

レーザートラッピング技術による生細胞の機能観察

寺川 進, 坪井 貴司†

浜松医科大学 光量子医学研究センター (〒431-3192 浜松市半田山1-20-1)

Functional Study of Live Cells by Laser Trapping Technique

Susumu TERAKAWA and Takashi TSUBOI†

Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Hamamatsu, 431-3192

(Received February 5, 2003)

We tested a hypothesis that water ejection takes place in the secretory cell. A micro bead was held at about 1 μm distant from the cell surface by laser trapping with a 1064 nm light, and the position of the bead was measured by DIC imaging with a visible light. A series of small displacements of the bead was detected transiently upon stimulation of the cell, indicating repetitive occurrences of volume flow. The water ejection from endocrine cell detected by the present technique has a significant role in the exocytotic release of hormones.

Key Words: Numerical aperture, Exocytosis, Evanescent wave microscopy, Water secretion, Endocrine cell

1. はじめに

細胞はそれ自体小さなものであるが、その中に無数ともいえる分子を取り込み、それらの相互作用や化学反応を安定して継続させ、制御し、実に様々な仕事をしている。その様子は、限られた回路とプログラムによって何でもこなすコンピュータに似ている。したがって細胞に関する研究対象は広いが、我々は、細胞からの信号分子の放出に興味を向けている。ホルモンや伝達物質さらに各種の酵素類は、細胞内で合成され、分泌顆粒に濃縮されて集積し、何らかの制御の下にいわゆる開口放出の機構によって細胞外に放出される。分泌顆粒は細胞膜と類似の分子的構造を持つ限界膜によって包まれる構造をしており、この限界膜が細胞膜と融合して一体化し、顆粒の内容が位相幾何学的な変形によって細胞外に置かれることになる (Fig. 1)。従来、この細胞外に置かれた物質は開口放出反応に際して急に水に溶けた状態に変化し、水中の分子としてブラウン運動によって所定の目的地に移動するものと考えられてきた。すなわち、実際の放出の過程は細胞の能動的な力によるものではなく、自然に起こる拡散現象と思われてきた。我々は、超高開口数を持つ対物レンズを開発し、これをレーザーを用いたエバネッセント波照明による蛍光観察に応用した。このエバネッセント波照明による顕微鏡観察の手法と、レーザートラッピング法を用いて、細胞からの物質放出が単なる拡散ではなく水の噴出によって起こるものであることを

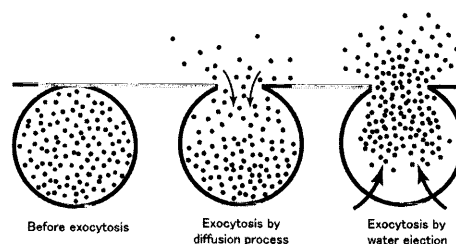


Fig. 1 Hypotheses for the process of transmitter release upon the exocytotic response. Two models are compared. Arrows indicate water flow.

証明した仕事について紹介しよう¹⁾。

2. 開口放出の仮説と証明法

2.1 開口放出

開口放出は、シャボン玉のようなリン脂質膜でできた2つの球形の膜同士が融合して一つになる反応に似ている。細胞膜がシャボン玉と少し異なる点は、膜同士は単に接触しても融合せず、融合するかどうかは膜内のタンパク質の状態によって制御されていることであろう。研究の趨勢はこの融合を開始するタンパクの制御機構に集中しており、その膜の融合反応の後に放出反応がどのように引き継がれるかはあまり議論されてこなかった。我々は、開口後に物質がどのように細胞から出ていくのかについて二つの仮説を検討することとした。一つは、

†現住所: Department of Biochemistry, School of Medical Science, University of Bristol, University Walk, Bristol, BS8 1TD, UK.

