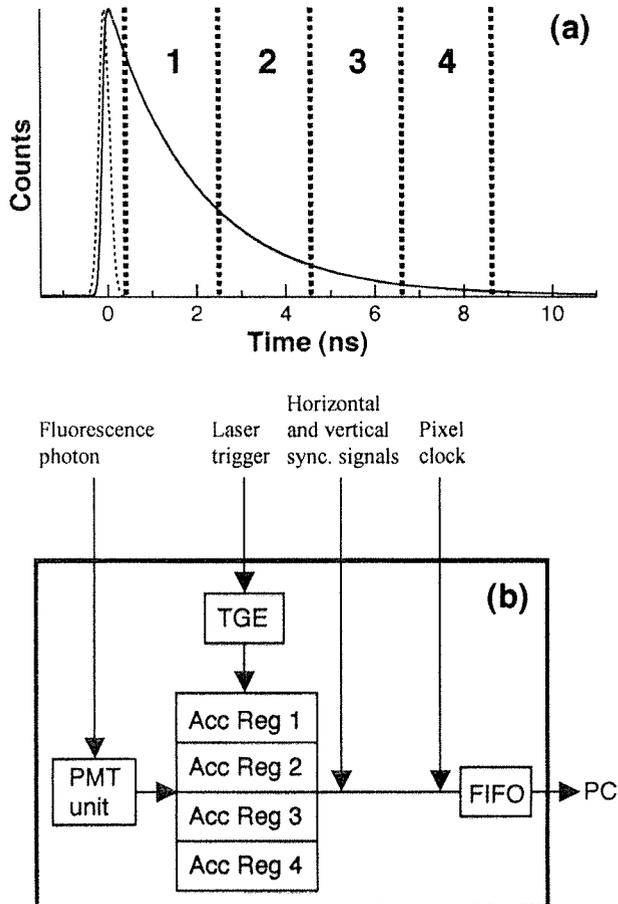


Fig. 1 Schematic illustration of the time-gating method (a). Fluorescence decay profile (solid line) and excitation pulse (dotted line). LIMO captures the fluorescence in the four time-windows. Schematic diagram of LIMO (b). PMT unit: photomultiplier unit, Acc Reg: accumulation registers in which the detected photons are counted, TGE: time gating electronics that activates each of the accumulation registers during the corresponding time window, FIFO: first in first out memory that forms a buffer before the transfer of the data to the computer.

TE2000-E) を使用している。スキャナーの入射ポートに上記の光ファイバーを装着し、フェムト秒レーザー光を励起光として共焦点蛍光画像を測定できるようにする。対物レンズによって集められた試料からの蛍光は、スキャナーより出射され、マルチモードファイバーを通してフィルターボックスに入射される。フィルターボックスからの出力は Nikon Europe BV 製の Lifetime Imaging Module (LIMO) に入射される。LIMO は時間ゲートを行う部分であり、本実験では Fig. 1(a) に示すように蛍光減衰曲線を 4 つの window に分割し、各 window の積分強度を時間に対してプロットし、単一指数関数の減衰を仮定して寿命を求めている。Fig. 1(b) に、LIMO のブロック図を示す。LIMO 内には光電子増倍管が装着されており、導入された蛍光信号を光子計数検出する。またフェムト秒レーザー

の基本波の一部を高速ダイオードを用いて検出および増幅し、LIMO のトリガーパルスとしている。検出された光子とトリガーパルスとの間の遅延時間に応じて、光子信号を 4 つの Accumulation Register に振り分け、積算を行う。共焦点蛍光顕微鏡から位置情報と pixel clock が LIMO に入力され、4 つの Accumulation Register から 4 枚の時間分解共焦点蛍光画像を得ることができる。画像の各ピクセルにおいて、蛍光強度の時間変化から蛍光寿命を求め、それらをプロットすることによって蛍光寿命イメージングを得ることができる。時間ゲートの window 幅は可変であり、ソフトウェア上にて任意に変化させることができる。

本実験で用いた LIMO は、 ~ 80 MHz の高繰り返しパルス列にも応答することができる。そのためフェムト秒レーザーパルスの繰り返し周波数を分割することなく、そのまま用いることができ、信号雑音比の向上に大きく寄与している。全時間幅 (4 つの時間ゲートの和) は ~ 80 MHz のトリガー周波数に対して、最大で 10 ns である。時間分解能は、全時間幅を 255 で割った値となるが、50 ps より短くなることはない。LIMO の蛍光光子検出の最大カウント速度は 5 MHz である。フィルターボックス内には色ガラスフィルターを装着することができ、観測したい波長領域の蛍光のみを取り出すことができる。また色ガラスフィルターを取り外すことによって、スキャナー内のダイクロイックミラーから漏れ出た試料からの散乱光を検出することができる。

2.2 ピコ秒時間相関光子計数システム

本システムでは、FLIM のみではなく、CLSM によって画像を取得した後、特定の地点における蛍光減衰曲線および時間分解蛍光スペクトルについてピコ秒時間相関光子計数法を用いて測定することができる。この場合、CLSM 部分は FLIM と同様であるが、検出器としてマイクロチャンネルプレート内蔵型光電子増倍管 (MCP-PM) を用いている^{10,11)}。

励起光源としてフェムト秒チタンサファイアレーザーを用いる。パルスピッカー (Conoptics, Model 350-160) によって、レーザーパルスの繰り返し周波数を 9 MHz にまで低下させた後、2 倍波を発生させる。FLIM と同様に、2 倍波を光ファイバーによりスキャナーに導入し、フェムト秒レーザー光を励起光として共焦点蛍光画像を測定できるようにする。2 倍波の光ファイバーからの出力は約 0.1 mW である。スキャナーより出射された蛍光はマルチモードファイバーを通して分光器 (Nikon, G-250) に入射され、MCP-PM (Hamamatsu, R-3809U-52) によって検出される。前置増幅器 (Hamamatsu, C5594) によって増幅された蛍光光子信号は波高弁別器 (ORTEC, 583) によって波高弁別され、時間-電圧変換器 (ORTEC, 457) にスタートパルスとして導入される。またフェムト秒レー

ザーの基本波の一部を高速ダイオードにより検出, 増幅, 波高弁別し, 時間-電圧変換器のストップパルスとしている. 時間-電圧変換器からの信号を多チャンネル波高分析器 (SEIKO EG&G, MCA7700) によって解析し, 蛍光減衰曲線を得る. 装置の応答関数は半値全幅にて約60 ps である. コンボリューションを行うことにより, 10 ps 程度の減衰定数を区別することができる. また分光器の波長を自動掃引することによって時間分解蛍光スペクトルも測定することができる.

