3PD041

核内における mRNA の運動の 1 分子イメージング

多田 尚史¹、阿藤 淳一郎¹、石浜 陽¹、羽原 靖晃²、
谷 時雄^{2,3}、船津 高志^{1,3}

(¹ 早大・理工・物理、² 九大・理・生物、³ 科技団・さがけ研究 21)

【目的】 mRNA の核から細胞質への輸送は、真核生物の遺伝子発現において重要な過程であるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。これを明らかにするため、生きた細胞の核内で 1 分子の mRNA の動きと局在をビデオ観察した。

【方法】 細胞内の蛍光分子を局所励起するため、共焦点顕微鏡 (CSU10, 横河電気) を改造し、YAG2 倍波(532nm)を励起光源として、ISIT で蛍光像をビデオレート観察した。核内の mRNA をラベルするために、5'末端にテトラメチルローダミンを結合させた 15mer の S-オリゴヌクレオチド(TMR-S-Oligo-dT、コントロールとして TMR-S-Oligo-dA)を調製した。また、特定の mRNA を過剰発現させる為に CMV プロモーターを持つ GFP プラスミドを調製した。観察は、数千分子のオリゴヌクレオチドと数十分子のプラスミド (核内の個数と濃度はそれぞれ数 nM と数十 pM) を *Xenopus* A6 細胞の核にインジェクションして行った。

【結果】 核は 1 分子蛍光観察の妨げとなる自家蛍光が無かった。オリゴヌクレオチドだけをインジェクションすると、mRNA に結合していないオリゴヌクレオチドはブラウン運動が早すぎて蛍光の輝点とならず核全体の蛍光が増加した。mRNA に結合するとブラウン運動が遅くなり dT の約 15% が 1 蛍光分子の輝点として観察された。さらにプラスミドを加えて mRNA を過剰発現させると、輝点数が数倍に増加した。一方 dA の場合は輝点として観察されなかった。核膜や核小体の周辺で静止している mRNA が見られたが、大部分の mRNA は核内をブラウン運動していた。拡散定数は $4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と見積られ、報告されている溶液中での値とほぼ同じであった。

H. Tadakuma, J. Atoh, Y. Ishihama, Y. Habara, T. Tani, T. Funatsu:
Imaging of a single mRNA molecule moving within a nucleus of living cells.

3PD043

RNA ポリメラーゼはどのように DNA 鎖上をスライ
ディングしていくのか—— DNA 1 分子操作による
観察系構築
○十川久美子、嶋本伸雄 (国立遺伝学研究所)

加畑らは、誘電泳動によりベルト状に固定した DNA を用い、蛍光標識した RNA ポリメラーゼがスライディングしていくことを証明した。RNA ポリメラーゼが塩基配列を見ながら進んで行けば、DNA のグルーブに沿って螺旋状に塩基をなぞりながら動いていく、つまりグルーブトラッキングをしている、と考えられる。実際のところはどうか。われわれはこの疑問に答えるために、光ピンセットによる DNA 1 分子操作の技術を用いて、RNA ポリメラーゼと相互作用している DNA 1 分子の動きを観察する方法の構築を進めている。

大腸菌 RNA ポリメラーゼは、転写活性を維持したままガラス基盤に固定することが必要である。このために β' サブユニットに His-tag を導入したものを発現させ、同時に発現した α 、 β のサブユニットとともに RNA ポリメラーゼを形成させることにした。一方 DNA の一端に複数のビオチンを導入すると、アビジンビーズに複数点で結合し、DNA 分子の旋回をアビジンビーズの回転として伝えることができる。RNA ポリメラーゼを固定したガラス基盤を微速で動かしながら、光ピンセットで捕捉したアビジンビーズの動きを観察する。ガラス基盤を動かすためには、ピエゾ素子を用いている。

年会では、これらの観察系構築の詳細について報告する予定である。

K. Sakata-Sogawa, N. Shimamoto : Is RNA polymerase tracking a groove of DNA? --Observation using a single-molecule manipulation technique

3PD042

磁気ピンセットを用いたマニピュレート法の開発

○竹中啓^{1,2}、原田慶恵^{1,2}、伊藤尊康²、木下一彦^{1,2}

(¹ 慶大・理工・物理、² CREST チーム 13)

顕微鏡下で分子を操作する方法として、多くの場合光ピンセットが使われる。光ピンセットは、レーザー光を 1 点に集め、プラスチックビーズなどをつかむ方法である。操作したい分子にプラスチックビーズをつけておけば、ビーズを介して分子を操作することができる。しかし、1 つの光ピンセットで一度にたくさんの分子を操作することはできない。また、光ピンセットのトラップの中でビーズは自由に回転してしまうので、分子をねじるような操作はできない。そこで私たちは磁気ビーズを磁場で操作する磁気ピンセットの装置の開発を行うことにした。磁気ピンセットは、磁場の勾配を利用して磁気ビーズを引っ張ったり、回転させたりすることができる装置である。磁気ビーズを引っ張る力は磁石を上下させることで調節する。磁石の高さと磁場の力の関係を調べるために、図のように磁気ビーズを DNA の片端につけ、もう片端をガラス表面につける。引っ張る力はビーズのブラウン運動から求まる。磁石を回すと磁場が回転するのでビーズを回転させることができる。

私たちはこの装置を用いて RNA polymerase が DNA を転写するとき DNA を手繰り寄せる様子を観察している。本年会ではその結果を報告する予定である。

K. Takenaka, Y. Harada, H. Itoh, K. Kinoshita, Jr.:
Manipulation with magnet tweezers

3PD044

DNA のねじれ弾性測定

○羽田裕子、原田慶恵、木下一彦
(慶大・理工・物理、CREST チーム 13)

DNA のようなひも状の分子は、細胞中でねじれていると思われる。DNA のねじれは、DNA のねじれの硬さに依存するであろう。そしてそれは、DNA が様々な DNA 結合蛋白と相互作用する際にも影響を与えているかも知れない。

私たちは、DNA のねじれブラウン運動を可視化することによって、DNA のねじれ弾性を測定している。DNA の片端をカバーガラスに固定し、もう一方の端にビーズを接着させる方法を用いている。

DNA に接着させたビーズには直径が小さな蛍光ビーズをまばらにつけてある。顕微鏡下において、光ピンセットを用い、ビーズをカバーガラスに対して垂直に持ち上げた。するとビーズが回転ブラウン運動する様子を、蛍光ビーズを目印にして観察できた。

ビーズの回転ブラウン運動は、DNA のねじれ弾性による制限を受けている。したがってビーズの回転ブラウン運動から、ねじれる範囲を測定することによって、ねじれ弾性を見積もることができる。

昨年の発表では、直径 $2 \mu\text{m}$ のビーズと、長さ $16 \mu\text{m}$ の DNA を用いて測定を行った結果を発表した。ビーズが大きいと粘性抵抗が大きくなる。また DNA が長いとねじれる範囲が大きくなる。そのため、ねじれブラウン運動の範囲がわかるまで長い測定時間が必要となる。

今回は、このビーズの直径を $2 \mu\text{m}$ から $1 \mu\text{m}$ にし、DNA も $16 \mu\text{m}$ から $1.6 \mu\text{m}$ にして、測定を行った。これにより測定の精度が上がって、DNA のねじれの persistence length が、平均で約 80nm と求められた。この値は、過去に他の方法で求められた値と同じオーダーである。

Y. Hada, Y. Harada, K. Kinoshita Jr. : Measurement of the torsional rigidity of single DNA molecules