

第12回細胞生物学ワークショップ

2008年11月9日(日)－11月14日(金)

北海道大学 電子科学研究所
北海道大学 大学院先端生命科学研究院
北海道大学 光イメージング研究連携推進プロジェクト

大阪大学 大学院生命機能研究科・
グローバル COE プログラム「高次生命機能システムのダイナミクス」

(独立行政法人) 情報通信研究機構
神戸研究所

協力

オリンパス株式会社
カールツァイス株式会社
ニコンインステック
浜松ホトニクス株式会社
横河電機株式会社
ライカマイクロシステムズ株式会社
株式会社オプトライン

スケジュール全般

11月9日 電子科学研究所

到着 午後2時から午後3時 電子科学研究所 1階会議室
〒001-0020 札幌市北区北 20 条西 10 丁目

午後 3 時 から講義（電子研1階会議室）

午後 6 時 から Scientific Party（Scientific Presentation）

11月10日 - 13日

講義 創成科学研究棟 5階 大会議室

実習

電子科学研究所

次世代ポストゲノム研究棟

午前 9 時 ホテル発（地図参照 西方向 徒歩 15 分）

午前 9 時半から午後12時 講義

（昼食、各自 弁当を購入、創成研究棟1F、またはポストゲノム棟 1F にて販売しています。）

食事場所は創成研究棟2F またはポストゲノム棟 4F で可能です。

午後実習

（夕方 軽食を用意、）

午後 7 時から午後 9 時～ データ解析、

11月14日 塩野義創薬基盤技術研究棟

午前 9 時半から データ発表

午後 12 時半から 15 時 軽食その他。解散、

講習スケジュール

11月9日 日曜日 3:00~6:00

3:00 オリエンテーション

3:00~3:40

講演1 原口徳子 (情報通信研究機構 未来 ICT 研究センター)
Live Cell Imaging を成功させるために

3:40 ~4:20

講演2 平岡泰 (大阪大学大学院生命機能研究科)
蛍光顕微鏡の基礎

4:30~5:10

講演3 近江谷克裕 (北海道大学大学院医学研究科)
発光イメージングの基礎と応用

6時から 受講生による発表(一人5分)

11月10日 月曜日 9:30~12:00

9:30~10:10

金城政孝 (北大 先端生命)
FCS 概論

10:10~10:40

永井健治 (北大 電子研)
FRET 概論

10:40~11:10

小寺一平 (北大 電子研)
FRET-「3フィルター法」

11:20~11:50

谷知巳 (北大 電子研)
幾何光学

11月11日 火曜日 9:30~12:00

9:30~10:30

永井健治：(北大 電子研)

FRET 指示薬

10:30~11:30

石井淳一 (オプトライン)

干渉フィルターの基礎から応用

11:30~12:00

岩井草介：(産総研)

PRIM による分子間相互作用の検出

11月12日 水曜日 9:30~12:00

9:30~10:10

三國新太郎(北大 医学部)

蛍光相互相関分光法の基礎と細胞測定

10:10~10:50

斎藤健太(北大 電子研)

FRET 測定 - 「トリビアル FRET とアクセプターブリーチング」

11:00~11:40

松田知巳(北大 電子研)

FDAP

11月13日 木曜日 9:30~12:00

9:30~10:10

木村宏 (阪大 生命機能)

「ビフォー&アフター フォトブリーチ」

10:10~10:50

和田郁夫 (福島医科大学)

ICSとFCS

11:00~11:30

榎木亮介 (北大 医学研究科)

多光子レーザー顕微鏡を用いた海馬シナプス可塑性の光学測定

11:30~12:00

加藤薫 (産総研)

蛍光を利用しない観察法

11月14日 金曜日 9:30~12:00

塩野義創薬基盤技術研究棟

(ポストゲノム棟 の北側に位置します。10 ページの地図を参照)

各グループによる発表 (20 分発表 10 分質疑)

