

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 16 日現在

機関番号：32704

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22300129

研究課題名(和文) Oxonol系電位感受性色素の新規応用による新しい細胞膜電位イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of a new single-cell imaging method using oxonol voltage-sensitive dyes

研究代表者

佐藤 容子 (Momose-Sato, Yoko)

関東学院大学・人間環境学部・教授

研究者番号：70251501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しい細胞イメージング法を確立することを目的として、oxonol系色素のスクリーニングを行った。孵卵8-9日の鶏胚脳幹から分離細胞を作成し、外液 high K⁺ solutionに対する脱分極応答を蛍光変化として測定した。スクリーニングを行った全ての色素において明瞭な光学的シグナルが測定され、本研究の結果から、oxonol系色素は細胞レベルでの光学イメージングに有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the suitability of voltage-sensitive oxonol dyes for optical imaging at the single-cell level. We screened four oxonol dyes in dissociated cells from 8-9 day-old embryonic chick brainstems. Voltage-related fluorescent changes in response to the perfusion of a high-K⁺ solution were measured using a cooled CCD camera. Clear optical responses were detected with every dye, suggesting the potential utility of the oxonol dye in optical imaging of voltage changes at the single-cell level.

研究分野：生理学

キーワード：膜電位感受性色素 イメージング 鶏胚 細胞

1. 研究開始当初の背景

高等動物の中樞神経機能は、ニューロン間の機能的連絡のシステム化、すなわち回路網の問題と認識されるようになってきている。この機能的システムとしての中枢神経系を解析する際、これまでは微小電極を用いた電気生理学的測定法が主流であった。しかし、電気生理学的測定法では、多数のニューロンにより構成される神経回路網の活動状態をダイナミックにとらえるのには限界があった。

このような状況下で、電気生理学的測定法の適用限界を打ち破る測定方法として、ニューロン電位活動の光学的測定法が開発され、神経活動のイメージング法として広く用いられている(文献1)。この方法は、膜電位感受性色素で細胞を染色し、膜電位の変化に応じてその色素が示す吸光や蛍光の変化を光学的に計測するものである。

膜電位感受性色素には、fast-response dye と slow-response dye とがある(文献1)。神経活動の光学的測定では、fast-response dye が用いられ、活動電位やシナプス後電位などの速い時間経過の電位変化が測定されている。しかし、この色素を用いた測定では、光学的変化が非常に小さいために、single cell レベルでの応答を加算なしに検出するのはほとんど不可能であった。一方 slow-response dye としては、diS-C₃(5)などのシアニン系色素が知られているが、diS-C₃(5)は、応答時間が秒のオーダーと遅く、また色素懸濁液中で測定が行われるため、活動電位のような速い電位活動の測定には不向きである。

2. 研究の目的

本研究では、diS-C₃(5)と化学構造が類似している DiBAC₄(3)、DiBAC₄(5)といった oxonol 系色素に着目し、fast-response dye と slow-response dye のそれぞれの欠点を克服し、かつ利点を併せ持った新しい細胞イメージング法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物の取り扱い

本研究の実施においては、関東学院大学生物研究倫理委員会の承認を得、「動物実験の飼育及び保管等に関する基準」(総理府告示第6号、1980年)を遵守した。ニワトリ(White Leghorn)の受精卵は、白石動物(埼玉)および日本生物材料センター(東京)より入手した。

(2) 色素

実験に用いた色素は、oxonol 系の DiBAC₄(3) [Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol]、DiBAC₄(5) [Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) pentamethine oxonol]、DiSBAC₂(3) [Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)

trimethine oxonol]、DiSBAC₂(5) [Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) pentamethine oxonol]である。色素の構造式を図1に示す。

DiBAC₄(3)は Molecular Probes (Eugene, OR, USA)、その他の色素は AnaSpec Inc. (Fremont, CA, USA)より入手した。

