



A technique for monitoring multiple signals with a combination of prism-based total internal reflection fluorescence microscopy and epifluorescence microscopy

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-09-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安達, 英輔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003425

論文審査の結果の要旨

全反射照明蛍光顕微鏡は開口放出のメカニズムなど細胞膜直下の生体分子の動態の解析に有用である。一方、従来の対物レンズ型全反射照明顕微鏡は細胞膜より離れた細胞質内の計測や多数の細胞を同時に観察することには適していなかった。

申請者らは、プリズム式全反射照明蛍光顕微鏡と落射型蛍光顕微鏡を組み合わせることにより、同一細胞群を対象に細胞内 cAMP 濃度、 Ca^{2+} 濃度、DAG 産生など多種のシグナルの経時的変化を同時計測するシステムを本研究で構築した。細胞内 cAMP 濃度及び Ca^{2+} 濃度は、両端に yellow fluorescent protein (YFP) と cyan fluorescent protein (CFP) を結合させた cAMP 結合タンパク (epac1-camps)、及び Fura-2 をそれぞれのプローブとして用い、DAG の産生は C1 ドメインに red fluorescent protein (RFP) を結合させた protein kinase C γ (C1₂-mRFP) の細胞質から細胞膜への移動を指標に解析した。3つのプローブを導入した Cos7 細胞を ATP (50 μM) により刺激すると cAMP/ Ca^{2+} /DAG 細胞内濃度が同時に変化する様子が観察された。さらに INS-1 細胞内でインスリン分泌におけるセカンドメッセンジャーの相互作用を観察することに成功した。

申請者らは本研究において、プリズム式全反射照明蛍光顕微鏡と落射型蛍光顕微鏡を組み合わせることにより、細胞質内と細胞膜表面の動態を観察し、多種のシグナル変化を同時計測可能なシステムを構築することに成功した。また linear unmixing を用いて、蛍光スペクトルの広がりによる計測ウィンドウ内の蛍光のオーバーラップの問題を検討し、Fura-2 の蛍光がわずかに過小評価されるが、本システムにより得られる結果は適切であることを確認した。本研究は、リガンド刺激下のシグナル伝達の序列決定に有用であり、新たなドラッグスクリーニング技術としても高く評価される。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	渡邊 裕司
副査	福田 敦夫	副査 山本 清二