	9:30~14:30	15:00~19:00				19:00~			
9日(日)	受付	講義(原口・平岡・近江谷)				Welcome reception (研究紹介)			
	9:30~12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	
10日(月)	講義 FCS概論(金城: FRET概論(永井:30) FRET測定1(小寺:30) 幾何光学(谷:30)	G1	FCS vitro (坂田:Confo2)	C-FCS (長谷川)	FCS cell (三國:Confo3)			データ解析	
		G2	FCS vitro (三國:Confo3)	FCS cell (北村:Confo2)	C-FCS (長谷川)				
		G3	FRET 1 (3フィルター法:小寺&植松)		蛍光顕微鏡組み立て (谷)				Chemi-Lumi反応 (近江谷)
		G4	蛍光顕微鏡組み立て (谷)		FRET 1 (3フィルター法:小寺&植松)				
11日(火)	講義 FRET指示薬(永井:60) 石井(オプトライン)(60) 岩井(産総研)(30)	G1	FRET 1 (3フィルター法:小寺&植松)		蛍光顕微鏡組み立て (谷)			Chemi-Lumi反応 (近江谷)	
		G2	蛍光顕微鏡組み立て (谷)		FRET 1 (3フィルター法:小寺&植松)				
		G3	FCS vitro (坂田:Confo2)	C-FCS (長谷川)	FCS cell (三國:Confo3)				
		G4	FCS vitro (三國:Confo3)	FCS cell (北村:Confo2)	C-FCS (長谷川)				
12日(水)	講義 FCCS(三國:30) FRET測定2(齊藤:30) FDAP(松田:30)	G1	FCCS vitro (佐々木:Confo2)	FCCS cell (孫:Confo3)	FCCS advance. (三國:Confo3)			2光子FRET (永井&友杉)	
		G2	FCCS vitro (武藤:Confo3)	FCCS cell (三國:Confo2)	FCCS advance (北村:Confo2)			2光子FRET (永井&友杉)	
		G3	FRET 2 (Trivial FRET:齊藤)	FRET 3 (高速&マルチカラー:堀川)	FDAP (松田)				
		G4	FDAP (松田)	FRET 2 (Trivial FRET:齊藤)	FRET 3 (高速&マルチカラー:堀川)				
13日(木)	講義 木村(京都:60) 和田(福島:60)	G1	FRET 2 (Trivial FRET:齊藤)	FRET 3 (高速&マルチカラー:堀川)	FDAP (松田)				
		G2	FDAP (松田)	FRET 2 (Trivial FRET:齊藤)	FRET 3 (高速&マルチカラー:堀川)				
		G3	FCCS vitro (佐々木:Confo2)	FCCS cell (孫:Confo3)	FCCS advance. (三國:Confo3)				
		G4	FCCS vitro (武藤:Confo3)	FCCS cell (三國:Confo2)	FCCS advance (北村:Confo2)				
14日(金)	発表	Farewell Party							