測定手順は, まず CLSM 付属の検出器を用いてフェムト秒レーザー励起による共焦点蛍光画像の測定を行う. 次に測定したい地点にカーソルを移動し, 視野 (走査範囲) を必要最小限の大きさにする. その後, 蛍光を伝搬させるマルチモードファイバーを CLSM 付属の検出器から MCP-PM が装着された分光器につなぎ変え, CLSM の連続走査を開始させる. 最後に多チャンネル波高分析器の測定を開始させ, ある特定の箇所における蛍光減衰曲線の測定を行うことができる.

3. 測定例

3.1 標準試料を用いた測定

Molecular Probe Inc. による多重標識細胞標本スライドを用いて, システムの性能評価を行なった. FLIM システムを使って測定したウシ肺動脈内皮細胞の細胞標本スライド (F-14781) の時間分解共焦点蛍光画像を Fig. 2(a)-(d) に示す. 用いた試料は, 微小管部分はマウス抗 α -チューブリンモノクローナル抗体と BODIPY FL ヤギ抗マウス IgG にて標識され, F-アクチンは Texas Red-X フレロイジン, 核は DAPI にて染色されている. 時間ゲートは 2 ns ごとになるように調整し, 4 枚の画像は蛍光光子信号とトリガーパルスとの間の遅延時間が 0 から 2 ns, 2 から 4 ns, 4 から 6 ns, そして 6 から 8 ns の間の画像となっている. ソフトウェア上で蛍光光子信号とトリガーパルスとの間のオフセットを調整し, 蛍光減衰曲線が 4 つの時間ゲート内に入るようにしてある. Fig. 1(a) からわかるように, 蛍光強度の時間変化曲線の立ち上がり部分が 0-2 ns のゲート内に入ると, 0-2 ns の間にて積分される発光強度が見かけ上減少する. そのため時間ゲートにおける遅延時間の 0 ns は, 減衰曲線のピーク位置より, 300-500 ps 程度正の時間方向へ移動したところに置いている (Fig. 1(a)). 具体的には, 適当な参照試料を用いて 0-2 ns の領域の画像の発光強度が最大になる位置を探し, その地点からオフセットを 200 ps だけ遅らせた位置を時間ゲートにおける 0 ns としている.

Fig. 2 は励起波長として 410 nm を用いている. フィルターボックス内の色ガラスフィルターを取り外しており, ダイクロイックミラーを透過した 420-470, 500-530, 570-710 nm のすべての領域の蛍光を含む. サブミクロン以下

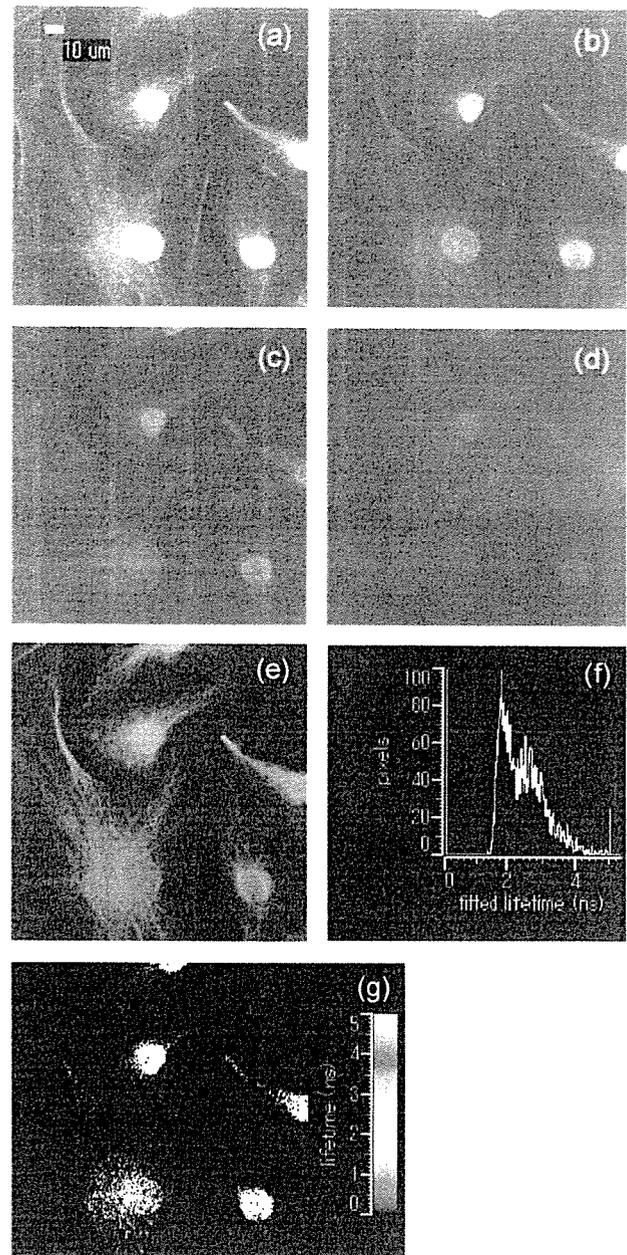


Fig. 2 Time-resolved fluorescence images of a standard slide (F-14781) containing multi-labeled bovine pulmonary artery endothelial cells with a time-interval of 0-2 ns (a), 2-4 ns (b), 4-6 ns (c), and 6-8 ns (d). The static fluorescence image is shown in (e). Histogram of the fluorescence lifetime and fluorescence lifetime image are shown in (f) and (g), respectively.

