2P157

アポディゼーション位相差顕微鏡法による、アクチンの網目の直接観察

○加藤 薫^{1,2}、大瀧 達朗³、鈴木 基弘⁴ (¹産総研・脳神経、²JST・さきがけ21、³ニコン(株)・コアテクノロジーセンター、⁴ニコン(株)・インストルメンツカンパニー)

我々はPol-Scope(新しい偏光顕微鏡)を用いて神経成長円錐の細胞骨格の可視化に取り組み、フィロポディアに付随するアクチン束を可視化し、運動解析を行ってきた。しかし、ラメリポディアに付随するアクチンの網目の観察は難しかった。また、一般に高解像度の顕微鏡は作動距離が小さく、スペースが1mm以下しか取れず、生理実験のための、顕微操作が極めて難しい。今回、「アポディゼーション位相差法」を用いて、ラメリポディアのアクチンの網目を直接観察でき、且つ、作動距離が3cm取れるシステムを構築したので報告する。

位相差顕微鏡で観察すると、ハロという光の「にじみ」が物体の周囲にみられる。細胞の周囲が白く光り、高解像度の観察には不向きとされる。最近、大瀧(ニコン)は「ハロ」を除く方法(アポディゼーション位相差法)を考案した。この手法は、対物レンズ内の位相リングを透過率の低いアポダイズド輪帯でサンドイッチした形状のものを使う方法である。低倍率(乾燥系10~40倍)の対物レンズに使われている。私達は、アポディゼーション位相差法は低倍率よりも、高倍率(高NA)の対物レンズ(油浸)で威力を発揮すると予想し、試作をニコンに要望し、大瀧と共に対物レンズ(NA1.3)を試作した。

アポダイズド輪帯の幅や透過率を検討し最適化すると共に、蛍光法や微分干渉法との比較を行った。この試作対物レンズを用いて、成長円錐を観察したところ、細胞の条件が良ければ、成長円錐のアクチンの網目や分泌小胞を無染色で観察出来ることを見いだした。この方法は、作業スペースが3cm取れ、生理実験に極めて好都合である。今後、蛍光と組み合わせる実験に使用し、アクチンの網目の動態とアクチン関連蛋白質の関係について解析を進める予定である。

K.Katoh, T.Otaki, M.Suzuki : Direct observation of actin meshwork in the growth cone with apodized phase contrast microscopy.

2P159

PC12D細胞における神経成長因子による活性化した受容体の運動パターンとクラスター形成

○柴田 晶カール¹、柳田 敏雄^{1,2}、佐甲 靖志^{1,2} (¹阪大院・医学系・情報生理、²阪大院・生命機能・ナノ生体)

神経成長因子(Nerve Growth Factor; NGF)は、神経細胞の生存や分化を制御するタンパク質である。生体内で分泌されたNGFは、神経細胞膜上で受容体と結合し細胞内へと取り込まれる。我々は、蛍光色素Cy3でNGFの標識を行い、全反射顕微鏡を用いて1分子単位でのNGFとPC12D細胞の細胞膜上の受容体との結合過程を観察している。一つ一つのNGF分子は、1秒以上にわたって追跡することができた。細胞膜上の受容体と結合したNGF分子はブラウン運動をするが、1つのNGF分子の運動には2種類の異なるphaseがみられた。NGF分子の拡散運動の軌跡を解析することで、拡散係数が大きいphaseと小さいphaseとに分けることができた。拡散係数が小さいphaseでは、Cy3NGF分子が他のCy3NGF分子と衝突しdimerを形成することが多く、蛍光強度の階段状の増加が観察された。反対にCy3NGF分子同士の解離と同時に拡散運動が激しくなり、運動に変化がみられた。また、一つのCy3NGF分子が複数回、異なる相手とdimerを形成する過程も観察された。さらにCy3NGF投与後約30分ごろより、3秒以上にわたって十数分子によるCy3NGFのクラスター形成がみられた。微分干渉像と蛍光像の同時観察から、このクラスターは細胞体とラメリポディアの基部とに多く形成され、ラメリポディアの伸展収縮運動に関係なく停滞していることが明らかになった。NGFのクラスターは、methyl-beta-cyclodextrinによるコレステロール除去やラトランキュリンに対して抵抗性であり、raftや細胞骨格の破壊にかかわらず形成された。以上よりNGFの結合後の受容体の運動パターンには複数の状態があり、これによって細胞の様々な応答を制御している可能性が示唆された。