実習室の使用予定案内

1 講義 創成科学研究棟 5F 大会議室

2 電子科学研究所 2F

実習 FRET, FDAP, 蛍光顕微鏡組み立て、化学発光観察、2光子

1. FRET1

Nikon Ti + Cascadell + MetaMorph

2. FRET2

Nikon confocal A1

3. FRET3

Nikon TE2000 + Yokogawa CSU + Hamamatsu ImaGeM

4. FDAP

Olympus confocal FV1000

5. 顕微鏡組み立て実習

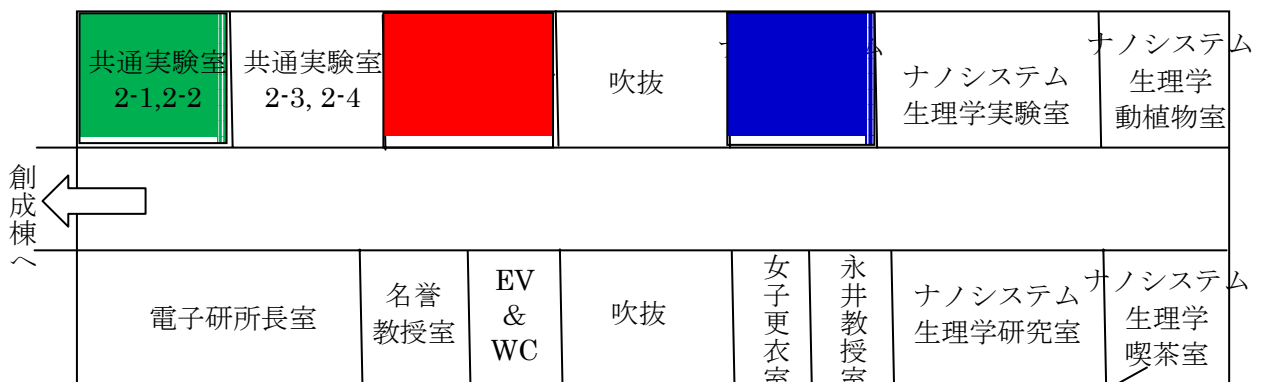
Siguma 光機など

6. 化学発光観察

Nikon TE2000 + Hamamatsu ImaGeM

7. 2光子

Olympus FV300 + MaiTai

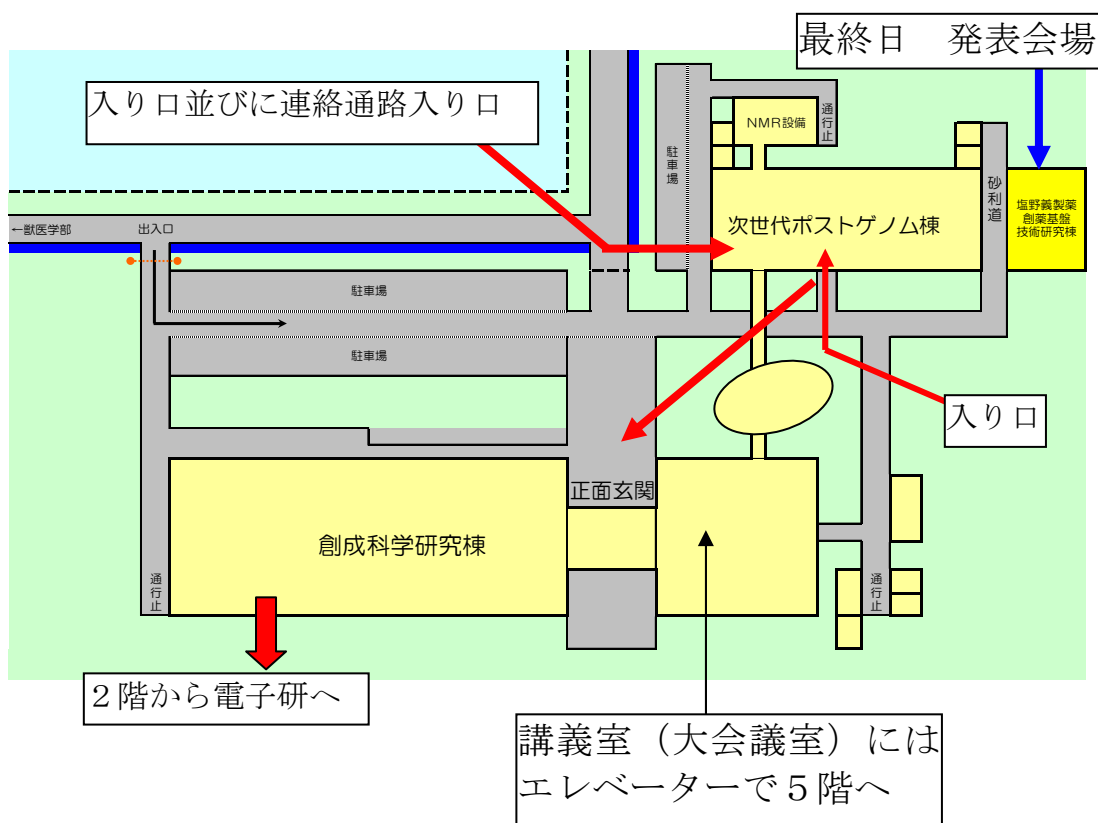


リフレッシュルームとしてお使い下さい

創成科学研究棟とポストゲノム棟ならびに電子研の行き来について

電子研へは創成棟の玄関から入館してください（厳守）

創成科学研究棟，並びに ポストゲノム棟は午後 5 時にオートロックになります。
創成科学研究棟とポストゲノム棟に入る時にはカードキーを利用してください。
各グループ 1 枚配布します。



FRET1

3 フィルタセット法を用いた FRET シグナルのセンシタイゼーション

[担当] 小寺一平、植松利亮

[内容]

一般的な蛍光顕微鏡で FRET を検出する場合、大きな問題点として蛍光と励起光のクロストークがある。適切なフィルタセットやストークスシフトの大きなアクセプタを用いても、クロストークを完全に排除することは困難である。そこで本実習では 3 フィルタセット法を用い、こうしたクロストークを排除した FRET シグナルの増強(FRET sensitized emission)を行う。FRET ペア間での蛍光クロストークと励起クロストークを予め測定し、測定した FRET シグナルからこれらの影響を補正して真の FRET シグナルを得る。3 フィルタセット法の原理を理解し、データ取得から計算までを行えるようになることが本実習のねらいである。

[材料]

GFP-RFP カルシウム指示薬を発現する HeLa 細胞

GFP のみを発現する HeLa 細胞

RFP のみを発現する HeLa 細胞

[機材]

ニコン ECLIPSE Ti 蛍光顕微鏡

日本ローパー CCD カメラ CascadeII

モレキュラーデバイス MetaMorph 画像解析ソフトウェア

Semrock 蛍光フィルタ

[実習の流れ]

実習の説明

機材の説明

細胞の準備

データ取得

画像解析

考察

[必読箇所]

「生細胞蛍光イメージング」第 13 章 (110-113)、第 14 章 (118-123 ページ)

[参考文献]

Biophys J, May 1998, p. 2702-2713, Vol. 74, No. 5

Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements Using Fluorescence Microscopy