の膜厚を持つ高分子薄膜などでは, ダイクロイックミラーから漏れ出た散乱光の寄与が大きく, 色ガラスフィルターを用いなければ散乱光を取り除くことができない場合もある (3.3章). 散乱光は 0-2 ns の領域の画像の背景を明るくするために, 容易に散乱光の寄与を評価することができる. Fig. 2(e) は, 励起光として同じフェムト秒レーザーの 2 倍波 (410 nm) を用い, CLSM 付属の検出器によって測定した共焦点蛍光画像である. 得られた画像は,

LIMOによって測定した時間分解蛍光画像とほぼ同一であることがわかる。

Fig. 2(a)–(d)では、スキャナー内にある共焦点像を得るためのピンホール径を $100\ \mu\text{m}$ 、画像の大きさを $161.7\ \mu\text{m} \times 161.7\ \mu\text{m}$ 、測定点数を 256×256 ピクセルとして測定を行った。ピクセルごとのレーザー光照射時間を $50\ \mu\text{s}$ 、平均化は10回であり、約2分の測定時間で時間分解共焦点蛍光画像を得ることができる。この結果を解析して得られた蛍光寿命の値の分布(ヒストグラム)と蛍光寿命イメージングの結果をFig. 2(f)と2(g)にそれぞれ示す。Fig. 2(g)からわかるように、蛍光寿命は細胞の位置によって変化しており、核の領域では $1.8\text{--}2.0\ \text{ns}$ の値であるのに対し、核の周辺部分では $2.5\text{--}3.0\ \text{ns}$ の値を持つことがわかる。実際に蛍光寿命のヒストグラムには $1.8\ \text{ns}$ と $2.6\ \text{ns}$ に2つのピークが存在し、核の染色色素の蛍光寿命と核の周辺部の染色色素の蛍光寿命にそれぞれ対応している。

Fig. 3(a)と3(b)は、別の細胞標本スライド(F-14780)を用いて測定した共焦点蛍光画像および蛍光寿命イメージングである。試料はFig. 2と同様にウシ肺動脈内皮細胞に多重染色を施したものであり、ミトコンドリアはMitoTracker Red CMXRos、F-アクチンはBODIPY FL フラランジン、核はDAPIにて染色されている。励起波長は $440\ \text{nm}$ 、色ガラスフィルターを用いて $520\ \text{nm}$ から長波長側の蛍光を観測している。ピコ秒時間相関光子係数システムを用いて、この試料の特定の地点における蛍光減衰曲線の測定を行った。アクチンが多く含まれると思われる領域にカーソルを移動し(Fig. 3(a)の×印)、この地点を励起して得られた蛍光減衰曲線の測定結果をFig. 3(d)に示す。2.2章で述べた実験手順にて測定を行っている。蛍光のプロープ波長は $600\ \text{nm}$ である。スキャナーの走査範囲はゼロとしている。使用したスキャナーでは、走査範囲を最小としても、ある有限な範囲内を走査しており、その大きさは測定点数で 16×16 ピクセルとなる。そのためFig. 3(d)も 16×16 ピクセルの範囲の平均値となる。また走査範囲をゼロとすると、励起光が一部に集中して照射されることになる。そのため $0.1\ \text{mW}$ の励起光強度に対しても、固定標本を使用している場合は数十秒で退色してしまい蛍光がほとんど観測されなくなることがある。空間分解能があまり必要のないときには、励起光強度の低減化よりも走査範囲の拡張を行った方が良い信号雑音比を得ることができる。

Fig. 3(d)の時間ゼロ付近において、デルタ関数的な鋭いピークが観測されている。これはダイクロイックミラーおよび分光器にて取り除くことができなかった散乱光によるものであり、寿命解析にはこの部分を除いて行う。時間ゼロ付近を除いて単一指数関数にて減衰のフィッティングを行うと、蛍光寿命はおよそ $2.9\ \text{ns}$ となり、この値はFLIMによる結果と定性的に一致している(Fig. 3(b))。

