

ビデオマイクロコピーにおけるエキソサイトーシスの証明

寺川 進 (浜松医科大学・光量子医学研究センター)

この5、6年、光学顕微鏡の分解能はあまり変わっていないが、それによって見える世界は著しく広がった。光学像をビデオカメラで捉え、画像処理をすることが助けとなって一分子の可視化さえできるようになってきている。細胞レベルでもこれまで光学顕微鏡で見えると思われなかったものが見えるようになった。その一つが内分泌細胞におけるエキソサイトーシス(開口放出)反応である^{1~7)}。直径が1ミクロンよりも小さいホルモンの入った分泌顆粒が細胞膜と融合し、ホルモンを細胞外に放出する反応は、電子顕微鏡による観察から確立してきたものであり、その動的特性についての測定はあまりなされてこなかった。ペプチドなどのホルモンは高い密度で顆粒内に蓄えられており、光学的には細胞質よりも高い屈折率を示す。ホルモンの分泌は、分泌顆粒のこの高い屈折率が細胞外液の低い屈折率で置き換えられることである。このような、屈折率の変化を屈折率の変化しない細胞質との対比として捉えるには微分干渉顕微鏡が適しており、実際、各種の分泌細胞で分泌刺激をすると、個々の分泌顆粒の明るさが突然変化するような反応を示すのが分かる。このような反応はエキソサイトーシスを示すものであり、エキソサイトーシス反応の動的な測定、また、定量に使える。

光学顕微鏡で観察した分泌顆粒の弾けるような反応がホルモン分泌であることは、そのアゴニスト感受性などの様々な性質を調べると、疑いの無いものであるが、直接的な証明ができればこれに越したことはない。最近、分泌反応を検出するいくつかの方法を用いて、光学顕微鏡的に捉えた反応が本当に分泌に対応するものであること証明することができたので、それについて紹介してみたい。

1. カーボンファイバー電極法

直径が8 μ mほどのカーボンファイバーをガラス管の中に封じ、端の一部のみを露出して他を絶縁すると、その露出した端のみを微小な電気化学検出器として作動させることができる⁸⁾。このような電極先端に適当な電圧をかけ、電圧固定モードで電流の測定をすると特異的な電圧範囲で酸化または還元される分子の量を生ずる電流量から知ることができる。+500mVの電圧をかけると比較的特異的にカテコールアミンの検出をすることができる。電極が小さいので、局所的な分子の濃度に敏感な検出器として働かせることができる。原理としては脳内アミンをマイクロダイアリス法によって検出するときの検出器と同じものである。そこで、培養したウシ副腎髄質細胞をビデオ強化型の微分干渉顕微鏡の上で観察しながら、カーボンファイバー電極を細胞にあて、カテコールアミンの検出をおこなった(上智大・熊倉鴻巣之助、ロンドン大・M. Duchenとの共同研究)⁹⁾。カテコールアミンによる電流パルスと顕微鏡像での顆粒の反応の同時性を確認するため、電極からの信号を顕微鏡像を記録するビデオテープに同時に記録した。アセチルコリン(100 μ M)や高濃度(56mM)K⁺溶液によって刺激をすると、細胞内のクロマフィン顆粒の弾ける反応に同期して、カーボンファイバー電極に電流が生ずるのが検出できた(図1)。最大の電流パルスの大きさは400pAに達した。顕微鏡像の中で反応した顆粒の位置が電極の近くであると、電流変化は大きく、遠くであると電流変化は小さくなった。細胞は、カバーガラスの上に、基質である薄いコラーゲン層に平面的に接着して培養されている。この接着平面は顕微鏡のフォーカス面に平行なので、多数の