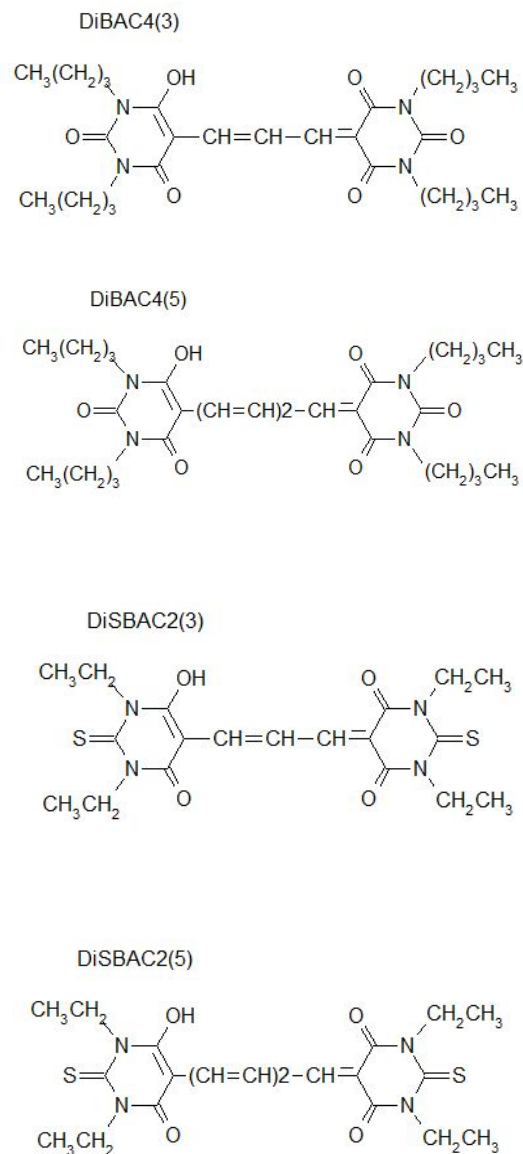


図1 oxonol系色素の構造式

(3) 色素の最適励起波長・蛍光波長の同定

蛍光分光光度計 (Fluorescence Spectrophotometer 650-10s, Hitachi, Tokyo)を用いた波長スキャンによって、最適励起波長、蛍光波長の同定を行った。まず励起光の波長を固定し、蛍光波長を変化させて、蛍光スペクトルを測定した。次に、蛍光波長を固定し、励起波長を変化させて、励起スペクトルを測定した。データは、Lab chart (ver.7)を用いてデジタル化し、コンピュータに記録した。

(4) 分離細胞

色素の膜電位感受性、signal-to-noise ratio (S/N) を検討するために、鶏胚神経系の分離細胞を用いた。この標本系は次の点でメリットがある。1) 材料が安価で入手が容易である、2) 単一細胞でのイメージングが行え、かつ長期培養系ではないので取り扱いが容易である、3) グリア細胞系が未分化で、ニューロンとグリアの応答を区別できる。

受精卵を 38 °C、湿度 60 % の孵卵器に、孵卵 8 ~ 9 日目に取り出した。鶏胚脳幹組織片 (三叉神経節 ~ obex のレベル) を、CMF Hanks 液中にて細切し、trypsin (0.25 %) と DNase (0.2 %) 存在下で 37 °C、20 min インキュベートした。パスツールピペットとマイクロピペットによる gentle cell dissociation を行った後、遠心分離 (1000 rpm, 5 min) と、Hanks 液あるいは Ringer 液による洗浄を 3 クール行った。poly-D-L-リジンでコートしたカバーガラス上に細胞懸濁液を滴下し、38 °C で 1 時間おいた後、測定用チェンバーにセットした (図 2)。チェンバーを倒立型顕微鏡 (Axiovert 135TV, Zeiss, Germany) のステージ上にのせ、Ringer 液で灌流を行った (1 ml/min, 室温)。

Ringer 液の組成は、NaCl 138 mM、KCl 5.4 mM、CaCl₂ 1.8 mM、MgCl₂ 0.5 mM、glucose 10 mM、Tris-HCl buffer (pH 7.26 ~ 7.28) 10 mM である。Ringer 液は、O₂ で飽和させて実験に用いた。