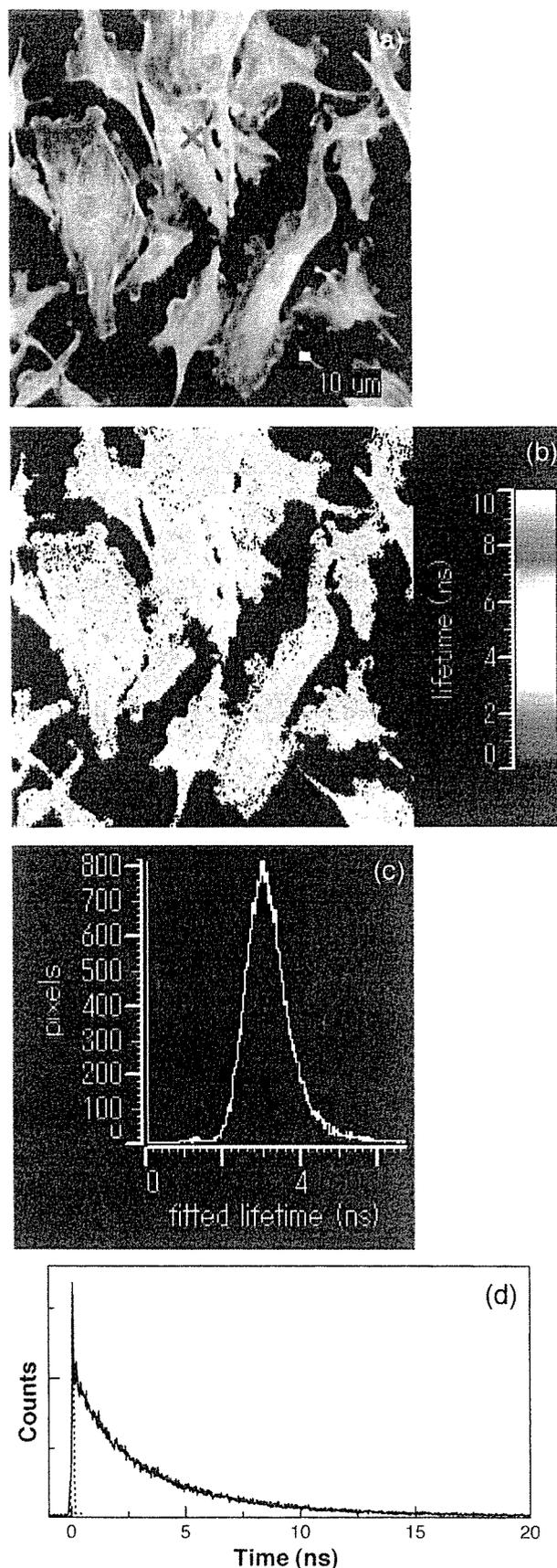


Fig. 3 Static fluorescence image (a), fluorescence lifetime image (b), and histogram of the fluorescence lifetime (c) of a standard slide (F-14780) containing multi-labeled bovine pulmonary artery endothelial cells. A time-resolved fluorescence decay at a position of X in (a) is shown in (d). The response function is shown by a dotted line.

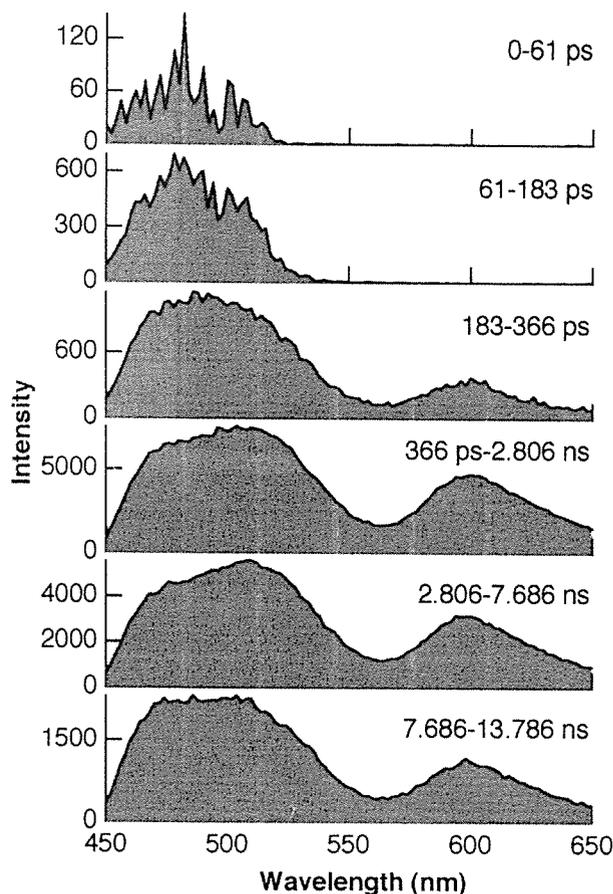


Fig. 4 Time-resolved fluorescence spectra of living cells having CFP and YFP with a low concentration of phenol red in water. Excitation wavelength was 422 nm. The time window for which the fluorescence intensity was integrated is given on the right side of each spectrum.

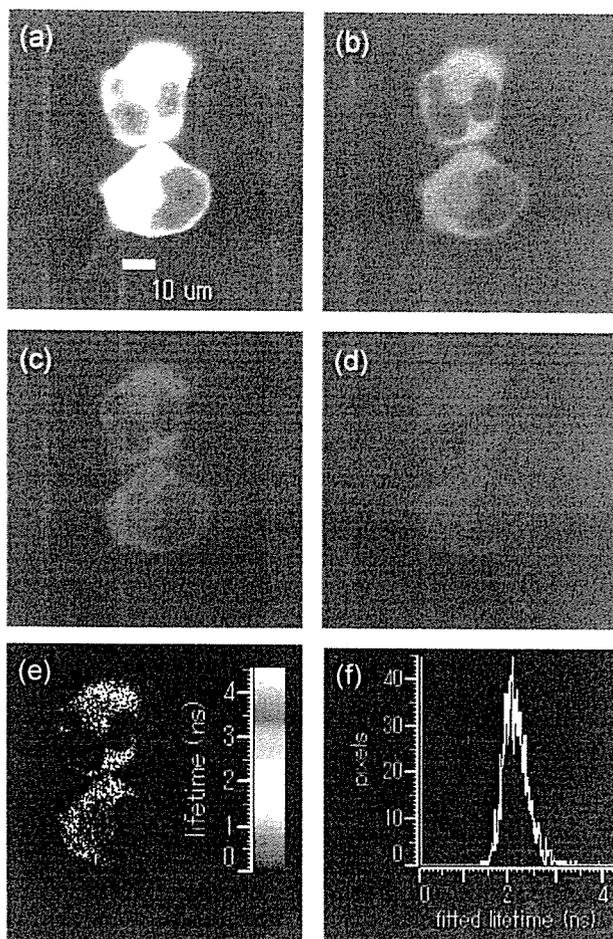


Fig. 5 Time-resolved fluorescence images of GFP oligomer in a living cell with a time-interval of 0-2 ns (a), 2-4 ns (b), 4-6 ns (c), and 6-8 ns (d). Fluorescence lifetime image and histogram of the fluorescence lifetime are shown in (e) and (f), respectively.

