

細胞内カルシウムイオンの測定

平 本 幸 男

超高感度テレビカメラとの出会い

1982年の秋、私は Dartmouth College の Dr. R. D. Allen から一通の手紙を受けとった。その前年に Allen と Woods Hole の井上信也さんは、光学顕微鏡にテレビカメラを取りつけて顕微鏡を通して得られた光学情報を電気情報に変換することによって肉眼では殆んど見ることはできないような低いコントラストの顕微鏡像を可視化する方法をそれぞれ別個に報告し、従来光学顕微鏡では見るのが不可能とあきらめられていた細胞内の動的現象を直接観察できる可能性を示していた。Allen の手紙は彼が浜松ホトニクス K. K. (当時は浜松テレビと呼ばれていた) の協力によって開発した AVEC 顕微鏡 (Allen video-enhanced contrast microscopy) を日本でも宣伝したいので、いろいろ世話役をしてほしいとのことであった。Allen とは旧知の仲であり、私自身この方面に興味をもっていたため、この申し出を受けて浜松の人達と協力して翌年6月に東京で AVEC 顕微鏡に関する集りを開き、また1箇月余りの間 Allen やその他の人達と共同でこの装置を使って観察・実験を行った。

この機会に私は浜松ホトニクスの晝馬輝夫社長をはじめ同社の人達と面識になり、当時同社が東京天文台と協力して宇宙のはるかかなたから来る極めて弱い光の星の像をとらえるための紫外線用の超高感度テレビカメラを試作していること、また可視光領域のものも近く製作する予定であることを知った。その頃、私はエクオリン (発光クラゲから抽出した Ca^{2+} によって発光するタンパク質) を使って細胞内 Ca^{2+} の変動を記録することに興味をもっていたため、このカメラを使えば細胞内の Ca^{2+} の分布およびその変動をとらえることができるであろうと考えた。そこで晝馬社長に可視光用の超高感度のカメラができたらまっ先に私の所に貸してもらいたいむねお願いした。

浜松ホトニクスでは私のこの申し出を快く受け入れてくれ、私は翌年 (1984年) 4月に第一号機ができてただちにこれを使うことができた。そこでこのカメラを顕微鏡に接続させて細胞内の極めて弱い発光の分布を観察、記録できる装置を作り、ただちに吉本康明君が中心になって愛知教育大学の岩松鷹司さんの協力をあおいでエクオリンを注入したメダカ卵を使って受精の際の卵内 Ca^{2+} の遊離をしらべた。また平野憲一君、岸本健雄君などに協力してもらってウニ、ヒトデなどの卵でも同じような実験を行った。たまたま同年8月に東京で開かれた国際細胞生物学会で私は「光学顕微鏡技術の最近の進歩」についてのワークショップの世話をするようになっていたため、Allen と University of Edinburgh の Murdoch Mitchison に依頼して3人でオーガナイザーになるとともに、この超高感度テレビカメラを使った仕事をここで発表した。このワークショップで Allen は AVEC 顕微鏡を使っての研究を、Pittsburgh の Taylor はやはりテレビカメラを使った蛍光顕微鏡について話した。これら

は私の発表とともに顕微鏡による観察、測定におけるテレビカメラの重要性を強く聴衆に印象づけたと思う。

受精における卵内 Ca^{2+} の遊離

秋になって科研費が交付され、超高感度カメラを新たに浜松ホトニクスから購入することができた。このカメラの特徴は、感度が極めて高いうえ、非常に暗い像から出た光の点（量子的範囲であるため像は不連続な光点の集りである）を一定時間フレームメモリーに蓄積することによってリアルタイムでは殆んど見えないような像を可視化することである。宇宙のはるかかなたの星から来た光はまさしく光点であり、形が変わらないから何時間でも蓄積することができる。しかしわれわれが取扱う細胞は、数秒あるいは1秒以下の間に形や光点の分布が変わる。そのため装置には数秒ないし数分の一秒といった短時間だけ光点を蓄積して作られた像をモニターで示しながら次の一定の時間に光点を蓄積してゆくような機能が必要である。私はカメラに接続しているイメージプロセッサにこのような機能をもたせるようプログラムを作ってもらい、また画面上の任意の広さの部分における一定時間内にあらわれる光点の数の時間的変化の測定ができるようなコンピュータプログラムも付加してもらった。

