

生体をみる

パルスレーザー蛍光顕微鏡

膜電位の瞬間測定



木下一彦* 池上明*** 永山国昭***

はじめに

顕微鏡は、見えないものを見るための道具である。そもそも、小さすぎて見えないものを拡大する道具として生まれた。薄い試料にコントラストをつけるために染色法が開発されたが、それは染め分け、すなわち対象の化学的性質の差を可視化する技術につながった。見たいものだけを染めて見るとなると蛍光顕微鏡が断然有利で、蛍光抗体や蛍光プローブの結合した分子だけが暗い中で光って見える。ここまでは形態学だが、蛍光プローブはさらに、細胞内 pH や細胞膜電位など本来見えるはずのないものまで、蛍光の強度や色の変化を通じて“見せて”くれる。

表題のパルスレーザー蛍光顕微鏡も、見えないものをなんとかして見ようとする試みの一つである。目にも留まらぬ速い現象を見る、あるいは“一瞬を見る”ための道具である。

I. パルスレーザー蛍光顕微鏡

顕微鏡、特に蛍光顕微鏡下で速い現象を画像として記録するのは、やさしくない。一般に高速現象を捉えるにはシャッタースピードを速くする(検出器の高速化)かフラッシュ撮影を行うかの二つの方法があるが、蛍光画像は明るくないので、シャッタースピードを上げると光量不足になってしまう。設定した露光時間内に撮像を完了するには強力なフラッシュ光を使うしかない。

フラッシュ撮影のできる顕微鏡として組み立てたのが、図1のパルスレーザー蛍光顕微鏡である^{1),2)}。

レーザーパルスの持続時間は0.3マイクロ秒で、この光が当たっている間だけ蛍光が光る。この像を超高感度テレビカメラで捉えることにより、露光時間わずか0.3マイクロ秒で瞬間撮像ができることになる。レーザー光は十分強力で、一発のパルスで像が撮れる。フラッシュ撮影だから検出器側はシャッターを開けっ放しでもよいところがミソで、テレビカメラはふつうに使えばよい。ビデオに記録すると、どこか1コマに瞬間像が映る。図1のシステムでは、ビデオの代わりに画像処理装置に像を取り込み、解析を行う。

高速現象を0.3マイクロ秒の時間分解能で解析する装置ができたわけだが、今のところレーザーが毎秒数回しか光らないので、見たい現象のうち文字通り一瞬しか捉えられない。時間的に連続した画像を得るには、現象を繰り返させて、レーザーを光らせるタイミングを少しずつずらしながら撮像することになる。1回限りの現象の解析は原理的にも至難の技だが、“数瞬”を見るだけなら不可能ではなさそうなので、いま改良を試みているところである。

II. その応用：細胞膜電位の瞬間測定

パルスレーザー蛍光顕微鏡の持つマイクロ秒の時間分解能とマイクロメートルの空間分解能を生かした例として、外部電場により細胞膜電位が誘起される現象の解析を取り上げよう^{1),2)}。