自然の過程としての拡散によるというこれまでの仮説であり、もう一つは細胞から能動的に水が噴出することによって顆粒内容が押し出されるとする仮説である (Fig. 1). ミクロな世界で起こる反応をどのようにしたら観察し区別することができるかは、困難な問題であった。水が噴き出るのであれば、そこには水圧が存在することになり、力学的な測定の対象となる。原子間力顕微鏡のような微弱な力を測定する手法を用いれば、そのような力も計れるのではないかと考えられたが、水中で水分子のブラウン運動に近い力の発生が計れるかどうかという賭に、大金を投入して装置を購入するのは難しい。お椀に棒を刺したような形をしている風力計のようなものでミクロの測定ができないかと考えた末に、レーザートラップ法に思い至った。レーザートラップ装置は比較的簡単に自作でき、安価である。開口放出のときの開口の大きさは大きく見積もっても $0.5\mu\text{m}$ 程度であり、このような小さな孔からの噴水を検出しようと試みた。

2.2 レーザートラップ法

レーザートラップ法はすでに広い応用を持っているが、最近の固体レーザーの発達によって、より使いやすくなってきている。特に、かつての共産圏諸国で作られるレーザーは安価であり、レーザートラップ装置を容易に自作できる。我々は、ロシア製の半導体励起YAGレーザー ($\lambda=1064\text{ nm}$, TEM₀₀) を購入し、手持ちの顕微鏡に組み合わせて、レーザートラップ装置を構成した。開口数1.35の対物レンズ(オリンパス)を使用し、その後方開口(瞳)一杯に平行レーザー光が入射するようにした。近赤外光を可視化するカード型のスクリーンを使って光軸調整などを行った。これによって、容易に直径 $1\sim 2\mu\text{m}$ のラテックスビーズを水中においてトラップすることができた。ビーズの位置の測定には、通常我々が用いている微分干渉法を採用した。トラップされたビーズはちょうど焦点にあり、可視光領域でノルムスキープリズムを使用した微分干渉像では、相補的な白黒の半月模様が生ずる。この半月の中心の明るさからビーズのz軸方向の動きが検出できた (Fig. 2)。レーザーの出力を抑えることで、トラップ力は減少し、ビーズは水中で次第に大きなブラウン運動をするようになり、最後にはトラップからはずれる。水中では、ブラウン運動より小さな圧力や水流は存在しないので、トラップからはずれる直前が最大感度を与えるレーザー出力となるが、このときは基線のノイズも大きくなる。したがって、ある程度レーザー出力を上げて基線の揺れを下げることがあり、あるところに妥協点が存在する。

3. 測定法

3.1 細胞

副腎髄質細胞はクロマフィン細胞とよばれ、アドレナリンやノルアドレナリンを放出する内分泌腺の機能を果たしている。元々神経細胞に向かって分化した細胞が、その形を変えて後腹部に納まったものである。ウシの副

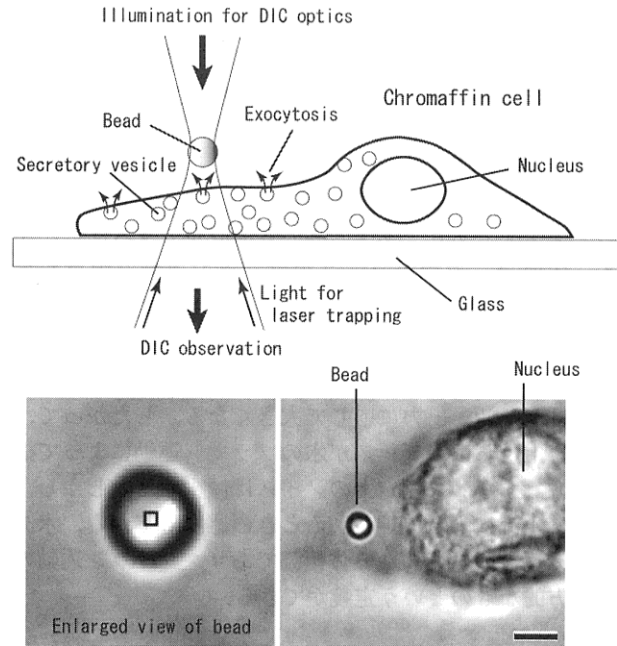


Fig. 2 Method for detecting minute ejection of water from a secreting cell. Top; sectional view of a chromaffin cell with a bead trapped nearby with a laser beam. Bottom; DIC images of a chromaffin cell (right) and a bead (left) held above it. Bar, $5\mu\text{m}$.