エクオリンを使つての Ca^{2+} の測定で重要なものにエクオリンの質がある。われわれは始めは市販 (Sigma) のものを使っていたが、その後 MBL (Woods Hole) の下村脩さんをお願いして送っていただいたエクオリンを使うようになった。これは市販品にくらべてはるかに感度が高く、美しい像を得ることができた。下村さんは元来このタンパク質の発見者であり、発光性タンパク質について多くの業績がある。私は昨年 Woods Hole を訪れた際にお会いしてお礼を申し上げるとともに論文を共著にするかどうか伺ったが、かたく遠慮され、また新たに精製されたエクオリンも提供して下さい。下村さんは、私以外にも特にエクオリンを使った細胞内 Ca^{2+} についての初期の研究者にエクオリンを提供されて、この方面の研究に大いに貢献しておられる。

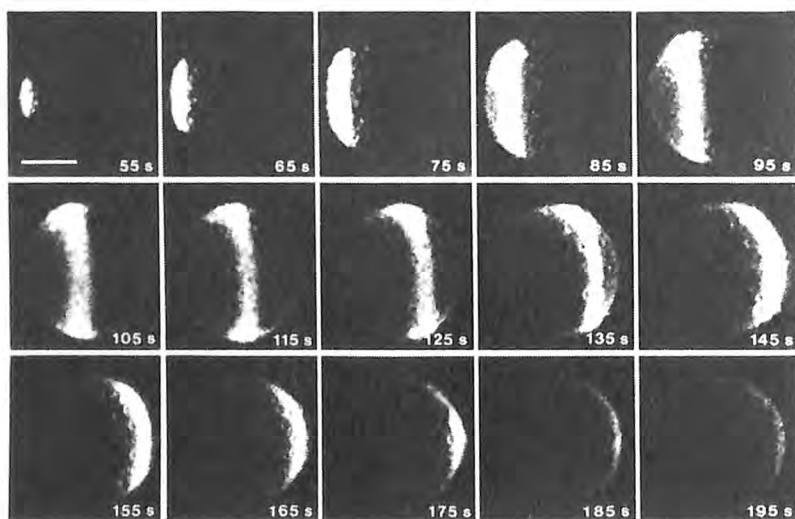


図 1

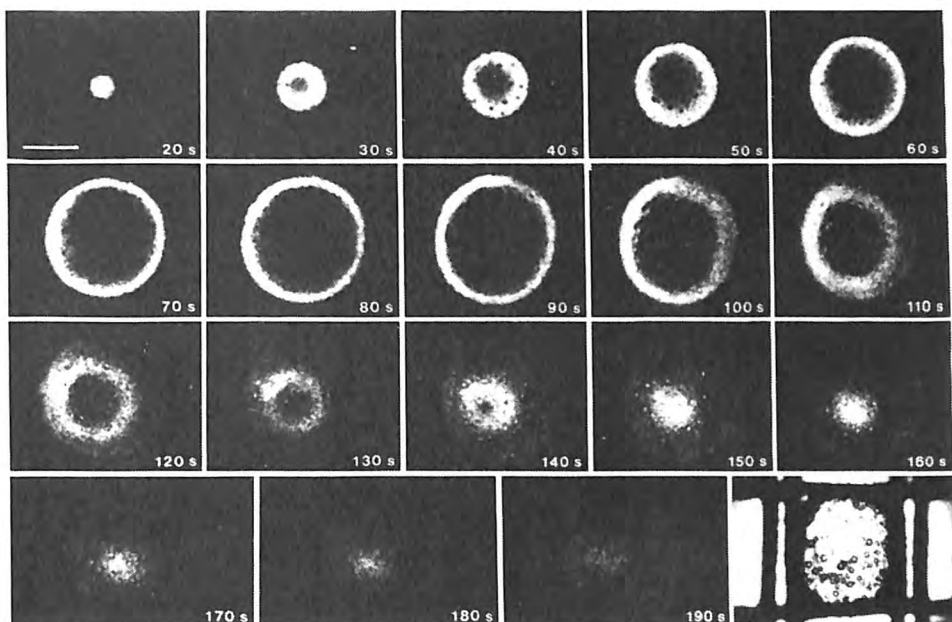


図 2

実験は、あらかじめ細胞内部にエクオリンを注入しておいた卵に精子を加え、受精にともなう卵内 Ca^{2+} 濃度の変化をあらわすエクオリンの発光を超高感度テレビ顕微鏡で撮影するものである。図 1, 2 は、メダカ卵の受精の際、表層内の Ca^{2+} 濃度の一時的増加が精子侵入点（卵門）附近（図 1 では卵の左側、図 2 では卵の中央）から始まり、波状に表層を通過して反対極に伝導していることを示す。この Ca^{2+} 波の伝導速度は卵の全表面で殆んど一定であり、また従来から報告されている表層胞崩壊の波は Ca^{2+} 波より 10~20 秒程度おくれてやはり精子侵入点附近から始まって Ca^{2+} 波と全く等しい速度で卵表面を伝導することがわかった。発光のピーク、すなわち Ca^{2+} 濃度の増加は精子侵入点附近では高く、他の部分では殆んど一定であった。このような Ca^{2+} 波の様子から見て、受精における Ca^{2+} 濃度の一時的増加は精子の刺激によって卵表層内のある種の成分（小胞体？）