S2D02

Analysis of protein structure and dynamics by multiparametersingle-molecule fluorescence spectroscopy

○ Seidel Claus (Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry)

The newly developed multiparameter fluorescence detection (MFD) is applied to perform single-molecule fluorescence-resonance-energy-transfer (FRET) studies on biological systems labeled with a fluorescent donor and acceptor dye. Work on double-labeled DNA molecules, HIV-1 Reverse Transcriptase:DNA/DNA complexes and SNARE proteins, will be presented. MFD is performed in a confocal epiilluminated microscope and it allows the simultaneous registration of all fluorescence information (intensity, lifetime, anisotropy and spectral range) on a signal burst, where each burst reflects a single molecule or particle freely diffusing in the focus. Thus, it is possible to circumvent the classical pitfalls of the FRET method in ensemble measurements (incomplete labelling, uncertainty about assumptions concerning dye anisotropy and quantum yield) and to quantitatively measure the distance distributions. Applying efficient methods for data analysis, this information can be used in high-quality analytics and for FRET studies to resolve structural subpopulations with subnanometer resolution. Furthermore, direct access to the time trajectories of the different fluorescence parameters is obtained revealing the dynamics of the system. Finally, the construction of more-dimensional frequency histograms of the fluorescence parameters found in the trajectories on the single molecule level and selective analysis of these species gives detailed view on the molecular energy landscape and the associated molecular structures.

Seidel, C. A. M : Analysis of protein structure and dynamics by multiparametersingle-molecule fluorescence spectroscopy

S2D04

Single-molecule imaging for the study of biological membranes

○ Thomas Schmidt (Department of Biophysics, Leiden University)

The organization and the mobility of proteins in the plasma membrane is believed to play a key role in cellular signal transduction and regulation of a cell. We have developed wide-field single-molecule imaging for the investigation of fluorescent probes localized at the plasma membrane of cells in vivo. Various membrane-targeted proteins and signal-peptides were fused to the yellow-fluorescent protein (YFP). These fusion proteins were individually visualized when expressed in a human cell line. A detailed analysis of the fluorescence properties, the fluorescence anisotropy and the lateral position allowed us to determine their local organization into larger aggregates, and their rotational and lateral mobility in the membrane of live cells. The presentation will focus on our findings on YFP, when fused to a lipid-anchoring signal (CAAX domain). Study of the lateral diffusion showed indication of a local confinement on a length scale of 200 and 800 nm, respectively. The implication of this finding will be further discussed.

T. Schmidt : Single-molecule imaging for the study of biological membranes

S2D03

蛍光相関分光法を用いた生細胞における単一分子解析

○ 金城 政孝 (北大・電子研・超分子)

AcHTMLAeAcBODYAeAcPAe 蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy) は、非常に微少な領域 (サブフェムトリットル) を観察視野として、そこを出入りする分子の動きを蛍光強度の「ゆらぎ」から検出する方法である。そこから得られる物理量は分子の大きさや形、そして分子数 (濃度) という基礎的な量である。FCS 測定の特徴は光を利用した無侵襲、少量の試料 (マイクロリットル、もしくは、1 細胞)、希薄な濃度 (nM) で分子の動態を短時間 (数十秒) で測定が可能な事である。また、FCS は検出部に高性能な対物レンズを用いているために空間分解能にも優れ、細胞内の局所部位を区別して測定する事も可能である。Ac/PAeAcPAeAc/PAeAcPAe 我々は、細胞内に蛍光色素を導入する方法として種々の大きさの蛍光性ビーズや色素をエンドソーム経由や細胞膜経由で取り込ませたり、または直接マイクロインジェクションにより細胞へ導入する方法を採したり、近年急速に進歩してきた GFP もしくは GFP 融合蛋白質を細胞質内に発現させることで、細胞内の微環境の解析を試みてきた。これまでに細胞質内においては、蛋白質の拡散速度は水溶液中にくらべ約 10 倍程度遅くなることや、エンドソーム内に取り込まれたビーズや色素の拡散速度は水中での速さの約半分なるものの、ほぼ細胞外と同じ環境であること。また、細胞内情報伝達分子である PKC-GFP が細胞膜と相互作用を行う過程を細胞内で直接観察できることを明らかにしてきた。Ac/PAeAcPAeAc/PAeAcPAe このように、FCS は溶液の中の単一分子検出法として非常にユニークな特徴をもっている。現在我々はさらに進んで、生きた組織を対象とした観察が可能な正立型 FCS の装置を試作している。その結果もあわせて報告する予定である。Ac/PAeAc/BODYAeAc/HTMLAe

M. Kinjo : Single molecules detection in living cell using fluorescence correlation spectroscopy.

S2D05

走化性情報伝達反応の細胞内 1 分子可視化解析

○ 上田 昌宏 (科技振・さがけ)

近年の 1 分子計測技術の進展によって、生きた細胞の中で、シグナル分子 1 つ 1 つの振る舞いを検出することが可能になってきた。細胞内の反応がしばしば少数の分子によって担われていることや、細胞内の構造、微小環境が不均一であることを考えると、細胞内 1 分子計測は情報伝達の分子機構を解明する上で有用な研究手段になるであろう。本講演では、情報伝達研究への応用例として、走化性情報伝達反応の 1 分子可視化解析について報告する。

走化性の情報伝達システムが持つ機能の一つは、誘引物質の濃度勾配を検出することである。その仕組みを調べるためのモデル生物として、細胞性粘菌 Dictyostelium がよく用いられている。走化性誘引物質は cAMP であり、そのセンサーは三量体 G 蛋白質共役型受容体である。我々はこれまで cAMP と受容体の結合・解離過程を 1 分子イメージングし、細胞内での受容体 1 つ 1 つの振る舞いを解析してきた。cAMP の結合数の時間変化と空間分布の変化、および cAMP の結合時間を計測することによって、受容体の活性が細胞内の場所によって異なり、細胞全体としては極性が形成されるように調節されていることが明らかになってきた。また、三量体 G 蛋白質を欠損する突然変異体やリン酸化部位を欠く受容体を発現した細胞を用いた同様の解析から、こうした受容体の活性の違いが、受容体のリン酸化には依存せず、G 蛋白質との相互作用の違いを反映していることが示唆された。個々の受容体の特性が細胞内で相互に適切に設定されることによって、誘引物質の濃度差を増幅して受容する可能性について議論する。

M. Ueda : Single molecule analysis of chemotactic signaling in Dictyostelium cells