

研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 細胞内情報伝達機構の1分子イメージング

2. 研究者名： 船津 高志

3. 研究のねらい：

生命現象は、多数の生体分子の相互作用によって引き起こされている。これらの分子間相互作用が、細胞内の"どこ"で、どのような"タイミング"で起こっているかを明らかにするためには、従来の細胞をすりつぶして解析する生化学的な手法や、固定した細胞を用いた生体分子の観察法では、多数の分子の平均を解析するため限界がある。本研究では、生細胞の内部で蛍光標識した1分子の生体分子をビデオレートで可視化する技術を開発し、この技術を用いて mRNA の核内運動を解析した。

4. 研究結果及び自己評価：

1) 生きた細胞内で1個の生体分子を可視化する顕微鏡の開発

1分子の蛍光色素を可視化する蛍光顕微鏡法として、全反射型エバネッセント蛍光顕微鏡が多用されている。この方式では、スライドガラスから150nmまでの領域を局所的に照射するため細胞膜付近の生体分子の観察に威力を発揮するが、細胞内部を観察することはできない。また、落射蛍光顕微鏡では、観察している面の上下の蛍光が背景光となるので、細胞のように厚みをもった試料の1分子観察には適していない。これらの問題を解決するために、生細胞の内部で1分子の蛍光色素を観察できる共焦点顕微鏡を開発した。ニポードディスク型共焦点ユニット(横河電機 CSU-10)を改造し、高感度カメラを用いてビデオレートよりも早く1秒間に500枚の画像を得ることを可能にした。同様の性能を有する蛍光顕微鏡は無く、本研究で開発した装置により、今まで不可能であった生体分子間相互作用がイメージングできるようになると期待される。2光子励起法などを用い、多重染色した複数の生体分子のイメージングが今後の課題である。

2) mRNA の核内運動の1分子蛍光イメージング

mRNA のプロセッシングと核外輸送機構は、真核生物の遺伝子発現にとって非常に重要であるが、いまだに不明な点が多い。生きた細胞内の mRNA を研究するための第一歩として、蛍光標識した1分子の mRNA の核内運動を共焦点顕微鏡で観察した。モデル mRNA として、ヒト グロビン遺伝子の部分配列からなる mRNA を in vitro で合成し、グアニン残基に蛍光色素 Cy3 を平均 5~10 個、共有結合させた。この mRNA を細胞の核にマイクロインジェクションして観察したところ、動いている mRNA と止まっている mRNA が、ほぼ同数見られた。止まっていた mRNA が動き出すまでの時間をヒストグラムにして解析した結果、平均 30 秒の指数関数分布になった。次に、運動している mRNA を解析したところ、これらはブラウン運動していた。拡散定数は $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、純水中の約 1/100 であった。以上の結果は、mRNA が核内構造物とダイナミックな結合・解離を繰り返しながらブラウン運動で核膜孔へ到達することを示している。生細胞の核内で mRNA の運動をイメージングした例は、本研究が初めてである。今後の課題は、mRNA の核膜孔通過のメカニズムと、細胞質内輸送のメカニズムの解明である。そのための要素技術を本研究で作り上げることができた。

5. 領域総括の見解：

蛍光色素をラベルした生体高分子1分子の挙動を蛍光顕微鏡下で識別する1分子生理学を核内で行われる伝令RNAに適用して、はじめて グロビン mRNA を観察した。これから、mRNA が核膜を通過して細胞質へ移動する様子が追究されることであろう。このように新しい技術を未知の現象解明に適用するプロジェクトもさきがけ研究のひとつのテーマとなることを本研究は示している。

6 . 主な論文等 :

- (1) Yamaguchi J., Nemoto, N., Sasaki, T., Tokumasu, A., Mimori-Kiyosue, Y., Yagi, T., and Funatsu, T. 2001. Rapid functional analysis of protein-protein interactions by fluorescent C-terminal labeling and single-molecule imaging. FEBS Lett. 502: 79-83.
- (2) Taguchi,H., Ueno,T., Tadakuma,H., Yoshida,M., and Funatsu, T. 2001. Single-Molecule Observation of Protein-Protein Interactions in the Chaperonin System. Nature Biotech. 19: 861-865.
- (3) Tadakuma H., Yamaguchi, J., Ishihama, Y., and Funatsu,T. 2001. Imaging of Single Fluorescent Molecules Using Video-rate Confocal Microscopy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 287: 323-327.
- (4) 多田隈尚史、船津高志 2001. 「生きた細胞の核内 mRNA の1分子蛍光イメージング」細胞工学 20: 672-677.

特許出願

名称 : 「局所的遺伝子発現調節法」
出願番号 : 特願平 11-322481
発明者 : 弓場俊輔、船津高志

招待講演

国際学会 5件、 国内学会 8件