に結合していた Ca が遊離されて Ca^{2+} 濃度が増加し、この増加した Ca^{2+} が隣接部の Ca^{2+} の遊離をうながすといった方式で伝導が進むために一定速度の波の伝播がおこるものと考えられる。また表層胞は増加した Ca^{2+} によって崩壊がうながされるため、一定の時間の後に Ca^{2+} 波と同一速度で伝播するのであろう。この点については、現在岩松さんと共同でさらにしらべている。

ウニ、ヒトデの卵はメダカ卵にくらべてはるかに小さいため、注入できるエクオリンの量も少なく、測定はメダカ卵にくらべて困難であったが、受精に際してメダカ卵に見られたのと同様な Ca^{2+} 波の

伝播が見られた。

京大の久保田洋さんと米田満樹さんは、以前から両生類卵で受精や人為付活の際に卵表面でおこる伸縮の波（表面弛緩波および表面収縮波）について研究を行って来た。そこでこの材料でもメダカ卵、ウニ卵と同様な Ca^{2+} 波があるかどうか、またあるとすれば表面の伸縮とどのような関係があるか知ろうとして私に共同研究を申し込んで来た。そこで吉本君の協力のもとにこの問題もしらべて見た。実験は、あらかじめエクオリンを注入しておいたカエル卵に精子を加えたり、人工的に付活した際の発光を記録し、ときどき反射光による顕微鏡像を記録することによって卵表面の弛緩、収縮をしらべることにした。実験を始める前には、仮に卵内で Ca^{2+} の遊離がおこっても発光は不透明な原形質にさえぎられて記録できないのではないかと懸念していたが、受精の場合にも付活の場合にもメダカ卵におけると同様な刺激点から始まって卵全表面を伝播する発光、すなわち Ca^{2+} の波が観察された。おそらく Ca^{2+} の遊離は卵表の近くでおこるため不透明な原形質にさえぎられることなく観察できたのであろう。同一の卵でエクオリンの発光と表面の伸縮とを測定した結果、 Ca^{2+} は受精（および付活）後にまずおこる表面弛緩波と場所的にも時間的にも一致することがわかった。おそらく細胞表面附近の Ca^{2+} の増加が表面の弛緩を誘起し、さらにそれが表面の収縮（表面収縮波）につながるのであろう。