Gerald W. Gordon, Gail Berry, Xiao Huan Liang, Beth Levine, and Brian Herman

蛍光顕微鏡を自分で組み立ててみよう

【担当】 谷知己

【内容】

光学顕微鏡は生命科学に欠くことの出来ない道具である。驚いたことに、最も単純な構成を持つシングルレンズ顕微鏡が発明された 16 世紀から、現在市販されている最新の光学顕微鏡に至るまで、その動作原理はほとんど変わっていない。そのため、基本的な動作原理を理解していれば、光学顕微鏡は様々な研究の用途に応じた改変が可能な道具である。この実習では、対物レンズとさまざまなレンズ、ミラーなどの必要最低限の構成で、光学基盤上に蛍光顕微鏡を自作する。普段実験室では中身を触れることが出来ない光学顕微鏡とほぼ同じ動作原理をもつ自作の顕微鏡をくみ上げ、像を結ぶためのさまざまな光学部品を自らの手でさわって、その調整をおこなうことによって、これまでに学んだ光学顕微鏡利用法を発展させ、研究者が自らの実験用途に応じた新しい光学顕微鏡システムを自ら開発するための知識を体験的に身につける。

【実験材料】

1. ハイトゲージ：本来は工作用の計測機器だが、今回は光路の高さを測るためにつかう
2. 光源：タングステンハロゲンランプ 超高压水銀灯
3. 光学レール：レンズやミラーなどを一列に並べるためのレール
4. 対物レンズ：生物顕微鏡用のものを使う
5. コンデンサーレンズ：生物顕微鏡用のものを使う
6. チューブレレンズ、投影レンズ：収差・倍率調整のために使用
7. フィルターホルダー
8. デジタル CCD カメラ：IEEE1394b ケーブルを介して画像を直接パソコンに取り込む
9. 3 軸ステージ：試料を 3 次元的に動かして、観察位置と焦点を合わせるために使う
10. 絞り、レンズ等の光学素子

【実習の流れ】

1. 光軸の設定
光学レールの端に光源を設置し、光源の手前に視野絞りを設置する。視野絞りの中心高さをハイトゲージで測り、光学レールのもう一方の端に見えるフィラメントの像の中心が視野絞りの中心高さと同じになるように、フィラメントの位置をあわせる。
2. コンデンサーと対物レンズの設置
光学レールの適当な位置に対物レンズとコンデンサーを設置する。ハイトゲージで対物レンズの中心高さをはかり、視野絞りの中心高さとも一致させる。コンデンサーも同様の方法で高さを合わせる。対物レンズの後ろから出てきた光の中心が光源の中心高さとも一致するように、コンデンサーの微調整つまみを調節する。
3. 結像レンズ（あるいは投影レンズ）の設置
対物レンズに対応した適当な焦点距離のチューブレレンズ（ニコン 200mm、オリンパス 180mm、ライカ 250mm）あるいは投影レンズ（有限遠補正レンズの場合）を、中心高さを合わせて適当な位置（投影レンズの場合は対物レンズ取り付け位置から 160mm 離れた場所）に設置する。
4. 透過照明光によるケーラー照明の調整
光源のレンズを調節する、あるいはコレクターレンズを光源とコンデンサーの間に入れて、コンデンサーの絞り上に光源のフィラメント像をつくる。さらに、コンデンサーレンズと対物レンズの距離を調節することによって、チューブレレンズの焦点位置（投影レンズから 125mm 離れた位置）に視野絞り像が見えるようにする。視野絞り像の中心高さが視野絞りの高さとも一致するように、コンデンサーレンズやコレクターレンズの高さを調節する。
5. 落射照明光によるケーラー照明の調整
落射照明光路に超高压水銀灯由来のファイバー光源を光学レール上に設置する。ファイバー端の高さを透過光学系と合わせたのち、落射光学系と透過光学系の交点の位置にダイクロイックミラー、励起フィルター、蛍光フィルターが入ったフィルターホルダーを設置する。ファイバー端とフィルターキューブの間に適当なレンズを入れる。フィルターホルダーと対物レンズを抜けてコンデンサーに入った落射照明光がコンデンサー絞りの位置でファイバー端の像を結ぶようにレンズの位置を調節する。
6. カメラの設置
視野絞り像の中心位置に CCD 素子がくるようにカメラを設置する。
7. 試料ステージの設置と観察試料の位置調節
光軸方向（Z 軸）、光軸に直交する X 軸、Y 軸方向に観察試料を動かすことが出来る 3 軸ステージを設置する。このステージを操作して、試料を透過光学系の焦点位置に移動する。
8. 観察と実験
試料を観察しながら、光路中にいろいろな遮蔽物、光学フィルターなどを入れて、観察される像の変化を確認する。

FRET2

FRET の評価法: アクセプターブリーチング法 (FRET の真偽判定、FRET 効率、偽 FRET)

[担当] 齊藤健太

[内容]