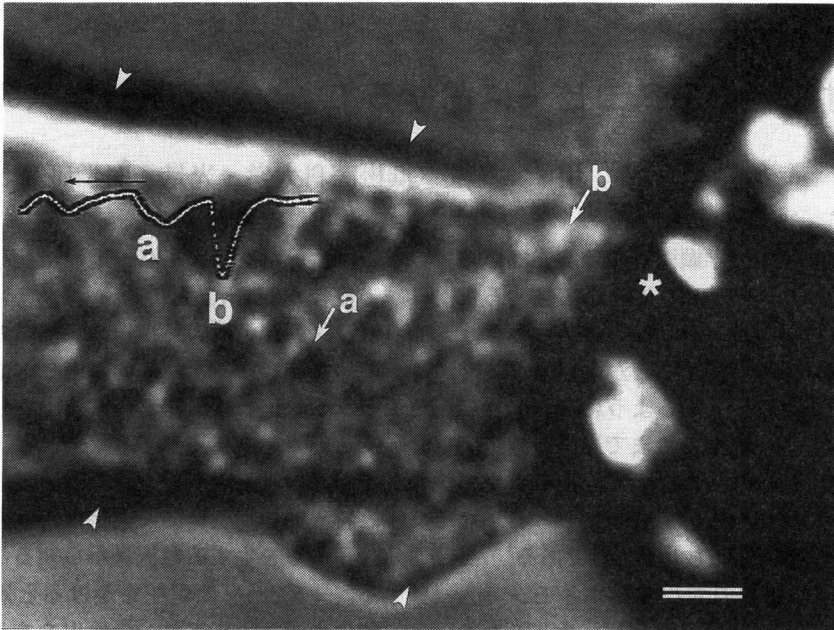


図1 エキソサイトーシス反応のビデオマイクロスコープとカーボンファイバー電極による同時観察。ウシ副腎髄質のクロマフィン細胞(矢頭)をカバーガラス上に培養し、高濃度 K^+ 溶液(56mM)による刺激をした。左中央の白いトレースが電極を通して流れた電流の記録。ビデオ画面上ではこのトレースは左にスローする(黒矢印)。下向きが電流の増加を示す。電流のパルスaは細胞の矢印aの部位で、パルスbは矢印bの部位でエキソサイトーシスが見られた。アステリクスは $8\mu\text{m}$ の直径の電極先端を示す。較正棒の長さは $2\mu\text{m}$ 。

エキソサイトーシスを観察する領域として都合がよい。この平坦な細胞膜で起こるエキソサイトーシスでは、電極の先端からの距離が約 $7\mu\text{m}$ の領域まで、光学的に捉えられる顆粒の弾け反応に同期した電流変化が検出できた。検出可能距離や検出電流の大きさは、分泌顆粒の大きさによって左右された。細胞とカバーガラスとの隙間の大きさは正確には分からないが、ほぼ $0.5\mu\text{m}$ 程度と思われる。このように狭い隙間であると、一個のクロマフィン顆粒の反応は $7\mu\text{m}$ も拡散してもパルス状の濃度上昇をすることがわかった。この距離より遠いところで反応が起こると電極では検出できないことが明らかになった。

このような方法で顕微鏡観察と電気化学的測定を同時におこなっていると、以下の3種類の反応パターンが得られる。1) 顕微鏡での顆粒の反応と電気化学信号とがよく同期して起こる細胞。2) 顕微鏡での反応はよく見られる

が、電気化学信号の見られない細胞。3) 顕微鏡での反応は見られないが、電気化学信号が数多く見られる細胞。顆粒の大きさが非常に小さい場合や顆粒内への物質の蓄積濃度が低い場合は顕微鏡では見えないと思われ、放出物がカテコールアミンを含まない場合は電極では測定できないものと思われる。

2. リバース・ヘモリティック・プラーク・アッセー法

電気化学的方法でその存在が検出できないペプチドホルモンなどを、感度よく検出する方法としては、リバース・ヘモリティック・プラーク・アッセー法がある¹⁰⁾。赤血球を抗体で感作し、補体の存在下で抗原が抗体に結合すると溶血するという反応を利用する。わずかな免疫反応を眼で見えるレベルの変化に増幅する方法としてユニークなものである。聖マリアナ医科大学の服部淳彦、飯郷雅之らと

の共同研究で、ラット脳下垂体前葉から得たプロラクチン細胞を単離培養しこの方法による分泌反応観察の比較をおこなった¹¹⁾。光顕下の細胞内には分泌顆粒と思われる微小な顆粒が多数観察されるので、その消失はエキソサイトーシス反応として捉えられるはずである。刺激としてはK脱分極、または、微小電極による電気刺激を用いた。多くの細胞で30分くらいの間にプラークの形成が見られたが、光学顕微鏡的には顆粒の弾ける反応は捉えられなかった。しかし、数例で、光顕での顆粒の弾け反応が現れ、かつプラークの形成の認められた細胞があった(図2)。プラークの形成のみが起こった細胞では、単に細胞膜等の透過性が異常に上がった(deteriorateした)のだということも考えられたが、エキソサイトーシス以外の分泌モードの存在も否定できなかった。しかし、エキソサイトーシスが光