1. 外部電場による膜電位誘起

図2の中央が球形の細胞だとして、その両側に電極を置いて電場をかけると、青色で表した細胞膜の

* KINOSHITA Kazuhiko Jr., IREGAMI Akira 理化学研究所生物物理 ** 現慶應大学医学部

*** NAGAYAMA Kuniaki 日本電子株式会社

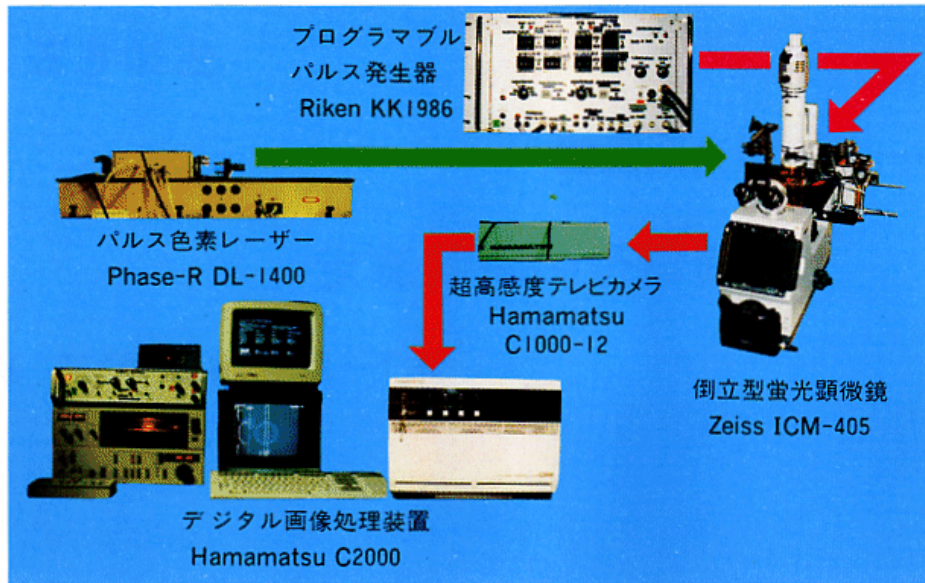


図1 パルスレーザー蛍光顕微鏡

中央上のパルス発生器は試料に電気刺激を加えるためのもの。

ところではイオンの流れが阻止されて表面にイオンが溜るので、膜をはさんだ電位差すなわち膜電位が発生する。陽極側では細胞外側が内側に対して正、陰極側では逆に外側が負の電位である。この膜電位誘起現象を見るために、球形の細胞であるウニ卵の細胞膜を、図2上に示したRH292という膜電位感受性蛍光色素で外側から染めた。この色素は、赤色で示した親水性の頭部と緑色で示した疎水性の尾部を持ち、図2下のように細胞膜にほぼ垂直に突き刺さると考えられる。色素の中央の紫色で示した部分が蛍光を出すところだが、ここに頭部から尾部に向かう電場がかかると蛍光が強くなり、逆向きの電場では蛍光が弱くなるという性質がある。したがって図2下のように膜電位を発生させた場合は、陽極側で蛍光が強くなり、陰極側で弱くなるのが見られると期待される。

図3上は、パルスレーザー蛍光顕微鏡による実測結果で、RH292の出す赤色の蛍光は予想通りの変化を示した。図中の数字は電場をかけてからの経過時間で、蛍光変化(膜電位発生)に数マイクロ秒かかっているのは、膜表面にイオンが溜る(膜の電気容量をイオン電流が充電する)のにこの程度の時間がかかるからである(色素が膜電位に応答するのにかかる時間は別の実験で確かめてあり、1マイクロ秒以内である)。

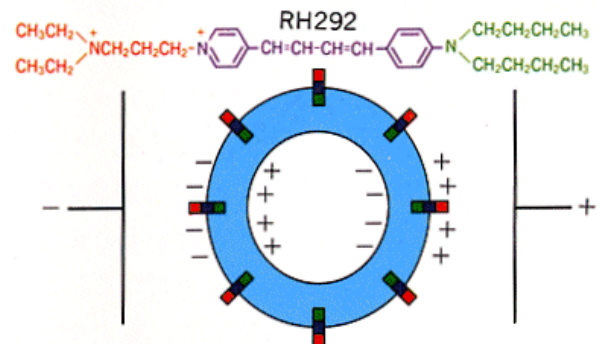


図2 外部電場に誘起された細胞膜電位の、膜電位感受性蛍光色素 RH 292による測定

かけた電場に対してどれだけの膜電位が発生するかは、理論的に計算できる。図3の一番右側、膜電位が定常に達したところで、陽極に面した部分の膜電位は0.75V、陰極側は-0.75Vである。図3下には蛍光強度変化を疑似カラーで表示してあり、RH292の蛍光は電位1Vあたり数十%も変化することがわかる。神経細胞の活動電位などは0.1Vくらいで、時間経過も1ミリ秒程度だから、かなり細かい解析も可能なはずである。ただし、生体内では非興奮性の膜がそばにあってそちらにも色素が結合してしまうので、実際の蛍光変化はずっと小さくなり、精度良い検出には繰り返しによる平均化が必要となってしまう。培養細胞系を使うとか、興奮性膜だけを特異的