FRET の真偽を評価する方法として 1) アクセプターブリーチング法、2) 蛍光寿命測定法、3) ドナーブリーチング法の 3 つが知られている。本実習では、特別な機材を使用せずに比較的簡便に行える方法であるアクセプターブリーチング法を行う。

アクセプターブリーチング法は、アクセプターを褪色させたときにドナーの蛍光回復が起きるかどうかで FRET の真偽を評価する方法である。エネルギーを受け取る相手がなくなる事でドナーが再び発光するという原理を利用している。この方法は FRET の真偽判定の評価だけでなく FRET 効率算出にも利用できる。アクセプターをブリーチングする前後でのドナーの蛍光強度をそれぞれ F_{DA} 、 F_D とすると、FRET 効率 E_T は $E_T = 1 - (F_{DA} / F_D)$ で導出される。

アクセプターブリーチング法は有用な方法であるが、FRET と蛍光の再吸収機構を区別できないという欠点を持つ。再吸収機構は試料中のドナーから放射された蛍光が同試料中のアクセプターによって吸収されることである。アクセプターが蛍光分子の場合、アクセプターからの蛍光放射も起こる。このように再吸収機構では FRET と同様の現象、つまりドナー強度の減少およびアクセプター強度の増加、が観察される(偽 FRET)。

実習では、アクセプターブリーチング法を実際に体験してもらい FRET 効率の算出を行う。また、この方法では原理的に FRET と再吸収が区別できない事を実感してもらう。

[材料と機材]

機材はニコン 共焦点顕微鏡 A1 を用いる。

以下の 3 種類の発現する蛍光タンパク質の異なる HeLa 細胞を用いる。

- | | |
|--|---------------|
| (a) Cy11.5 タンパク質(CFP、Venus 融合タンパク質)を発現 | 「FRET 観察用」 |
| (b) ECFP と Venus を低濃度で共発現 | 「No FRET 観察用」 |
| (c) ECFP と Venus を高濃度で共発現 | 「偽 FRET 観察用」 |

ECFP が FRET のドナー、Venus が FRET のアクセプターとなる。

[実習手順]

- 1) 目視の蛍光観察にて適当な発現量の細胞を探す。
- 2) Ar+レーザー457 nm 励起で ECFP,Venus の蛍光像を取得する。
- 3) Ar+レーザー517 nm にてアクセプターをできるだけブリーチングする。
- 4) Ar+レーザー457 nm 励起で ECFP,Venus の蛍光像を取得する。

[必読箇所]

「生細胞蛍光イメージング」共立出版、講義編 第 13,14 章、実習編 6-2

FRET3

多色ライブイメージング:カルシウム波の発生・伝播の測定

[担当] 堀川一樹

[内容]

Ca²⁺イオンは最も重要なセカンドメッセンジャーの一つで、通常細胞内のCa²⁺濃度は数十nM程度に保たれているが、刺激応答時には最大数百μMまで上昇する。こうしたCa²⁺濃度の変化は細胞内に存在する様々なカルシウム結合蛋白質を介し下流の生理応答をトリガーする。本実習では原理が異なる二つのCa²⁺応答性蛍光プローブ、cameleonおよびPKC-Keimaを利用し、Ca²⁺濃度変化の時空間パターンの可視化を行う

CameleonはCa²⁺濃度の変化を検出するFRET型センサーである。その分子構造は、Ca²⁺結合蛋白質カルモジュリン(CaM)およびCa²⁺結合型カルモジュリン(Ca-CaM)の結合ペプチドであるM13を連結したペプチド鎖をCFPとYFPでサンドイッチした形をとる。CaM-M13の立体構造はカルシウムイオン濃度に応じて大きく変化するが、これに伴いCFP-YFP間のFRET効率も変化するため、Ca²⁺濃度の変化をCFP/YFPの蛍光強度比として検出することができる。またPKCはCa²⁺の結合により、細胞質から細胞膜へその局在を変化させることから、やはりCa²⁺濃度変化の指標となる。

本実習では、3-CCDカメラによる一波長励起三波長同時計測システムを用い、CFP-YFP間のFRETおよびPKC-Keimaの膜移行を検出し、セカンドメッセンジャーの発生と伝播の時空間スケールの理解を目指す。

[材料と機材]

一波長励起三波長同時計測システム(下記を組み合わせたもの)

- ・顕微鏡 TE2000 (Nikon)
 - 対物レンズ: PlanApoVC 60x / NA 1.4
 - ダイクロイックミラー: 455 DRLP
- ・励起光源: 440 nm 半導体レーザー
- ・ニポウディスク式共焦点システム CSUX1 (横河電機)
- ・検出器 3-CCD カメラ Ashura (浜松フォトニクス)
- ・画像解析ソフト AQUACOSMOS (浜松フォトニクス)

サンプル: Cameleon YC3.60, PKC-Keima 発現 HeLa 細胞

[実習手順]

