B541

β actin mRNA の細胞内輸送と局在のイメージング

○鞍馬 秀輝¹、貴家 康尋²、多田隈 尚史¹、永川 豊広¹、船津 高志¹、原田 慶恵² (¹早大・理工・物理、²都臨床研・生理活性)

【はじめに】mRNA の組織・細胞内局在は、発生や分化、細胞機能の発現などに重要な役割を果たしている。 β actin mRNA は、非翻訳領域にある Zip Code にその配列を認識するタンパク質 (ZBP1) が結合し、その複合体が分子モータにより輸送されることが知られている。しかし、生きた細胞内で mRNA 局在化の過程については未だに不明な点が多い。本研究では一分子蛍光イメージング法により、生きた細胞内で β actin mRNA の細胞内運動と局在化を観察した。【方法】ニワトリ胚繊維芽細胞由来の β -actin cDNA(全長 1.7kbp) をクローニングし、in vitro 転写系を用いて β actin mRNA を合成し、蛍光色素 Cy3 で標識した。9 日目ニワトリ胚の心臓から繊維芽細胞を調製し、その細胞質に mRNA をマイクロインジェクション法で導入した。細胞内での mRNA の運動と局在化の過程を斜光照明顕微鏡及び共焦点顕微鏡を用いて観察した。【結果】生きた細胞内で β actin mRNA の局在部位と細胞の運動方向の先端が一致していることを観察した。細胞質内に β actin mRNA を導入してから局在するまでに要する時間は 5 分以内であった。この過程に於ける mRNA の細胞質内運動を一分子単位で観察したところ、能動輸送、拡散、一定領域内の拡散、静止しているものがあった。これらは mRNA の局在化に様々な調節機構が働いていることを示している。今後、 β actin mRNA の細胞内運動と局在化の詳細なメカニズムを明らかにしていく。

H.Kurama,Y.Sasuga,H.Tadakuma,T.Egawa,T.Funatsu and Y.Harada : Imaging of transport and localization of beta-actin mRNA using fluorescence microscopy

B543

神経成長円錐での突起伸長を先導する WAVE アイソフォームの役割

○宮本 茂昭¹、野住 素広²、中川 裕之¹、三木 裕明³、竹縄 忠臣³ (¹九工大・情報工・生化システム、²遺伝研・脳機能、³東大・医科研・分子腫瘍)

神経成長円錐はラメリポダイアおよびフィロポダイアを伸長しつつ進展する。アクチンフィラメントがこれらの突起の芯を形成し、その再編によって伸展運動の原動力が生じる。WASP(Wiskott-Aldrich syndrome protein)family に属する WAVE がアクチンフィラメント再編の空間的制御をおこなっていることがわかってきた。WAVE には -1、-2、-3 の 3 種のアイソフォームが同定されている。WAVE-2 と -3 はラメリポダイアの先導端とフィロポダイアの先端の両者に局在する。しかし WAVE1 はラメリポダイアの先導端のみに局在した。これら 3 種いずれにも C 端側にアクチンフィラメントの再編機能を持つ VCA(Verprolin Cofilin homology Acidic) 領域が存在する。空間的局在を決定している分子内領域をあきらかにすることを試みた。各領域または断片と EGFP の融合タンパク質を NG108-15 細胞に発現させることにより解析をおこなった。 WAVE2N 末端 54 アミノ酸からなる WAVE2NT54-EGFP は拡散的に分布したが、WAVE2NT83-EGFP(N 末端 83 アミノ酸) および WAVE2NT109-EGFP(N 末端 109 アミノ酸) は全長と同様の局在を示した。WAVE2 の 54-82 アミノ酸の領域には leucine-zipper-like motif が存在している。この motif がこれらの局在を決定することを示している。WAVE3 は WAVE2 とほぼ同様のしくみで作用していることがわかっている。また WAVE1 の N 末端側 283 アミノ酸 WAVE1NT283-EGFP はラメリポダイアとフィロポダイアの両者の先端に局在する。しかし全長はラメリポダイア先導端のみである。このことは、WAVE1 の C 末端側にフィロポダイア先端への局在を抑制する作用が存在することを示している。

S.Miyamoto, M.Noзумi, H.Nakagawa, H.Miki and T.Takenawa : Roles of WAVE isoforms promoting lamellipodia and filopodia extension at neuronal growth cones