またスキャンを行いながら減衰曲線を測定しているため、ピクセルごとのレーザー光照射時間および画像取得回数(平均化)も重要なパラメーターになる可能性がある。しかし本実験では、減衰曲線の形状はこれらの値には依存しなかった。

FLIM 測定では測定時間の短縮化のために時間ゲート法を用いている。そのため数分にて測定は終了するものの、高い信号雑音比でなければ、定性的な蛍光寿命の値のみしか得ることはできない。本システムでは、定性的な蛍光寿命の空間分布について FLIM を用いて測定し、その結果をもとに、定量的に調べたい地点の蛍光減衰曲線について、時間相関光子係数法を用いて測定することができる。生細胞の光励起ダイナミクスに関して詳細な情報を得ることができると期待される。

時間相関光子係数システムを用いて、時間分解蛍光スペクトルも測定することができる。細胞の時間分解蛍光スペクトルの例として、Cyan Fluorescent Protein (CFP) と Yellow Fluorescent Protein (YFP) をアミノ酸リンカーで結びつけたタンパク質を生細胞中に発現させた細胞の時間

分解蛍光スペクトルを Fig. 4 に示す。培養液中の pH を監視するために、pH 指示薬のフェノールレッド (PR) を培養液に加えている。CFP を光励起させると、450-550 nm の領域に CFP と YFP の蛍光が観測されるだけでなく、550-650 nm の領域に PR の蛍光も観測されていることがわかる。さらに PR の蛍光強度は光励起直後では非常に弱く、約 500 ps の時定数で緩やかに増加している。この結果は、細胞から溶液中の PR に対して約 500 ps の時定数で励起エネルギー移動が起きていることを示している。現在、CLSM を用いて特定の地点における時間分解蛍光スペクトルの測定を行なっている。

3.2 生体試料への応用

生細胞の時間分解共焦点蛍光画像の例を Fig. 5(a)-(d) に示す。励起波長は 410 nm、色ガラスフィルターは使用していない。ピンホール径などの CLSM のパラメーターは Fig. 2 と同じであり、時間ゲートは 2 ns ごとになるように調整している。試料は HeLa 細胞に GFP を発現させたものであり、GFP からの蛍光を観測している。得られた蛍光寿命イメージを Fig. 5(e) に示す。GFP の蛍光

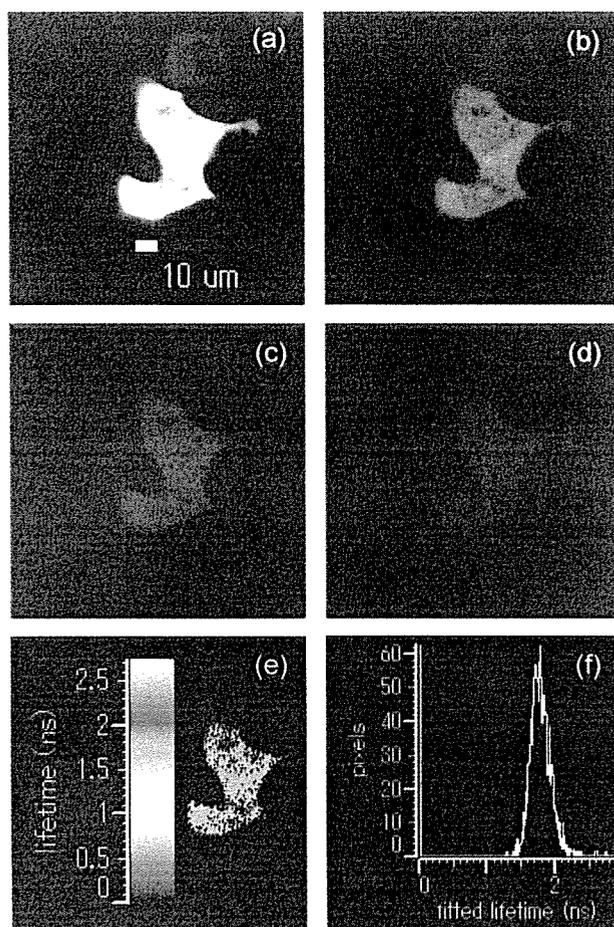


Fig. 6 Time-resolved fluorescence images of GFP in a living cell with a time-interval of 0–2 ns (a), 2–4 ns (b), 4–6 ns (c), and 6–8 ns (d). Fluorescence lifetime image and histogram of the fluorescence lifetime are shown in (e) and (f), respectively.

寿命は細胞の位置によらずほぼ一定であることがわかる。蛍光寿命のヒストグラム (Fig. 5(f)) から、GFP の蛍光寿命は、2.1 ns を中心として半値全幅がおよそ0.5 ns の分布を持っていることがわかる。平均化を50回行っても、得られた蛍光寿命イメージはほぼ同一であり、約2分の測定時間にて十分な信号雑音比を得ることができる。Fig. 6 に他の GFP を発現させた HeLa 細胞の時間分解共焦点蛍光画像、蛍光寿命イメージおよび蛍光寿命ヒストグラムを示す。実験条件は Fig. 2 と同一である。Fig. 5 と同様に GFP の蛍光寿命は発現部位に依存していないことがわかる。蛍光寿命は僅かに短くなっており、1.8 ns を中心として半値全幅がおよそ0.3 ns の分布を持っている。

生きた動物細胞に応用するためには、測定を数分で終了しなければならない。本システムは GFP の蛍光寿命イメージングを少なくとも5分以内で終了することができ、様々な生細胞に対して応用できることがわかる。

