2N1700

細胞質-核間輸送の蛍光 1 分子イメージングによる細胞内分子間相互作用の定量

○徳永 万喜洋^{1,2,3}、今本 尚子^{1,4} (¹ 遺伝研、² 総研大、³ 理研・免疫センター、⁴ 理研・細胞核機能)

細胞内部の蛍光 1 分子イメージングを行う方法として、薄層斜光照明法を開発した。原理的に簡単な方法であり、照明用レーザー光の対物レンズへの入射位置を調整し、カバーガラスに平行に近い浅い角度で試料を照明する。照明は、厚さ 3 ~ 5 μ m 前後の薄い光の層で行う。背景光を下げるができるので、高感度に蛍光試料観察をすることが可能となり、細胞内部でも明瞭な蛍光 1 分子イメージングを行うことができた。ガラス表面上の GFP 像と比べても、ほぼ遜色のない 1 分子像が得られている。

薄層斜光照明法を用いて、細胞質-核間で輸送される分子を GFP で蛍光標識し細胞内で観察したところ、分子 1 個の蛍光像が核膜上で観察された。蛍光像が光っている時間から、核膜孔上での通過時間が、約 3 秒であることがわかった。

蛍光ラベルした分子濃度を増やすと、核膜孔の点像からなる蛍光像が得られた。1 分子と核膜孔 1 個との蛍光強度の比から、1 つの核膜孔に結合している分子数を定量した。濃度を変えて定量的画像解析を行うことにより、核膜孔との結合分子数・結合定数といった、分子機構上重要な量を定量的に求めることができた。その結果、核膜孔には弱い結合部位と強い結合部位があることが見つかった。弱い結合部位は最大約 100 個の分子を結合させて分子を集める役割を果たし、約 8 個の分子を結合できる強い部位もしくはその近傍で、G タンパク質との反応がおこって核内に荷物を降ろすのであろうと考えている。

このように、1 分子イメージング法は、従来求められなかった細胞内での諸量を定量的に求め、分子機構を解明する新しい手法として有用である。

M. Tokunaga and N. Imamoto : Single molecule imaging of nucleocytoplasmic transport and quantification of intermolecular interactions in the cell

2O1330

F₁-ATPase の回転におけるサブステップと蛍光性 ATP の同時観察

○西坂 崇之¹、大岩 和弘¹、木村 成輝¹、木下一彦²、吉田賢右³、宗行 英朗³、野地 博行⁴ (¹ 通信総合研究所・生体物性 G、² 岡崎・統合バイオ、³ 東工大・資源研、⁴ 東大・生産研)

F₁-ATPase は 1 分子でできた回転分子モーターである。回転軸である γ サブユニットは、3 つの β サブユニットに 120° 間隔で取り囲まれており、 γ の回転は β が ATP を加水分解することにより生じる。我々は、この回転のメカニズムを明らかにする目的で、1 分子の蛍光性 ATP の結合・解離と、F₁ のステップ状回転を顕微鏡下で同時に観察した。今回用いた蛍光性 ATP (2'-O-Cy3-EDA-ATP) と F₁ ミュータントの組み合わせでは、加水分解の途中に遅い反応があるために、ビデオレート (1 フレーム=33ms) においても 120° ステップの中のサブステップ (80° と 40°) が観察される。蛍光性 ATP と無標識の ATP を混在させ、F₁ の回転と蛍光性 ATP の結合を同時観察したところ、蛍光性 ATP の結合に対して同期した 120° のステップが見られた。興味深いことに、ATP が蛍光性 ATP に引き続いて結合した時に、80° のサブステップが観察された。蛍光性 ATP は、次の 40° のサブステップが完了しても結合したままで、さらにもう 1 個の ATP の結合によるステップと同期して解離した。F₁ における蛍光性 ATP の振る舞いが、結合と解離に関して無標識の ATP と同じだと仮定して、以下のメカニズムを提唱する：(i) 空のサイトに ATP が結合する → (ii) それにより γ が 80° 回転する → (iii) (回転方向から見て) 1 つ前のサイトにおいて、すでに結合していた ATP の加水分解、もしくは Pi の放出が起こる (ただし ADP の放出ではない) → (iv) それにより γ が 40° 回転する。(iv) を終えた時に F₁ は始めの状態にリセットされるので、2 つ前のサイトからの ADP の放出は、(ii) ~ (iv) のあいだのどこかで (あるいはどれかの反応と同時に) 起こる。