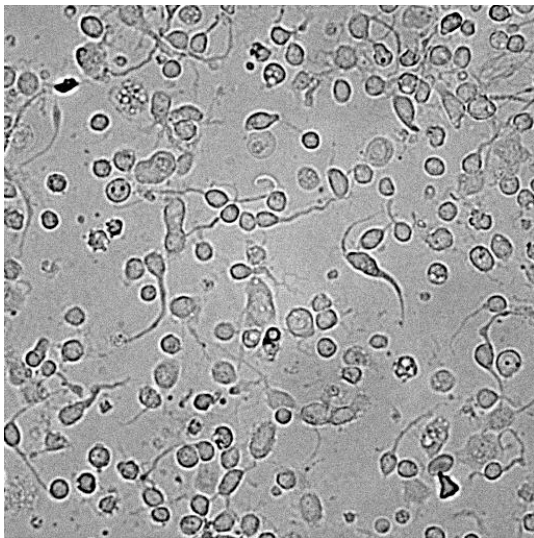


図 2 孵卵 9 日の鶏胚脳幹から作成した分離細胞。対物レンズ 40 倍、明視野で撮影したもの。

(5) 光学イメージング

光源には Xenon lump (75 W) を用い、対物レンズ×40 倍で拡大した細胞群から、落射蛍光を cooled CCD カメラ (EM CCD, Ixon +DU897E, Andor Technology, Tokyo) (空冷

-80 °C) で測定した。

色素の膜電位感受性は、灌流液を normal solution ([K⁺]₀=5.4 mM) から high K⁺ solution ([K⁺]₀=50 mM) に変化させた時に、細胞脱分極にともなって変化する蛍光シグナルの強度として測定した。

4. 研究成果

(1) 各色素の最適励起波長および蛍光波長の同定

まず初めに、4 種類の oxonol 系色素について、励起波長と蛍光波長の波長スキャンを行い、それぞれのピーク波長を同定した。図 3 は、DiSBAC₂(3) について行った波長スキャンの結果を示したものである。励起スペクトルと蛍光スペクトルを重ね合わせて表示した。このグラフにおいて、励起波長のピークは 534 nm、蛍光波長のピークは 556 nm のところに認められた。ほかの色素についても同様の測定を行い、励起波長と蛍光波長のピークを同定した。結果を表 1 に示す。

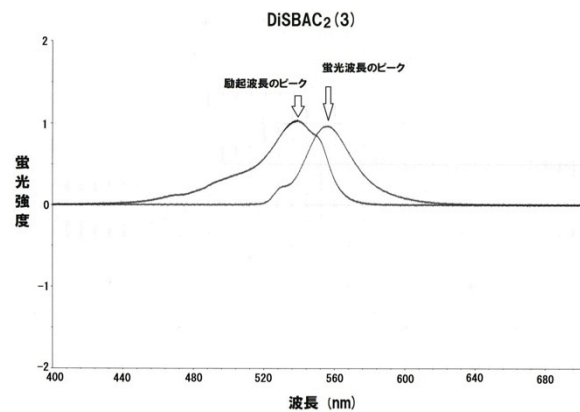


図 3 DiSBAC₂(3) の励起波長スキャン・蛍光波長スキャンのグラフ。励起波長のピークは 534 nm、蛍光波長のピークは 556 nm に認められた。

表 1 色素の最適励起波長・蛍光波長

色素名	励起波長のピーク (Ex)	蛍光波長のピーク (Em)
DiBAC ₄ (3)	490 nm	520 nm
DiBAC ₄ (5)	586 nm	610 nm
DiSBAC ₂ (3)	534 nm	556 nm
DiSBAC ₂ (5)	628 nm	648 nm