3.3 高分子薄膜のモルフォロジーへの応用

FLIM 測定においては、蛍光光子信号とトリガーパルスとの間のオフセットを調整し、4つの時間ゲート内に蛍光

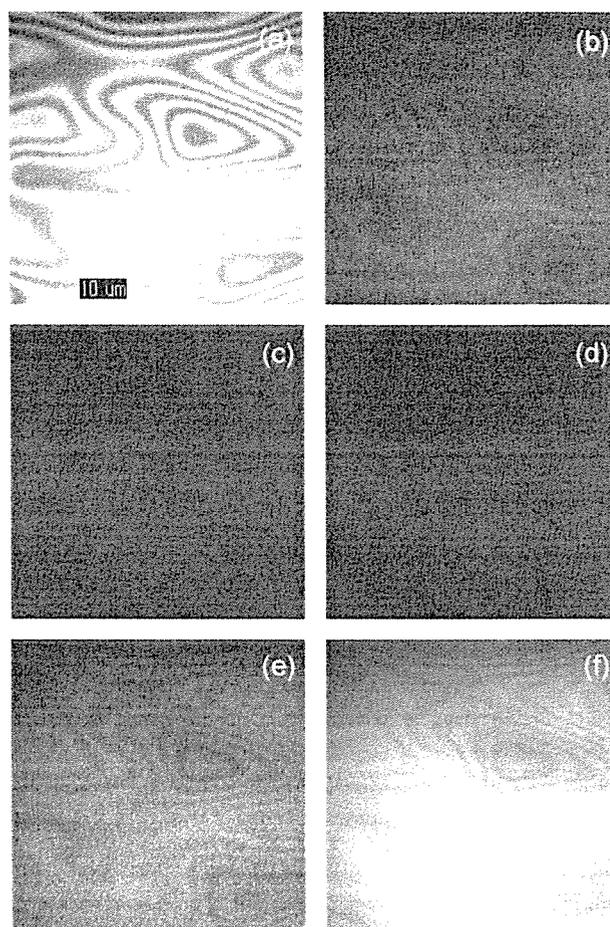


Fig. 7 Time-resolved images of DNS doped in a PMMA film with a time-interval of 0–2 ns (a), 2–4 ns (b), 4–6 ns (c), and 6–8 ns (d). The measurement was performed without a color glass filter. The 2–4 ns image optimized by the dark and saturation levels is shown in (e). The static fluorescence image is shown in (f).

減衰曲線が入るようにしている。我々は励起波長を吸収する有機色素がドーブされた高分子薄膜を用いて、オフセットの調整を行っている。色素がドーブされた高分子薄膜の発光強度は細胞試料よりも桁違いに大きい。そのため画像の強度変化を見ながら、オフセットを容易に調整することができる。また高分子薄膜については、光散乱画像と蛍光画像とを FLIM によって同時に得ることができ、光散乱画像では高分子薄膜のモルフォロジー像を高感度に検出できることがわかった。例として Fig. 7(a)–(d) に 4-ジメチルアミノ-4'-ニトロスチルベン (DNS) がドーブされたポリメタクリル酸メチル (PMMA) 薄膜の時間分解画像を示す。励起波長は410 nm、時間ゲートは2 ns ごとにとっている。膜厚は約700 nm、PMMA 膜中における DNS の吸収および蛍光極大波長は、それぞれ435 nm と600 nm である¹²⁾。薄膜は透明電極である Indium-Tin-Oxide (ITO) が均一に蒸着された石英基板上に PMMA を含んだベンゼン溶液を滴下し、スピコート法によって作成している。

Fig. 7(a)の0-2 nsの領域の画像において、楕円形が複雑に入り組んだPMMA膜のモルフォロジー像が明瞭に観測されていることがわかる。2 ns以降はコントラストが悪く、モルフォロジー像を見ることはできない。Fig. 7(e)にコントラストの補正を行った2-4 nsの領域の画像を示す。コントラストの調整を行えば、2-4 nsの画像においてもモルフォロジー像を見ることができる。しかし、そのモルフォロジー像の明暗は、0-2 nsの画像とは逆になっている。つまり0-2 nsの画像における明るい領域と暗い領域は、2-4 nsの画像においては暗い領域と明るい領域にそれぞれなっている。0-2 nsの画像の明暗における光子計数の差が100程度の領域において、2-4 ns画像の明暗の差は5程度であった。4-6 nsおよび6-8 nsの画像も僅かにモルフォロジー像を観測することができ、その明暗は2-4 nsの画像と同じであった。Fig. 7(f)にCLSM付属の検出器を用いて測定した静的な蛍光画像を示す。コントラストは良くないものの、時間分解画像と同一のモルフォロジー像を見ることができる。その明暗は2-4 nsの画像と同じである。

Fig. 7の実験では、フィルターボックスの色ガラスフィルターを外して測定を行っている。そのため0-2 nsの領域の画像のモルフォロジー像は、ダイクロイックミラーから漏れ出た試料からの散乱光と蛍光の重ね合わせによるものであり、明るい部分は散乱光によるものであると考えられる。実際に色ガラスフィルターを用いてFLIM測定を行うと、明暗の逆転は起こらなくなる。Figs. 8(a)-(d)に色ガラスフィルターを用いて測定した高分子薄膜の時間分解画像を示す。コントラスト補正を行った2-4 nsの領域の画像もFig. 8(e)に併せて示す。色ガラスフィルターを用いて散乱光の寄与を抑えると、0-2 nsの画像と2-4 nsの画像のモルフォロジー像の明暗は一致することがわかる。またFig. 8(f)に示すように、CLSM付属の検出器を用いて測定した静的な蛍光画像の明暗とも一致している。この結果は、Fig. 7(a)の明瞭なモルフォロジー像は主に光散乱によるものであることを示している。

Fig. 7(a)-(d)において、0-2 nsの領域では散乱光を主に観測し、2 ns以降は散乱光の寄与がなく、蛍光による像のみが観測されている。これは2-4 nsの領域の画像のモルフォロジー像の明暗が、静的な蛍光画像の明暗と一致することからもわかる。また0-2 nsの画像ではモルフォロジー像を明瞭に見ることができるのに対し、2 ns以降の画像または静的な蛍光画像では、モルフォロジー像は不鮮明であったり、観測できない場合が多い。本システムでは光散乱画像と蛍光画像を同時に観測することができ、光散乱画像では明瞭にモルフォロジー像を観察できることがわかる。