T. Nishizaka, K. Oiwa, S. Kimura, K. Kinoshita Jr., M. Yoshida, E. Muneyuki and H. Noji : Origin of substeps in 120°-stepping rotation of F₁-ATPase

2N1715

細胞質-核間輸送の新しい in vitro assay 系の開発

○小此木 孝仁¹、廣島 通夫²、椎名 伸之⁴、小瀬 真吾³、今本尚子³、徳永 万喜洋^{1,2,4} (¹ 総研大、² 理研・免疫センター、³ 理研・細胞核機能、⁴ 遺伝研)

近年、核膜孔複合体と輸送される分子との分子間相互作用がどのようにおこなわれているのか、といった点を中心に、細胞質-核間輸送の分子メカニズムの解明がひとつの大きな課題としてクローズアップされている。セミンタクト細胞を用いた assay 系による細胞質-核間輸送の研究は、輸送機構の解明や関わる生体分子の同定に大きく貢献してきた。従来の assay 系はセミンタクト細胞を用いているため、細胞質側に関しては内容物を洗い流し輸送因子や基質を加え輸送系を再構築することはできるが、核内の液交換や内容物の洗い流しは不可能であった。このことは核内の様々なタンパク質の影響が含まれた assay 系で観察していることであり、細胞質-核間輸送を調べるうえで問題がある。今回、細胞質-核間輸送の新しい in vitro assay 系として、顕微鏡用のカバーガラス上に載せたアガロース切片の表面上に xenopus の卵抽出物を用いて、核膜を人為的に再構築する方法を開発した。再構築系では細胞質側・核側ともに溶液を自由に交換できるため、よりさまざまな溶液条件下で計測することが可能である。また、この系では核内構成物質および細胞質成分のほとんどを除いているので、核膜孔を介した輸送現象に関し、より特異的な測定をすることができる。人工的に構築した核膜が輸送活性を保持しているか確認するために輸送担体である importin β の挙動の観察を行った。その結果、セミンタクト細胞で観察される挙動と同様の現象が観察され、この新しい測定系において輸送活性を保持した核膜が再構成されていることが確認された。さらに、高感度蛍光顕微鏡を用いた 1 分子レベルでの蛍光イメージングから、GFP 標識した importin β が結合した核膜孔複合体を観察することができた。

A. Okonogi, M. Hiroshima, N. Shiina, S. Kose, N. Imamoto, M. Tokunaga : A new in vitro assay system of nucleocytoplasmic transport

2O1345

F₁-ATPase は結合ヌクレオチドの γ リン酸解離とともに構造変化する

○政池 知子¹、宗行 英朗²、野地 博行³、木下一彦⁴、吉田賢右^{1,2} (¹ ERATO 吉田 ATP システム、² 東工大・資源研、³ 東大・生産研、⁴ 岡崎・統合バイオ)

[目的] F₁-ATPase は、ATP 加水分解に伴って中心軸の γ サブユニットが回転する分子モーターである。この回転を駆動すると考えられる β サブユニットの構造変化を検出することで回転トルク発生の機構を解明するのがこの研究の目的である。

[方法] 部位特異的突然変異を用い、触媒サブユニット β の Arg333 に Trp を導入した単離 β サブユニットと $\alpha_3\beta_3\gamma$ 部分複合体を作成した。まず、導入した Trp 由来の蛍光強度の変化を測定することで、 β R333 周辺の構造変化を検出することができた。つぎに、同条件で ATP 加水分解速度、リン酸解離速度、ヌクレオチド結合量を測定し、Trp 蛍光変化が起こる反応ステップをつきとめた。

[結果] 単離 β サブユニットについては、ATP, ADP 結合により蛍光強度が増加した。増加の割合は ATP の方が大きく、この変異 β サブユニットが結合ヌクレオチドの γ リン酸の有無を感知していることがわかった。 $\alpha_3\beta_3\gamma$ を用いた蛍光測定では、ATP 結合により蛍光が増加後、リン酸解離と同じ速度で減少した。

[結論] F₁-ATPase の触媒サブユニット β は ATP の γ リン酸を解離する瞬間に構造変化を起こすことがわかった。いままで予想されているヌクレオチドの結合と解離に伴う大きな構造変化以外にも、リン酸解離に伴った構造変化が γ サブユニットの回転を駆動している可能性も考えられる。

T. Masaike, E. Muneyuki, H. Noji, K. Kinoshita, Jr., and M. Yoshida : F₁-ATPase Changes its Conformations upon Phosphate Release