- 1) 440 nm 励起で、CFP(455-500 nm), YFP(500-565 nm)と Keima(565-780 nm)の蛍光を同時に観察する。
- 2) 最終濃度 50nM~1μM のヒスタミンで HeLa 細胞を刺激し、細胞内 Ca²⁺波の発生・伝播および PKC の膜移行を高速撮影する。

FDAP による細胞内のタンパク質動態解析

[担当] 松田知己

[内容]

蛍光タンパク質はタンパク質局在化のマーカーや遺伝子発現レポーターとして用いられる単色の蛍光プローブから発展を遂げ、光刺激により蛍光特性を変化させることのできるプローブが開発されるまでに至った。このような、光刺激により蛍光を発しない状態から蛍光を発する状態へ変化する Photoactivatable な蛍光タンパク質や蛍光波長の変化を起こす Photoconvertible な蛍光タンパク質に局所的・パルスの刺激を与えて蛍光特性を変化させ、イメージングによりそのパターンが緩和していく過程を追跡することによって生細胞内の蛋白質動態を観測することができる。

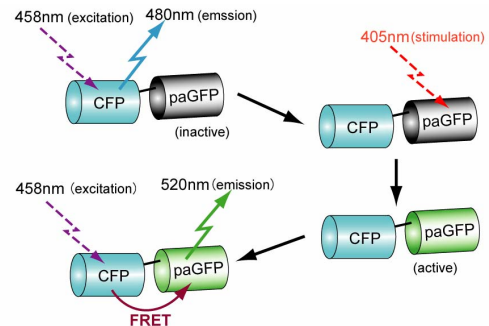
この実習では、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内での Photoactivatable な蛍光タンパク質プローブの動態の観察を行い、さらに activation を行った領域の蛍光強度の減衰の解析から比較的速く拡散する分子 ($>10 \mu\text{m}^2/\text{sec}$) の拡散定数の定量にチャレンジする。

[材料]

FRET を利用した Photoconvertible な蛍光タンパク質 Phamret を安定発現する HeLa 細胞

[機材]

オリンパス共焦点顕微鏡 FV1000



[実習の流れ]

- 405nm の刺激光で細胞内に発現する Phamret の Photoactivation (Photoconversion) を行い、Time-lapse **Phamret の色変換メカニズム** イメージングにより activate (convert) された Phamret の動態を観察する。
 励起光: 458nm、観察 Ch1: 465-510nm Ch2: 510-600nm or
 励起光: 488nm、観察 Ch2: 510-600nm
- 細胞内に発現する Phamret の 405nm の刺激光による activation と line scanning によるイメージ取得を行い、activation 領域での蛍光減衰カーブをプロットする。
 以下、励起光: 488nm、観察 Ch2: 510-600nm
 Activation: point activation; time 0.25msec、line scanning (round-trip)
- 固定した細胞を用いたレーザープロファイルを測定する (activation constant を求める)。
 相対蛍光強度として、パルスの activation を与えた場合の蛍光強度と細胞内の Phamret を十分に activate させた時の強度の比をとる。
- 1.で測定した蛍光減衰カーブに対して 2.で求めた activation constant を含むモデル式のフィッティングを行い、拡散定数を求める。

[参考資料]

生細胞蛍光イメージング 第 19 章、実習 5
 Matsuda T, Miyawaki A & Nagai T., *Nature Methods*, 5(4), 339-345, 2008

Equations

[Gaussian laser profile]

$$Cr(t) = 1 - \exp\left(-K\left(\exp\left(-\frac{2r^2}{w^2}\right)\right)\right)$$

Cr: 相対蛍光強度、 K : activation constant、 w : 中心から $1/e^2$ の蛍光強度になる場所までの距離

[FDAP decay curves]

相対蛍光強度

$$I_{rel_image}(t) = \frac{I_{ROI}(t)}{I_{MAX}}$$

$I_{ROI}(t)$: 時間 t 経過後に観測された蛍光強度、 I_{MAX} : photo-activation後の最大蛍光強度

自由拡散の場合のフィッティング関数 (FRAPに用いているものを改変したもの)

$$I_{rel_image}(t) = \alpha \cdot I_{rel_calc}(t) = \alpha \left(1 - \left((1 - \beta) \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{(-K)^n}{n!} \left(1 + n \left(1 + \frac{2t}{\tau_D} \right) \right)^{-1} + \beta \frac{1 - e^{-K}}{K} \right) \right)$$

α : フィッティングの関数 I_{rel_calc} と 実測値 I_{rel_image} の $t=0$ での値をあわせる変数

β : immobile fraction の割合(0 から 1 まで)

τ_D : 拡散時間 ($\tau_D = w^2/4D$, D : 拡散定数)

