

学 位 論 文 題 名

Studies on the intracellular microenvironments
using microscopic optical methods

(光学的手法による細胞内微環境の研究)

学位論文内容の要旨

本論文は、細胞内微小領域における種々の物質移動や粘性等を顕微分光法を用いて解析したもので、4つの章から構成されているが、その研究内容は大きく以下の2つに分けられる。

(第1章)

(1) 発光性ルテニウム錯体分子の細胞内酸素プローブとしての応用

Tris (1,10-phenanthroline) ruthenium (II) (以下 TPRu) はカチオン性かつ両親媒性の発光性分子であり、その発光は酸素分子との衝突により、著しく消光される。一般に、均一溶液内において、酸素濃度と発光強度との間に Stern-Volmer 関係式 $I_0/I = 1 + \tau k_q [O_2] = 1 + K_{sv}[O_2]$ が成り立つ。この式において、 I_0 、 τ は酸素非存在下における発光強度および発光寿命、 I 、 τ は与えられた酸素濃度 $[O_2]$ における発光強度と寿命である。 k_q および K_{sv} はそれぞれ、消光定数、Stern-Volmer 定数と呼ばれる溶液の物理化学的性質に依存した定数である。純水中での TPRu の K_{sv} の値は約 2,670 であり、これは、室温、空気飽和状態において、励起された TPRu 分子の約半数が酸素との衝突によって消光されることを意味する。申請者は、TPRu のこの性質に着目し、生きた細胞内部の光学的酸素濃度プローブとしての可能性を検討した。この目的の為に、TPRu は次に挙げる条件を満たす必要がある；(I) TPRu が細胞内部に充分量取り込まれること、(II) 取り込まれた TPRu が細胞の機能に悪影響を及ぼさないこと、(III) 細胞内においても、酸素濃度と TPRu 発光強度との間に Stern-Volmer 関係式が成立すること。

これらについて検討するために、申請者はまず、TPRu を溶解した緩衝液に酵母を添加した懸濁液を用いた実験を行った。単一酵母の発光像写真により、TPRu が細胞内部に高濃度に取り込まれ、核を含む、細胞内のあらゆる部位に分布していることが分かった。次に、酸素電極を用いて、TPRu 存在下、および非存在下での酵母懸濁液の酸素消費速度を測定したところ、両者の間に著しい差は認められなかった。この結果は、TPRu が細胞の呼吸機能などを阻害しないことを示すものである。次に、酸素濃度と細胞内部の TPRu 発光強度の関係を調べた。酵母懸濁液では、TPRu は細胞内外に分散しているが、強力な消光剤であるフェロシアン化カリウムを添加すると、水相部の TPRu のみがほぼ完全に消光されることが分かった。この状態

で、酵母内部からの発光強度を測定したところ、酸素非存在下では、空気飽和時の約1.3倍の発光強度を示した。

次に、単一細胞内の異なる部位での発光強度変化を培養ウシ大動脈血管内皮細胞で測定した。TPRuとフェロシアン化カリウムを含んだ生理的緩衝液で細胞を浸し、グルコースオキシダーゼによって酸素濃度を減少させながら、単一細胞内のTPRu発光像を高感度冷却CCDカメラによって撮影した。核、およびサイトゾルにおける酸素濃度と発光強度との関係を解析したところ、どちらの部位においてもStern-Volmer関係式が成立することを確認した。

以上の結果より、TPRuは細胞内酸素プローブとなりうる条件を全て満たしていることが確認された。興味深い結果として、Ksvの値は、核では1,000~1,700、サイトゾルでは280~370であり、純水の値に比べると小さい。この理由として、細胞内部はタンパク質などの高分子が高濃度に存在し、酸素の拡散が遅いために、消光効率が低くなることが予想される。この検証のため、ウシ血清アルブミン水溶液におけるTPRu発光強度を測定したところ、アルブミン濃度が高くなるにつれて、消光効率が直線的に低下することが分かり、先に述べた予想が裏付けられた。

(第2章～第4章)

