

ラマンイメージングによる培養神経細胞のネットワーク形成過程の評価 Live-cell Raman imaging of cultured hippocampal neurons in neuronal maturation

阪大院工¹, 産総研・阪大先端フォトバイオ², 阪市大院理³, 阪大院生命機能⁴, 産総研 バイオメディカル⁵

○ (M1) 長野貴裕^{1,2}, 増井恭子^{2,3,4}, 名和靖矩^{1,2}, 細川千絵^{2,3}, 石飛秀和^{1,2,4}, 谷知己⁵, 藤田聡史^{1,2}, 井上康志^{1,2,4}
Appl. Phys. Osaka Univ.¹, PhotoBIO-OIL, AIST², Chem. Osaka City Univ.³, Front. Biosci., Osaka Univ.⁴, Biomed. Res. Inst., AIST⁵. ○ T. Nagano^{1,2}, K. Masui^{2,3,4}, Y. Nawa^{1,2}, C. Hosokawa^{2,3}, H. Ishitobi^{1,2,4}, T. Tani⁵, S. Fujita^{1,2}, Y. Inouye^{1,2,4}

E-mail: nagano_t@ap.eng.osaka-u.ac.jp

初代培養された神経細胞が形成する神経ネットワークは、脳内における情報伝達の仕組みを解明するためのモデルとして利用されている。基板上に播種された神経細胞は複雑なネットワークを再構築し、シナプスを介して神経細胞間の情報伝達を行う。細胞内小器官のひとつであるミトコンドリアは、その内膜に結合するシトクロム c (cyt c) による電子授受を介してエネルギーの生産と供給を行い、シナプス形成時には突起部分に集積することで神経ネットワークの形成に寄与していると考えられている[1]。本研究では、神経ネットワーク形成を評価する手法の構築を目指して、培養下の神経細胞内 cyt c の空間的分布の変化を無染色で観察し、培養日数の経過に伴うミトコンドリアの局在分布を調べた。

培養日数の異なる海馬神経細胞を顕微ラマン散乱分光計測し、神経ネットワーク形成に関与するミトコンドリアの分布変遷を cyt c 画像から評価した。標本には胎齢 18 日の Slc:Wistar ラットの海馬を使用した。胎児から摘出した海馬組織をトリプシン処理によって個々の細胞に単離し、石英基板上に播種した後、5 % CO₂ 下のインキュベーター内で培養した。観察には自作のライン走査型ラマン顕微鏡を使用した。励起光として波長 532 nm の CW レーザー光 (試料面: 3 mW/μm²) をライン状に成形し、水浸対物レンズ (倍率: ×25、N.A.: 1.1) で試料面に集光させ、露光時間 10 s/line でラマン画像を取得した。波長 532nm のレーザー光を使用することで、共鳴ラマン効果による cyt c 由来のラマン散乱光を選択的に増強し、可視化した。

培養日数の異なる神経細胞の cyt c 画像を図 1 に示す。培養 3 日目では細胞体に cyt c が多く分布している一方で、培養日数の経過に伴って神経突起への分布の広がり及び局所的な集積が確認できた。本研究の結果から、神経細胞のネットワーク形成における cyt c の空間分布変化をラマンイメージングによって無標識かつ低侵襲で観察することに成功し、細胞体と神経突起の両方で発現量が増加した cyt c によるエネルギー生産が神経シナプス形成の一助となっていることが示唆された。

参考文献:[1] L. Zheng et al., *Cell*, 119, 873 (2004).

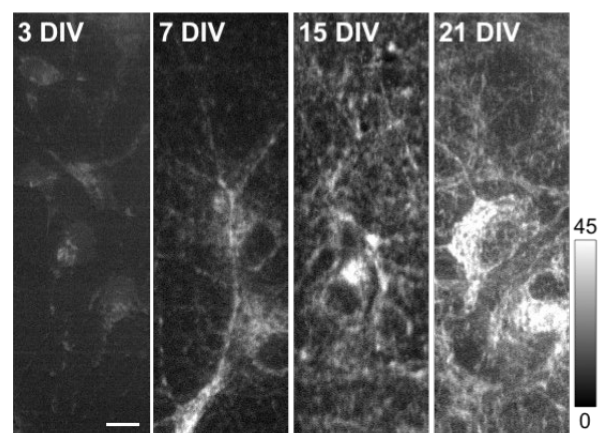


Figure 1. Raman images of cyt c in neuronal cells at each DIV. Scale bar corresponds to 10 μm.