FCS1-1

FCS in vitro : 溶液中での拡散速度計測

- 目的:
- FCS の概念, 装置操作, 用語を理解する。
 - Rhodamine 6 G (Rho6G) と EGFP の比較、及び粘性の違いによる EGFP の拡散運動依存性を測定し、ストークス - アインシュタイン関係を理解する。
 - GFP の濃度変化を FCS で解析する。
 - 相関関数の変化とその物理的意味合い (分子数、拡散速度、拡散時間等)を理解する。

- 材料:
- Rho6G 溶液 (10^{-7} M)
 - GFP サンプル溶液
 - スクロース溶液 (10, 20, 30, 40, 50% w/v)

機材: Carl Zeiss ConfoCor 2 または ConfoCor 3

実習内容:

- (1) Rho6G を用いた基本測定
 - 観察ボリュームを最適化する。
 - Structure parameter を決定する。
- (2) 粘性の異なる溶液中における EGFP の FCS 測定 (相関関数の左右のシフト)
 - スクロース溶液(10, 20, 30, 40, 50% w/v)中の EGFP の測定
 - 溶媒粘性(スクロース濃度) 対 拡散定数 の比較をする。
 - ストークス - アインシュタイン関係式と Rho6G の測定結果を用いて GFP のサイズを評価する。
- (3) 溶液中における濃度の異なる EGFP の FCS 測定 (相関関数の強度変化)
 - 分子数を算出する。
 - 既知のサンプル濃度と FCS から算出された濃度を比較する。
 - 分子量を計算する。

[必読箇所]

「生細胞蛍光イメージング」第 12 章 (101-109), 第 20 章 (188-197 ページ), 実習 7 (278-282)

FCS1-2

FCS in vivo : 細胞内での拡散速度計測

- 目的 :
- ・細胞内 FCS 測定における注意点を学ぶ。
 - ・分子量の違いによる細胞内での動き (拡散速度) の違いを実感する。
 - ・細胞内の平均粘性を求める。

- 材料 :
- ・標準色素溶液として Rho6G 溶液 (10^{-7} M)
 - ・単量体 GFP (GFP₁)~タンデム五量体 GFP (GFP₅)をそれぞれ発現した HeLa 細胞
 - ・観察用培地として Opti-MEM (Phenol red free)

- 機材 : Carl Zeiss ConfoCor 2 または ConfoCor 3

実習内容 :

- ・大きさ (分子量) の異なる GFP を発現した細胞内における拡散速度計測
 - ① 水銀ランプによる落射照明で FCS 測定に適した細胞を探す。
 - ② LSM で GFP 発現細胞の共焦点蛍光画像を取得する。
 - ③ 得られた画像から細胞質、核質を判別して FCS 測定する。
※GFP₁ ~GFP₅ 発現細胞それぞれに対し、以上の測定を行う。
- ・細胞質、核質における GFP₁ ~GFP₅ 分子量と拡散定数を比較する。
- ・GFP₁ の溶液中 (FCS 実習 1-1) と細胞内における拡散定数の比から細胞内の粘性を推定する。

[必読箇所]

「生細胞蛍光イメージング」実習 7-2 (282-285)

FCCS 1

FCCS in vitro: 溶液中での相互相関計測

- 目的：
- FCCS の原理とシステムの構成, FCS との違いを理解する。
 - 両末端標識 DNA が制限酵素により切断される過程を自己相関関数あるいは相互相関関数の変化として追跡する。
 - Relative cross amplitude (RCA) の概念について理解する。

- 材料：
- Rhodamine Green (RG) 標識オリゴヌクレオチド
 - Cy5 標識オリゴヌクレオチド
 - 両末端を RG、Cy5 のそれぞれで標識した二本鎖 DNA(500bp)
 - 制限酵素 Sau3AI

- 機材： Carl Zeiss ConfoCor2 または ConfoCor 3

実習内容：

- 2 色の蛍光ラベルで修飾した二本鎖 DNA の相互相関測定
 - ① RG 標識オリゴ+Cy5 標識オリゴの FCCS 測定 (ネガティブコントロール)
 - ② 片方の末端を RG、もう一方の末端を Cy5 で標識した二色蛍光の二本鎖 DNA (500bp~) 溶液の FCCS 測定
 - ③ 制限酵素 Sau3AI による DNA 切断の FCCS 測定
- 相互相関関数、自己相関関数から Relative cross amplitude (RCA) を算出する。
- 分子の大きさ (DNA 鎖長) と観察領域の大きさを比較する。
- 酵素による切断反応の時間経過を観察する。

[必読箇所]

「生細胞蛍光イメージング」第 21 章 (198-205), 実習 8-1 (286-288)

