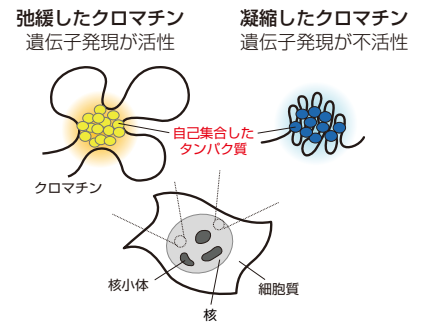


超解像顕微鏡とクラスター解析機能を用いた、RNAポリメラーゼIの局在解析

近年、タンパク質や核酸が自己集合を介して細胞内を区画化し、さまざまな生物学的機能を制御する「相分離」と呼ばれる現象が相次いで報告され、注目が集まっている。細胞核内におけるクロマチンの弛緩・凝縮などの構造変換や、遺伝子発現をはじめとする核機能の制御メカニズムも、相分離で説明され始めている。本アプリケーションノートは、公益財団法人がん研究会がん研究所 実験病理部の野澤竜介 生命科学博士と共同で行った実験例を紹介する。先生は、さまざまな核機能の土台となるクロマチンの構造と、それを制御する分子メカニズムの解析を通して、その”場”で起こっている生命現象の仕組みを解明したいと考え研究に取り組まれている。



実験の概要

細胞核内の核小体の主要な構成タンパク質の1つであるRNAポリメラーゼIは、リボソームDNAからリボソームRNAを転写する役割を担っている。

本実験では、このRNAポリメラーゼIの局在を、ニコン超解像顕微鏡N-STORMを使用して1分子レベルで観察した(図1と図2)。さらに、アクチノマイシンD処理でRNAポリメラーゼIの機能を阻害し、薬剤処理による分子の分布パターンの変化をクラスター解析を使用して解析した(図3)。

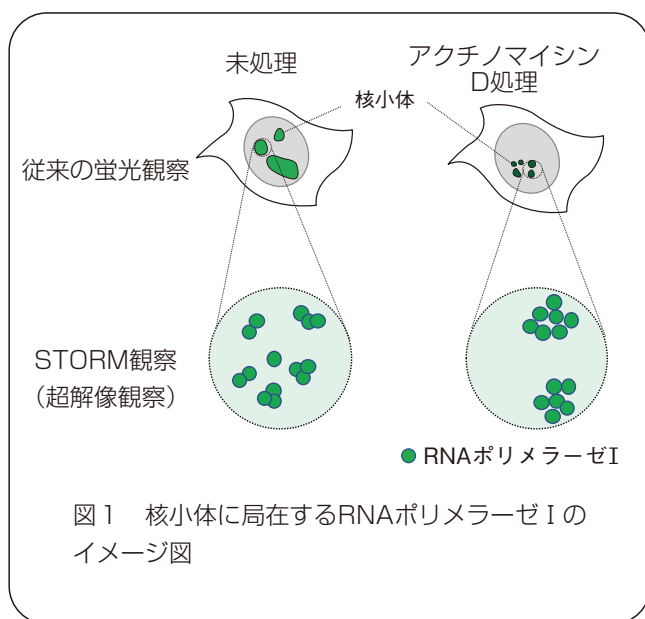
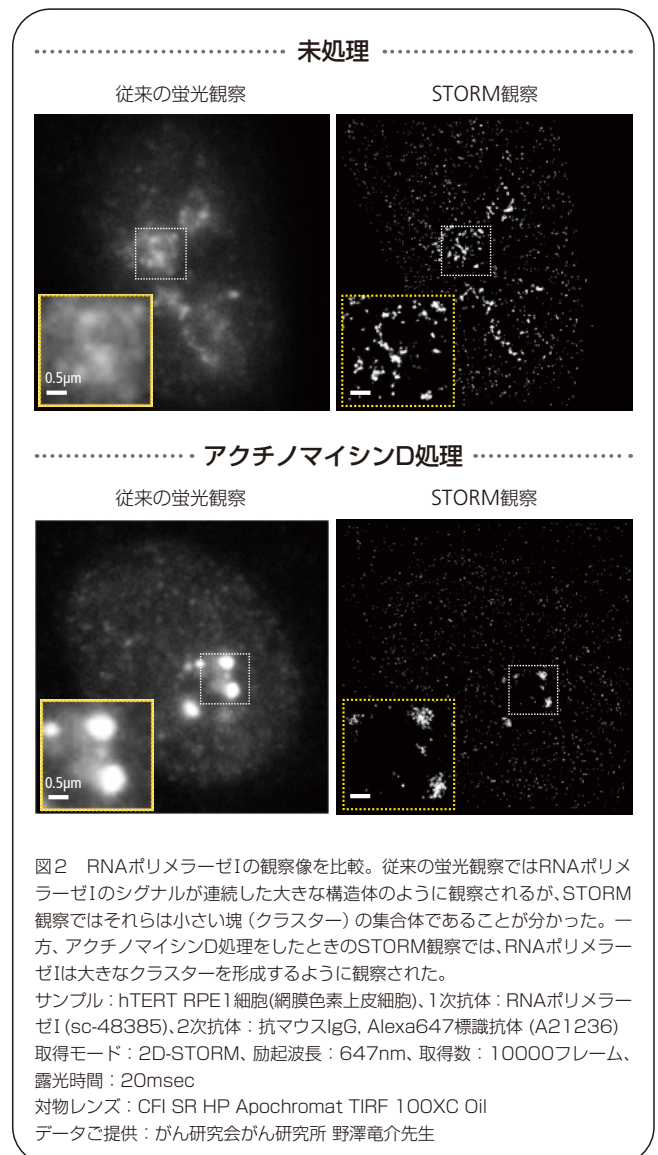
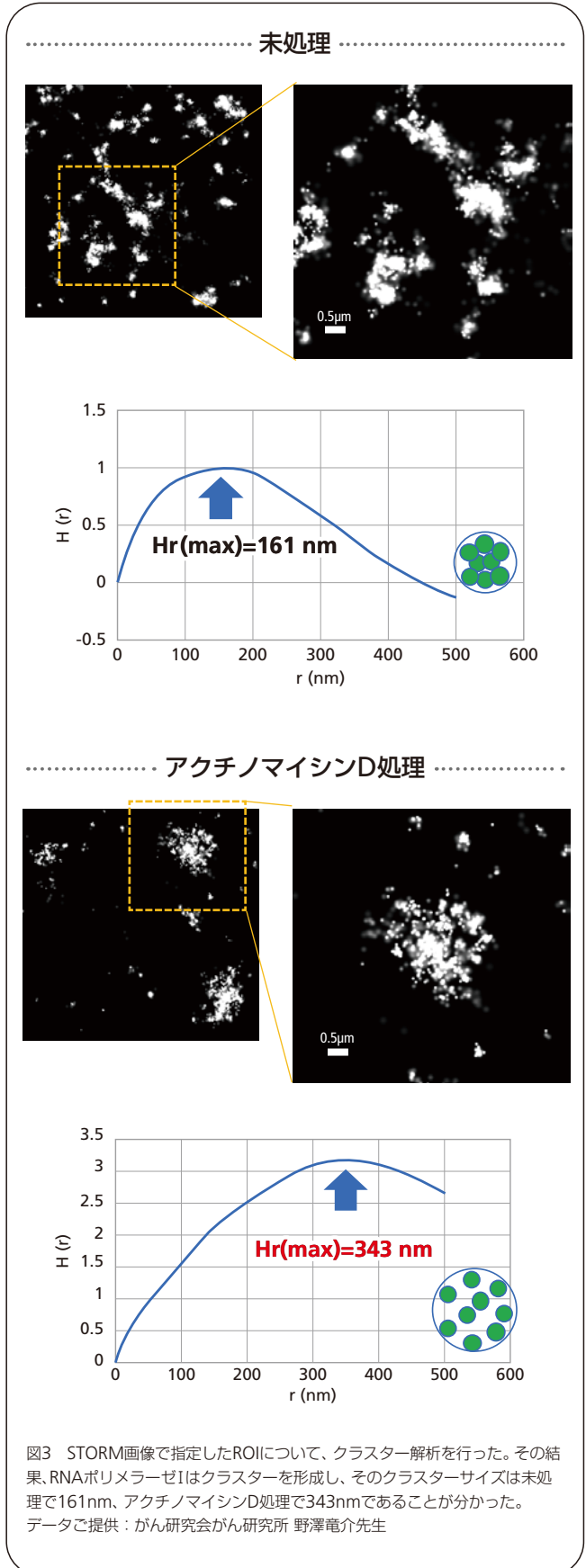