(2) 光学的イメージング

次に、分離細胞を用いて、色素の膜電位感受性について検討を行った。図4は、DiSBAC₂(3)で染色した分離細胞の蛍光画像である。上図は、 $[K^+]_o$ (細胞外カリウム濃度) = 5.4 mM の Ringer 液灌流下でのコントロール画像、下図は、 $[K^+]_o = 50$ mM の high K⁺液を流した時の蛍光画像である。細胞膜電位は、Nernst の式に従い $[K^+]_o/[K^+]_i$ に比例するので、灌流液中のカリウム濃度すなわち $[K^+]_o$ を高くすることにより、細胞に脱分極を引き起こすことができる。high K⁺液を流す前と流した後、つまり、静止電位の状態であるコントロールと、脱分極をさせた時の蛍光を比較すると、脱分極させた時に蛍光が著明に増大した。

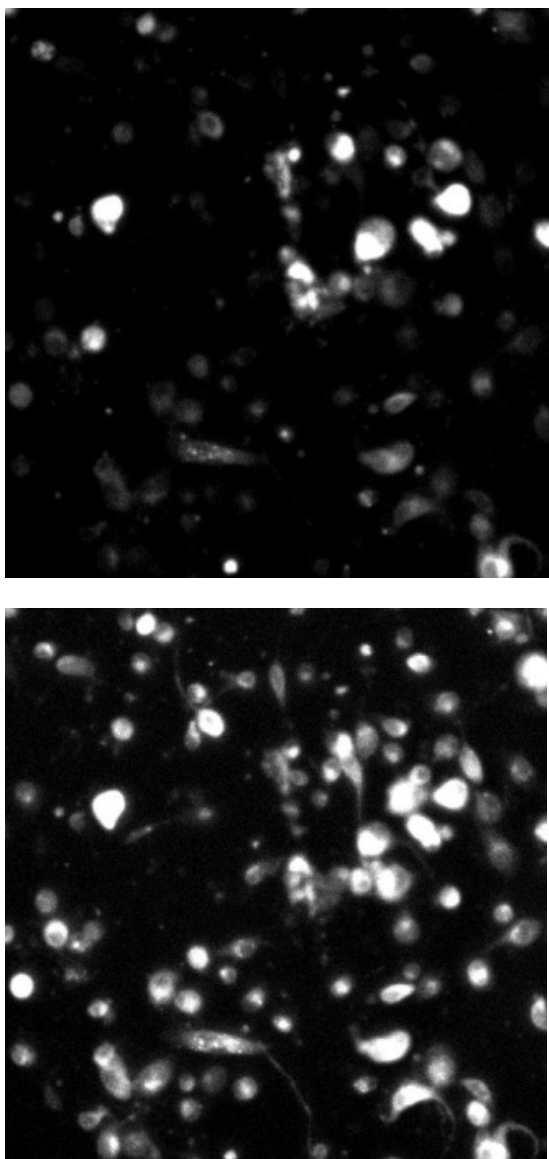


図4 色素で染色した細胞の蛍光画像
上はコントロール ($[K^+]_o = 5.4$ mM の Ringer 液)、下は high K⁺液 ($[K^+]_o = 50$ mM) を流した後の蛍光画像である。high K⁺液中では、蛍光が強くなっていることがわかる。

膜電位感受性色素において、膜電位変化に比例するのは、色素が示す吸光あるいは蛍光の fractional change ($\Delta A/A$, $\Delta F/F$) である (文献 1)。High K⁺液に対する蛍光強度変化を定量的に比較するために、蛍光強度の変化分を背景光強度で normalize し、カラーイメージで表示した (図5)。赤い部分が、high K⁺液に対してより大きな応答を示した細胞である。このように、個々の細胞における脱分極応答をイメージ画像としてとらえ、かつ定量的に比較解析することが可能であることが示された。

DiSBAC₂(3)以外の 3 種の色素についても同様の測定を行い、図4～図5と同様の結果を得ることが出来た。しかしながら、high K⁺液に対する蛍光強度の変化には色素によって大小があり、現在定量的な比較解析をすすめている。

