3PD045

蛍光画像解析による単一心筋ミトコンドリアの活性測定

○大鷲 笑子、渡辺 功一、太田 善浩
東京農工大学 工学部 生命工学科

〔目的〕

真核細胞に見られる細胞内小器官であるミトコンドリアは、物質の酸化によるエネルギーを用いて酸化的リン酸化をし、ATPを合成することを主要な役割としている。そこで、本研究では単一の、かつ固定されたミトコンドリアに焦点をあて、基質添加に伴うNADHの生成、フラビン蛋白質の還元及び膜電位の変化を確認する。

また、ミトコンドリアのATP合成機構のさらなる解明のために、上述した事を踏まえて単一ミトコンドリアにおけるATPの合成を確認したい。

〔実験〕

ガラスプレパラート上に生きている状態でミトコンドリアを固定し、ここにミトコンドリア内のクエン酸回路の反応を促進させるための基質として、終濃度3.6mMのリンゴ酸を加えた。この基質の添加により、NADHの生成、フラビン蛋白質の還元、膜電位の変化をCCDカメラと蛍光顕微鏡を用いて観察した。この際、フラビン蛋白質とNADHは自家蛍光で、膜電位の変化は膜電位感受性色素であるTMREを使用した。

〔実験結果〕

基質の添加に伴うNADHの生成、フラビン蛋白質の還元、膜電位の変化を単一の、固定されたミトコンドリアで測定した。CCDカメラと蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度時間変化を観察したところ、個々のミトコンドリアについて上述した3つの変化を観察することが出来た。

また、リンゴ酸を添加して反応させた上澄み液に含まれるATPを、ルシフェリン-ルシフェラーゼを用いて定量し、ミトコンドリア1個あたりどれだけのATPを合成するのか、現在検討中である。

E. Ohwashi, K. Watanabe, Y. Ohta: Fluorescence imaging analysis of a mitochondrial activities : single mitochondria measurements.

3PD046

単一ミトコンドリアの蛍光計測による副腎皮質
ミトコンドリアのプレグネノロン生成機構の研究

フーラハン美由紀¹、吉村珠美¹、川戸 佳²、○太田善浩¹

¹東京農工大学・工学部・生命工学科

²東京大学大学院・総合文化研究科

副腎皮質細胞では、ACTHなどのペプチドホルモンが受容に結合すると、プレグネノロンを生成しステロイドホルモンを合成する。受容体に結合した後にACTHが細胞内部に引き起こす現象は多く、その現象のひとつにカルシウムイオンの増加がある。受容体を介さずに細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させた場合でも、細胞内のステロイドホルモンの合成速度は増加する。このため、カルシウムイオン濃度の増加がステロイドホルモン合成の促進につながることは明らかであるが、そのメカニズムは不明であった。我々は、細胞質で増加したカルシウムイオンがミトコンドリアのNAD(P)H濃度を増加させ、その結果ステロイドホルモン合成速度が上昇するという仮説を立て、その立証を試みた。

ステロイドホルモンはNADPHからP450_{scc}に電子が渡ることで合成されるので、測定対象には、ミトコンドリア内部のNAD(P)H量、及び、ミトコンドリアのP450_{scc}によるプレグネノロン生成速度を選んだ。カルシウムイオンの添加は懸濁されたミトコンドリアの凝集状態を変化させるため、ミトコンドリアをカバーガラスに吸着し、単一のミトコンドリア内部での反応を測定した。これにより、ミトコンドリアの会合による測定結果への影響を取り除いた。NADPH量とコレステロール代謝速度は蛍光法により測定した。

NAD(P)H合成酵素の基質であるリンゴ酸とグルタミン酸の混合液をミトコンドリアに添加すると、ミトコンドリア内部でNAD(P)H濃度の増加とプレグネノロン生成の両方が観察できた。加える基質の濃度を増加させると、これらは両方とも増大した。低濃度の基質を添加した場合は、カルシウムイオンを更に添加するとNAD(P)H濃度の増加とプレグネノロン生成速度の増大が観察できた。以上から、細胞質でカルシウムイオン濃度が増加するとミトコンドリア内部でNAD(P)H合成を活性化し、P450_{scc}によるプレグネノロン生成が促進することが示唆された。

M. Hoolahan, T. Yoshimura, S. Kawato, Y. Ohta: Fluorescence Study on Pregnenolone Synthesis in Single Adrenocortical Mitochondria.

3PD047

Mueller行列を用いた蛍光偏光イメージング

○後藤晃、大場哲彦、大木和夫（東北大・院理・物理）

蛍光異方性は生体膜の流動性を知る手法として広く利用されている。これは試料中の色素の回転拡散の速さを通じて、色素の置かれた環境の情報を得る手法である。蛍光分光器で測定した場合、蛍光異方性は空間平均値しか求まらない。そこで我々は蛍光顕微鏡に自由に回転する偏光子を2つ取り付け、蛍光偏光の空間分布を測定する装置を作った。

過去にFushimiらは同様の装置により、あらゆる励起方向による蛍光像を平均化することで励起方向に依らない蛍光異方性画像を取得している。しかしこの方法では平均化により色素の配向性の情報が失われてしまう。そこで我々は偏光を一般的に配向し、試料のMueller行列を得る方法を開発した。

「Mueller行列の方法」では、線形独立な3つの励起方向・3つの検光方向の組み合わせで蛍光像を撮影し、行列演算により試料のMueller行列を得る。一度Mueller行列が求まれば、試料のあらゆる偏光応答を計算により求めることができる。それゆえ色素の運動性の情報(蛍光異方性)だけでなく、色素の配向性の情報も得ることができる。また装置の光学部品もMueller行列で記述できるため、偏光の歪みの補正を統一に行なえる。

この手法を検証するために、まず装置の各光学部品のMueller行列を求め、次にモデル脂質膜としてDPPCに色素DPHを入れたリポソーム系の偏光測定をした。装置の補正をしたMueller行列(Fig. 1)を算出し、それから蛍光異方性(Fig. 2)と色素の配向分布(Fig. 3)を得た。その結果蛍光異方性の平均値は分光器の値とほぼ一致し、DPHは膜面に縦に配向していることがわかった。

現在は、DPH以外の色素の波長域での測定、また細胞への適用を検討中である。

Fig. 1 Mueller行列画像

Fig. 2 蛍光異方性画像

Fig. 3 配向分布画像

線分の方向が色素の平均的な配向方向を表わしている。

A. Goto, T. Ohba, K. Ohki : Fluorescence polarization imaging microscopy by using Mueller matrix method.

3PD048

蛍光相関分光法によるエンドサイトシスの観測

○吉田直人、金城政孝、田村守
(北海道大学・電子科学研究所)

(序) 蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy : FCS) は、 $f(10^{-13})$ オーダーの微小領域における発光物質のブラウン運動に起因する蛍光の「強度ゆらぎ」を観測することにより、その物質の大きさ、拡散速度、濃度を定量化する方法である。これまでに、FCSを用いた均一溶液系での化学反応の研究などが多く報告されている。我々は、この方法の単一細胞内での物質測定への応用を試みている。今回、培養ウシ血管内皮細胞へのlatexビーズの取り込み(エンドサイトシス)の観測を行った。

(方法) 培養液またはHanks液にローダミンでラベルしたlatex微粒子(直径10nm, 30nm)を適量添加した。ディッシュ底部に接着した細胞の内部に、共焦点対物レンズの焦点を合わせ、微粒子の蛍光測定を行った。取り込み量の時間変化、細胞内での微粒子の拡散速度の測定などを試みた。

(結果) 微粒子添加後、時間の経過につれて、細胞内の発光強度が上昇することが認められた。これは、微粒子が細胞内部に取り込まれる過程を示しているものと思われる。また、細胞内部での微粒子の拡散速度は、Hanks液内に比べて2-5分の1程度遅いことがわかった。微粒子は、エンドサイトシスのため、細胞内では複数個がベシクルに包まれた状態で存在すると考えられているが、今回の我々の実験結果と併せて議論を行いたいと思う。

N. Yoshida, M. Kinjo, M. Tamura : Measurement of endocytosis using FCS method