

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570151

研究課題名（和文） 画像分離型位相変調法を用いたシナプトソーム活性の計測

研究課題名（英文） Measurements of synaptosomal activity by using RM-DIC with large shear amount

研究代表者

太田 善浩（OHTA YOSHIHIRO）

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号：10223843

研究成果の概要：

本研究では、オルガネラの微細な構造変化を無染色のまま光学顕微鏡で計測できる画像分離型位相変調法を開発し、「神経伝達物質がシナプス小胞へ充填される際に使用されるエネルギーは、どのように供給されるのか」を調べました。得られた成果は、シナプトソーム中のミトコンドリアの有無を染色することなく見分ける方法の開発に成功したことと、ミトコンドリアが神経伝達物質の蓄積を促進することを見つけたことです。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメーjing、オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

(1) シナプスにおけるミトコンドリアの役割が不明。

神経細胞はエネルギーを多く必要とし、パーキンソン病などミトコンドリアの機能異常が原因と考えられる神経疾患が多く存在します。しかし、シナプス末端を電子顕微鏡で観察すると、ミトコンドリアを含んだものと、含んでいないものがあります。また、阻害剤を使った実験から、神経伝達物質の放出はミトコンドリアによる ATP 合成よりはむしろ、

解糖系による ATP 合成に影響を大きく受けているという報告があり、シナプスでのミトコンドリアの役割は、はっきりしていません。

(2) 蛍光色素を使わないミトコンドリアの有無の判別方法が無い。

シナプトソームの活性をミトコンドリアの有無で比較するため、シナプトソーム内のミトコンドリアの有無を見分ける必要があります。予備実験としてミトコンドリアを蛍光法で検出しましたが、検出したい機能によ

って蛍光色素の波長のオーバーラップや多重染色によるシナプトソームのダメージなど不都合が多く、無染色でミトコンドリアの有無を判別できる方法の開発が必要となりました。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) オルガネラの微細な構造変化を無染色のまま光学顕微鏡で計測できる画像分離型位相変調法を開発し、シナプトソーム内のミトコンドリアの有無を無染色で見分けることと、2) 神経伝達物質がシナプス小胞へ充填される際に使用されるエネルギーは、どのように供給されるのかを明らかにすることです。

3. 研究の方法

(1) 画像分離型位相変調光学系と解析プログラムの作成

微分干渉顕微鏡のポライザを回転して干渉させる2本の光の位相差を変化させられる光学系を作成します。位相差を変えることで、シア量分だけずれた2つの画像のコントラストの変化を求め、回転ポライザの回転角から試料の光学的厚みを求めます。1つの試料に対して得られる2つの画像AとBが重なると、それぞれの画像の明るさを明確に求めることが困難になりますので、シナプトソームの直径が約1 μmであることを考慮して、ビーム結合子で結合させる2本の光の距離は3 μmに設定し、1つの試料から得られる2つの画像が完全に分離できるようにします。

解析方法は、次の通りです。まず、画像上の各点で、ポライザを回転させたときの輝度変化を次式により解析します。

$$I = A \sin(2X+B) + C$$

ここで、I は各点の輝度、X はポライザの回転角、A, C は定数、B は分離された2光線の干渉光の位相です。次に、画像上の背景(試料の無い箇所)を基準点とし、各画素と背景との位相差を求めます。求めた位相差を光線の分離方向に分離量だけ離れた点ごとに足していき、各点における位相差を求めます。これを自動的に行うプログラムを作成し、基準点の位相を0としたときの、各点の位相を求められるようにします。

また、この光学系が正しく作成され、明暗が位相差を正しく反映しているかどうかの確認は、ガラスにビーズを吸着させ、ビーズ周囲の溶媒の屈折率を変化させることで、屈折率差が小さくなれば位相差が小さくなることを確認します。

(2) ミトコンドリアの有無によるシナプス小胞の分極の比較

ラット全脳から前シナプス部(シナプトソーム)を単離し、その中のミトコンドリアの

有無を(1)で作成した光学系を用いて判別します。ミトコンドリアを含んだシナプトソームは位相が大きく、含まないシナプトソームは位相が小さいので、位相の閾値を決めることで両者の区別が可能になります。これが正しいことを、シナプトソームをミトコンドリア感受性の蛍光色素で染色し、確認します。

次に、ミトコンドリアで合成されたATPが、シナプス小胞の分極に及ぼす影響を調べるため、ミトコンドリアの有無を判別した書くシナプトソームに含まれるシナプス小胞の分極状態を蛍光色素 Acridine Orange を用いて計測します。

