1P245

二重鏡筒対物レンズを用いた蛍光イメージングシステムの開発

○太田 善浩¹、阿部 勝行² (¹東京農工大学・工学部・生命工学科、²オリンパス光学工業・工学技術部)

【目的】従来の落射型蛍光顕微鏡では1) 励起光が対物レンズ鏡筒内部にあたり、そこから発した蛍光が試料からの蛍光に混ざる、2) 多重染色した試料を波長を切り替えて測定する際に、ダイクロイックミラーが波長切り替えの障害となる、という問題があった。本研究では、これら2つの短所の克服を目的とし、二重鏡筒対物レンズを用いた蛍光イメージングシステムを開発した。

【方法】開発した蛍光イメージングシステムの概要は以下の通りである。キセノンランプハウスと顕微鏡鏡体の間に励起フィルターを、CCDカメラと鏡体の間に蛍光フィルターをいれ、それぞれフィルターホイールで波長を選ぶようにする。キセノンランプからの励起光を円環状にし、中央に穴のあいた全反射ミラーに穴の外側に光があたるように45度の角度で照射する。対物レンズの鏡筒は2重にし、外側の鏡筒と内側の鏡筒の間に励起光を導き、外側の鏡筒の先端に放物面鏡を取り付けて試料に励起光を集める。内側の鏡筒の先端につけた対物レンズにより試料からの蛍光を集め、全反射ミラーの中央に空いた穴に通し、蛍光フィルターにより蛍光だけをCCDカメラに導く。

【評価】まず、蛍光顕微鏡としての性能を検討したところ、いずれの波長においても従来の落射型蛍光顕微鏡と遜色ない質の画像を得ることが出来た。また、細胞をcalcium green-1とTMRE(tetramethylrhodamine ethyl ester)で2重染色し、各々を同時進行で時間分解測定したところ、どちらの画像も画面での細胞の位置がずれることなく時間経過を測定できた。以上から、今回開発した蛍光イメージングシステムは、多重染色した試料をそれぞれの波長で同時に時間分解測定するのに適した装置であることがわかった。当日は、上記を含め詳細を報告する。

Y.Ohta and K. Abe : Fluorescence imaging system with the double-cylinder objective

1P247

Giant Liposomeの膜流動性のビデオレートイメージング(その2) - 相分離の生成と消滅

○土屋 清吾、大場 哲彦、大木 和夫(東北大・理・物理)

Giant Liposome (GL) は直径5~20 μ mの脂質からなる小胞で細胞膜のモデルとして研究されている。我々は特にリン脂質からなるGLの相転移温度付近での膜流動性の変化のダイナミクスに注目して研究を進めている。

本研究では膜流動性を表す指標としてLaurdanの蛍光分光特性を用いた。Laurdanは脂溶性で脂質二重層膜中のゲル層では440 nmの、液晶層中では490 nmの発光のピークを示す。したがって、その二波長での発光強度から定義される

$$GP(\text{General Polarization}) = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

は膜の流動性を知る良い指標になる。

我々はこのGPを顕微鏡下において、ビデオレートで取得するため、二波長の画像を一つのカメラの受光面の異なる位置に結像させるDual-View光学系を製作した。この画像をデジタルビデオで録画し、後に画像処理をすることで、ビデオレートでのGP画像の取得が可能になっている。

GP画像からDMPC:DMPE=1:1の混合Liposomeでは相転移温度付近で緩やかに降温させるとその途中で相分離がおき、膜の曲率によって膜の流動性が異なっていて、Liposomeの形状と膜の流動性に相関がある様子が見られた。さらに、一旦下げた温度を上昇させると降温させたときと同じ場所に流動性の異なる領域が現れた。しかし、すばやく降温(9°C/分)させると相分離は起こらず、ほぼ一様に相転移が起きた。このことから、流動性の異なる領域が生成されるにはある程度時間が掛かり、完全なゲル層状態になってしまうと脂質の拡散が抑えられそのような領域が生成(又は消滅)しないと思われる。

S.Tsuchiya, T.Ohba and K.Ohki : Video-rate Imaging of Giant Liposome Membrane Fluidity(Part 2)