(2) 蛍光相関分光法を用いたエンドソーム内部微環境の直接測定

蛍光相関分光法(FCS)は、共焦点光学系を用いて、fオーダーの微小領域における蛍光分子の拡散に由来する”蛍光強度揺らぎ”から蛍光自己相関関数(FAF)を求め、その解析から、分子の拡散定数、濃度、相対蛍光量子収率などの物理化学的パラメーターを求める高感度分析法である。申請者は細胞の食作用によってエンドソームに取り込まれた蛍光性ラテックス微粒子の挙動をFCSによって評価することにより、その内部環境を測定した。

まず最初に、水溶液に分散させた微粒子の拡散定数を求め、理論式との比較、評価を行った(第2章)。純水中における直径14、35および93 nmの微粒子の拡散定数を測定したところ、直径の逆数と求められた拡散定数との間には比例関係が認められた。また、直径14および35nmの微粒子の拡散定数を異なる粘性(1.0~6.3cP)の水溶液において測定したところ、粘性の逆数と拡散定数の間には比例関係が認められた。これらの結果はStokes-Einstein式を満たすものであり、FCS測定の正確さを証明するものであった。さらに、pH 4からpH 9の間で微粒子の拡散定数を求めたところ、大きな差は認められず、pHが6.5から4.2まで減少するエンドソーム内部に取り込まれた微粒子に凝集などの形態変化が起こらないことを示した。

続いて、培養ウシ大動脈血管内皮細胞のエンドソームに取り込まれた直径14および35 nmの微粒子の挙動解析を行った(第3章)。培地に微粒子を添加すると、約30分でエンドソーム内に取り込まれることが、蛍光顕微鏡によって確かめられた。複数の細胞の異なる部位におけるエンドソーム内の微粒子に由来するFAFを測定、多成分解析を行い、求められた拡散定数と成分比の関係をプロットすると、水中での拡散定数に近い値を持つ成分(fast component)と10分の1以下の拡散定数を持つ成分(slow component)に区分することが出来た。fast component

は、エンドソーム内での微粒子の自由拡散に由来するものと考えられ、その拡散定数の平均値は、水中の値の約45%であった。この結果より、エンドソーム内部の粘性は水の約2.2倍と見積もられた。さらに、微粒子とのインキュベーション後1時間以上、fast diffusionに相当する成分が検出されたことから、エンドソーム内部は、骨格構造などの微粒子が付着するような構成成分のない均一な環境であることが示唆された。一方、slow componentは、主にエンドソーム自身の動きに由来すると考えられる。エンドソームの動きは、微小管やアクチンなどによって制御されていると考えられ、その速度についてはいくつかの報告がされているが、今回の結果は、これらとよく一致するものであった。本章の結果により、FCSが、エンドソームのみならず、他のオルガネラの内部環境を研究する有力な手段であることを示した。

第4章では、エンドソーム内のpH測定の試みについて述べている。一般に、食作用によって取り込まれるのは、LDLやトランスフェリンなどの蛋白質が主であり、これらはレセプターを介した食作用 (receptor-mediated endocytosis)によってエンドソームに取り込まれる。取り込まれた蛋白質は、pHの低下に伴って変性が起こり、レセプターとの結合状態に変化が起これと考えられる。その為、エンドソーム内のpHと蛋白質の挙動を同時測定することが求められている。申請者は、酸性条件下において、pHに依存して蛍光量子収率が大きく変化するフルオレセイン誘導体の一つであるカルセインを用いて、エンドソーム内pHのFCSによる測定を試みた。水溶液内において、カルセインの量子収率はpHが7から4に減少するにつれて直線的に減少することが確かめられた。次に、エンドソーム内に取り込まれたカルセインの量子収率を測定部位を変えながら測定したところ、どの部位においても、得られた値は、水溶液で求められた値の範囲内であり、エンドソーム内部のpHを反映していることが示唆された。しかし、エンドソーム内部での測定では、他の不確定な要素が、測定値に影響していることも考えられ、さらなる検討が必要であるが、カルセインがpH測定のためのプローブとして好適であることが確かめられた。また、FAFからカルセインのエンドソーム内での拡散定数を求めたところ、水での値の47%程度であり、微粒子の結果とよく一致することも分かった。これは、エンドソーム内の粘性について議論した第3章の記述をさらに裏付けるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守
副 査 教 授 谷 口 和 彌
副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

Studies on the intracellular microenvironments using microscopic optical methods

(光学的手法による細胞内微環境の研究)