腎の血管からコラーゲンを分解する酵素液を流して細胞間の結合を切り離し、これらの細胞をばらばらにしてガラス上で培養する。細胞は長径 $30\mu\text{m}$ 、短径 $10\mu\text{m}$ 、高さ $10\mu\text{m}$ ほどの大きさが普通である。核のある部分が厚く、その周辺部は 1 から $3\mu\text{m}$ と薄く広がっている。細胞の接合したガラス基板を倒立顕微鏡のステージに置き、対物レンズを通して近赤外光でレーザートラップを行い、白色光で通常の微分干渉観察を行った。細胞内には平均直径 $0.4\mu\text{m}$ の分泌顆粒がほぼ均等に分布しており、それらは常にブラウン運動し、また微小管のレールに乗ってどこにでも移動する。細胞内でCaイオン濃度が上昇する条件になると、色々なタンパク質の酵素的な活性が上がり、分泌顆粒と細胞膜とが結合し、さらにそれらは融合して、一体の構造となり、膜を基準にして位相幾何学的に考えると、顆粒内の物質が細胞外に移動したことになり、放出が起こる。

3.2 検出感度

ラテックスビーズは 1 または $2\mu\text{m}$ のものを使用した。このビーズを注意深く細胞上面で細胞膜から $1\mu\text{m}$ ほど離れたところに把持する。まず細胞上面の高さを対物レンズの焦点合わせで見当をつけ、フォーカスつまみの位置として記録する。ビーズをトラップしてからその高さまで下ろすという手順を取る。もし、下ろしすぎるとビーズは細胞膜面に接触し、電気的な力で結合し、我々のレーザー強度では、これを引き離すことができなくなる。これによって、逆にビーズが細胞から離れているかどうか判定できる。ビーズが細胞から離れていることが、細胞から生ずる水流を検出する条件となる。ビーズが細胞膜面に接着しているときは、実際にビーズは動くことが

できず、水流を検出することができない。ビーズの動きは微分干渉法によって焦点面にあるビーズの上に行きわたる明暗の変化を測定することによって検出できる。微分干渉法では、小さなビーズは、わずかに焦点を変えるだけで明暗の最大値と最小値の間を変化させる。焦点の1 μm の変化で100%の明るさの変化が起こる。このスロープは極めて急勾配であり、感度の高い変位計ができることになる。実際は、水中のビーズのブラウン運動が限界を与え、ノイズのレベルの検出感度は5 nmであった。レーザートラップが一定の平衡位置からの変位に応じたバネバカリのようなものと考え、バネのヤング率に相当する定数はレーザー出力に応じて大きくなる。したがって、出力を上げれば、ビーズが水のブラウン運動によって揺れる幅、すなわち測定上のノイズは減少する。しかし、同時に水流によって押されるとき感度も下がる。水流といえるものはいわゆる体積流であり、ブラウン運動の非等方的なものという定義ができる。

4. 実験結果

4.1 変位応答

細胞に1ミリ秒の電流パルスを通して電気刺激すると、レーザートラップされたビーズが細胞から遠ざかる方向へ変位してすぐ元に戻る、という反応が多数回検出された (Fig. 3)。その反応の様子は、カーボン電極を用いて測定したアドレナリン放出の反応パターンと矛盾しないものであった。速いスパイク状の一過性反応が色々な大きさで生じた。FFT解析によって、変化率の速い成分を除くと、小さいけれども10秒以上持続する遅い反応もあることがわかった。

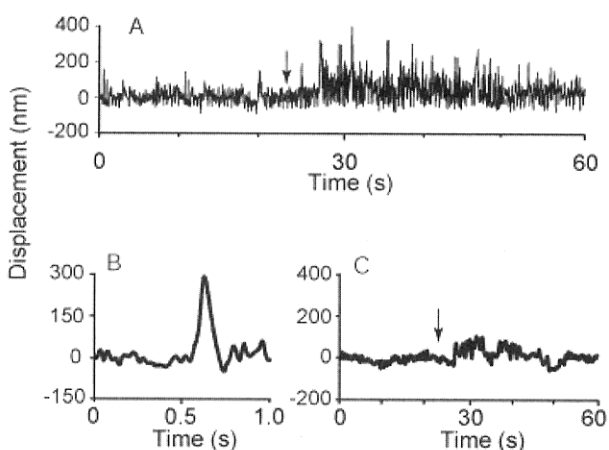


Fig. 3 Displacement of the bead trapped above the cell. The upward deflection indicates movements of the bead away from the cell. A: some noise on the baseline and many spiky responses appeared after an electrical stimulation. B: spiky response recorded at a fast time scale. C: slow response extracted by filtering the raw signal by FFT filtering. The cell was stimulated at the time indicated by the arrow.

