LS3A2

TIRF Analyses of Cell Spreading On Matrix-coated Surfaces Reveals STEPs (stochastic, timed extension periods)

Dubin-Thaler Benjamin, ○Sheetz Michael P. (Columbia Univ. Dept. of Bio. Sci.)

Using a high throughput, quantitative, total internal reflection fluorescence (TIRF) assay for cell spreading and motility, we have analyzed fibroblast spreading on extracellular matrix (ECM). Cells require matrix coating of the glass for spreading. For each cell image, an equation describing the cell perimeter is derived in polar coordinates (radius length and angle) with the original cell centroid as the origin. Spreading is described as the increase in radius length with time and involves a series of extension events that we call STEPs (stochastic, timed extension periods). Two distinct modes of spreading are observed; a high velocity, isotropic or a slower, non-isotropic extension of lamellipodia. Isotropic spreading is characterized by radial protrusions as fast as $12 \mu\text{m}/\text{min}$ and over half to the entire cell periphery while the cells spread to $1200\text{--}1800 \mu\text{m}^2$ in as little as 2-4 minutes. In contrast, non-isotropic spreading involves slower, narrower protrusions that have velocities below $6 \mu\text{m}/\text{min}$ and extents less than half the cell periphery; however, the final spread area is similar. We determined that new matrix contacts are required since addition of GRGDTP peptide blocked even partially spread isotropic cells from spreading further. Additionally, we find that STEPs occur during protrusions in both modes of spreading and STEPs have a half-life of 20-40 seconds before stopping and then extension has to be restarted. We are using this technology now to define the specific roles of known motility molecules in the spreading process.

B. Dubin-Thaler and M. P. Sheetz : TIRF Analyses of Cell Spreading On Matrix-coated Surfaces Reveals STEPs (stochastic, timed extension periods)

LS3I2

スピニングディスクを利用した非線形光学顕微鏡

○藤田 克昌 (大阪大学大学院工学研究科)

近年、超短パルスレーザーの普及により、高強度の光と物質とが相互作用した場合に生じる非線形光学効果を比較的簡単に得ることが可能となってきた。その中でも、2光子吸収、第2高調波発生、コヒーレントアンチストークスラマン散乱 (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering, CARS) は、生体の顕微観察に新たな展開をもたらすものとして注目されている。特に、2光子蛍光顕微鏡はすでに市販されており、それを利用した様々な応用研究も数多く報告されている。また、第2高調波、CARS顕微鏡は、光学顕微鏡の空間分解能を超えた領域の情報 (分子・タンパクの配向や状態) を可視化できるとして期待されている。一例として、図1に第2高調波顕微鏡により観察されたHeLa細胞 (RH237染色) の像を示す。図中の矢印は、細胞を照明したレーザー光の偏光方向を示している。用いた蛍光分子は細胞膜を形成する脂質分子の間で配向しており、図中では、その配向とレーザーの偏光方向とが一致した部位が強く検出されている。講演では、上記の3つの顕微鏡のための基本的な非線形光学の概念、それを利用した顕微鏡システム、及び生体観察への応用例を紹介する予定である。

図1 RH237で染色したHeLa細胞の第2高調波像

K. Fujita : Nonlinear optical microscopy using the spinning disc

LS3I1

横河の共焦点ユニットによるリアルタイム1分子イメージング

○多田 隼史 (早大・理工・物理)

in vitro で始まった1分子生理学は in vivo へと適用範囲を広げている。

このセッションでは、ニッポウディスク型共焦点ユニットによる1分子イメージング紹介する。

共焦点の最大の特徴は文字通りピンホールを使用することである。ピンホールを使用することで0.7mmの半値幅で光学切片を得ることが可能となっている。しかし、ピンホールを使用することによる弊害ももちろん出る。例えば、共焦点顕微鏡では、ピンホールをスキャンする事で画像を得るので、single ピンホールではスキャンする事による描画速度の遅さが問題となる。1枚の円盤に数万個のピンホールが開いているニッポウディスクを用いればこの問題は解決できる。しかし、その事で新たな問題が生じる。ピンホールは円盤の数%の面積しか占めないで、入射光のうち数%しか実際には励起光とならない。このため、通過できなかった入射光によるノイズが問題となる。横河の共焦点ユニットはニッポウディスクとマイクロレンズを採用する事で、これらの問題を解決している。描画速度は最速で1000frame/秒に達しており、励起光の透過も~50%へと向上している。我々は、このユニットを用いてリアルタイム (30frame/秒) の1分子蛍光イメージングに成功した。また、共焦点ユニットを高速カメラと併用する事で、生きている細胞核中の mRNA 拡散運動の1分子高速イメージング (250frame/秒) も行った。

本セッションでは、これらの結果を、他の照明方法 (対物エバネッセントや斜光照明) と比較しながら紹介する。

参考文献

- 1) 生物物理 42(3), 137-139 (2002)
- 2) BBRC 287, 323 - 327 (2001)

H. Tadakuma : Single molecule imaging by real time confocal microscopy

LS3J1

共焦点レーザー顕微鏡を基礎とした分子間相互作用の解析

○金城 政孝 (北大・電子研・超分子)

莫大なゲノム情報解析結果をもとに、細胞・器官・個体におけるタンパク質の動態・機能・相互作用の網羅的な解析を目指すプロテオミクスが大きな注目を浴びている。ここでは特に、生きた細胞の内での標的タンパク質の局在を高精度なレーザースキャン顕微鏡でとらえ、それと同時に分子間相互作用を解析する最近の2つの方法について紹介する。一つは、蛍光強度の揺らぎを利用する「蛍光相関分光法とレーザースキャン顕微鏡を利用した生体高分子解析」でありもう一つは蛍光スペクトルを利用する「蛍光スペクトル顕微鏡を用いた生体分子間相互作用の解析」である。まず蛍光相関分光法を用いた手法に付いて手短かに紹介したい。蛍光相関分光法 (FCS) は溶液の中の分子運動を妨げることなく、単一分子レベルの高感度に分子間相互作用を検出する方法である。我々はこれまで均一な溶液系 (in vitro) における反応から細胞 (in vivo) へと研究対象を発展させてきた。光測定と言う非侵襲性と測定領域がサブフェムトリットルのピンポイントである空間分解能の高さを利用し、生きたままの細胞内の核・細胞質・細胞膜・エンドソームという様々な局所での、蛋白質分子がどのくらいの速さで拡散しているのか明らかにしてきた。FCSの測定によると、例えば蛍光性タンパク質である GFP が細胞内や核内で拡散する速さは水の中の約3分の1程度と見積もられた。分子同士が結合や相互作用を起こすと、その拡散定数が変化する。例えば、膜結合性タンパク質の PKC は刺激を受ける前と後では細胞膜近傍において、拡散定数が低下する事が観察された。このようなダイナミックな過程はいくら高精度な画像であってもそれだけからでは得られない情報である。我々はこのような手法を通して生きた細胞内の生体分子間相互作用を明らかにしたいと考えている。

M. Kinjo : Analysis of biomolecular interaction in vivo using laser scanning microscopy combined method