1P345

投影型X線顕微鏡を用いた元素解析

○鶴田 進¹、坂田 真信²、川崎 たまみ³、並木 秀男²、吉村 英恭¹ (¹ 明大院・理工学・生物物理、² 早大院・生命理工、³ 早大・理工総研)

投影型X線顕微鏡は走査型電子顕微鏡の試料室を改造したもので、収束させた電子線を金属薄膜に当てることにより、点光源に近い範囲でX線を発生させている。そして、そこから球面上に広がるX線を試料に当て、その投影拡大像を得る仕組みになっている。試料室を真空にする必要がないため、生物試料の観察に適している。この投影型X線顕微鏡の限界分解能は約0.1 μm と言われている。また、発生する特性X線の波長は電子線を当てる金属の元素に依存している。本研究では、吸収端の前後での吸収係数の違いによるコントラストの違いを観測することで、元素解析を試みた。つまり、特定したい元素の吸収端波長を挟むようなX線波長を発生させるターゲット金属を選択し、そこから得られた画像を比較し、目的の元素の存在を同定する。今回は、鉄についての元素解析を行った。今回使用したターゲット金属は、鉄のK吸収端波長が0.1743nmなので、ニッケル(K線:0.1659nm)とコバルト(K線:0.1791nm)である。この結果、鉄の微粒子を他の微粒子と区別することが出来た。今後は生物試料を観察し、その体内にある鉄の存在を明らかにしていきたい。

S.Tsuruta, M.Sakata, T.Kawasaki, H.Namiki and H.Yoshimura : Element Analysis by Projection X-ray Microscopy

1P347

可逆的生体分子蛍光ラベル技術の開発

○安藤 亮子、水野 秀昭、宮脇 敦史 (理研・BSI・細胞機能探索)

近年、蛍光タンパク質を使って生体分子をラベルして可視化する技術は、広く普及している。しかし、一般的な蛍光イメージングは、蛍光シグナルの分布の定常状態を観察できるが、その動きに関してはほとんど情報をもたらさない。2002年に我々がクローニングした蛍光タンパク質Kaedeなどは、分子を光でラベルしてその動きを追跡することを可能にしたが、ラベル反応が不可逆的であるため、ラベラー追跡が一回のみに限るという問題があった。生体分子は絶えず動いており、その動きは条件によって変化する。生体分子の動きの変化を経時的に追うために、光ラベルが何回も繰り返してできる技術が求められてきた。2004年、我々は、ウミバザ科のサンゴから発見した蛍光タンパク質を改変することにより、異なる2つの波長の光でラベルと脱ラベルを繰り返せる、フォトクロミック蛍光タンパク質の開発に成功した。そのタンパク質「Dronpa」は、普段は青色領域に吸収を持っており、青色の弱い光を当てると明るい緑色の蛍光を発する。ところが、青色の光を非常に強く当てるとその吸収帯が紫色領域に移行し、蛍光を発しなくなる。さらに紫色の光を弱く当てると、瞬時に最初の状態にもどる。Dronpaをガラスにコーティングしたところ、レーザーを使って蛍光のON/OFFを切り換えることにより、情報の書き込み、読み出し、消去を何回も繰り返すことができた。これは、「書き換え可能な分子メモリーシステム」と呼ぶことができる。この技術を細胞生物学に応用して、MAP kinaseという細胞内情報伝達分子の細胞質-核間の往來を観察した。Dronpaを融合したMAP kinaseが核膜を通過する動きを、同一細胞で繰り返し観察したところ、細胞増殖因子刺激に伴い、MAP kinaseの核への流入および核からの流出両方ともが亢進することを証明することができた。

R.Ando, H.Mizuno, A.Miyawaki : Development of reversible protein highlighting techniques

1P346

海馬神経活動のリアルタイム分光光計測・2波長光計測

○富永 貴志、富永 洋子、市川 道教 (理研BSI・脳創成デバイス)