4. 研究成果

(1) 画像分離型位相変調光学系の作成

図1に示す位相変調光学系を作成しました。

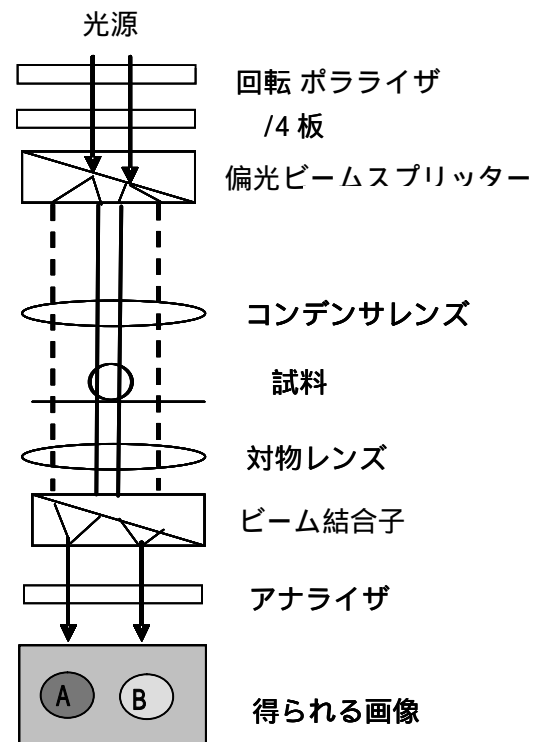


図1 画像分離型位相変調 光学系

(2) シア量・シア方向の計測

CCDカメラの前に置いたリレーレンズの倍率を変えて撮影した血球計算盤の透過光画像において、50μm四方の領域が縦横それぞれ何ピクセルあるかをカウントし、1ピクセルあたりの距離を求めました。計測は複数の領域で行い、その平均値を採用したところ、リレーレンズ1倍では0.34μm/pix、2倍では0.19 μm/pix、4倍では0.10 μm/pixでした。つまり実際は、リレーレンズ設定での2倍は1.8倍、4倍は3.3倍程度であることを意味しています。また、像の縦/横比もリレー

ズ倍率によって変化が生じており、1倍では0.9939、2倍では1.0143、4倍では1.0190と、倍率の上昇に従って、像は縦長になっていました。

同様に倍率を変えて撮影したポリスチレンビーズ画像において、2像の輝度重心間の距離と方向を求め、これをシア量として算出しました。こちらも、複数のサンプルに対して解析を行い、その平均値を採用した。各倍率のシア距離と方向は、1倍では4.55pixel : 45.09°、2倍では8.47pixel : 45.95°、4倍では17.04pixel : 45.78°でした。

以下の実験結果は、ここで求めたピクセル距離と、シア量・方向を用いて行いました。

(3) ポリスチレンビーズを用いた位相差の確認。

カバーガラスに吸着させたポリスチレンビーズの周囲の溶媒を帰ることで、ビーズと溶媒間の屈折率差を変化させ、それに応じた位相差が計測できるか確認しました。結果は図2の通りで、ビーズと溶媒の屈折率差が小さくなると位相差が小さくなることが観察され、作成した光学系で位相差が検出できることが確認されました。

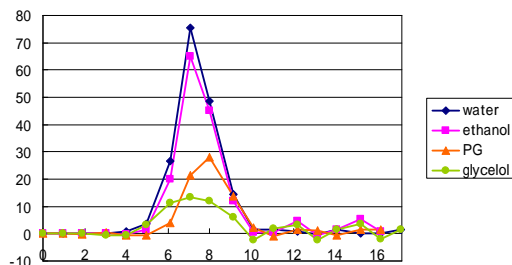


図2 ポリスチレンビーズの位相の計測

縦軸はビーズを透過した光と背景を透過した光の光学距離差 (nm) を示し、横軸は計測位置 (μm) を示します。屈折率は、ポリスチレンビーズ (Rx=1.55) の、水 (Rx=1.33)、エタノール (Rx=1.36)、ポリエチレングリコール (Rx=1.43)、グリセロール (Rx=1.47)。

(4) シナプトソームの位相差計測

ラット全脳から単離したシナプトソームを緩衝液中におき、上記光学系で位相の計測を行った。ミトコンドリアを含むシナプトソームは、緩衝液との位相差が0.19rad付近に分布するのに対し、ミトコンドリアを含まないシナプトソームは0.10rad付近に分布し、ミトコンドリアの存在が、位相差として計測できることが分かった。しかしながら、少数ではあるが、蛍光色素ではミトコンドリアが検出できないものの、位相差ではミトコンドリアが存在するとされるシナプトソームが存在した。これは、蛍光染色では活性のある