4.2 薬剤効果

溶液に、細胞膜や顆粒膜にあるCl(クロライド)チャンネルを阻害するものとして知られているDIDS (Distylenedithioisothyanate)を加えて、10分くらいしてから同じような測定をすると、速いスパイクの大きさが小さくなり、その数が減少した。DIDSがClチャンネルを抑制すると水の分泌機構が停止する。したがって、この実験結果はビーズの変位応答が細胞からの水分泌に基づくものであることを示している。

4.3 水流の広がり

通常、ビーズを把持しておく位置は細胞表面から1 μm 程度としている。ビーズに働くような力がどこまで広がっているのかを調べるために、対物レンズを動かして、ビーズを把持している位置を(細胞から)遠くへ移動させて計測すると、距離3 μm で変位反応を検出するのが難しくなる。水流の噴出すると思われる孔の大きさは1 μm より小さいもので、その力は直接遠くまでは及ばないようである。

4.4 ガラスバネ

ビーズをレーザーでトラップして細胞上に把持する代わりに、細く引き伸ばしたガラス繊維に付けて細胞上に把持する、という手法を取ることもできる。レーザートラップのための近赤外光線は細胞の下にある対物レンズから出射し、細胞を通過した後に焦点を形成している。したがって、近赤外線の捕捉力に細胞の何らかの光学的性質の変化が影響を与えると、それが、ビーズの動きとなって現れる可能性がある。0.1 μm より細くしたガラス繊維を水中でビーズに触れさせると自然にビーズはガラス繊維先端に付着する。このようなガラス繊維(実際はガラス管の細いもの)の他の端をマニピュレータで操作し、ビーズを細胞表面近傍に把持するのであるが、レーザートラップ法に比べて、長い繊維の先端の位置的安定性が低く、測定は大変困難であった。しかし、この方法でも基本的にはレーザートラップ法のとおり同じ信号が得られた (Fig. 4)。

4.5 エバネッセント照明レーザー顕微鏡

エバネッセント波はガラスと水の界面に臨界角以上の大きさで光ビームを入射させ、これを界面で全反射させるときに界面上に生ずる薄い光の層である。この光の層

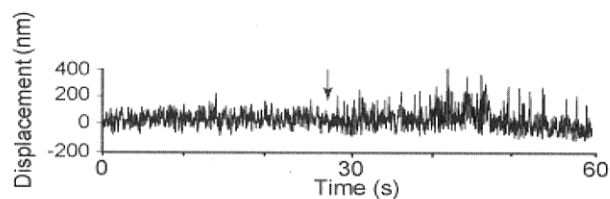


Fig. 4 Displacement signal recorded with a bead held at the end of a thin glass fiber. The upward deflection indicates the movement of bead away from the cell. The cell was stimulated at the time indicated by the arrow.

の強度は界面からの距離に応じて指数関数的に減少する。その減衰定数は媒質の屈折率の比や光の入射角によって決まる。我々は、開口数が1.65という値を持つ対物レンズを開発し、レンズの後方よりレーザー光を導入して、焦点面にエバネッセント場を作って蛍光観察している^{2,3)}。このレンズを使って作られるエバネッセント場の減衰定数は50 nm程度になる。レーザートラップとは違うが、これもレーザー顕微鏡の一つといえよう。培養条件下にある細胞はガラスに密着しているのので、分泌反応を示す細胞膜はこのエバネッセント場の中に置くことができ、分泌顆粒内に蛍光色素が取り込まれた状態で細胞を電気刺激すると、顆粒内の蛍光分子は細胞外、つまりガラス面に対して、放出される。この様子を指数関数的なエバネッセント場の中で観察すると、蛍光分子が一瞬にして広がり消失するのが見える²⁾。このとき、多くの顆粒の反応において、蛍光強度の一過性の上昇が起こるのが認められる。この過渡的な反応は、顆粒内の蛍光分子の集団が、等方的なブラウン運動(拡散過程)によって細胞膜とガラス面の間に分布するとすると説明がつかないが、ガラス面のごく近傍に押し付けられるように偏って分布する瞬間があるとすると説明できる。このことは分子の