我々は神経回路機能の解明のため、海馬を中心とする脳スライス標本に膜電位感受性色素を適用し神経活動の光学的計測を行っている。この膜電位感受性色素は膜の脂質2重層に挿入され膜を横切る電位差を蛍光強度に変換するものである。従来、この光計測には530nmの励起光を用い、590nm以上の波長域での蛍光変化(約0.5%; 脱分極で蛍光減少、過分極で蛍光増大)を計測してきた。蛍光分子の分光特性はメーカーの計測などでも明らかであるが、それは特定の溶媒中での観測結果であり、細胞膜を構成する生体膜中では異なることが予想される。また、通常、膜は均一であると想定しているが、細胞各部位・細胞種(神経・グリア)での脂質構成の違いにより波長域ごとに異なる反応を示す可能性もある。そこで今回、神経活動に伴って起る蛍光変化をより詳細に知るために分光器と高速撮像装置を組み合わせ神経活動に伴う蛍光変化をリアルタイム高速分光計測した。その結果、電気刺激に対する反応では、これまでの予想と同じく530nm励起で590nm以上の比較的広い波長域でほぼ一様な蛍光変化が見られた。また、数十nmの範囲では励起光のバンド幅、中心波長の違いも神経活動に伴う蛍光変化に大きな差を起さなかった。一方、励起波長を480nmにすると550nm付近を境界として、それより長波長側では脱分極に対して蛍光の減少、それよりも短波長側では蛍光強度の増強が見られ、その変化比はほとんど一緒であることがわかった。そこで、480nmを励起光として530nmの蛍光変化と590nm以上の波長の蛍光変化とをそれぞれ高速カメラで検出して、その比をイメージングする装置を作成したので報告する。さらに同じ装置を用いて内因性シグナルについても分光測定と直交偏光測定を試みた。

T.Tominaga, Y.Tominaga, M.Ichikawa : High-speed real-time spectroscopic and ratiometric optical imaging of neuronal activities in hippocampal slices

1P348

mRNAの細胞内ラベリングと運動解析

○山岸 舞¹、貴家 康尋²、寺田 佳代子²、原田 慶恵²、船津 高志^{1,3} (¹ 東大・院薬、² 都臨床研、³ JST, CREST)

mRNAは核内でDNAから転写され、修飾を受けた後、核外輸送されてリボソームへと運ばれる。このプロセスを生きた細胞内で可視化できれば、細胞質内局在化の過程や細胞の運動とmRNAのダイナミクスとの関係などを知る一助となる。これまでに、生きた細胞内でのmRNAの動きを可視化する方法として、*in vitro*で蛍光ラベルしたmRNAを細胞内にインジェクションし、その蛍光輝点の動きを解析する実験が行われてきた。この方法は直接的ではあるが、例えば転写と並行して、もしくは連続しておこなうmRNAのプロセッシングの効果を見逃すことになる。一方、細胞内で転写されたmRNAを*in situ*で蛍光ラベルし解析する方法として、特定RNA配列を認識し結合するタンパク質を利用する方法がある。たとえば、ファージのコートタンパク質であるMS2、スプライシング因子のひとつであるU1Aタンパク質を利用して酵母のASH1 mRNAの局在を可視化した報告がある(Ref. 1, 2)。また、MS2を利用する方法は哺乳類細胞での実験に応用されている(Ref. 3)。そこで今回は、MS2を利用する方法にいくつかの改良を加えて、細胞骨格タンパク質である β -actinのmRNAの可視化に適用した。GFP融合MS2をコードするベクターと、MS2認識配列の下流に β -actin配列を組み込んだベクターを同時に細胞内に導入すると、転写された β -actin mRNAの上流にGFP融合MS2が結合し、その結果 β -actin mRNAがGFPラベルされる。このGFPの輝点をイメージングし、生きた細胞内での β -actin mRNAの運動解析を試みた。

Reference

- Bertrand, E. *et al.*, (1998) *Mol. Cell.*, **2**, 437-445.
- Irie, K. *et al.*, (2002) *EMBO J.*, **21**, 1158-1167
- Fusco, D. *et al.*, (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 161-167

M. Yamagishi, Y. Sasuga, K. Terada, Y. Harada and T. Funatsu : Labeling and imaging of mRNAs in living cells