1PA017

タッピングモードAFMによる1分子水中イメージング

古野泰二 (慶應義塾大学医学部)

AFM (原子間力顕微鏡) を使った生体分子1分子イメージングが高分解能で可能になれば、多くのご利益があるものと期待される。

水溶性タンパク質であるフェリチンおよびカタラーゼとλ-DNA の1分子タッピングモードイメージングを試みた。試料はマイカ表面に吸着、もしくは気液界面に展開した単分子膜に吸着する方法などで作成し、純水またはバッファ中で観察した。AFMティップにはスーパーティップを使用した。

大まかに見ると、フェリチンは直径 13nm の球、カタラーゼは平坦な面を下に吸着しているとする、面内が 9x10nm 厚さが 6nm の直方体、DNAは太さ 2nm の棒状である。現在までの結果を下の表にまとめた。得られたイメージは、ティップサイズだけでなく、走査中のティップが分子におよぼす横方向の力による変位や変形の影響を強く受けていた。ただし、球状のフェリチンと四角いカタラーゼの違いは確認できた。高さについては、およそ真の値の 5-8 割であった。

基板への固定の安定化と走査パラメータの検討により、今後イメージの改善が可能と考えている。

	真の分子の大きさ	像の大きさ (半値幅)	
		走査方向	走査と垂直方向
フェリチン	13x13	20-25	20-25
カタラーゼ	10x9	15-20	12-18
DNA	太さ 2nm	4-6	4-6

T.Furuno: Single molecule imaging by tapping mode AFM under aqueous conditions

1PA019

細胞内アクチン線維の一粒子追跡

○池博司¹、Gerard Marriott²、楠見明弘^{1,2}
(¹名大院理・生命理学、²科技団・ERATO)

我々は細胞膜上の膜タンパク質を金コロイド粒子を用いて標識し、膜タンパク質の運動、集合、局在化の制御機構を研究してきた。同様の手法が細胞質内のタンパク質にも応用できれば、細胞研究に重要な貢献をするものと考えられる。そこで、本研究においては、細胞内アクチン線維の運動を一粒子追跡法を用いて観察する方法を開発し、他の応用への第一歩とすることを目指した。まず、ストレプトアビジンを結合した直径40nmの蛍光ビーズ (yellow-green, Molecular Probes社) にファロイジン-ビオチン (終濃度 0.1mg/ml) 加えて、室温で30分間静置した。次に、終濃度 5mg/ml の卵白アルブミンと混合して30分間インキュベートした。この蛍光ビーズを洗浄後、細胞内に顕微注入して観察した。ファロイジン-ビオチンを結合させなかった対照群のビーズはほとんどが早いランダムな動きを示した。一方、ファロイジンを結合させたビーズでは、殆どの粒子が400nm程度の範囲の中で運動をするようになった。これらはアクチン線維に結合した結果であると考えられる。しかし、全体の数%の粒子は、500秒間の観察中に、急速な定方向運動をおこなった。しかも、線状の部位を何個もの粒子が両方向に動いていった。速度の平均は約2μm/sであった。このような動きは対照群のビーズでは見られなかった。これらは細胞内でより強く固定されたアクチン線維の上を別のアクチン線維 (に結合したビーズ) がミオシンモーターによって駆動されて動いているところを捕らえた可能性がある。以上の結果は細胞質内の一粒子追跡がアクチン骨格や膜骨格の研究に有用であることを示している。

H. Ike, G. Marriott, A. Kusumi: Single Particle Tracking of Actin Filaments in Living Cells

1PA018

PC12D細胞のNGF刺激によるアクチン重合の解析とNGF受容体 (TrkA) の分布の観察

○一ノ瀬純也^{*1}、井頭昌彦^{*2}、大木和夫^{*1}^{*1}:東北大学大学院理学研究科・物理^{*2}:東北大学文学部人文社会学科

神経成長因子 (NGF) による神経突起の走化性伸張誘導は、神経回路網構築の過程における標的組織への神経投射を説明するためのモデルとして広く研究されている。この現象において最も重要なのは、神経突起先端部の成長円錐が濃度勾配を感知し、より高い濃度へと突起を牽引していくことである。そこで我々はPC12細胞の垂株であるPC12D細胞を用い、高親和性NGF受容体膜タンパク TrkAと成長円錐の運動に不可欠なコンポーネントであるアクチンフィラメントのNGF刺激下での分布について研究を行った。

