2P173

全反射蛍光顕微鏡を利用した Protein Kinase C の動態解析

○大杉 友^{1,2}、齊藤 健太²、田村 守²、金城 政孝² (¹北大院理・化学、²北大・電子研・超分子)

蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, 以下 FCS) は顕微鏡視野下の一点を観測し、その微小領域内でブラウン運動している蛍光分子のゆらぎから、分子数・分子の拡散定数を求める手法である。FCS はその非侵襲性と空間分解能の高さから生きたままの細胞内での分子間相互作用解析法としても用いられる。以前、我々は対物レンズで絞られたレーザースポット領域での FCS 測定によって細胞質及び膜上における Protein Kinase C (PKC) の拡散定数を求めた [1]。本研究では全反射蛍光顕微鏡を用いた 1 分子観察法によって生体膜上における PKC の拡散定数を算出した。その平均値は約 $0.1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ であり、これは [1] で得た拡散定数と同じオーダーであった。さらに我々は全反射蛍光顕微鏡を基盤とする光学系と FCS 検出器を組み合わせた全反射 FCS の装置作成を進めている。以下の点が全反射 FCS の長所として期待される。1. 細胞膜上の特定分子を標的とした FCS 測定が可能になる 2. 対物レンズで集光したレーザースポットよりも測定領域が小さいため、ゆらぎの検出感度が向上する。つまり、より高濃度の蛍光分子も FCS 測定が可能になると考えられる。予備的な結果であるが、in vitro および in vivo 系での全反射 FCS 測定データも併せて報告する予定である。[1]Saito K, Ito E, Takakuwa Y, Tamura M, Kinjo M. FEBS Lett. 2003 541(1-3):126-131

Y. Ohsugi, K. Saito, M. Tamura and M. Kinjo : Measuring protein kinase C dynamics using TIRFM

2P174

3次元単粒子追跡法の開発: 乳癌細胞における膜表面受容体の運動を立体的に観る

○渡邊 朋信¹、樋口 秀男^{1,2} (¹東北大学・先進医工、²東北大学・学際)

乳癌患者の約 30% で、膜上受容体 HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2) の過剰発現が報告されている。我々は、HER2 過剰発現による細胞の癌化機構の解明を目指している。HER2 は HER1, 3, 4 と 2 量体を形成した後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、下流へと信号を伝達すると考えられている。本研究は、乳癌細胞において HER2 が信号を伝達する現場を可視化することを目的とする。細胞内に取り込まれた HER2 の観察において、従来の様な二次元情報のみでは、ある限られた部位しか観測することができない。そこで我々は、生きた細胞内において、蛍光粒子 CdSe で標識した蛋白質の運動を実時間で 3 次元的に観察できるビデオ顕微鏡システムを構築した。本システムにおいて、ひとつの 3 次元画像は、9 枚の共焦点画像から成り、330ms 毎に連続的に記録される。CdSe 粒子の 3 次元位置は、蛍光強度を重みとした輝点の重心を計算することで求められる。位置精度は、水平方向 ~ 20nm、垂直方向 ~ 85nm (直径 100nm 蛍光ビーズで、水平方向 ~ 6nm、垂直方向 ~ 45nm) である。我々は本手法を用いて、HER2 が乳癌細胞 KPL4 内で輸送されている様子を 3 次元的に実時間で観察することに成功した (右図)。

CdSe-HER2粒子を追跡した例

T.M. Watanabe and H. Higuchi : Three-dimensional single particle tracking of the movements of HER2 in KPL4 Cell

2P175

ナノ粒子追跡による細胞間相互作用の可視化

○高木 直¹、樋口 秀男^{1,2,3} (¹東北大院・工学、²先進医工、³学際センター)

貪食等に見られる細胞間相互作用時における細胞運動の分子機構は未だ明らかでない。これを解明するために細胞膜表面の動態を詳細に調べることを試みた。手法として、有機蛍光分子に比べ発光時間が長くかつ蛍光強度が高い蛍光性ナノ粒子 (CdSe 微粒子) を膜タンパク質に結合させ、そのナノ粒子の挙動を追跡した。

まず生細胞 (乳がん細胞 KPL-4) を特異的に染色するために、直径 ~ 40nm ポリマーコーティングされた蛍光性 CdSe 微粒子を抗 HER2 抗体と架橋した。このナノ粒子と生細胞を混合し 30 分間反応させた後、高感度の共焦点顕微鏡で検出した輝点位置を解析したところ、溶液中より遅く拡散する輝点が多数観察された (図)。この遅い拡散は、HER2 を介して膜表面に結合したナノ粒子の運動であると考えられる。このような蛍光性ナノ粒子の輝点追跡法 (渡邊ら本年会) で、貪食作用時の膜表面の運動を観察し、貪食過程の運動機構の解明を試みた。また、一方向に運動する輝点 (~ 400nm/sec) も少数だが観察された (図)。この一方向に運動する輝点は、細胞内に取込まれた後にモータータンパク質によって運動するナノ粒子の可能性が高い。

輝点の位置変化

N. Takaki, H. Higuchi : The visualization of intercellular interaction by tracking nano-particles

2P176

トリインフルエンザウイルスの情報処理能力

○堺 立也 (川崎医大・微生物)

一般にウイルスは運動や記憶といった高度な能力は持たないとされている。しかしこれまで私は、インフルエンザウイルスが細胞表面を 2 次元的に運動する能力を持ち、この運動がウイルス感染の効率を高めることを報告している。インフルエンザウイルスの運動は、ウイルスのスパイク蛋白質 (ウイルス表面に突き出ている蛋白質) であるヘマグルチニン (HA) と細胞表面のシアロ糖鎖との結合が入れ替わることで起きる。ところでスパイク蛋白質には HA のほかにノイラミニダーゼ (NA) がある。NA はシアロ糖鎖の加水分解活性を持つ。NA は、ウイルスが感染細胞から出芽する際に細胞のシアロ糖鎖を分解し HA と結合できなくすることで、ウイルス粒子の遊離を助けると考えられている。NA の活性はウイルスの運動にどのような影響を与えるだろうか? NA がシアロ糖鎖を分解すれば、ウイルスはもといた場所に居られないため、常に新しい場所へと移動するというあたかも記憶を持った粒子のように振る舞うのではないだろうか。今回この仮説を検討するため、トリインフルエンザウイルス A/whistling swan/Shimane/227/01 (H3N9) を蛍光標識し、シアロ糖鎖でコートすることで細胞表面を模したガラス表面でのウイルスの動きを全反射顕微鏡を用い追跡した。表面に結合したウイルスの平均移動距離は、ランダムウォークで予想されたものより大きいという結果が得られた。これはウイルスが始めに結合した場所から積極的に離れる行動をとったことを意味する。トリインフルエンザウイルスは、NA によりシアロ糖鎖を分解することで細胞表面に情報を書き込み、HA は書き込まれた情報を読み取りながら細胞表面を行動するという原始的な情報処理能力を持つ粒子と言えよう。

T. Sakai : Intelligent behavior of avian influenza virus