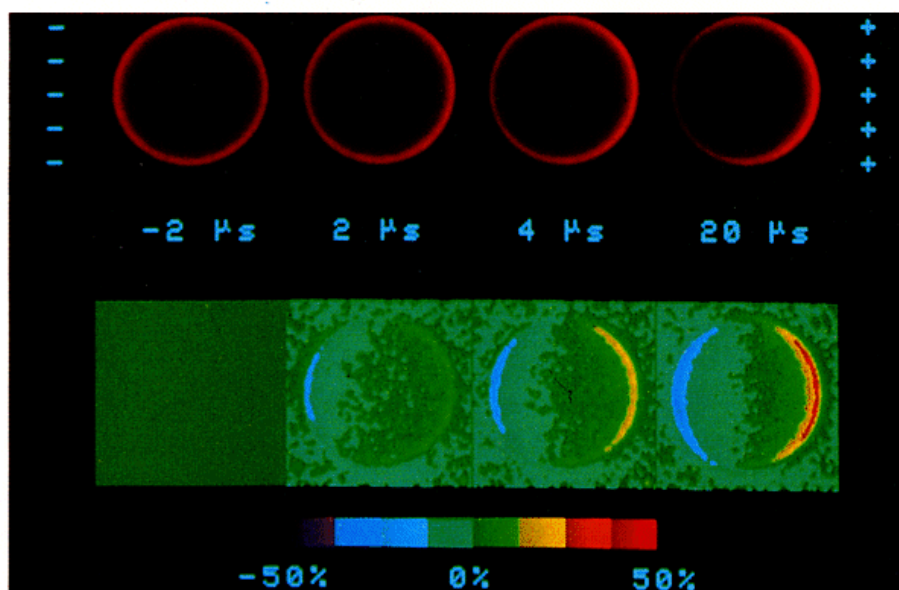


図3 外部電場によりウニ卵細胞膜に誘起された膜電位

上は膜電位感受性蛍光色素 RH292の蛍光像(蛍光強度の変化は膜電位に比例). 時間は100V/cmの直流電場を印加してからの経過時間. 下は電場印加前(-2 μ s)の蛍光強度との差を疑似カラー表示したもの.

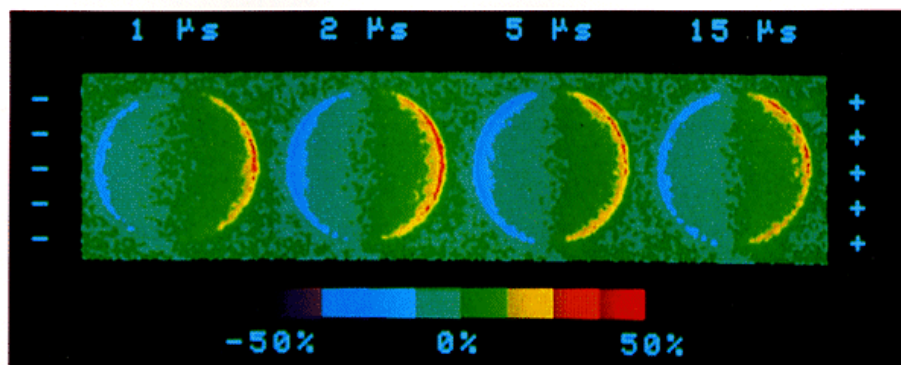


図4 大きな電場下での膜電位変化

図3下と同様で、電場の大きさのみ400V/cm.

に染色する手法を開発すれば、興奮伝達のメカニズムの解明などに迫る有力な手段となりうるだろう。

2. 細胞電気穿孔

さて、細胞外から電場をかける話に戻り、かける電場の強度を増していくと、あるところから膜に変化が生じるのが見えてくる。図4は図3下と同様の蛍光変化の疑似カラー表示だが、かける電場強度が4倍になっている。したがって蛍光の変化量(膜電位)も図3の場合の4倍になってよいところだが、そう見えるのは1マイクロ秒までである。それ以降、陽極側と陰極側では変化が飽和ないしむしろ戻り気味で、残りのまだ飽和に達していない部分のみ変化が

続く。全体として、膜電位の絶対値がある値(約1V)に達すると、それ以上の上昇が抑えられるように見える。

これは、細胞電気穿孔という現象が見えているのである^{1),2)}。細胞膜にかかる膜電位が約1Vという閾値に達すると、あたかも膜に多くの小孔が開いたかのように膜の透過性が増大する。膜の両側に溜ったイオンが膜を通して流れてしまうので、膜電位上昇が阻止されるのである。図4から、電気穿孔は非常に速いプロセスで、膜電位が閾値に達するや否や1マイクロ秒以内に起こることがわかる。さらに詳しい解析から、穿孔の起きた部分の膜透過性は非常に

高く、膜面積の0.01~0.1%が小孔に置き換わったとみなせるほどに達していることがわかった。ただし透過性が異常に高いのは外から電場がかかっている間だけであり、電場を切ると1ミリ秒以内に透過性は1/10以下に下がる。

電場を切った後、膜が完全に回復するには時間がかかり、しばらくの間(条件を選べば何時間も)小孔が残る。この小孔の実効径は制御できるので³⁾、孔径以下の分子を細胞に出し入れして細胞内組成を人為的に変えることができる。特に、細胞内へDNAを導入する手段として脚光を浴びている⁴⁾。もっとも、DNAの場合、本当に小孔をすり抜ける形で細胞内に入っていくのかどうかはまだはっきりとはわかっていない。そもそも“小孔”というのも1個1個を見た人はまだおらず、分子レベルの実体は明らかでない。パルスレーザー蛍光顕微鏡をはじめ、いろいろな手段で研究が進められつつあるのが現状である。