FCCS 2

FCCS in vivo:細胞内での相互相関計測

- 目的：
- ・ 2色の蛍光タンパク質を発現した細胞の FCCS 測定を通して、細胞内で測定する場合の注意点を学ぶ。特に FCS や他の蛍光イメージング法との違いを理解する。
 - ・ クロストークの概念について理解し、対処法を学ぶ。

- 材料：
- ・ 標準色素溶液として Rho6G 溶液 (10^{-6} M) と Alexa594 溶液 (10^{-9} M)
 - ・ 蛍光タンパク質を発現した HeLa 細胞
 - (1) EGFP のみ発現
 - (2) EGFP と mCherry の共発現 (Negative control)
 - (3) EGFP と mCherry の間に Caspase 3 によって切断される DEVD 配列を組み込んだタンデム融合タンパク質 (EGFP-DEVD-mCherry)
 - (4) EGFP と mCherry の間に DEVD 配列を含まないタンデム融合タンパク質 (mCherry-EGFP) (Positive control)
 - ・ アポトーシス誘導試薬として Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) と Cycloheximide (CHX)
 - ・ 観察用培地として Opti-MEM (Phenol red free)

機材： Carl Zeiss ConfoCor2 または ConfoCor 3

実習内容：

- ・ 細胞内 FCCS 測定は以下の順序で行う。
 - ① 水銀ランプによる落射照明で FCCS 測定に適した細胞を選ぶ。
(2色の蛍光タンパク質を発現した細胞ではEGFPよりmCherryの発現量が高い細胞を選ぶ)
 - ② LSMで共焦点画像を取得する。
 - ③ 得られた画像から任意の点を決定し、FCCS測定を行う。
- ・ 相互相関関数、自己相関関数から Relative cross amplitude (RCA)を算出する。
- ・ 材料(1)と(2)の細胞における RCA からクロストークについて考察する。
- ・ アポトーシス誘導前後での(2)～(4)の細胞における RCA を比較する。

[必読箇所]

「生細胞蛍光イメージング」第21章(198-205), 実習8-2(288-290)

FCCS3

FCCS in vivo advance : 細胞内での相互作用検出

目的 : 相互作用する 2 種類のタンパク質を共発現した細胞の FCCS を通して、細胞内相互作用検出の実際を学ぶ。

材料 :

- ・ 共発現細胞
 - (1) EGFP 及び mCherry ラベルされた p65 及び p50 (NF- κ B のサブユニット)
 - (2) EGFP 及び mCherry ラベルされた Calmodulin (CaM) 及びその結合ドメインの M13 fragment
- ・ イオノマイシン (Ca²⁺イオノフォア)
- ・ 観察用培地として Opti-MEM (Phenol red free)

機材 : Carl Zeiss ConfoCor2 または ConfoCor 3

実習内容 :

- ・ 細胞内 FCCS 測定手順は前項「FCCS 実習 2」を参照のこと。
- ・ 相互相関関数、自己相関関数から Relative cross amplitude (RCA)を算出する。
- ・ 材料(1)については発現量の異なる細胞について測定を行い、RCA をそれぞれ算出する。「発現量の多い細胞」と「発現量の低い細胞」での RCA と FCCS 実習 2 で測定した「Positive control (mCherry-EGFP)」の RCA を比較する。
- ・ 材料(2)についてはイオノマイシン添加前後での RCA を比較する。

[必読箇所]

「生細胞蛍光イメージング」第 21 章 (198-205), 実習 8-2 (288-290)

発光プローブを用いた一細胞内の遺伝子発現イメージング

[担当] 安東頼子、近江谷克裕

[内容]

ホタルルシフェラーゼ等の発光プローブは遺伝子発現解析、いわゆるレポーターアッセイに用いられている。最近、発光強度の強い甲虫ルシフェラーゼが開発、販売されている（東洋紡 ELuc）が、ルシフェラーゼに対象とする遺伝子のプロモータ配列を挿入すれば、一細胞内の遺伝子発現を長時間にわたりイメージングすることができる。発光イメージング装置は単純であり、明るいレンズで光を冷却 CCD カメラなどに集光すればよく、大事なことは如何に迷光を無くするかである。本実習では装置、発光細胞を含めてすべて用意してあり、ごく短い時間で発光イメージングの概略を知っていただき体験していただくことが本実習のねらいである。

[材料]

時計遺伝子プロモータレポーター発光細胞など

[機材]

浜松ホトニクス冷却 CCD カメラ Image M C9100-13
ニコン電動倒立顕微鏡 N2000-1

[実習の流れ]

実習の説明
機材の説明
データ取得
画像解析
考察

[必読箇所]

「蛍光・発光試薬の選び方と使い方(羊土社、東京)2007」第2部第4章

[参考文献]

Hoshino H, Nakajima Y, **Ohmiya Y**: Single-cell imaging with fluorescent protein excited by luciferin-luciferase reaction. *Nature Methods* 8:637-9, 2007