1P246

mRNA スプライシングの1分子蛍光分光イメージング

○石浜 陽¹、渋谷 利治²、多田 隼 尚史¹、座古 保¹、谷 時雄³、船津 高志^{1,4} (¹早大・理工・物理、²九大・理・生物、³熊大・理・生物科学、⁴科技団・さきがけ研究21)

[はじめに]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必要不可欠な重要な過程である。しかし、このmRNAの核外輸送メカニズムについてはいまだに不明な点が多い。高等真核生物では、通常mRNA前駆体が細胞質に輸送されることはなく、スプライシングを受け成熟mRNAとなることで初めて核外へ移行できるようになる。一方で、XIST RNAやomega-n RNAのように、細胞質に輸送されず核内に留まるRNA分子種も知られている。これらの事実は、mRNAの核外輸送が高度に選択的な過程を経て行われていること、そしてmRNAのスプライシング反応と核外輸送に密接な関連があることを示唆している。我々は、すでに生きた細胞の核内で1分子のmRNAの動きをイメージングする蛍光顕微鏡技術の開発に成功している。本研究では、さらに生きた細胞内でmRNA 1分子がスプライシング反応を起す現場を可視化する技術を開発し、これらの技術を用いて、細胞内におけるスプライシング反応の分子メカニズム及びmRNAの核外輸送の分子メカニズムを明らかにすることをめざしている。[方法]ヒト β -globin部分遺伝子(540塩基)の第1、第2エクソン配列及びイントロン配列をもつRNAを別個に調製し、それぞれ異なる蛍光色素(Cy3, Alexa568, Cy5)で標識したものをライゲーションにより1本のmRNAにする。このmRNAを、核抽出液を使ったin vitroスプライシング反応系によりスプライシングさせる。それぞれの蛍光をプリズムによる分光を利用して同時観察し、イントロンを標識した蛍光色素の存在の有無からスプライシングを検出する。また、mRNAをインジェクションにより細胞核に導入し、細胞内でのスプライシング反応検出も試みる。[現状]3色の蛍光色素で染め分けたmRNAの調製、及びプリズムを利用した1分子レベルでの複数蛍光同時観察系の評価を行っている。

Y.Ishihama, I.Shibuya, H.tadakuma, T.Zako, T.Tani, T.Funatsu : Single molecule imaging of mRNA splicing by reaction

1P248

蛍光性希土類錯体プローブによる多色同時染色法とその特徴について

○佐野 浩樹¹、松本 和子^{2,3} (¹振技団CREST、²早大・理工・化、³早大・理工総研)

蛍光検出法はごく微量の生体物質(蛋白質、核酸など)を超高感度で検出する手法として液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動に用いられている。また生体内機能分子を蛍光標識する事によって生命現象を明らかにする目的でも用いられている。演者達のグループでは生体分子染色用の蛍光性希土類錯体を合成している。近年、新規ユウロピウム蛍光ラベル剤と時間分解蛍光測定法を組み合わせることで、抗原-抗体反応を利用した血清中の超微量成分を分析するイムノアッセイにおいて従来法(ラジオイムノアッセイ、エンザイムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなど)に比べて105倍もの飛躍的高感度化を実現し、血清中の主要マーカーであるアルファフェトプロテインの検出限界が10-17Mという驚異的記録を達成している。これは(1)一般の蛍光物質の蛍光寿命は数ナノ秒であるのに対し、ユウロピウム錯体は数百マイクロ秒ときわめて長い。(2)ストークスシフトが一般の蛍光物質では~20nmであるのに対し、ユウロピウム錯体では~270nmと極めて大きい、といった特徴を生かした測定法の賜である。但し金属錯体が発光体となっている為に複数の蛍光性金属錯体を共存させた際に錯体の金属が交換してしまうといった危険性があった。本発表では蛍光性金属錯体を観察する溶液系を工夫することによって金属の交換を抑えることに成功し、長時間にわたって上記特徴の蛍光観察が可能となったことを発表する。またバックグラウンド蛍光を抑えて高S/Nで蛍光を測定できる時間分解蛍光顕微鏡についても紹介をする。

H.Sano and K.Matsumoto : Highly sensitive fluorescent microscopy for the detection of functional rare-earth fluorescent complexes