

電子顕微鏡法のための 細胞内分子標識法の開発

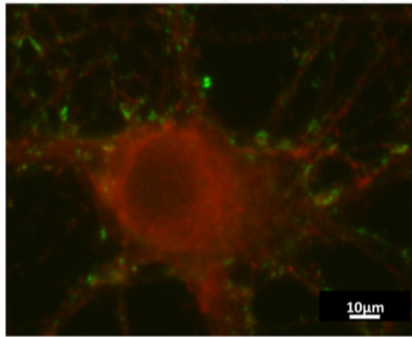
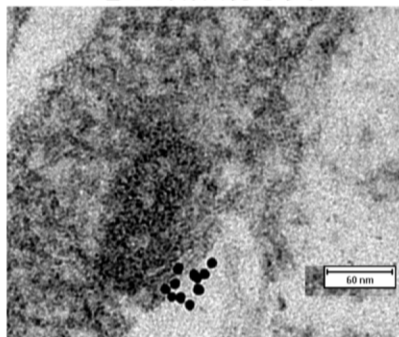
～はじめに～

・電子顕微鏡の分解能は約0.1nm(光学顕微鏡の約1000倍)で、光学顕微鏡では観察できない超微細構造が観察可能である。細胞内の分子を同定するには、主に抗体を用いた免疫染色法が用いられてきた。

免疫染色した神経細胞の写真

電子顕微鏡写真

光学(蛍光)顕微鏡写真



電子顕微鏡写真の黒い粒は分子を標識するために用いられた金属粒子である。光学顕微鏡(蛍光顕微鏡)では分子を標識するために蛍光標識等が用いられる。

免疫染色には非特異的な結合の可能性があることや、細胞内の組織を破壊してしまう問題点がある。しかし光学顕微鏡においては、蛍光タンパク質(GFPなど)を用いた1分子標識法が確立され、これらの問題を克服している。

～目的～

電子顕微鏡において、光学顕微鏡におけるGFPのような細胞内分子標識法を開発する。

～方法～

電子顕微鏡の電子を検知する性質
と
重金属の電子を透過させにくい性質
を組み合わせ

→金属結合タンパク質を標識として用いる

(左図)
金属結合タンパク質
メタロチオネイン(MT)
Fischer E H, Davie E W
PNAS 1998;95:3333-3334
メタロチオネインはCu²⁺,
Zn²⁺などの金属と結合できる

～メタロチオネインを用いた標識法～

手順

①cDNA コンストラクトを作製



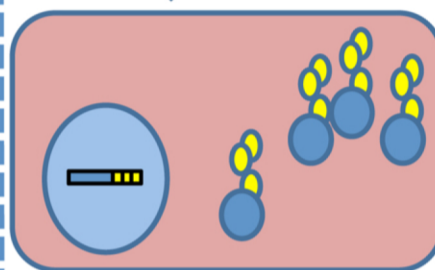
目的タンパク質

MT

MT

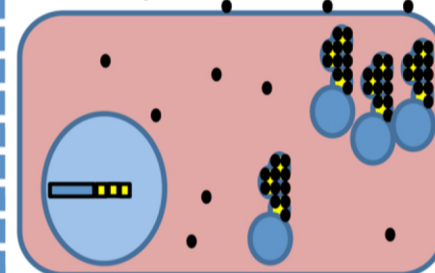
MT

②細胞へcDNAを導入



③メタロチオネイン(黄)と結合した目的タンパク質(青)が細胞内で発現する。

④培地に金属を添加

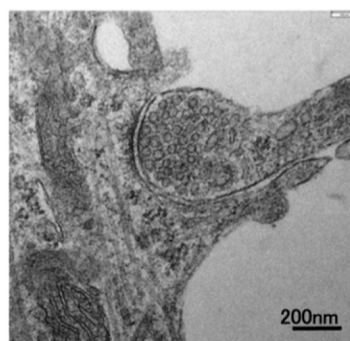


⑤細胞内に入った金属はメタロチオネインと結合し、目的タンパク質の近くで集積する。

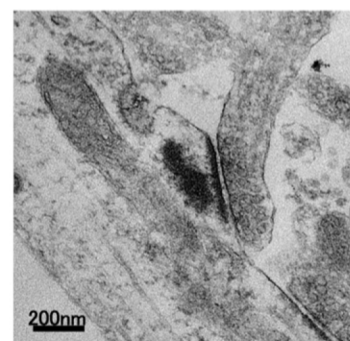
これを電子顕微鏡で観察すると

MT標識をしない神経細胞

MT標識をした神経細胞



目的のタンパク質がどこにあるか分からない。



電子顕微鏡像は金属が集積した部分が黒くなる。
→目的タンパク質の局在が分かる

この標識法は電子顕微鏡による高分解能な細胞内分子観察を可能にする。様々な分子にこの標識法を適応し、光学顕微鏡では分からなかった、タンパク質の局在や機能を明らかにしていく。