3F1130

細胞質－核間分子輸送の1分子イメージング

○徳永 万喜洋¹、今本 尚子² (¹ 遺伝研・生体高分子、² 遺伝研・遺伝子回路)

対物レンズ型全反射照明法による蛍光イメージングにより、細胞内の核膜を1分子感度で低背景に観察することができる。この方法により、核内に輸送される分子を蛍光標識し、細胞質－核間分子輸送に関係する分子のイメージングを行い、核膜を介した選択的輸送の分子メカニズム解明を目的として研究を進めている。

近年、異なる輸送担体が担う多くの輸送経路の存在が示され、核膜孔を通過するためのシグナルをもつ蛋白質がどのように認識されて核膜孔にターゲットするのが明らかにされてきた。しかし、蛋白質が核膜孔を通過する具体的な分子機構の解析は進展していない。例えば、増殖細胞では1分間に100万個以上の分子が核膜孔を通して核－細胞質間を往来していると推測されているが、複数の輸送経路に乗ったこのように大量の分子が核膜孔を滞りなく流通する機構や制御の仕組みについては明らかにされていない。

細胞膜をジギトニン処理して細胞質と外液を交換可能にしたセミインタクト細胞に、核移行シグナル(NLS)と蛍光色素とで標識した分子を導入し、対物レンズ型全反射照明法により観察した。細胞質－核間輸送が起こる条件では、標識分子が核膜を通過する瞬間はとらえられなかったが、これは通過がイメージングの時間分解能よりも速いためと考えられる。輸送が起こらない条件では、標識分子が核膜孔に点々と結合した像を観察することができた。核膜孔と輸送される分子との結合定数はこれまで求められていないが、数ナノモルの標識分子を加えても点像が観察されることから、結合定数はナノモル程度のオーダーとかなり強いことが推測される。核膜孔の使い分け等、核－細胞質間輸送の分子機構に関し、どのような手がかりが得られるか議論したい。

M. Tokunaga and N. Imamoto : Single molecule imaging of nucleocytoplasmic transport of proteins.

3F1315

蛍光1分子分光イメージングの新しい手法

○鈴木 良和、上村 慎治、須藤 和夫(東大総合文化)

蛍光色素1分子をリアルタイムでイメージングする技術の発展に伴い、タンパク質一つ一つが行う酵素反応を直接観察できる様になってきた。この方法により従来の多分子系による測定では平均化されて観測できなかったような現象が見えてくる可能性がある。特にタンパク質の化学反応に伴う構造変化の研究においては、個々のタンパク質分子の化学反応と構造変化を同時に観測することで、1回の反応が終わるまでに通過する一連の中間状態の構造を化学状態に対応づけて検出できる可能性がある。

蛍光色素を用いてタンパク質の構造変化を検出するのに有効な手段の一つとして蛍光エネルギー移動法(FRET法)があげられるが、この方法ではドナーとアクセプターという2種類の異なる蛍光スペクトルを持つ蛍光色素を同時に観測することが必要である。従って、本研究では蛍光色素一分子からの蛍光スペクトルを実時間で観測する方法を新たに開発し応用した。この方法では、対物レンズの下に特殊なプリズムを置くことで蛍光色素一分子からの蛍光を分光し、そのままカメラの受光面に蛍光スペクトルの像として投影する。プリズム型全反射照明顕微鏡にこの方法を応用することで、ローダミンレッド(ドナー)とCy5(アクセプター)で2重標識したミオシンのモータードメインを観測したところ、ミオシン1分子内で起こるFRETを蛍光スペクトルの像として検出することができた。この方法を用いれば調べる蛍光スペクトルの領域を広くでき3つ以上の蛍光色素からの蛍光を同時に観測することも容易であるため、ドナーとアクセプター以外の蛍光色素で標識したリガンド(ミオシンの場合はATP)を用いれば、化学反応と構造変化を1分子レベルで実時間で追跡できると考えている。

