2P177

蛍光相関分光法を用いた細胞内でのGFPの並進拡散運動の解析

○寺田 尚史¹、多田 隈 尚史²、石浜 陽¹、座古 保³、船津 高志³ (¹ 早大院・生命理工、² 東大院・理工、³ 東大院・薬学)

細胞内では様々な分子の移動や反応が起きているが、細胞内の場所によって移動のしやすさ(拡散の速さ)には違いがある。それは細胞内の構造物や分子の混み具合等の影響によると考えられる。Hela細胞にGFP(緑色蛍光蛋白質)を強制発現させ、FCS(蛍光相関分光法)を用いてそのブラウン運動を解析することにより、細胞質、核質、核小体の微小環境を評価することを試みた。

HeLa細胞中のGFPのブラウン運動はほぼ2成分の拡散定数で表された。速い成分の拡散定数は37℃では細胞質、核質、核小体ともに水溶液中の拡散定数($120 \mu\text{m}^2/\text{sec}$)の1/2-1/3だった。また、23℃では細胞質、核質では水溶液中の拡散定数($87 \mu\text{m}^2/\text{sec}$)の1/3、核小体では1/8だった。細胞質、核質、核小体といった細胞内の場所により、拡散定数が異なるという結果になった。細胞内の粘性は水溶液中の2-8倍大きくくなっているだけで、GFPは細胞中を比較的容易に移動できることが明らかになった。また、23℃では2成分目の遅い成分(水溶液中の1/30-1/60)の占める割合は0-3%だったが、温度を細胞本来の生育温度である37℃にすると3-12%に増加した。細胞内の微小環境が、温度に大きく依存することが明らかになった。

N. Terada, H. Tadakuma, Y. Ishihama, T. Zako, T. Funatsu : Analysis of translational diffusion of GFP in cell by fluorescence correlation spectroscopy

2P179

Analysis of diffusional motion of molecular rulers in nucleoplasm and nucleolus by fluorescence correlation spectroscopy

○白 燦基、金城 政孝(北大電子研超分子分光)

In our previous study, we exploited green fluorescent protein (GFP) and other four kind of tandem GFPns with different size as molecular rulers to analyze the microenvironment in the cell using fluorescence correlation spectroscopy (FCS). We found that tandem GFPns have obviously two kinds of diffusional motion, a fast and a slow diffusion depending on the position in the nucleus. Diffusion constant of the slow diffusion was several times smaller than that of the fast diffusion. Although the probability for finding of the slow diffusion is not high, the slow diffusion was found in not cytoplasm but cell nucleus. In this study, we have chosen other types of cell line such as HeLa cell because of low background of fluorescence. Moreover, a nucleolar protein of fibrillarin locating in nucleoli and Cajal bodies was used to discriminate the position of nucleoplasm and nucleoli in the nucleus. For FCS measurement, the molecular ruler of tandem GFPn and mRFP fusion fibrillarin protein were transiently co-transfected to HeLa cell. Results of FCS measurement show the slow diffusion was well found in the nucleoli where the fluorescence intensity of mRFP-fibrillarin was strong.

C.Pack and M.Kinjo : Analysis of diffusional motion of molecular rulers in nucleoplasm and nucleolus by fluorescence correlation spectroscopy

2P178

β -actin mRNA と zipcode-binding protein 1 の結合・解離のキネティクス

○永川 豊広¹、鞍馬 秀輝¹、貴家 康尋²、原田 慶恵²、船津 高志^{1,3} (¹ 早大院・生命理工、² 都臨床研・生理活性、³ 東大・薬)

様々な生命現象において、胚発生や細胞極性の確立などには特定のmRNAが細胞内の特定の領域に局在化することが重要である。例えば、ニトリ胚絨毛芽細胞の細胞極性は、 β -actin mRNAの細胞前端での局在化がもたらす β -actinの局所的合成によって確立されているとの報告がある。数年前に β -actin mRNAの局在化にzipcode-binding protein 1(ZBP1)が関与していることが明らかになり、 β -actin mRNAの3'非翻訳領域に含まれるACACCCの繰り返し配列がZBP1との結合において重要であることが示された。 β -actin mRNAとZBP1の結合・解離のキネティクスを明らかにすることは、局在化のメカニズムを知る上で重要である。そこで、本研究では蛍光標識した β -actin mRNAとZBP1を用いて、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法等を指標にして両者の結合・解離のキネティクスを明らかにすることを目的とする。

まず大腸菌で発現、精製したZBP1のアミノ基をCy3で蛍光標識した。一方、 β -actin mRNAはCy5 UTPを含むin vitro転写系を用いて合成し蛍光標識した。結合活性をGel shift assayで調べたところ、結合能を有することが確認できた。両者を混ぜ蛍光分光光度計で測定したところ、donor(Cy3)の蛍光強度の減少が見られ、FRETが起こっていることが示された。現在、 β -actin mRNAとZBP1の結合・解離速度をFRETなどを指標として測定しており、両者の結合・解離のキネティクスについて解析中である。

T.Egawa, H.Kurama, Y.Sasuga, Y.Harada and T.Funatsu : Association-dissociation kinetics of beta-actin mRNA binding to ZBP1

2P180

蛍光相互相関分光法による細胞内酵素活性検出

○齊藤 健太¹、和田 郁夫²、田村 守¹、金城 政孝¹ (¹ 北大・電子研・超分子、² 福島医大・生体情報研・細胞科学)

蛍光相関分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy、以下FCS)は蛍光分子が測定領域を通過する事に起因する蛍光強度のゆらぎから、分子の動きの情報(拡散時間)を測る手法である。一方、蛍光相互相関分光法(Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy、以下FCCS)は2色の異なる蛍光分子が測定領域を通過する際の光強度変化の同時性(相互相関)から、分子間相互作用を検出する手法である。細胞内でのFCCS測定としては、コレラ毒素の細胞外からの取り込みおよび細胞内でのサブユニット解離の測定および細胞内のカルモジュリンおよびそれに依存したプロテインキナーゼの相互作用を測定の報告がある。これらの測定では蛍光分子として両方または片方に合成色素を用いており、細胞内導入が煩雑になる事や色素のラベル化率の不均一性が結果の再現性を損なう可能性がある。本研究では2種類の異なる蛍光蛋白質を利用した細胞内FCCS測定を行なった。蛍光蛋白質として緑色蛍光蛋白質(以下EGFP)および単量体赤色蛍光蛋白質(以下mRFP)を用いた。まずin vitroで合成した融合蛋白質EGFP-mRFPを溶液中で測定し、測定条件の検討および最適化を行った。次に、細胞内に発現したEGFP-mRFPのFCCS測定および細胞内でのプロテアーゼ活性を相互相関の減少を通して観測した。結果から、FCCS測定においてEGFPと比較して発光の弱いmRFPをタンデムに二つ融合させる事で細胞内における酵素活性の検出を行なった。

K.Saito, I.Wada, M.Tamura and M.Kinjo : Detection of enzyme activity in cells by using fluorescence cross correlation spectroscopy