顕的に認められ、かつプロラクチン細胞(大きい細胞)と判定できるものでは、プラークの形成があり、光学顕微鏡的に捉えられる顆粒の弾け反応は、やはり、物質の放出によるものであることはまちがいないものと考えられた。

膵臓のβ細胞でも光学顕微鏡的にエキソサイトーシス反応を観察定量することができる¹²⁾。この場合にもヘモリティク・プラーク・アッセー法によってインスリン分泌の確認をすることができた(生理研・櫻井孝司との共同研究)。灌流チェンバーの底に感作した赤血球を一層になるように敷き詰め、その上に膵組織片をおいてβ細胞の高倍率観察をおこなった。グルコース15mMの刺激をすると、各細胞の中の分泌顆粒が弾ける反応を示した。そのあと20分後に補体を添加して赤血球を観察すると、溶液の流れに対して組織の上流側で

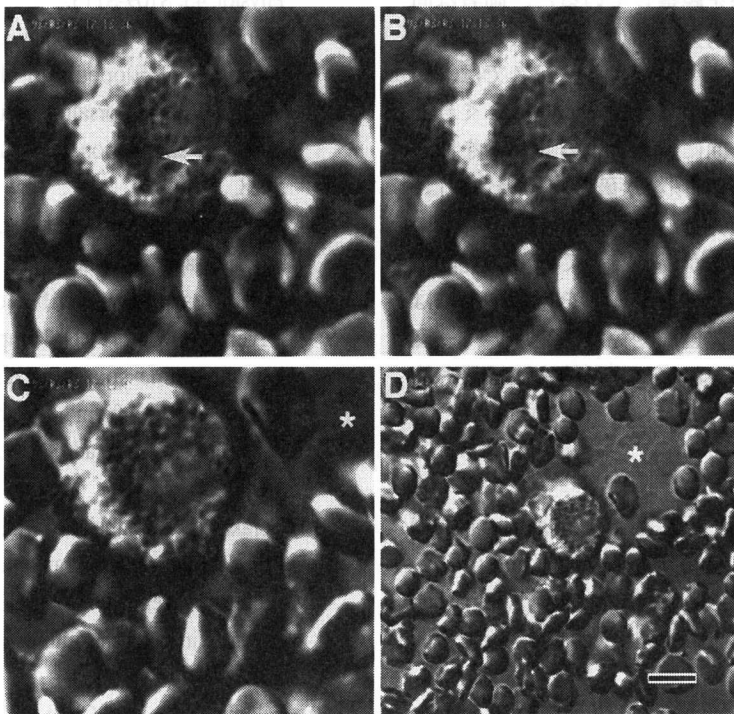


図2 ラット脳下垂体より単離したプロラクチン細胞のエキソサイトーシス。AとBは240ms間隔のビデオ画像で、矢印の点の明るさが急激な変化を示している。CはBを撮ってから16分後のもの。赤血球の溶血が認められる(アステリスク)。DはCの低倍像。溶血のプラークが認められる(アステリスク)。較正棒はA-Cに対して5μm、Dに対して12.5μm。

は何らの変化も起きないが、下流側では殆どの赤血球の溶血反応が見られた。グルコース刺激をしない場合、または、刺激をしても顆粒の反応が現れない場合では、溶血は起こらなかった。

以上のような観察から、光学顕微鏡的に観察される顆粒の弾け反応は実際にエキソサイトーシスであることが証明された。しかし、常に弾け反応の全てがエキソサイトーシスであるということはいえない。一例として、キナクリンのような蛍光物質を顆粒に予め入れて蛍光観察すると、エキソサイトーシスによってキナクリンが細胞外に放出されるのが蛍光の消失として観察されるが、観察時間が長くなり(数分)励起光によるラジカル産生が進行すると、顆粒が細胞内で破裂してキナクリンが細胞質内に拡散するのが見られる。このとき微分干渉像を観察していると、両者は同じような顆粒の消失反応(脱顆粒)として見える。正確には、エキソサイトーシスでは、顆粒の明るさの変化が上昇に続いてゆっくりとベースライン方向に戻るといった経過を取るのに対し、細胞内で顆粒が破裂する場合には、ステップ状の上昇となり下降相が見られないという違いがあるが、一見似ており、光顕像のみからエキソサイトーシスを判定するには慎重を要する。電極法や免疫法を用いて一度確認してからであれば、光学的方法は最も簡単で感度のよい方法として有用である。