自治医大の宮崎俊一さんと共同研究者達はゴールデンハムスターの受精卵において、卵内の Ca^{2+} 濃度の一過性の増加が周期的（約 1 分間隔）におこることを卵内にさし込んだ Ca^{2+} 電極での測定によって発見した。このくりかえしおこる Ca^{2+} 濃度の増加が他の種類の動物卵と同じように精子侵入点附近から始まる波状のものかどうかをエクオリンの発光によって知ろうと考えて、宮崎さんは私どもに共同研究を申し込んで来た。その結果、自治医大の宮崎俊一、井草幸夫、基生研生殖の岸本健雄、橋本有弘の諸氏とわれわれ（吉本と平本）が共同で実験を行うことになった。実験はゴールデンハムスターの未受精卵にエクオリンを注入しておき、顕微鏡下で受精させた。透過光で観察しながら精子が卵表面に接着したのを確認して直ちに暗黒にして光学系を超高感度テレビカメラに切りかえてエクオリンの発光を記録した。その結果、受精卵においては Ca 電極による測定から予期されたように一過性の Ca^{2+} 濃度の増加を示す発光が周期的に観察された。初めの 2～3 回の発光では、発光は精子付着点附近からおこり、数秒で卵全体にひろがり以後数秒で消滅した。いっぽう最初から 4 回目以降の発光は精子付着点とは無関係に卵全体で始まり、数秒で極大に達し、さらに数秒かかって消滅した。つまり最初の 2～3 回までは他の動物卵におけるものと同様な Ca^{2+} 波であるが、以後の反応では波の伝導はみられないことがわかった。

Ca^{2+} と受精

受精に際して卵内の Ca^{2+} が増加するという説は 1930 年代に Heilbrunn が述べている。しかしその説の根拠になった実験結果は現在疑問の点が多い。彼は同じ頃、筋収縮についても Ca^{2+} の重要性を述べているが、やはり実験的根拠は薄弱であった。筋収縮に Ca^{2+} の重要性を示した実験として鎌田と木下（1943）のものがある。私の大学での卒業研究は単一筋繊維の収縮に関連したもので、この鎌田、木下の論文は木下先生の研究室に入って最初に読んだものであるが、当時はこの中に記載されて

いる Ca^{2+} を筋繊維内に注入すると収縮がおこるという記述にはそれほど注目しなかった。卒業して大学院生であった頃には、私は当時次々と発表された筋・神経の活動電位の発生に関する Hodgkin らの研究のすばらしさに目をうばわれて、彼等が主張する Na^+ 、 K^+ への重要性だけが頭にあり、 Ca^{2+} については殆んど注目していなかったわけである。筋収縮における Ca^{2+} の重要性に気がついたのは江橋先生などの研究の出た1960年代になってからであり、受精における Trigger として Ca^{2+} を考えるようになったのは1970年頃のことであった。

エクオリンや Ca^{2+} 緩衝液についての情報が耳に入ってきたのはその頃であった。 Ca^{2+} が発生の Trigger であることを証明するために当時私が考えたのは次の2つの実験であった。ひとつはあらかじめエクオリンを注入しておいた卵を受精させてその発光から受精の際 Ca^{2+} 濃度が増加するかどうかしらべることであり、もうひとつは Ca^{2+} 緩衝液を未受精卵に注入して細胞内 Ca^{2+} 濃度をあるレベル以上まであげれば卵は付活され、一定濃度以下にクランプしておけば精子による受精反応をおさえることができるのではないかというものであった。後の方の実験はその後浜口幸久君と共同で成功し、ずっと後になって(1981)発表した(ゾウリムシの纖毛逆転反応についての同様な実験は斎木(浜口)みやこさんと共同で1975年に発表した)。エクオリンの実験は1972年頃から磯野直秀君や馬淵一誠君と共同してまずエクオリンを日本でとれるクラゲから抽出し、それを使って上記の実験をする計画を立てた。この仕事は後に浜口幸久君に引きつがれたが、感度、純度の高いエクオリンを得ることができなかったため満足すべき結果が得られなかった。1977年になって Steinhardt らや Ridgway らによって受精における卵内 Ca^{2+} 濃度の上昇を細胞内に注入したエクオリンの発光によって示す報告がなされた。彼等は下村さんからもらったエクオリンを使っていたから、もし私が最初この実験を計画したときに下村さんに手紙を書いていたら彼等に先んじることができたであろう。今から考えると残念なことである。1968年、Gilkey らは超高感度カメラを使ってメダカ卵における Ca^{2+} 波の存在をエクオリンの発光によって示した。この研究はわれわれにとって衝動的なものであったが、カメラに関しては当時われわれの手のとどくようなしろものではなかった。結局私は1984年浜松ホトニクスからカメラを手にするまで待たなければならなかったわけである。

