

核内を動く粒子の同定

三松 沙織 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

生物個体の設計図は、DNA の塩基配列として、核内のゲノムに蓄積されている。核における、遺伝情報の発現制御の仕組みは、*in vitro* の実験で解明された。近年、生きた細胞の核において、タンパク、DNA、RNA の動態を、直接探る研究が行われ、核は動的な構造だとわかり始めた。

核内構造は、クロマチン領域とクロマチン間領域の 2 つに分けられる。クロマチン領域では、遺伝子の発現状態に応じ、DNA が規則的構造をとる。クロマチン間領域では、タンパク質や RNA が、離合集散を繰り返して、様々な核内構造体を形成し、遺伝子発現を調節する。クロマチン間領域の核内構造体は、時間とともに変化するので、生きた細胞での研究が必要である。

産業技術総合研究所の加藤薫先生の研究室では、新しいタイプの位相差顕微鏡 (アポダイズド位相差顕微鏡) を用いて、核内を活発に動き回る未同定の核内粒子を発見し、解析してきた。先行研究により、この核内構造体は、細胞周期に依存して、数、運動活性が変化することがわかっていたが、構成タンパク質は不明で、未同定のままであった。

私は、細胞核の動態に興味を持ち、中野先生の研究室から、産総研に出向いて、未同定の核内粒子の同定を目指した。間接蛍光抗体法で蛍光染色し、同定に成功したので、報告する。

材料および方法

1. 細胞の培養

材料に、HeLa 細胞を用いた。細胞は DMEM 溶液で培養し、2-3 日おきに継代し、維持した。観察の際は、カバーガラス上に細胞を播種し、一晚培養後に、固定染色した。

2. 固定染色

高解像度観察のために、電子顕微鏡観察に近い条件で、固定した。ブロッキング処理し、一次抗体、二次抗体で染色した。染色後、退色防止剤が入った封入剤を用いて封入した。

3. 観察

共焦点顕微鏡とアポダイズド位相差顕微鏡で、同一細胞を観察した。共焦点顕微鏡は FV1000 (オリンパス社) を用いた。200 nm のステップで、z 軸方向にピント位置をずらし、3~12 枚の画像を、z 軸スタックとして取得した。アポダイズド位相差顕微鏡では、50 nm のステップでピント位置をずらし、40~50 枚の画像を、z 軸スタックとした。これらのスタック画像 (蛍光とアポダイズド位相差) を比較し、核内粒子の分子を同定した。撮影した画像は、コンピューター上で画像処理 (デコンボリューション処理) を施し、解像度を上げてから解析した。

結果

共焦点顕微鏡、アポダイズド位相差顕微鏡ともに、画像は光学的切片になった。光学的切片の厚さは、共焦点で約 1 μm 、アポダイズド位相差で 0.6-0.8 μm だった。共焦点で記録した、z 軸方向の核の中央部付近の断層像と、同じ z 軸位置のアポダイズド

位相差画像を、目視で探した。その上で、蛍光抗体法で染色された部位と、アポダイズド位相差の白い粒子が一致するか調べ、白い粒子の構成分子の同定を進めた。その結果、アポダイズド位相差顕微鏡で白く見える粒子の、構成分子を同定した (未発表のため、結果は口頭発表で述べる。核内粒子の蛍光染色画像も、口頭発表にて示す。)

この分子は、細胞の分裂増殖に、重要な役割を果たすことが知られている。その分子が核内で運動することは、想定されていたが、動きを直接とらえた人は、誰もいなかった。この研究は、初めて、この分子が核内で動くことを証明したものである。

考察

この研究では、核内での粒子の運動を直接観察し、粒子の構成成分のタンパク質を同定した。今まで、核内の粒子の運動は拡散による運動とされてきた。この結果は、核内の分子を蛍光ラベルし、FCS 等により、全体の蛍光強度を計測することにより、算出されたものである。ところが、今回同定した粒子は、方向性をもって運動している様に見える。今後、この粒子の運動の仕組みについて解析を進めたい。

近年、光学顕微鏡による可視化技術は、長足の進歩を遂げ、低倍率の電子顕微鏡に近い 50 nm 以下の分解能が達成された (超解像)。このような新しい技術も学び、取り入れて、さらに解析を進めたいと考えている。

謝辞

顕微鏡観察は、産総研の加藤薫先生の研究室で行いました。指導してくださった、沼田治先生、中野賢太郎先生、加藤先生、研究室の方々にお礼申し上げます。

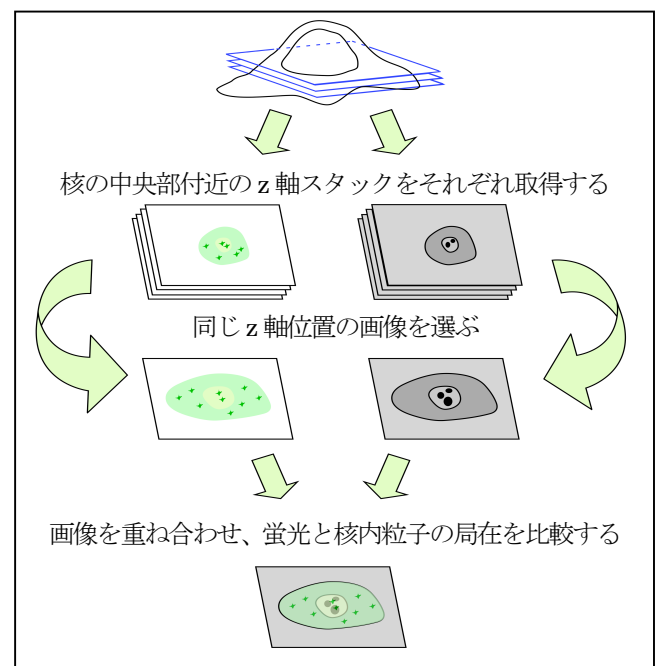


図: 共焦点像と位相差像の比較・同定の概要