

凍結固定した細胞内における Ca^{2+} 濃度分布の蛍光顕微鏡観察

Fluorescence imaging of Ca^{2+} concentration in cryo-fixed cells

阪大院工¹, 京府立医大医², 産総研・阪大 先端フォトバイオ³

○辻 康介¹, 平野 花咲¹, 國本 拓実¹, 田村 昌子², 森下 祐馬², 望月 健太郎²,

原田 義規², 田中 秀央², 熊本 康昭¹, 山中 真仁¹, 藤田 克昌^{1, 3}

Osaka Univ.¹, Kyoto Prefectural Univ of Medicine.², AIST Advanced Photo-Bio Lab.³,

°Kosuke Tsuji¹, Hanae Hirano¹, Takumi Kunimoto¹, Shoko Tamura², Yuma Morishita²,

Kentaro Mochiduki², Yoshinori Harada², Hideo Tanaka²,

Yasuaki Kumamoto¹, Masahito Yamanaka¹ and Katsumasa Fujita^{1, 3}

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

細胞内のカルシウムイオンは、その濃度変化によって、筋収縮や神経伝達物質の放出などのさまざまな生命現象における細胞内情報伝達物質として働いている。カルシウムイオンの空間分布や濃度を定量性高く観察できれば、こうした生命現象を詳細に解析できる。しかし、心筋細胞の拍動など、カルシウムイオンの数 msec から数十 msec の急速な濃度変化を、高い定量性で観察することは困難である。

本研究では、急速凍結により細胞内カルシウムイオンの空間分布を固定して、十分な信号量が得られるまで露光時間を長くすることで、カルシウムイオン濃度観察の定量性を向上させる手法を提案する。急速凍結により固定した細胞の定量性が長時間露光により向上することを確認するために、スピニングディスク共焦点顕微鏡を用いて、カルシウム指示薬 (Fluo-4) を導入したヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) のカルシウムイオン分布を常温 (23 °C) と凍結環境下 (-135 °C 以下) で蛍光観察した (図)。露光時間は、常温ではカルシウムイオン観察でよく用いられる 30 msec、凍結環境下では十分な信号量が得られる 600 msec に設定した。定量性は、細胞内で 1 msec あたりに検出される信号量の精度によって評価した。常温では 61.8 ± 1.4 カウント/msec、凍結環境下では 23.8 ± 0.2 カウント/msec となり、露光時間を長くすることで定量性が向上した。露光時間をさらに長くすることで、より高い定量性で計測することも可能である。また、図より常温と凍結環境下で細胞の構造が大きく変化していないことがわかる。このことは、急速凍結後も生きた細胞の構造が保たれていることを示している。

謝辞：本研究は、JST、CREST (グラント番号：JPMJCR1925) の支援を受けたものである。

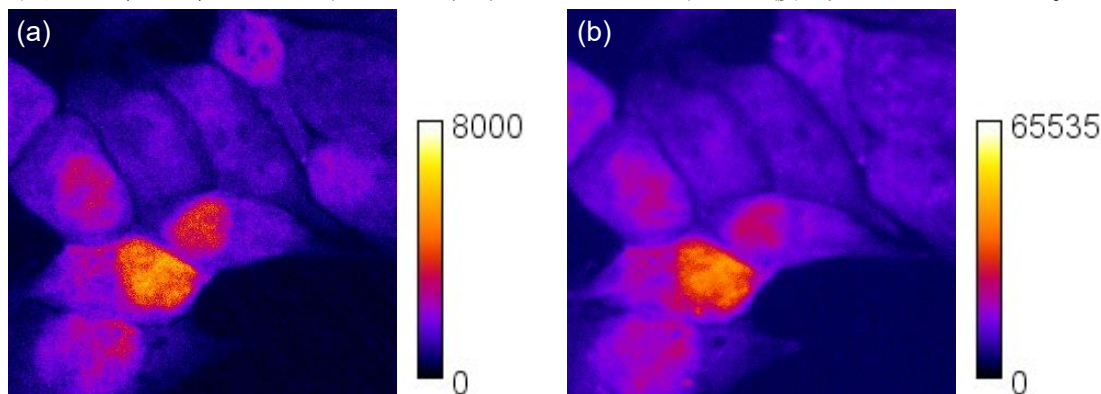


Fig.: Fluorescence images of calcium ion in HeLa cells loaded with Fluo-4. These images were measured by spinning disk confocal microscopy. The exposure time were (a) 30 ms (23 °C) and (b) 600 ms (below -135 °C), respectively.