このカメラを手にするきっかけになった R. D. Allen の AVEC 顕微鏡は細胞生物学の別の分野で大きな役割をはたしている。この顕微鏡を使うことによって、従来は直接観察することが不可能と考えられていた原形質中や人工水溶液中の単一微小管およびその上にそって動く粒子の運動を直接観察できるようになった。その結果、神経軸索輸送に関係していると考えられる微小管にそっての粒子の運動にあずかるタンパク質(kinesin)の発見など細胞運動における新しい展開として注目されている。

Allen が初めて来日したのは1961年で、彼は滞日中、主として前半は東大の三崎臨海実験所で、後半は阪大の神谷研究室で過ごした。たまたま私は Napoli に出かけていて不在であったため彼は私の三崎の家に起居していた。当時実験所の助手であった金谷晴夫さんがその家を訪れた時、2 m を越す大男の彼が急に立上ったため鴨居に頭を強打して転倒したという話が伝えられている。その後度々来日し、基生研コンファレンスにも参加した。1983年に来日した時には岡崎まで私といっしょに来て、久しぶりに金谷所長と3人で食事をした。金谷さんががんで入院する一週間ほど前のことである。

1985年の初めの頃、Allen ががんになったとの話が伝わって来た。しかし、その年の5月に西独の Stuttgart であった Cytomechanics のシンポジウムにはやって来て、同じく出席した私に“私は金谷さんと同じくらい臓がんだが、最近の monoclonal anti body を使った治療法によって回復にむかっている”と話していた。図3はシンポジウム終了後 Bonn の Wohlfarth-Bottermann 教授の研究室を訪れた際の写真で、中央の背の高い男が Allen, その前が同年秋に彼と結婚した女性、その隣りは当時この研究室に居られた神谷先生、右から3番目が W-Bottermann 教授、その隣が私である。結局 Allen は昨年3月に亡くなった。



図3

基生研共同研究

エクオリンを使った細胞内 Ca^{2+} の研究としては、上記の受精における Ca^{2+} 波のほかに細胞分裂、アメーバ運動、原形質流動にともなう細胞内 Ca^{2+} の変動などについて岩松さん、阪大の黒田清子さんなどが吉本君と共同研究を続けている。以上のように細胞内 Ca^{2+} についてはさまざまな研究機関の方々との共同研究によって比較的短期間に多くの成果をあげることができた。ひとくちに共同研究といっても通常の大学・研究所の研究室の間では研究のためのスペースや費用、時間的制約などによってなかなか実現しにくいものである。今回の場合は基生研における共同研究ということで、参加された方々もこの制度のおかげで十分な成果をあげることができてたいへん喜んでおられた。

基生研は全国の多くの生物学者や生物学関係の学会の支持のもとに10年前に設立され、現在では国立遺伝学研究所とともに数少ない生物学の基礎分野の研究所として大きな役割をになっている。国立

大学共同利用機関として、いっぽうにおいて研究所スタッフを中心としてすぐれた研究成果をあげると同時に、他方全国の生物学者との共同研究の場としての役割も期待されている。設立当時のいきさつから見ても、生物学者の大多数はそれぞれ自分達の専門分野を含む広い分野の研究が共同研究として受入れられることを期待している。基生研が限られた人数のスタッフでこのような期待にそうのには困難な点もあろうが、設立当時考えられた広い分野のカバーできる部門とすぐれた研究設備をもつ基生研ができるだけ多くの生物学者の要望に答えることができるようなものであってほしいと思う。私はさまざまな学会や学術会議などを通して多くの生物学者と接して感じられることは、基生研の人達がある限られた分野の恵まれた研究者の集りとして見られている傾向があり、また共同研究の申込においても一部の人達にとって多かれ少なかれしきいが高いと感じておられるように思われることである。設立10年にあたって基生研が全国に数少ない生物学関係の国立大学共同利用機関としてそのあり方を謙虚に反省して考えるべきであろう。

(細胞増殖研究部門教授)