B365

高速溶液交換システムを備えた顕微観察法の開発

○小玉 優哉、白崎 善隆、船津 高志（早大・理工・物理）

生体分子間相互作用を1分子レベルで機能解析するためには、観測対象となる生体物質の周辺の微小環境（溶液組成や温度など）を、正確に制御する必要がある。しかし、従来の1分子蛍光イメージング法では、迅速な溶液交換や、溶液を交換しながらの観察は困難であった。この問題を解決するために、私たちはガラス基板に複数の入力と1出力を持つ微小流路（幅 $\sim 200\ \mu\text{m}$ ）を加工し、光学顕微鏡で観察しながら溶液交換を数msオーダーで実現するシステムを開発した。この系では、全ての動作は自動化されており、実験の再現性が極めて高い。また、生体分子間相互作用を1分子蛍光イメージングするのに十分な領域を観察することが可能である。このシステムを用いて、シャペロニンなどの生物分子機械の機能を、高速な液交換を行いながら1分子蛍光イメージングすることを試みている。さらに、この微小流路を用いて細胞のイメージングも可能であるため、広範な利用が期待される。

3入力・1出力を持つ微小流路へ、Bufferを挟むようにして濃度の異なる蛍光色素を流した状態

100 μm

Y. Kodama, Y. Shirasaki, T. Funatsu : Development of the optical microscopy equipped with the quick solution exchange system

B367

細胞の apical, basal を同時に可視化する試み

○日野 美紀¹、安藤 亮子¹、青野 寧²、三島 周三²、渡邊 裕一²、宮脇 敦史¹（¹ 理研脳センター・細胞機能探索、² オリパス（株））

細胞のXY方向のイメージングは花盛りで、きらびやかな成果が毎週誌上を賑わしている。では細胞のZ軸方向の情報はどうか？特に極性を有する上皮細胞では、頂部と基底部でその役割が著しく異なっている、これを同時に観察したくはないか？しかし従来の方法ではZ軸ステップスキャンには時間がかかるし、得られた画像を3次元再構築して断面をとってもXYイメージングほど解像度のよい画が得られない。

そこで我々は、細胞を上下からでなく横から視ることを試みた。細胞培養器の工夫、光学系の検討を経て、XY方向のイメージングと同等の解像度を持つZ軸方向の画像を高速で得ることができるようになった。実際にZ軸方向に厚みのある上皮細胞MDCKをモデルとして、縦方向の情報伝達分子の時間空間的な活性化や、蛋白質や脂質輸送の可視化を試みた。本ポスターでは主にホスホリパーゼCのプレクストリンホモロジドドメインとEGFPの融合蛋白質（EGFP-PHD）を用いて、細胞内IP3を可視化した例を報告する。ATP刺激で、細胞のapical側、basal側からそれぞれIP3濃度の変化に違いがあることが明らかになった。本方法を用いることで、従来XY方向のみのイメージングでは得られなかった新しい細胞内ワールドの展開が期待される。

M.Hino, R.Ando, Y.Aono, S.Mishima, Y.Watanabe and A.miyawaki : Visualization of apical and basal region in epithelial cell

B366

薄膜水フィルム中での精子ペン毛運動観察

○上村 慎治（東大・総合文化・生命環境）

繊毛・ペン毛運動は、屈曲運動によって水中推進や物質輸送を行う運動器官である。屈曲運動するときには生じるペン毛・繊毛の各部分での法線方向と接線方向の粘性抵抗力の差を使って推力を得ている。つまり、溶媒の粘性抵抗、および、ペン毛・繊毛の屈曲波形は、運動の推進効率や制御機構を考慮する上で非常に重要な要素となる。さらに、非常に粘度の高い溶媒中であっても、速度が遅くなることはあっても、運動そのものが停止することはないため、ペン毛・繊毛の内部では負荷に応じた運動波形の制御がうまく機能しているものと考えられている。本研究では、溶媒の流体力学的な特性と運動との関わりを調べるための新しい観察方法を試みた。方法はMysels (*J. Physic. Chem.*, 1964, **68**, 3441)の装置を改良して用いたもので、チェンバー内に直径2mmの薄い水フィルム層を作成し、光学顕微鏡下で直接観察できるようにしたものである。通常の実験緩衝液のみでは安定した薄膜水層とはならないため、溶液中に表面活性効果のある溶質を入れて実験を行い、水分の蒸散を防いだチェンバー内において、高い画質にて拡大像を観察できるように工夫した。この手法の特徴は、ペン毛の運動を人為的に2次元的な空間に押し込んで観察できる点である。スライドガラスによる壁の影響もなく、流体力学的な解析やシミュレーションが3次元的な運動に比べて簡便化できる利点がある。水膜の厚みや溶質を変えることで流体力学的な特性を操作できる点なども特徴である。乾燥や表面張力による生体試料への影響は無視できないが、ペン毛・繊毛運動を観察する実験系としてこれまで試みられたことのない手法である。他の細胞運動系の観察、生体膜上の分子や脂質分子の挙動解析へも応用できる可能性も高い。

S. Kamimura : Observation of flagellar beats in a thin liquid film.

B368

多波長蛍光同時計測による mRNA スプライシング反応の可視化

○石浜 陽¹、多田 限 高史¹、谷 時雄²、船津 高志¹（¹ 早大・理工・物理、² 熊大・理・生物科学）

[はじめに] 真核生物の遺伝子は遺伝情報を持たない長大なイントロン領域によって分断されており、イントロンを除去するスプライシング反応は遺伝子の発現において必須の過程である。我々は、スプライシング反応を多波長蛍光の同時観察技術を用いて解析する新たな実験系の開発に取り組んでいる。[実験方法] スプライシング反応の検出にはイントロンとそれを挟む2つのエキソンをそれぞれ異なる蛍光色素で標識したmRNAを用いた。それぞれの蛍光を同時に検出し、イントロンの蛍光のみが無くなることを利用してスプライシング反応を可視化した。そのために、各部位を染め分けたmRNA前駆体の調製手法を確立した。蛍光色素Alexa532、Alexa568、Alexa647でそれぞれ標識したFushitarazu部分遺伝子（全長570塩基）のエキソン配列とイントロン配列を合成し、これらをT4 DNA Ligaseにより連結させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離回収した。連結した蛍光標識mRNAはHeLa細胞の核抽出液中でスプライシングされることが確認された。[in vitroでの可視化] 5'末端をビオチン修飾したオリゴdTをアビジン-ビオチン結合によりガラス基板上に固定化し、蛍光標識したmRNA前駆体のpolyA領域を介して結合させた。HeLa核抽出液を用いたスプライシング反応溶液下において反応を起こし、蛍光分光のためのプリズムを組み込んだエバネッセント型1分子蛍光分光顕微鏡システムにより観察した。現在、固定化されたmRNAのスプライシング反応活性を評価している。[in vivoでの可視化] 蛍光標識したmRNAをマイクロインジェクションによりHeLa細胞核内に導入した。フーリエ干渉型スペクトル顕微鏡を用いた解析を現在進めている。

Y.Ishihama, H.Tadakuma, T.Tani, T.Funatsu : Imaging of mRNA splicing with spectromicroscopy in vitro and in vivo