B537

細胞内 1 分子イメージングと定量解析による細胞質-核間輸送の分子機構

○徳永 万喜洋^{1,2,3}、今本 尚子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、薄層斜光照明法を用いて行い、細胞内部での分子数と分子間相互作用を定量的に解析した。細胞質-核間輸送に関し、輸送担体である Importin beta を GFP 標識し、セミインタクト細胞で 1 分子イメージングした。GFP-Importin beta の濃度を濃くすると、核膜孔 1 個 1 個が点像として観察された。画像解析により、2 点識別分解能が約 70nm 程度であることが結論され、個々の核膜孔を識別できることがわかった。

1 分子と核膜孔 1 個との蛍光強度比から、1 つの核膜孔に結合している分子数を定量した。濃度を変えることにより、核膜孔との結合分子数・結合定数を求めた。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、最大結合分子数 110 (+60,-40) 個、解離定数 70 (+50,-30) nM、強い結合部位は、最大結合分子数 7 (+6,-4) 個、解離定数 0.3 (+0.2,-0.1) nM であった。核膜孔複合体の構造には 8 回対称性があるので、強い結合部位の個数は、8 個 (もしくは 16 個) と推定される。強い結合には協同性が示唆され、結合に何らかの構造変化を伴うことが考えられる。

1 分子像の経時変化から、Importin beta と核膜孔複合体の結合時間 (滞在時間) を求めることができ、その平均時間は、弱い結合が約 1 秒、強い結合が 6 秒以上、輸送中が約 3 秒であった。輸送中に関しては、NLS-GFP を用いても同じ結果が得られた。

強い結合部位は、核膜孔複合体が通過できない条件では見られず、強い結合部位との相互作用は、核膜孔通過と密接な関係にあることがわかった。弱い結合部位はたくさんの分子を結合させて輸送される分子を集める役割を果たしていると考えられる。G タンパク質 Ran-GTP は、強い部位もしくはその近傍で相互作用し、核内に荷物を降ろすと考えられる。

M. Tokunaga and N. Imamoto : Molecular mechanism of nucleocytoplasmic transport elucidated by single molecule imaging

B539

細胞質-核間輸送の新しい *in vitro* assay 系による定量的解析

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

従来の assay 系はセミイ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。また、細胞質と核内にそれぞれ個々の輸送因子を加え細胞質-核間輸送を観察することが困難であった。このことは、核膜孔複合体と輸送される分子との分子間相互作用を中心に、細胞質-核間輸送の分子メカニズムの解明をするにあたって大きな課題であった。当研究室では、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、セミインタクト細胞と同様の輸送活性を保持した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。今回、この新しい系の特徴により、核膜両側での輸送因子 (importin、RanGTP など) の濃度を自由に变えて輸送活性を定量的に測定することがはじめて可能になった。

A.Okonogi, M.Hiroshima, N.Shina, S.Kose, N.Imamoto : Quantitative analysis by a novel *in vitro* assay system of nucleocytoplasmic transport

B538

タンデム型 GFP を用いた細胞核内微環境の解析

○白 燦基、斉藤 健太、田村 守、金城 政孝 (北大・電子研・超分子分光)

細胞の中に存在する核は細胞内外の刺激に応じて、発現すべき遺伝子をタイミングよく、且つ適切に発現するなど化学反応系の制御と、細胞分裂時においては遺伝子を 2 ヲ所に分け、そしてまた集めるなど時空間的な制御も行っている。 それに加えて、分子輸送の観点からみると様々な種類の分子が核-細胞質間を流通しており、その流通の制御も積極的に行われている。 細胞核というのはこのように非常にダイナミックな変化がある場所であるが、実際その内部で何が起きているかは実は良く分かっていない。 我々はこういった未知の細胞内環境を知るためには細胞内で自由拡散する分子の動き安さを解析することが有効であると考えた。 本研究では GFP (Green Fluorescent Protein) の単量体と重合させたタンデム型 2 量体 GFP を細胞内で発現させ、細胞内に分散したそれぞれの動きを主に CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) と FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) で測定した。 その結果、単量体 GFP はプラスミドのトランスフェクション後 24 時間以内に細胞質と核内で均等に分散したことに対し、2 量体は細胞質と核内での分布が大きく異なり、48 時間後でもその差は小さくなるものの区別できることが分かった。 また緩衝液中での単量体と 2 量体の拡散定数の差は思ったより大きかったことに対し、細胞内での差は意外と小さいことが示唆された。 今後 3 量体や 4 量体などさらに分子量の大きいタンデム型 GFP を用いて測定を行う予定である。 種々の大きさの異なる GFP 重合体の動きを解析することで細胞質や核内においてどのくらいの大きさの分子をトラップできるかなど、分子サイズ依存性を明らかにしたいと考えている。

C.Pack, K.Saito, M.Tamura and M.Kinjo : Analysis of microenvironment in cell nucleus with tandem type of green fluorescent protein

B540

蛍光相関分光法による神経細胞膜機能解析

○高橋 保夫^{1,2}、田村 守¹、金城 政孝¹ (¹ 北大・電子研、² オリンパス光学)

生体膜構造とその機能との関係についてはさまざまな研究がなされているが、膜における分子の動的解析についてはまだ十分とは言えない。例えば細胞膜は脂質マイクロドメインによる不均一な構造を示し、情報伝達などの機能効率を高めていることが予想されているがその実体についても多くの議論がある。今回、我々は蛍光相関分光法を用いて細胞膜上の蛍光分子の挙動を調べ、細胞膜構造の多様性がもたらす微小領域における拡散定数の変化を検討した。まずモデルとして赤血球を用い、膜に特異的に結合する蛍光マーカー (R18) の膜上での拡散を FCS にて測定した。その結果、R18 の拡散定数 (5 x 10⁻⁹ cm²/sec) は膜脂質の拡散定数とほぼ一致することから、R18 分子は膜脂質と同様に膜上を並進拡散しているものと思われる。FCS による自己相関関数の解析では膜結合と見られる 1 成分のみが得られ、R18 の膜局在はほぼ均一であると考えられた。しかし、低張液などの条件で赤血球をゴーストにすると、膜上 R18 の拡散は顕著に遅くなることが分かった。このように膜構造の物理的変化 (マイクロ領域での粘性低下など) が FCS によって測定可能であることが示された。次に、細胞膜機能に障害を与えるといわれるアミロイド β ペプチド (A-beta) に注目し、R18 を結合させた赤血球に対してどのような影響を与えるかについて、FCS 測定を行った。膜に結合しやすい疎水性部位を持つ A-beta₄₀ (40 アミノ酸) を添加すると既に結合していた R18 の膜上拡散を遅延させたことから、A-beta は膜構造に何らかの変化をもたらしたものと考えられた。さらに A-beta をマウス脳神経培養細胞 (Neuro2a) に添加すると赤血球同様、膜結合 R18 の拡散遅延をもたらした。この結果からアルツハイマー病の原因因子と言われる A-beta はこのように膜機能及び構造に障害を与える結果、神経細胞死の引き金になっていると推測される。

Y.Takahashi, M.Tamura, M.Kinjo : The analysis of neuronal cell membrane by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)