[文 献]

- 1) Terakawa, S., Fan, J.H., Kumakura, K. and Ohara-Imaizumi, M. (1991) Quantitative analysis of exocytosis directly visualized in living chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* 123, 82-86.
- 2) Terakawa, S. and Suzuki, Y. (1991) Exocytosis in colonic goblet cells visualized by video-enhanced light microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 466-472.
- 3) Segawa, A., Terakawa, S., Yamashina, S. and Hopkins, C.R. (1991) Exocytosis in living salivary glands: direct visualization by video-microscopy and confocallaser microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* 54, 322-330.
- 4) Kamijo, A., Terakawa, S. and Hisamatsu, K. (1993) Neurotransmitter-induced exocytosis in goblet and acinar cells of rat nasal mucosa studied by video microscopy. *Am. J. Physiol.* 265, L200-L209.
- 5) Terakawa, S., Manivannan, S. and Kumakura, K. (1993) Exocytosis in the growth cone of differentiated chromaffin cells induced by electrical stimulation. *Jpn. J. Physiol.* 43, S213-S216.
- 6) Kumakura, K., Ohara-Imaizumi, M., Muramatsu, S., Terakawa, S. and Kanno, T. (1993) Mastoparan evokes exocytosis without Ca^{2+} movement in adrenal chromaffin cells. *Jpn. J. Physiol.* 43, S109-S113.
- 7) Manivannan, S. and Terakawa, S. (1994) Rapid sprouting of filopodia in chromaffin cells, PC12 cells, and dorsalroot neurons induced by electrical stimulation. *J. Neurosci.* 14, 5917-5928.
- 8) Wightman, R.M., Jankowski, J.A., Kennedy, R.T., Kawagoe, K.T., Schroeder, T.J., Leszczyszyn, D.J., Near, J.A., Diliberto, E.J., Jr. and Viveros, O.H. (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 88, 10754-10758.
- 9) Terakawa, S., Kumakura, K. and Duchon, M.R. (1995) Spatio-temporal analysis of quantal secretory events from single bovine adrenal chromaffin cells in culture. *J. Physiol.* 487, 59P-60P.
- 10) Feldman, M.A. and Chou, J.Y. (1983) Isolation of cells secreting specific polypeptides. *In Vitro* 19, 171-174.
- 11) 飯郷雅之、服部淳彦、寺川 進(1993) 個々の下垂体細胞におけるエキソサイトーシス

ーシスによるホルモン放出量の解析 生
理学研究所年報 14, 219-220.

12) Sakurai, T. and Terakawa, S. (1995) Insulin

secretion from pancreatic β -cells directly
visualized as exocytosis by video microscopy.
Bioimages, 3, 85-92.

日本比較内分泌学会 編／全10巻

ホルモンの生物科学

1 比較内分泌学序説

山本 清 編 180頁・2884円

2 ホルモンの生産と分泌

見上晋一 編 300頁・3708円

3 ステロイドホルモンの生物化学

玉置文一 編 260頁・3708円

4 ホルモンと生殖Ⅰ

ー性と生殖リズム
新井康允・小林英司 編 310頁・3090円

5 ホルモンと生殖Ⅱ

ーその相関と作用機構
木川源則・大島 清 編 360頁・3914円

6 ホルモンと生殖Ⅲ

ー生殖現象の制御
笹本修司・会田勝美 編 270頁・4600円

7 ホルモンと水・電解質代謝

小林英司・平野哲也 編 210頁・3296円

8 行動とホルモン

大西英爾・川島誠一郎 編 250頁・3502円

9 性分化とホルモン

田名部雄一・川島誠一郎 編 200頁・3090円

10 ペプチドホルモン

石居 進 他編 180頁・3200円

A5判／学会出版センター刊 (定価は税込みです)