2ng/mlのNGFで分化させ突起を形成させた後に蛍光アクチンをインジェクションすると、突起先端部にのみアクチンの重合による束状の蛍光が観られた。その後NGF濃度を50ng/mlに上げて刺激すると数分以内に突起先端部のみでの束状蛍光の増大が観られた。この時点で固定しTrkAの蛍光免疫染色を行ったところ、突起先端部と細胞体部が染色された。特に突起先端部では、NGF濃度を上げたことによって新規に形成されたアクチンの束の存在領域にTrkAが集積するような分布は検出されなかった。

以上のことから、NGFの空間的濃度勾配を反映した成長円錐の運動は、受容体を直接高濃度の方面へ集積させることによるのではなく、NGFの結合により引き起こされる接着分子や細胞骨格系のダイナミクス等により間接的に実現されるらしいことが示唆された。また、NGFに応答してアクチン重合を引き起こすメカニズムは細胞の分化・突起形成に伴って突起先端部に局在化すること、そしてそれは受容体が突起先端部に局在化されたためではなく受容体とアクチンの間を仲介し重合させるメカニズムこそが局在化されたためであることが示唆された。

J. Ichinose, M. Igashira, K. Ohki :
Observation of actin polymerization & TrkA distribution
in PC12D cells stimulated by NGF

1PA020

F-アクチン/ABP-280ゲルの力学的性質

○伊藤忠直^{*}、T. P. Stossel[▽]、古池晶[△]、山崎昌一[△]
(^{*}京大院理^{*}、Harvard Medical School[▽]、静大理[△])

ABP-280は非筋細胞の細胞質に普遍的に存在するアクチンゲル化タンパク質で、IgGモチーフと類似の反平行β-シートの繰り返し構造からなる二量体分子である。ABP-280がつくるアクチンゲル (アクチン/ABPゲル) は細胞膜直下の細胞皮質を形成し、細胞の力学的な性質に重要な役割を果たしている。

左図のように、アクチン/ABPゲルはずり変形に対してユニークな応答を示す。即ち、10%以下のずり変形に対しては「弾性体」として、10%から100%の間では変形に応じてその堅さを変化する「粘弾性体」、100%以上ではずり力に応じてほぼ自由に変形する「粘性体」として振る舞う (実線)。しかも1000%以上のずり変形を起こさせた後、ずり力を解放すると数秒以内にもその状態に復帰する完全な可逆性を示した (矢印実線)。一方、F-アクチンが単に絡み合っただけのゲル化したF-アクチンゲル (点線) では、3%のずり変形でゲル構造は完全に壊れ、ずり力を取り去った後も構造を回復することはなかった (矢印点線)。アクチン/ABPゲルのこのようなユニークな応答は、細胞の力学的な性質を考えるうえで極めて興味深く、またそれらはABP-280分子の力学的な性質によるものと考えられる。

骨格筋の受動的な張力を担う巨大タンパク質のtitin/connectinはABP-280と類似の繰り返し構造を持つ。最近、一分子のtitin/connectinの両端をひっぱると繰り返し構造中のβ-シートがほどけ、ゆるめるとすぐに巻き戻ることが原子間力顕微鏡による一分子力学計測により示された。同様のことがABP-280分子でも生じ、それがアクチン/ABPゲルに上記のユニークな力学的性質を与えていると考えられ、現在、我々は一分子のABP-280が示す力学的な性質を同様の手法により研究している。

T. Ito, T. P. Stossel, S. Furukawa, M. Yamazaki: Mechanical Properties of F-actin/ABP-280 Gel