

主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	新野 祐介
主 論 文 題 目： Development of Multicolor Imaging Techniques Using Fluorescent Proteins (蛍光タンパク質を利用したマルチカラーイメージング技術の開発)				
(内容の要旨) 細胞の機能は、さまざまな生体分子によるシグナル伝達のネットワークによってもたらされている。生細胞内でシグナル伝達を調べる手段として、蛍光イメージングは広く用いられている。とりわけ、2つの蛍光タンパク質間で生じる蛍光のエネルギー移動 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)を利用したバイオセンサーは有用で、さまざまな細胞内シグナル伝達の可視化に応用されている。蛍光の異なる複数のセンサーを1つの細胞内で同時に使用すれば、細胞内シグナル間の関係を調べることができる。しかし1つのFRETセンサーは、蛍光タンパク質2つ分の広い波長域にわたる蛍光を持っているため、一方のセンサーの蛍光検出時に他方の蛍光が混ざってしまう“蛍光の漏れこみ Spectral bleedthrough”が生じ、複数のセンサーの同時利用は従来難しかった。本論文では、この問題を解決することを目指し、複数のバイオセンサーを組合わせて使用するマルチカラーイメージング技術の開発を行った。 第1章は緒言で、生物学研究に利用されている現行の蛍光イメージング手法についてまとめ、マルチカラーイメージングの進展のために解決すべき制約を明確にした。 第2章では、2つのFRETセンサーを単一の細胞で使用する方法として、波長切替のない1励起型 Dual FRET イメージング法の確立について述べた。最近報告された Dual FRET イメージング法では、交互に波長を切替えて2つのセンサーの蛍光を取得するため、速い動きを伴うサンプルに対応できない。本研究では、緑色・赤色の蛍光タンパク質を用いて環状グアノシン1リン酸 Cyclic guanosine monophosphate (cGMP)およびCa ²⁺ のFRETセンサーを開発し、シアン・黄色蛍光タンパク質 Cyan/yellow fluorescent proteins (CFP/YFP)を用いたFRETセンサーと併用した。検出した蛍光に混ざっている4つの蛍光タンパク質からのシグナルは、シグナル分離プログラムを作成し選り分けた。環状アデノシン1リン酸 Cyclic adenosine monophosphate (cAMP)とcGMPの同時イメージング、速い動きを伴う伸縮をくりかえすラット心筋細胞におけるcAMP/Ca ²⁺ の同時イメージングに成功した。 第3章では、既存のセンサーと蛍光が混ざらない青色蛍光cGMPセンサーの開発を行った。高い吸光特性を持つが蛍光を発さない Dark fluorescent protein を用いるアプローチを応用し、青色蛍光の変化のみでcGMP濃度変化の検出を可能にした。このセンサーはCFP/YFPのFRETセンサーと蛍光が混ざらないことを確認し、3つのセンサーの組合せによって、単一の細胞内でのcAMP/cGMP/Ca ²⁺ の同時イメージングが可能であることを示した。 第4章では本研究を総括し、細胞内cAMP/cGMP/Ca ²⁺ の相互作用と、今後のマルチカラーイメージング技術の進展について議論した。				
以上				