図1 核小体に局在するRNAポリメラーゼIのイメージ図



クラスター解析の結果、アクチノマイシンD処理でRNAポリメラーゼIの機能阻害を行った場合は、未処理の場合と比較してRNAポリメラーゼIの分子が大きなクラスターを形成することを確認した(図3)。

このように、N-STORMを使った1分子レベルでのイメージングとクラスター解析は、タンパク質の集合・分散の度合いを定量化できるため、「相分離」の新しい評価系としても有用であることが示唆された。



N-STORMのメリットと研究への貢献

- 従来の光学顕微鏡による巨視的な観察では得られなかった情報が、N-STORMによる微視的な観察によって得られた。
- クラスター解析と組み合わせることにより、一分子レベルでの目的タンパク質の集合度が定量的に解析できた。
- 目的タンパク質の1分子レベルでのクラスター解析が、「相分離」の新しい評価系として有用であることが示唆された。
- ターゲットの検出からSTORM撮影・解析までがフロー化されており、操作をスムーズに実行できた。

クラスター解析によるタンパク質や核酸の「相分離」の評価系に加え、DNA-FISH (DNA Fluorescence *In Situ* Hybridization) を用いたクロマチンの可視化と、その構造解析への応用が期待される。

またN-STORMでは多色イメージングも可能なため、幹細胞の分化に伴うクロマチン変化および、転写やDNA複製などの細胞イベントに関わる因子の相関解析などに展開できる可能性がある。

製品情報

超解像顕微鏡 N-STORM

ローカリゼーション法の一つであるSTORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) を採用し、従来の光学顕微鏡の約10倍の解像度を実現した。細胞内小器官の構造を1分子レベルで観察することが可能。
水平解像度：約20 nm
Z軸方向解像度：約50 nm



クラスター解析機能

超解像顕微鏡で取得した画像上において、目的の範囲をROIで指定することにより、輝点の分布パターンを自動的に解析することが可能。ナノスケールの精度での画像取得に、さらに定量的な評価も加わることで、画像から得られる情報の信頼性を大きく向上できる。