作成した高分子には色素濃度の濃淡および膜厚の差異があり、それらがモルフォロジーとして現れている。このモ

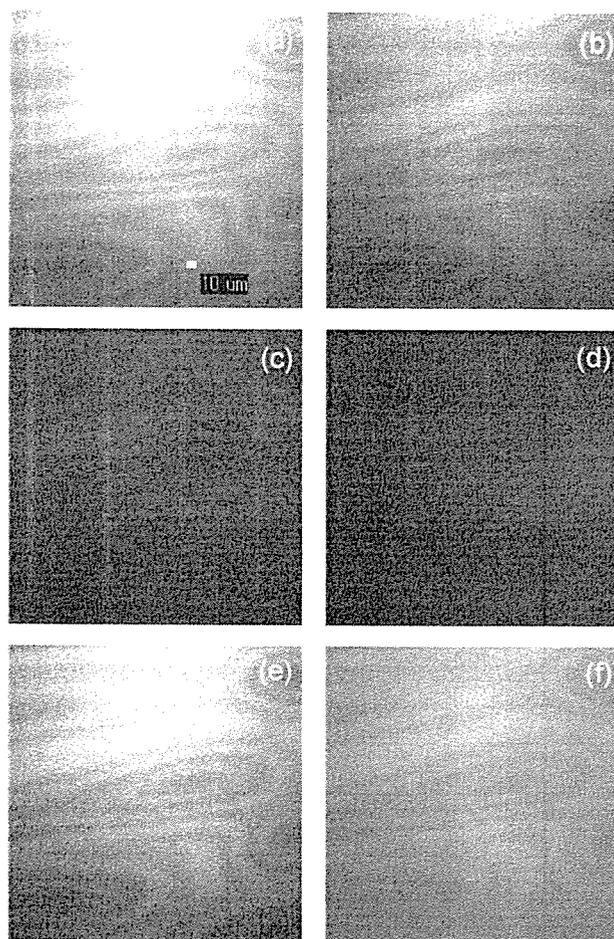


Fig. 8 Time-resolved images of DNS doped in a PMMA film with a time-interval of 0-2 ns (a), 2-4 ns (b), 4-6 ns (c), and 6-8 ns (d). The scattered light was removed by using a color glass filter. The 2-4 ns image optimized by the dark and saturation levels is shown in (e). The static fluorescence image is shown in (f).

ルフォロジー像は、高分子膜に含まれる溶媒のベンゼンが揮発するときに生じる自己組織化像であると考えられる¹³⁾。光散乱画像は基板からの反射光と薄膜からの反射光の干渉によって主に生じていると考えられるが、蛍光画像と明暗が逆転したモルフォロジー像が得られることについても干渉によって説明できるのか現在検討中である。また色素によって吸収される励起光強度の違いも、光散乱画像に反映されていると考えている。光散乱画像によって蛍光画像では得られない明瞭なモルフォロジー像を得ることができることから、光散乱画像と蛍光画像とを同時に測定することができるFLIMによる方法は、高分子薄膜のモルフォロジーの研究においても有効であると考えている。また時間分解ではなく、観測波長を変更することによっても蛍光画像と散乱画像とを順次得ることができる。しかし散乱光強度が非常に大きいため、散乱光強度を十分に抑えるようにフィルターの調整を行わなければ、蛍光画像に散乱光の一部が入ってしまう。時間分解による観測では、このようなクロストークを時間分解によって取り除くこと

ができるために、フィルターの交換などの煩雑な操作を必要とせず、また両画像を同時に測定できる長所を持っている。

4. 結 語

今回製作した時間ゲート法による FLIM 測定装置によって、僅か数分で生細胞の蛍光寿命イメージングを測定できることがわかった。また時間ゲート法による欠点を補うために、ピコ秒時間相関光子計数システムを FLIM システムに組合せ、特定の部位における蛍光減衰曲線および時間分解蛍光スペクトルを測定できる構成にした。本システムによって、定性的な蛍光寿命の分布は時間ゲート法による FLIM から得ることができ、特定の部位における定量的な蛍光寿命はピコ秒時間相関光子計数法から得ることができる。

生細胞の蛍光減衰曲線の測定は10年以上も前から行われているが、分子生物学や細胞生物学などの分野において、“蛍光寿命”というパラメーターはまだ十分に活かされていないと考えている。蛍光寿命測定は、励起エネルギー速度の直接測定を行えるだけでなく、蛍光寿命の変化から周囲の極性環境などの情報も得ることができる。蛍光寿命は光退色に依存しないために定量性に優れている。我々は蛍光寿命の有用性を広く知らしめるとともに、生物分野の研究者の方々と議論を深め、更なる工夫、改良、そして時間分解分光を用いた新たな測定・検出法などを提案していきたいと考えている。

謝辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金、特定領域研究「分子系の極微構造反応の計測とダイナミクス」の一環として行われたものである。

参考文献

- 1) T. Nagai, K. Ibata, E. S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, and A. Miyawaki: *Nature Biotechnol.* **20**, 87 (2002).
- 2) A. Miyawaki: *Dev. Cell* **4**, 295 (2003).
- 3) B. L. Sprague and J. G. McNally: *Trends Cell Biol.* **15**, 84 (2005).
- 4) N. Yoshida, M. Kinjo, and M. Tamura: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 312 (2001).
- 5) X. F. Wang, T. Uchida, D. M. Coleman, and S. Minami: *Appl. Spectrosc.* **45**, 360 (1991).
- 6) H. C. Gerritsen, M. A. H. Asselbergs, A. V. Agronskaia, and W. G. J. H. M. van Sark: *J. Microsc.* **206**, 218 (2002).
- 7) E. Gratton, S. Breusegem, J. Sutin, Q. Ruan, and N. Barry: *J. Biomed. Opt.* **8**, 381 (2003).
- 8) W. Becker, A. Bergmann, M. A. Hink, K. König, K. Bendorf, and C. Biskup: *Microsc. Res. Tech.* **63**, 58 (2004).
- 9) H. Wallrabe and A. Periasamy: *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 19 (2005).
- 10) I. Yamazaki, N. Tamai, H. Kume, H. Tsuchiya, and K. Oba: *Rev. Sci. Instrum.* **56**, 1187 (1985).
- 11) 津島 稔, 牛坂 健, 太田信廣: *分光研究* **53**, 93 (2004).
- 12) T. Nakabayashi, Md. Wahadoszamen, and N. Ohta: *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7041 (2005).
- 13) Y. Nabetani, M. Yamasaki, A. Miura, and N. Tamai: *Thin Solid Films* **393**, 329 (2001).