ミトコンドリアのみが検出されるのに対し、位相差計測では、失活したミトコンドリアをも検出してしまうことに起因すると考えられる。そのため、以下の計測では蛍光染色でミトコンドリアが認められ、かつ、位相差でミトコンドリアが存在すると確認されるシナプトソームをミトコンドリアがあるシナプトソーム、位相差・蛍光ともにミトコンドリアが認められないシナプトソームをミトコンドリアが無いシナプトソームとして、解析を行った。

(5) グルコース添加によるシナプス小胞の分極

シナプトソームに10mMのグルコースを添加し、シナプス小胞の分極をミトコンドリアの有無で比較した。図3に結果を示す。

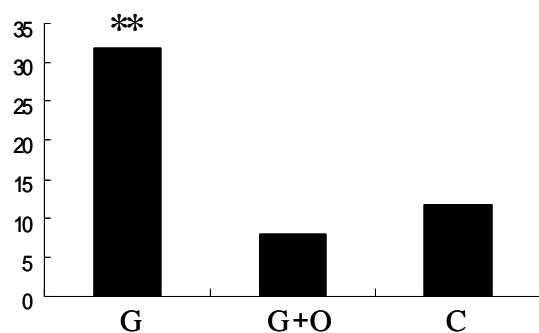


図3A ミトコンドリアのあるシナプトソームに対するグルコースの添加の影響

縦軸は分極したシナプトソームの割合。Gは10mMグルコース添加、G+Oはオリゴマイシン (ATP合成阻害剤) 存在下でのグルコースの影響、Cはグルコースの無い緩衝液の添加。

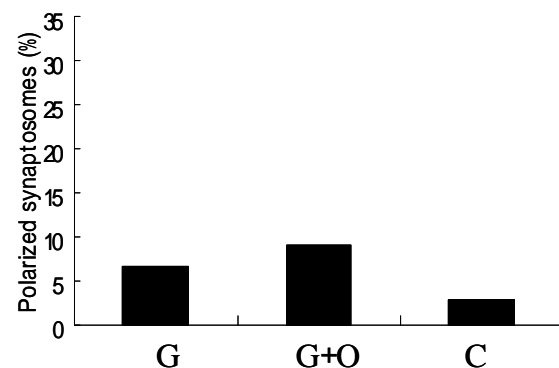


図3B ミトコンドリアのないシナプトソームに対するグルコースの添加の影響

図3AとBの比較から分かるように、ミトコンドリアはグルコース添加時のシナプス小胞の分極に大きな影響を示していることがわかった。

5. 主な発表論文など

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

田澤英二郎、藤田智沙子、町田清隆、長田裕之、太田善浩 “Involvement of cyclophilin D in mitochondrial permeability transition in intact cells” Arch. Biochem. Biophys. 481, 59-64 (2009) (査読あり)

[学会発表](計5件)

Ayumu Kikuchi, Suguru Kawato, Yoshihiro Ohta Fluorescence Imaging of synaptic vesicles polarization in single synaptosomes 第46回日本生物物理学会年会 12月3日~5日 福岡国際会議場、2008年、福岡県

Keisuke Haseda, Ayumu Kikuchi, Kazuhiro Kajiyama, Nao Komiya, Mituru Sato, Yoshihiro Ohta Novel approaches to organelle measurements with Retardation Modulated DIC microscope 第46回日本生物物理学会年会 12月3日~5日 福岡国際会議場、2008年、福岡県

長谷田圭亮、菊地歩、梶山和浩、小宮尚、佐藤充、太田善浩、位相変調微分干渉顕微鏡を用いた細胞内構造の光学計測、第17回日本バイオイメージング学会学術集会 10月30日~11月1日 千葉大学けやき会館、2008年、千葉県

菊地歩、川戸佳、太田善浩 蛍光顕微鏡による単一シナプトソームイメージング、第45回日本生物物理学会年会 12月21日~23日 パシフィコ横浜、2007年、神奈川県

田澤英二郎、藤田智沙子、Shi Xiaolei、太田善浩、町田清隆、長田裕之 ミトコンドリア膜透過性遷移の新規検出法の開発 第45回日本生物物理学会年会 12月21日~23日 パシフィコ横浜、2007年、神奈川県

[その他]

ホームページ

<http://www.tuat.ac.jp/~ohta>

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 善浩 (OHTA YOSHIHIRO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号：10223843

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし