レーザー光励起高感度蛍光顕微鏡システムによる生体細胞内カルシウムイオンの濃度分布測定

Measurements of Calcium ion concentration distribution in a living cell using laser excited highly sensitive fluorescence microscope system

木村正人^{*}、佐藤俊一^{*}、竹内和久^{**}、阿部圭志^{**}、稲場文男⁺⁺

M.Kimura^{*}, S.Sato^{*}, K.Takeuchi^{**}, K.Abe^{**}, and H.Inaba⁺⁺

*東北大学電気通信研究所

**東北大学医学部第二内科

+新技術開発事業団稲場生物フォトンプロジェクト

Intracellular calcium ion is thought to play an important role in a biological cell as a second messenger of intercellular communication. Hence it is strongly required to develop a reliable and simple method for the measurement of calcium ion concentration across a single living cell with high spatial resolution. Recently Ca^{2+} -sensitive fluorescent dyes are developed as a calcium ion concentration indicator. Away them, Indo-1 has a suitable property that the fluorescence spectral distribution changes according to the Ca^{2+} concentration. Then the ratio of the fluorescence intensities at two appropriately chosen two wavelengths can determine Ca^{2+} concentration distribution inside a living cell. We report here the measured result of intracellular calcium ion concentration distribution in a rats smooth muscle cell employing Indo-1 in conjunction with our highly sensitive laser-excited high sensitive fluorescence microscope system designed and constructed for this purpose. From this experiment it is suggested that Ca^{2+} concentration distribution in specimen cell distributes almost uniformly in the equilibrium state.

多細胞生物において、その発生・自己組織化における調節や成長、分裂の制御などは最も重要な機能のひとつであり、これらは細胞間のコミュニケーションによって行われていることが知られている。その情報伝達は、神経伝達物質、蛋白性ホルモン、成長因子などの細胞膜結合分子を介して行われるが、細胞内部では環状AMPやカルシウムイオンなどの二次的物質に引き継がれると考えられている。このうち特に細胞内カルシウムイオンは、筋肉や血管細胞の収縮に深く関与していることが認められており、その細胞内濃度の空間的分布の定量的な測定法の試作開発が強く要望されている。

これまでに用いられた主な細胞内カルシウムイオンの濃度測定法には、次の3つがあげられる。

(1) 微小電極法

カルシウムイオン選択性の微小電極を細胞に刺入し、外液との電位差によりカルシウムイオン濃度を算定する方法である。この方法の長所は時間応答性に優れていて、細胞膜の障害が少ないことなどがあげられるが、一方微小電極の刺入の困難な平滑筋や血球のような小細胞には応用できない、また刺入部分から細胞内に外液のカルシウムイオンが流入する可能性があるというような短所もある。

(2) 発光タンパク法

カルシウムイオン存在下でATPを分解して発光するタンパク質（エクオリンなど）を細胞内に注入し、その発光量を測定することによって、カルシウムイオン濃度の分布を測る方法である。この方法の長所は、外部からの励起光なしで発光するため比較的測定が容易な点である。短所としては、マイクロインジェクションによる方法以外に細胞内に発光タンパクを導入する方法がなく、応用範囲に制限があるため(1)の方法と同様、全ての細胞には適用できないことなどがあげられる。

(3) 蛍光色素法

我々が測定に用いた方法である蛍光色素法は、細胞膜透過性の蛍光色素を細胞内に取り込ませ、その蛍光を測定することにより細胞内カルシウムイオン濃度を算定する方法である。この方法は細胞膜に傷害を与えず色素を細胞内に入れることができるため、ほとんどの細胞に応用できる。

これまでカルシウムイオン濃度測定に用いられた蛍光色素として、QUIN-2、FURA-2、およびINDO-1がある。この3種類の蛍光色素の主要な特性をTable 1に示す。^{1), 2)}ただし、 K_d は反応速度定数を表す。

Table 1 3種類の蛍光色素の主要な特性^{1) 2)}

Dye	K_d (nM)	Absorption maxima (Extinction coefficient)		Emission maxima		Fluorescence quantum efficiency	
		Free anion	Ca complex	Free anion	Ca complex	Free anion	Ca complex
Quin-2	115	354(5.0)	332(5.0)	510	525	0.029	0.14
Fura-2	224	362(27)	335(33)	516	510	0.23	0.49
Indo-1	250	349(34)	331(34)	482	385	0.36	0.56

Table 1より明らかなように、初期に使われたQUIN-2は他の二つに比べて、蛍光量子効率がかかなり小さく、測定する場合かなり高い濃度で細胞に取り込ませなければならないため、細胞内のカルシウムイオンをキレートしてしまい、正確な濃度分布の測定が難しいものと考えられる。

これに対し、FURA-2とINDO-1の両者は蛍光量子効率が高いため、QUIN-2に比べ細胞内に注入する濃度を小さくでき、さらにキレート作用がQUIN-2より弱いのでカルシウムイオンに対する影響は少ない。このためこの2つの色素はQUIN-2よりも有用であると見られている。

さらにFURA-2、INDO-1の優れている点として、FURA-2ではカルシウムイオン濃度によって吸収スペクトル分布が変化する、またINDO-1はカルシウムイオン濃度によって蛍光スペクトル分布が変化するという点があげられる。この特性を利用して、FURA-2では励起光の波長を変えて、一方INDO-1では測定する蛍光の波長を変えて測定することによって、細胞内カルシウムイオンの濃度を求めることができる。

我々の測定には、励起光が一波長でよいため、励起光源にレーザーを使う場合有利であると考えられるINDO-1を使用した。Fig. 1にINDO-1の蛍光スペクトル特性を示す。²

Fig. 1 INDO-1の蛍光スペクトル特性

実験には我々が先に試作開発した単一細胞用レーザー光励起高感度蛍光顕微鏡システム³⁾を用い、蛍光スペクトル中の405 nmと485 nmの波長でそれぞれ測定を行った。Fig. 2はレーザー光励起高感度蛍光顕微鏡システムのブロック図を示したものである。

Fig. 2 単一細胞用レーザー光励起高感度蛍光顕微鏡システムのブロック図

励起光源にはエキシマレーザー励起色素レーザーを使用し、励起波長を355 nmとした。レーザー光は試料面上で均一に照射されるように拡散板を設置している。顕微鏡の入射前に試料面上でのレーザー光照射エネルギー密度は約1.2 mW/cm²になるようにした。試料から発せられた蛍光は干渉フィルターによって波長405 nm、485 nm（ともに半幅幅10 nm）が選択され、SITカメラによって撮影された画像はイメージプロセッサ、マイクロコンピュータによって様々な処理を行なった。

測定に使用した細胞は、ラットの腸管膜動脈中膜平滑筋細胞で、INDO-1濃度が 1×10^{-6} mol/lのHANKS液（フェノールレッド不含）中に37℃、1時間培養することにより細胞内に色素を取り込ませ、さらにINDO-1を含まないHANKS液中に37℃、1時間培養することにより細胞外の色素を取り除いた後、測定を行った。

測定の結果の代表例をFig. 3およびFig. 4に示す。

Fig. 3 INDO-1を取り込んだラットの動脈平滑筋の単一細胞からの蛍光強度の3次元グラフィック表示
(蛍光波長: 405 nm)

Fig. 4 INDO-1を取り込んだラットの動脈平滑筋の単一細胞からの蛍光強度の3次元グラフィック表示
(蛍光波長: 485 nm)

Fig. 3は波長405 nm、Fig. 4は波長485 nmの中心波長の干渉フィルターを通してSITカメラで撮影した蛍光強度の像を3次元グラフィック表示したものである。

両図とも、核付近における蛍光強度が他の部分に比べかなり強くなっていることがわかる。これはおそらくINDO-1が核に集まりやすい性質を持つためではないかと考えられる。Fig. 1より明かなように、カルシウムイオン濃度が高い場合には405 nm付近の蛍

光強度が強くなり、反対にカルシウムイオン濃度が低い場合、485 nm付近の蛍光が強くなるので、405 nmに対する蛍光強度を485 nmの蛍光強度で除算することにより細胞内のカルシウムイオン濃度分布を推定することができる。

以上の処理を行った結果をFig. 5に示す。

Fig. 5 Indo-1を取り込んだラットの動脈平滑筋の単一細胞からの蛍光強度比の3次元グラフィック表示

この結果より測定に用いた、細胞内でのカルシウムイオンは画素ごとにばらつきがあるがその差はそれほど大きくはなく、ばらつきに何等かの傾向があるようには見受けられない。これよりラットの腸管中膜平滑筋細胞においては、その平衡状態における細胞内カルシウムイオン濃度の空間分布はほぼ均一であると判断される。

参考文献

- 1) R.Y.Tsien: Biochemistry, 19 2396 (1980)
- 2) G.Gryniewicz, M.Poenie and R.Y.Tsien: J.Biol.Chem., 260 3440 (1985)
- 3) S.Sato, H.Inaba, Y.Taguchi and M.Kasai: Opt.Quantum Electron., 18 8 (1986)