B325

格子重合モデルによる細胞骨格フィラメント長の分布関数の時間発展

○古田 忠臣¹、蛭名 邦禎² (¹神戸大院・自然科学、²神戸大・発達科学)

我々は、拡散、(閾値のある)近距離相互作用、内部状態変化という物理的要素を含む細胞骨格フィラメントの重合の格子モデルを構築した(T. Furuta and K. Ebina, *AIP Conf. Proc.* **519**, 516–519 (2000), T. Furuta and K. Ebina, *Physica A* **314**, 163–170 (2002)). これまで、微小管で観測されている「動的不安定性」に似た現象を再現し、一本のフィラメントに関する臨界濃度を解析した。また、長時間でのフィラメント長さ変化の分布関数がガウス分布とは異なり時間幅に依存しないピークを持つという特徴が分かった。

そして、巨視的な物理量(濃度、フィラメント長の分布関数、平均長)と微視的な物理量(脱重合確率、一本のフィラメント長)の関係を明らかにする為、2次元格子重合モデルを用いて、脱重合確率、長さの閾値というパラメータを変化させ、様々な濃度において、非定常・定常状態における全空間での長さの分布関数を計算した。その結果、長さの閾値を越えたところに、分布のピークを見出した。これは、解離定数に依存した指数関数的な分布という単純な反応速度論では説明出来ない。

今回の発表では、エネルギー論を含め、微視的・巨視的ダイナミクスに関して議論し、また一本のフィラメントのダイナミクスに見られる邪魔ものの必要性という新奇な現象の生物学的意味について触れる予定である。

T. Furuta and K. Ebina : Time evolution of the distribution functions of length of cytoskeletal filaments in a lattice polymerization model

B327

PolScopeと蛍光の組み合わせによる、アクチンとアクチン関連タンパク質の同時観察

○古川 孔基¹、萩原 妙子²、山田 雅弘¹、加藤 薫² (¹都立科技大・工、²産総研・脳神経情報)

伸長している神経の先端に存在する成長円錐は、神経の伸長経路の探索やターゲットの認識に重要な役割を果たしている。この成長円錐の運動はアクチンによると考えられている。しかし、その運動のメカニズムは良く分かっていない。

そこで、加藤らは、生きたままの神経細胞でアクチンが直接観察できれば、運動機構の解明に資すると考えた。Oldenbourg が開発したPolScopeを生体試料に用い、アクチン束の光学的異方性(複屈折)に依るアクチン束の直接観察の系を立ち上げた。そして、生きた神経成長円錐や各種細胞のアクチン束の動きを直接観察し、そのパターンを報告してきた。

成長円錐も含め、胞内のアクチン束の運動制御には、アクチン関連タンパク質が関係している。アクチンの動きと同時に、アクチン関連タンパク質の分布が観察できれば、運動機構のさらなる解明につながると予想できる。そこで、本研究では、アクチン関連タンパク質を蛍光で、アクチンを偏光で同時に観察できる系を作成した。

偏光計測用のコンピューター、蛍光計測用のコンピューター、及び、電動式の光学顕微鏡を、制御用コンピューターで制御することで、偏光と蛍光を記録するシステムを制作した。時間分解能は約15秒おきに偏光と蛍光を繰り返し取ることができる。z軸方向の位置決め精度は50nmである。この発表では、いままでのデータのサマリーし、蛍光との組み合わせの装置を示し、それにより得られたデータの一部を紹介する。

K.Furukawa, T.Hagiwara, M.Yamada, K.Katoh : Combination of Polscope and fluorescence microscope reveal dynamics of actin and actin associate proteins

B326

成長円錐のアクチン、アクチン関連タンパク質等の同時観察

○萩原 妙子¹、吉田 史子¹、石川 良樹²、加藤 薫¹ (¹産総研・脳神経情報、²群馬大・医・薬理)