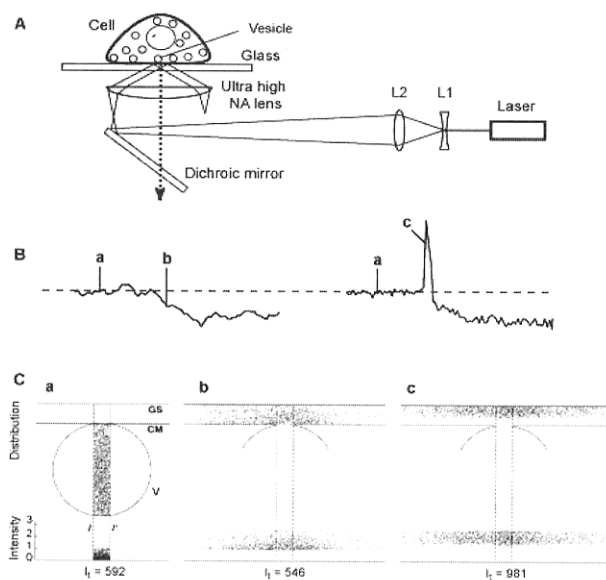


Fig. 5 Test of the hypothesis by evanescent field illumination with a laser microscope. The secretory vesicles were stained fluorescently with acridine orange. A; set-up of the laser microscope. The light was totally reflected at the top surface of the glass. Vesicles were excited with a thin layer of evanescent wave. The broken line indicated the fluorescence from the acridine orange. B; Change in fluorescence intensity upon exocytosis of secretory vesicles. Some vesicles showed a transient increase before their disappearance (right) and some did not (left). C; Monte Carlo simulation of the fluorescence intensity change with (c) and without (b) water-ejection from the vesicles. Each dot represents a molecule of acridine orange (top) and its fluorescence intensity (bottom). GS, glass surface. CM, cell membrane. V, vesicle. I_t , total intensity of acridine orange fluorescence. The time points a - c in B correspond to schemes a - c in C.

分布に関するモンテカルロ・シミュレーションによってわかる¹⁾(Fig. 5)。実験的に、蛍光強度の一過性の上昇を示す反応の数は、細胞をDIDSで処理することによって激減する。このことは、エバネッセント照明によって観察できる顆粒からの蛍光分子の放出反応も、水流の噴出によって強化されていることを示している。

5. 結論

以上に述べた実験結果はいずれも、分泌顆粒からの開口放出が、溶質が溶媒に溶けて単なるブラウン運動の結果細胞外に放出されるのではなく、顆粒から水が噴出し、その噴出する水によって顆粒内容が押し出されるものであることを示している。従来、外分泌細胞については、顆粒からの粘液や酵素の分泌に伴って水分泌が起こることはよく理解され、その機構もほぼ完全に解明されている。しかし、内分泌細胞については、ホルモンを血管に沁み出させるだけでよいと考えられており、反応の測定が困難であったこともあって、細胞からの積極的な水放出反応はこれまで無視されてきた。水が細胞内から細胞外に放出されるとすると、細胞の体積は減少することになる。内分泌細胞は内分泌腺の中に集積しており、ほとんど細胞間の隙間が無い。ホルモンはその狭い隙間に放出されるわけで、その反応と同時に各細胞が縮小することは、細胞間隙が拡大することであり、ホルモンがそこを通過して血管に到達するための理にかなっていない。外分泌細胞は血管側から水分を汲み込んで消化管側に送るので、水分泌を持続できるが、内分泌細胞では、細胞内にある水を汲み出すので、放出には限りがあるであろう。しかし、放出された水の一部は開口放出をしなかった細胞膜の部分から再吸収され循環することも可能であり、実際そのような動いているものと思われる。レーザートラップという手法によって、外分泌細胞と内分泌細胞が高い相同性を持つことが理解できるようになったことは大きな進歩である。

レーザートラップ法は、すでに細胞生物学の様々な場面で応用されて来ているが、我々は、その高感度を利用した新しい応用法を開発した。ブラウン運動に極めて近いレベルでの力学的な測定には、レーザートラップ法が原子間力顕微鏡より使いやすいといえる。

参考文献

- 1) T. Tsuboi, T. Kikuta, T. Sakurai, and S. Terakawa: *Biophys. J.* **83** (2002) 172.
- 2) T. Tsuboi, C. Zhao, S. Terakawa, and G. A. Rutter: *Curr. Biol.* **10** (2000) 1307.
- 3) T. Tsuboi, T. Kikuta, A. Warashina, and S. Terakawa: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282** (2001) 621.