DISTINCT GLUTAMATE RECEPTORS GOVERN DIFFERENTIAL LEVELS OF NITRIC OXIDE PRODUCTION IN A LAYER-SPECIFIC MANNER IN THE RAT CEREBELLAR CORTEX

D. OKADA,^{a,b,c,*} C. C. YAP,^a H. KOJIMA,^d K. KIKUCHI^d AND T. NAGANO^d

^aLaboratories for Memory and Learning, and Cellular Information Processing, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan

^bPrecursory Research for Embryonic Science and Technology, JST, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

^cBrain Science and Life Technology Research Foundation, Itabashi, Tokyo 175-0094, Japan

^dGraduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-0033, Japan

Abstract—To evaluate roles of nitric oxide (NO) in neural functions, it is critical to know how neural inputs activate neuronal NO synthase in individual sites. Although NMDA receptor-dependent mechanism well explains postsynaptic, robust NO production, this sole mechanism does not explain some aspects of NO production in the brain, such as the low-level production of NO and the mechanism for presynaptic NO production. We hypothesized that the glutamate receptor involved in NO production is site-specific and controls the initial NO concentration in each site. We visualized NO production mediated by NMDA, AMPA and type-1 metabotropic glutamate (mGlu-1) receptors in rat cerebellar slices and granule cells in culture, with an NO-specific fluorescent indicator, diaminofluorescein-2. AMPA receptor, but not NMDA or mGlu-1 receptor, was responsible for NO production at parallel fiber terminals, which was blocked by CNQX, tetrodotoxin or voltage-dependent calcium channel blockers. More numbers of electrical stimulation were required for NO production in the molecular layer than in other layers, suggesting that AMPA receptor activation generates NO at lower concentrations through a remote interaction with NO synthase. Although Purkinje cell does not express NO synthase, we detected NO production in Purkinje cell layer following electrical stimulation in the white matter at 50 Hz, but not at 10 Hz. This NO production was tetrodotoxin-sensitive, suggesting occurrence in the basket cell terminals, and required

*Correspondence to: D. Okada, Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS), 11 Minami-Ooya, Machida, Tokyo 194-8511, Japan. Tel: +81-42-724-6257; fax: +81-42-724-6257.

E-mail address: dada@libra.ls.m-kagaku.co.jp (D. Okada).

Abbreviations: ACSF, artificial cerebrospinal fluid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoline-2,3-dione disodium salt; CPCCOEt, 7-(hydroxyimino)-cyclopropa-[b]-chromen-1a-carboxylate ethyl ester; DAF-2, diaminofluorescein-2; D-AP5, D-2-amino-5-phosphonopivalic acid; DAR-4M, diaminorhodamine-4M; DIV, days *in vitro*; DTCS, N-(dithiocarboxy)-sarcosine; GC, granule cell; GCL, granule cell layer; L-NAME, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester; mGlu-1, type-1 metabotropic glutamate; ML, molecular layer; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; PC, Purkinje cell; PCL, Purkinje cell layer; PF, parallel fiber; ROI, region of interest; (S)-DHPG, (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine; TMA-DPH, 1-(4-trimethylammonium-phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene-*p*-toluene sulfonate; TTX, tetrodotoxin; WM, white matter.

synergistic activation of mGlu-1 and NMDA receptors. In the granule cell layer, activation of AMPA or mGlu-1 receptor produced NO uniformly, while NMDA receptor activation produced NO in discontinuous areas of this layer. Thus, distinct glutamate receptors, including non-NMDA receptors, govern occurrence and level of NO production in a layer-specific manner. © 2004 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: AMPA receptor, NMDA receptor, mGlu-1 receptor, DAF-2, parallel fiber.

Nitric oxide (NO) serves as an intercellular signal involved in synaptic plasticity (Shibuki and Okada, 1991; Boehme et al., 1991; Calabresi et al., 1999), activity-dependent synapse formation (Wu et al., 1994) and neuronal development (Tanaka et al., 1994). To evaluate roles of NO in these neural functions, it is critical to know how neural inputs activate neuronal NO synthase (nNOS) in individual sites. It is widely accepted that NMDA receptor activation triggers production of NO at near-maximal rate due to the close linkage between the NMDA receptor and nNOS by PSD-95 (Brenman et al., 1996; Christopherson et al., 1999). This coupling seems to be central for glutamatergic activation of nNOS. However, there are many aspects in neuronal NO production that are not readily explained solely by the NMDA receptor-dependent mechanism.

The first aspect is related to NO concentrations generated by nNOS. Malinski and Taha (1992) measured bradykinin-dependent NO production from cultured endothelial cells with their electrochemical probe, and detected 450 nM NO. The responsible NOS, eNOS, has V_{max} about 10 times lower than that of nNOS (Förstermann and Gath, 1996); therefore it is deduced that the nNOS maximal activation causes production of 4.5 μM NO. On the other hand, direct electrochemical measurements showed that parallel fiber (PF) stimulation produced NO only at 5 nM in the molecular layer (ML) of cerebellar slices (Shibuki and Kimura, 1997). This discrepancy suggests a possibility that input activity does not necessarily evoke full activation of NOS. However, it is not clear how low level activation of NOS is achieved by neuronal activity.

Second, it is known that the initial NO concentrations determine the diffusion range of NO, which is a critical factor for NO action in brain tissues, an assembly of neurons with heterogeneous activity states (Gally et al., 1990; Wood and Garthwaite, 1994). NO from one potent source may affect cells located outside of the activated neuronal circuit. Such an information leakage outside of the 'wired