Y.Suzuki, S.Kamimura and K.Sutoh : Development of new technique for single-molecule spectral imaging

3F1145

ハイブリッドAFMによる生きた細胞の細胞骨格分布と弾性率分布の観測

○佐戸 康洋¹、芳賀 永¹、松岡 一郎²、川端 和重¹ (¹ 北大・院理・物理、² 北大・院薬・生体分子薬学)

動物細胞における形態変化や運動は、細胞膜や細胞骨格タンパクなどの細胞内のミクロな生体高分子が、マクロなスケールで互いに協調し起こる現象である。我々は、細胞体の一つのマクロな力学系として捉え、局所的な力学量(弾性率)の空間分布とその時間変化が、形態変化や運動にどのように関係しているのかを調べている。本研究では、生きた細胞における細胞骨格タンパクの空間分布と弾性率分布を同時に観測するために、倒立型蛍光顕微鏡に力学測定原子間力顕微鏡(AFM)を搭載したハイブリッドAFMを作成した。これにより、生体蛍光タンパクを用いて生きた状態のままで蛍光像と弾性像をリアルタイムで観測できる新たな方法を確立させた。細胞骨格の一つであるアクチンフィラメントを緑色蛍光タンパクによって標識し、その空間分布の時間変化を観察した。また、弾性率の空間分布を測定するために、AFMによるForce Mapping法を用いた弾性率分布測定を行った。その結果、蛍光像では、アクチンフィラメントが細胞全体にわたり筋状の構造を形成していることを確認した。また、弾性率分布像では、核付近が柔らかく、細胞表面に堅い筋状の構造を見出した。本講演では、ハイブリッドAFMで細胞骨格蛍光像、弾性率分布像の時間変化を同時観察した結果をあわせて報告する予定である。

Y.Sado, H.Haga, I.Matsuoka and K.Kawabata : Visualization of cytoskeleton network and elasticity distribution of living cells using hybrid-AFM

3F1330

1分子FRET法における色素のブリンキング効果の除去

○横田 浩章¹、石井 由晴¹、柳田 敏雄^{1,2} (¹ 科技振・1分子過程プロジェクト、² 阪大・医・第一生理)

我々は、蛍光単分子直視技術をもとに、1分子蛍光エネルギー移動(FRET)法を用いて、1分子のタンパク質の構造ゆらぎをイメージングを試みてきた。この方法を用いてFRET効率をモニターすれば、タンパク質の構造を反映すると考えられる標識されたドナー・アクセプター色素間の位置関係を知ることができる。今回は、1分子FRET法にとって特に問題となる色素のブリンキング(明滅)現象の効果を取り除く方法と、その影響を取り除いた上でタンパク質の構造変化を解析する手法の開発を目的とした。色素のブリンキング(明滅)現象とは、連続的に励起をしているにもかかわらず、色素が蛍光を発する状態と発しない状態を行き来する現象のことである。

サンプルとしては、ドナーとしてGln41にテトラメチルローダミンを、アクセプターとしてCys374にIC5を2重染色したアクチンを用いた。励起光に関しては、アクセプターの蛍光をモニターしながら、FRETを同時に観察するために、アクセプターを直接励起する633nmの光と、ドナーを励起する532nmの光を、電子シャッターを用いて交互にビデオフレームと同期させて入射させた。得られた1分子の蛍光像は、Dual view光学系を用いてドナー蛍光像・アクセプター蛍光像に分離され、アクチンフィラメント上のスポットとしてビデオレートICCDカメラで同時に実時間録画し、画像解析により蛍光強度の時間変化を測定した。

測定の結果、アクセプターのブリンキングの効果により、FRET効率が変化していると考えられるものがあつた。まず、その判別法について紹介する。また、アクセプターのブリンキングが起こっていないところについては、ドナー・アクセプター色素の偏光の効果を検討に入れた解析法も合わせて紹介する。

H. Yokota, Y. Ishii, T. Yanagida : Elimination of blinking effect in single molecule FRET measurement