B542

広波長域 2 次元蛍光スペクトル顕微測光に基づく卵細胞内因子の多成分同時解析

○白川 英樹、宮崎 俊一 (東京女子医大・医・第二生理)

種々のシグナル分子に対する蛍光性プローブを用いれば、生きた細胞や組織内でのそれらの動態を光学的に測定することができる。複数種のプローブを用いれば複数のシグナル分子を同時に測定することも原理的には可能であるが、プローブ同士のスペクトルが重複している場合には、両者のシグナルを正確に分離することは容易でない。単一細胞からの蛍光を広範囲の励起・蛍光波長で測定し、得られた 2 次元スペクトルの時系列データから多くの蛍光成分を分離・測定するシステムを開発した。

励起波長は 9 種類のバンドパスフィルターを用いて高速にきりかえた。蛍光はモノクロメータで分光したのち、1024 チャネルの冷却 CCD センサにより全波長域を同時記録した。得られた 3 次元データ(励起波長 x 蛍光波長 x 時間)に適当な補正を施した後、多成分解析の手法により独立した蛍光成分のスペクトルおよび混在量の変化を同時推定した。市販のカルシウム蛍光プローブの混合水溶液を用いてシステムパフォーマンスを評価したところ、互いに大きく重複するスペクトルをもつ 1-11 個の蛍光成分を完全に分離できることが確認された。また非常に類似したスペクトル成分も分離可能であった。マウス卵の自家蛍光を単一細胞レベルで測定・解析したところ、NADH と FAD 以外にも最低でも 2 種類の成分が確認され、例えばミトコンドリア呼吸系阻害剤を投与した際のそれぞれの経時変化を分離測定することができた。さらに、fura-2 や BCECF といった蛍光プローブを用いることで、自家蛍光成分と細胞内カルシウムや pH の経時変化を同時に測定することも可能であった。この分離・解析システムには各成分単独のスペクトルに関する先見情報は必要ではなく、従って、未知の蛍光成分が混在したような標本の解析に非常に有効であると考えられる。

H. Shirakawa and S. Miyazaki : Multicomponent measurement of intracellular factors based on wide-range two-dimensional fluorescence microspectroscopy

B544

ストレスファイバー・ダイナミクスの再構成的研究

○平田 宏聡¹、辰巳 仁史^{2,3}、曾我部 正博^{1,2} (¹ICORP・「細胞力覚」、JST、²名大院・医学系・細胞情報医学、³CREST・JST)

基質上に接着・伸展した内皮細胞や繊維芽細胞においては、東化した F アクチンからなるストレスファイバーが形成される。このストレスファイバーはアクチミオシン相互作用によりそれ自身収縮力を発生すると共に、細胞内外の力学環境の変化に応じて速やかに解消・再構成されることから、細胞内における力学トランスデューサーとして機能している可能性がある。また蛍光褪色回復法による研究からストレスファイバー中のアクチン分子が入れ替わっていることが示されており、この動的性質がストレスファイバーの力学受容に応じた速やかな再編に重要であると考えられる。しかし、その構成要素であるアクチン分子のストレスファイバーへの取り込みや離脱のプロセスとその分子機構は分かっていない。今回我々は、細胞の上側を剥ぎ取り底面側の構造のみを残した単純な系を用いることで、再構成的にアクチン分子のストレスファイバーへの取り込み・離脱過程についての研究を進めることとした。フィブロネクチンコートしたカバーガラス上で培養したヒト皮膚繊維芽細胞にバッファーを吹き付けて機械的に細胞の上側を剥ぎ取った。この系には両端にタリンが集積したストレスファイバー様の F アクチン束が存在しており (本会 2002 年年会, 3N1015)、ストレスファイバーのモデル系として利用できると考えられる。ここに Cy3B で蛍光標識をした G アクチンを加え 37℃で 10 分間インキュベートすると、蛍光標識されたフィラメント状構造が細胞底面上に広範かつ密に形成されたが、特に既存のストレスファイバー様構造が存在する部位ではそれに沿って配向することが観察された。この結果は、このモデル系がストレスファイバーの形成・消失過程の研究に有用な実験系となり得ることを示している。現在、インタクト、セミインタクト細胞との比較を通して実用的な再構成系を開発中である。

H. Hirata, H. Tatsumi and M. Sokabe : Reconstitutive study on stress fiber dynamics