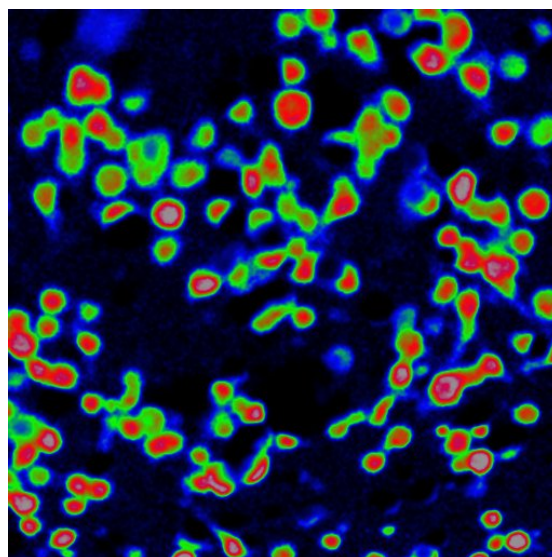


図5 high K⁺液に対する応答の fractional change。蛍光強度の変化分 (ΔF) を背景光強度 (F) で normalize し、カラーイメージで示したもの。

<引用文献>

①佐藤容子：膜電位感受性色素による膜電位測定法、日本膜学会編 膜学実験シリーズ 第I巻 生体膜編、野澤義則、神野耕太郎、井上圭三、大木和夫編、pp339-347、共立出版、東京、1993。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

① Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2015) Voltage-sensitive dye imaging during functional development of the embryonic nervous system: a brief review with special thanks to Professor Larry Cohen. Neurophotonics 2(2): 021009 1-5. (査読有)

DOI:10.1117/1.NPh.2.2.021009,
http://neurophotonics.spiedigitallibrary.org/

② Mullah, S. H. -E. -R., Komuro, R., Yan, P., Hayashi, S., Inaji, M., Momose-Sato, Y., Loew, L. M., Sato, K. (2013) Evaluation of voltage-sensitive fluorescence dyes for monitoring neuronal activity in the embryonic central nervous system. *Journal of Membrane Biology* 246: 679-688. (査読有) DOI:10.1007/s00232-013-9584-1.

③ Momose-Sato, Y. and Sato, K. (2013) Large-scale synchronized activity in the embryonic brainstem and spinal cord. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, Article 36: 1-15. (査読有) DOI: 10.3389/fncel.2013.00036.

[学会発表] (計 30 件)

① Sato, K. and Momose-Sato, Y. Voltage-sensitive dye imaging of neural activities in the embryonic central nervous system. 日本生理学会、2014年3月16-18日、鹿児島大学(鹿児島県、鹿児島市)。

② Mullah, S. H. -E. -R., Komuro, R., Yan, P., Inaji, M., Umy, J., Momose-Sato, Y., Loew, L. M. and Sato, K. Evaluation of voltage-sensitive fluorescence dyes for monitoring neuronal activity in the embryonic CNS. Society for Neuroscience 43rd Annual Meeting, 2013年11月9-13日、San Diego (USA)。

③ Momose-Sato, Y. and Sato, K. Membrane potential imaging during functional development of neuronal circuits in vertebrate embryos. XXXVII International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2013), Symposium on “Membrane potential investigated by voltage sensitive dyes “、2013年7月21-26日、Birmingham (UK)。

④ Sato, K., Komuro, R., Nakamori, T. and Momose-Sato, Y. Screening of voltage-sensitive fluorescence dyes for imaging embryonic neural activity. 日本神経科学学会、2011年9月14-17日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)。

⑤ Sato, K., Komuro, R. and Momose-Sato, Y. Screening of fluorescent voltage-sensitive dyes for detecting neural activity in the embryonic brain. 日本生理学会、2011年4月、東日本大震災のため誌上開催 (*Journal of Physiological Sciences* 61 suppl.1: S168)。

[図書] (計 1 件)

① Momose-Sato, Y., Sato, K. and Kamino, K. (2015) Monitoring population membrane potential signals during development of the vertebrate nervous system. In: *Membrane Potential Imaging in the Nervous*

System and in the Heart, Eds. Canepari, M., Zecevic, D. and Bernus, O., Springer, New York, in press (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 容子 (MOMOSE-SATO Yoko)
関東学院大学・人間環境学部・教授
研究者番号：70251501

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 勝重 (SATO Katsushige)
駒沢女子大学・人間健康学部・教授
研究者番号：80291342