細胞内における物質動態は、局所的な物理的環境に影響されるが、細胞内部はきわめて不均一な系であるため、その把握には”生きたまま”の細胞を用いた、高分解能かつ高感度な測定法が求められる。本論文は、顕微分光学的手法を応用した新しい細胞内微小領域における環境の非侵襲的測定法について検討したものであり、その内容は二つに大別される。

(1) 発光性ルテニウム錯体分子の細胞内酸素プローブとしての応用

Tris (1,10-phenanthroline) ruthenium (II) (以下 TPRu)はカチオン性かつ両親媒性の発光性分子であり、その発光は酸素分子との衝突により、著しく消光される。酸素濃度と発光強度の間にはStern-Volmer関係式で表される直線関係が成り立つ。TPRuのこの性質に着目し、細胞内部の光学的酸素濃度プローブとしての可能性を検討した。まず、TPRuを溶解した緩衝液に酵母を添加したところ、TPRuが細胞内部に高濃度に取り込まれ、核を含む、細胞内のあらゆる部位に分布していることが顕微鏡写真により分かった。次に、酸素電極を用いて、TPRu存在下、および非存在下での酵母懸濁液の酸素消費速度を測定したところ、両者の間に著しい差は認められなかった。この結果は、TPRuが細胞の呼吸機能などを阻害しないことを示すものである。

さらに、単一細胞内の異なる部位での発光強度変化を培養ウシ大動脈血管内皮細胞で測定した。グルコースオキシダーゼによって緩衝液の酸素濃度を減少させながら、細胞内のTPRu発光像を高感度冷却CCDカメラによって撮影した。核、およびサイトゾルにおける酸素濃度と発光強度との関係を解析したところ、どちらの部位においてもStern-Volmer関係式が成立し目的のプローブとなりうることを見出した。

(2) 蛍光相関分光法を用いたエンドソーム内部微環境の直接測定

蛍光相関分光法 (FCS) は、共焦点光学系を用いて、f1 オーダーの微小領域における” 蛍光強度揺らぎ” から得られた蛍光自己相関関数 (FAF) の解析から、分子の拡散定数、濃度、相対蛍光量子収率などの物理化学的パラメーターを求める分析法である。細胞の食作用によってエンドソームに取り込まれた蛍光性ラテックス微粒子の挙動を FCS によって評価することにより、その内部環境を測定した。培養ウシ大動脈血管内皮細胞のエンドソームに取り込まれた直径 14 および 35 nm の微粒子に由来する FAF を測定、多成分解析を行い、求められた拡散定数と成分比の関係をプロットすると、水中での拡散定数に近い値を持つ成分 (fast component) と 10 分の 1 以下の拡散定数を持つ成分 (slow component) に区分することが出来た。fast component は、エンドソーム内での微粒子の自由な動きに由来するものであり、その拡散定数の平均値は、水中の値の約 45% であった。この結果より、エンドソーム内部の粘性は水の約 2.2 倍と見積もった。さらに、微粒子とのインキュベーション後 1 時間以上、fast component に相当する成分が検出されたことから、エンドソーム内部は、骨格構造などの微粒子が付着するような構成成分のない均一な環境であることが示唆された。一方、slow component は、主にエンドソーム自身の動きに由来すると結論した。エンドソームの動きは、微小管やアクチンなどによって制御されていると考えられ、その速度についてはいくつかの報告がされているが、今回の結果は、これらとよく一致するものであった。本章の結果により、FCS が、エンドソームのみならず、他のオルガネラの内部環境を研究する有力な手段であることを示した。

さらに、酸性条件下において、pH に依存して蛍光量子収率が大きく変化するフルオレセイン誘導体の一つであるカルセインを用いて、エンドソーム内 pH の FCS による測定を試みた。水溶液内において、カルセインの量子収率は pH が 7 から 4 に減少するにつれて直線的に減少することが確かめられた。次に、エンドソーム内に取り込まれたカルセインの量子収率を測定部位を変えながら測定したところ、どの部位においても、得られた値は、水溶液で求められた値の範囲内であり、エンドソーム内部の pH を反映していることが示唆され、カルセインが pH 測定のためのプローブとして好適であることが確かめられた。

以上、著者は、光学的手法を用いることによる、細胞内微小領域における環境測定の新しい方法論を開発し、単一細胞レベルにおける生命現象のさらなる理解に大きく貢献したものである。よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。