神経成長円錐は神経伸長の経路探索やターゲットの認識を担う。現在の仮説では、成長円錐の運動は、繊維状アクチン動態でできまるといふ。そこで、アクチンの動態の仕組みを知るために、偏光でアクチンを、GFPの蛍光でアクチン関連タンパク質等を、可視化する実験系を作り、両者の関係を探ってきた。この発表では、数種のアクチン関連タンパク質について報告する。

まず、GFPで、ニューロプラストーマのアクチン関連タンパク質(数種)を可視化した。「GFP-ファシン」は成長円錐のアクチン束と細胞膜に分布した。あるサブタイプの「GFP-トロポミオシン」は細胞体のストレスファイバーに分布し、成長円錐のアクチン束には一切分布しなかった(他は略)。以上は蛍光抗体などによる観察と一致した。

次に、アクチン関連タンパク質の動態を調べた。成長円錐のアクチン束の「ファシン」は、アクチン束と同様にretrograde flowを示した。一方、細胞体のストレスファイバーのトロポミオシンは、ストレスファイバーと同様にretrograde flowは示さなかった。この結果は、アクチン関連タンパク質の動きがアクチンへの結合と関連することを示唆する。

ファシンのリン酸化はアクチンへの結合を阻害することが知られているので、リン酸化部位のアミノ酸を置換し、疑似リン酸化したGFP-ファシンを発現させ、結合状態を変えてみた。疑似リン酸化したファシンは細胞質に分布し、成長円錐のアクチン束への集積せず、retrograde flowも示さなかった。一方、偏光で可視化した繊維状アクチンは、通常通りのretrograde flowを示した。以上の結果はファシンのリン酸化はアクチンへの結合を阻害し、成長円錐のファシンのretrograde flowを阻害することを示唆する。

T.Hagiwara, F.Yoshida, R.Ishikawa, K.Katoh : Simultaneous imaging of filamentous actin and actin associate proteins in neuronal growth cones

B328

大腸菌走化性レセプターの極へのターゲット機構の解析

○塩見 大輔、吉本 誠之、入枝 泰樹、本間 道夫、川岸 郁朗(名大院・理・生命理学)

タンパク質が細胞内に空間的・時間的に正しく配置されることは生物種を問わずシグナル伝達・細胞内現象に重要である。大腸菌走化性においても走化性レセプターとシグナル伝達タンパク質が複合体を形成し、菌体の極に局在しており、この極局在が走化性シグナルの増幅や適応に重要であると考えられている。我々はレセプターの極局在がレセプターへのリガンド結合やレセプターのメチル化修飾などに制御されていることを示した(昨年度年会)。しかし、レセプター・キナーゼ複合体が極にどのように局在するかについては全く解析されていない。本研究ではレセプターの極局在の過程を可視化することを目的とした。これまでに、赤痢菌のIcsAは極に直接ターゲットするが、枯草菌のSpoIVFBはまず細胞膜に挿入された後、極へ移動することが示されている。我々はアスパラギン酸レセプターTarを用いて、走化性レセプターの極局在がどのようなメカニズムで起こるかを解析した。Tarを可視化するためにC末端にGFPを融合したTar-GFPを作製した。Tar-GFPの発現を誘導してから、経時的にTar-GFPの細胞内局在を観察した。その結果、Tar-GFPはまず細胞膜に一樣に挿入されてから、シグナル伝達タンパク質とクラスターを形成し、極に移動するように見えた。また、Tarと浸透圧センサーEnvZ(細胞膜に一樣に局在)のキメラを用いた解析からTarどうしの細胞質側での相互作用が極局在に重要であることが分かった。さらに、大腸菌の桿状形態形成に必須のタンパク質RodA欠損株ではTarは膜に一樣に局在した。以上の結果、Tarの極局在にはTarどうしの相互作用と菌の形態(膜の曲率?)が重要であることが示唆された。さらに一細胞観察によるクラスターの動きや、レセプターの極局在と膜タンパク質の膜透過装置Sec複合体、大腸菌の細胞骨格タンパク質MreBとの関係についても報告する。

D.Shiomi, M.Yoshimoto, H.Irieda, M.Homma and I.Kawagishi : Mechanism of targeting of the bacterial chemoreceptor to a cell pole.