S.C.Shibata, T.Yanagida and Y.Sako : Lateral diffusion pattern and cluster formation of NGF bound receptors in PC12D cells

2P158

神経成長因子の結合に伴う後根節神経成長円錐の運動反応：その刺激応答連関の1分子解析

○谷 知己、原田 慶恵(東京都臨床研 生理活性)

神経成長因子(Nerve growth factor; 以下NGFと略)は、知覚神経や交感神経の発生・再生に必須の分泌性蛋白質である。その作用は、神経軸索の伸長促進から、神経細胞のアポトーシス制御に及ぶ。NGFによる神経軸索伸長の促進は、神経軸索先端に存在する成長円錐の運動性が活性化されることに始まる。我々は、NGFの投与に伴うこの成長円錐の運動反応に着目し、NGFの結合を、蛍光色素Cy3によって標識したNGFを用いて1分子単位で観察した。この観察に加えて、成長円錐の運動反応を微分干渉顕微鏡法によって同時観察し、あるひとつの成長円錐上におけるNGF分子の結合数と、これによって引き起こされる運動反応の入出力関係を調べた。0.4 nMのCy3-NGFを成長円錐に投与すると、投与開始から1分程度で顕著なラメリポディアの伸展開始が観察され、その伸展は以後6-7分で定常状態に達する。Cy3-NGFに着目すると、投与直後から、成長円錐に結合したCy3-NGFの分子数は急激に増大し、6分程度で200個近くに達する。成長円錐のラメリポディア伸展が引き起こされる時点での結合分子数は、ひとつの成長円錐あたり平均で40個程度であった。10⁻¹² Mから10⁻⁴ Mの広い濃度範囲にわたってCy3-NGFを成長円錐に投与し、その結合量からひとつの成長円錐に存在するNGF受容体の個数を見積もった結果、高親和性受容体が200分子前後、低親和性受容体が700分子前後となった。すなわち、成長円錐の運動反応を引き起こすために必要なNGF分子数は、ひとつの成長円錐膜に存在する全受容体数のわずか4-5%となる。

T. Tani and Y. Harada : Motile responses of dorsal root ganglion growth cones upon application of nerve growth factor

2P160

光ピンセット法によるラメリポディア運動の解析

境 健一、○宮田 英威(東北大・院・理)

生体運動の中にはモーターたんぱく質によらずアクチン重合によって駆動されるもの、たとえば細胞辺縁におけるラメリポディア突出、ある種のバクテリアの細胞内における推進が挙げられる。いずれの場合もアクチンネットワークが細胞膜あるいは菌体の直近で一方向的に成長することと運動がカップルしている。この興味深い過程に関与する分子群の解明はここ10年くらいで著しく進んだが、それにくらべて運動メカニズムの物理的側面の理解は遅れている。われわれは光ピンセットを用いてラメリポディアの突出をnm・ビデオレートで測定し、突出および後退が加速・減速を伴う現象で、突出速度が光ピンセットからの外力と負の相関を持つことを明らかにしてきた(Takahashi et al., Biophys. J. 84: 2664 '03)。今回の測定を発展させ、外力の揺らぎと突出速度の間に相関のあることを見出した。光ピンセットで保持した直径1 μmのポリスチレンビーズをラメリポディアに接触させ、その運動がビーズの運動に反映されると仮定し、ビーズ運動のビデオ記録をオフラインで解析した。光ピンセットのばね定数は0.01~0.05 pN/nmであった。ラメリポディアの突出速度は最大で~100 nm/sであった。突出中のビーズの動きをスムージングし、もとの動きとの差をとることによりnmオーダーの細かい動き(便宜上「揺らぎ」と呼ぶ)を抽出した。この揺らぎの分散は突出速度とかなりよい相関を示した。この揺らぎはビーズがラメリポディアに及ぼす力の揺らぎを反映していると考えられ、ラメリポディア突出機構に何らかの形で揺らぎが関与していることをうかがわせる。(本研究は文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。)

K. Sakai and H. Miyata : Analysis of lamellipodial movements by optical trapping technique