III. 展望

膜電位に限らず、通常の蛍光顕微鏡で得られる情報はすべて、パルスレーザー蛍光顕微鏡の下で時間分解することができる。例えば図5に示すのは、同じ蛍光色素RH292で染めたウニ卵だが、励起側と検出側に図中の矢印の方向に向けた偏光板を入れて測定したものである。色素の向き(図2上に示したRH292分子の長軸方向)と偏光板の偏光方向が一致したとき蛍光強度が最大になるのだから、図5の結果は図2下の模式図、すなわちRH292が膜面に垂直に突き刺

さるはずだという予想を、実験的に確かめたことになる。図5も0.3マイクロ秒の瞬間測定で、この時間分解能で分子の向きの測定ができるわけである。例えば電気穿孔の瞬間に膜中の分子の向きが乱れるとすると、図5の明るい部分と暗い部分の差が小さくなるという形で検出されるはずである。実際見てみるとそういうことは起きないようで、膜構造の乱れはあったとしても局在しているらしい。穿孔に伴う膜構造変化は細胞融合を引き起こしうる(細胞電気融合⁵⁾)と考えられているから、融合の分子メカニズムを考えるうえでも重要な知見である。

時間分解測定の基本は、試料に刺激を与えてその応答を測ることである。上では電場刺激の例を取り上げたが、ほかにも光刺激や化学刺激など、いろいろ考えられる。フラッシュ撮影のおかげで細胞が動いていてもボケずに撮れることを考えると、ミキシングチェンバーで刺激剤と混合した細胞を流しながら下流で測ったりするのも面白いかもしれない。Caged ATP(光照射によりATPができる)など光刺激を通じた化学刺激も、高時間分解能を活かすのに役立つだろう。

レーザーを使ったので大きな装置になってしまったが、光源として優れているから使ったままである。通常のフラッシュランプでは、集光と波長選択の段階で光量の損失が大きい。レーザーの使い方としては最も単純なものだから、マイクロ秒の時間分解能までは要らないという場合でも、使ってみることを検討されてはどうであろうか。

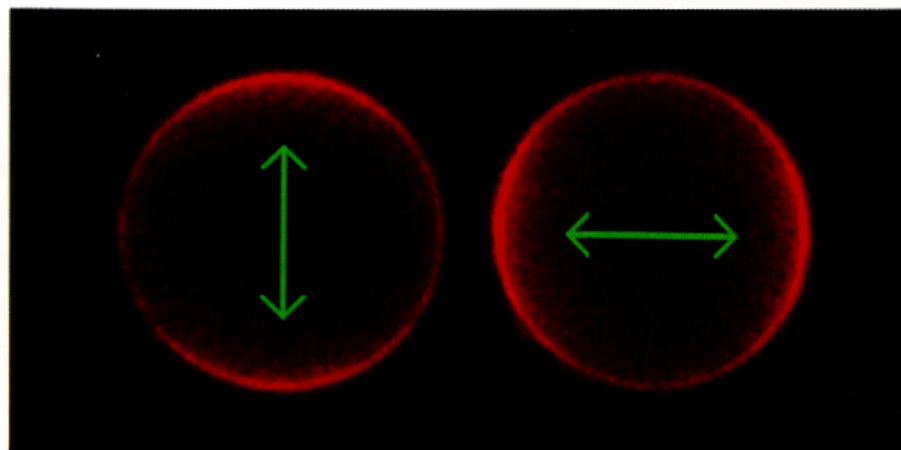


図5 RH292で染めたウニ卵の瞬間偏光蛍光像
矢印は偏光板の偏光方向を表す。

ただし、高速性と高精度とは基本的に両立しない要求であることは、十分認識していただきたい。例えば数 mV の膜電位をパルスレーザー蛍光顕微鏡で捉えるのは、(よほど何回も平均すればともかく)難しいのである。

ここに述べたのは、日比野政裕、重盛正哉、芦川育夫、伊藤博康、齊田信行、吉村英恭の諸氏との共同により、平野憲一博士はじめ多くの方々の御協力を得て行った研究の成果である。これらの方々に深く感謝いたします。

■文献

- 1) Kinoshita, K., Jr., Ashikawa, I., Saita, N., Yoshimura, H., Itoh, H., Nagayama, K. & Ikegami, A. : *Biophys. J.* 53,1015-1019 (1988)
- 2) Kinoshita, K., Jr., Ashikawa, I., Hibino, M., Shigemori, M., Yoshimura, H., Itoh, H., Nagayama, K. & Ikegami, A. : *Proc. O-E/* *LASE '88*, 909, 271-277 (1988)
- 3) Kinoshita, K., Jr. & Tsong, T. Y. : *Nature* 268, 438-441 (1977)
- 4) 葛西道生, 稲葉浩子 : 蛋白質 核酸 酵素 31,1591-1603 (1986)
- 5) 森川弘道 : 細胞工学 3, 497-505 (1984)