2P281

Mechanical Measurement on Green Fluorescent Protein with Atomic Force Microscopy

○WANG Tong¹、中嶋 健²、原 正彦¹ (¹ 理研 フロンティア 局所時空間機能、² 東工大院 理工 有機高分子)

Green Fluorescent Protein (GFP) is widely applied in biological field, not only due to its intrinsic fluorescence, but also because of its unique structural shape. From the physical and mechanical point of view, the quasi-static measurement that is the mechanical unfolding of single GFP molecules was conducted using Atomic Force Microscope (AFM) and the existence of their internal sub-domain structure was found. Furthermore, the mechanical properties of two circularly permuted GFPs (cpGFPs) were compared with those of the base ones. The unfolding results revealed different levels of the reduced mechanical stability of cpGFPs, and these levels were related to the proximity of the newly introduced termini to the central 'beta-can'. To elucidate more detailed conformational change at each extension length and understand the mechanical stability of such sub-domains, measurement on relax-stress response of the protein by applying sinusoidal movements of the sample stage was performed, which allow us to investigate the dynamic response of the protein molecule repeatedly before its full stretching.

T.Wang, K.Nakajima and M. Hara : Mechanical Measurement on Green Fluorescent Protein with Atomic Force Microscopy

2P283

mRNA スプライシング反応の1分子蛍光顕微分光観察

○石浜 陽¹、多田 隈 尚史¹、谷 時雄²、船津 高志^{1,3} (¹ 早大院・生命理工、² 熊大・理・生物科学、³ 東大・薬)

真核生物の遺伝子は遺伝情報を持たない長大なイントロン領域によって分断されており、イントロンを除去するスプライシング反応は遺伝子の発現において必須の過程である。我々は、イントロンとエキソンをそれぞれ異なる蛍光色素で標識した mRNA を調製し、スプライシング反応を1分子レベルで解析するための技術開発に取り組んでいる。このために、Fushitarazu 部分遺伝子(全長570塩基)のイントロン配列とそれを挟む2つのエキソン配列を合成し、それぞれ蛍光色素 Alexa568、Alexa532、Alexa647 で標識した。これらを T4 DNA Ligase により連結させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離回収した。連結した蛍光標識 mRNA が HeLa 細胞の核抽出液中でスプライシングされることを確認した。これを in vitro 観察するため、まず mRNA の基板への固定化方法を検討した。表面を PEG(poly ethylene glycol) 処理したガラス基板に mRNA の 3' 末端に相補的なオリゴ核酸をアビジン-ビオチン結合で固定化し、蛍光標識した mRNA 前駆体の 3' 末端配列を介して結合させた。これに HeLa 細胞の核抽出液を加えてスプライシング反応を開始させ、エパネッセント場照明による1分子蛍光顕微分光観察を行った。現在、固定化した mRNA のスプライシング反応活性を評価している。また、蛍光標識した mRNA をマイクロインジェクションにより HeLa 細胞核内に導入し、mRNA のスプライシングと核外輸送も観察している。

Y.Ishihama, H.Tadakuma, T.Tani, T.Funatsu : Single molecule imaging of mRNA splicing

2P282

斜光照明蛍光顕微鏡による好中球の CD69 分子の細胞膜表面移行のイメージング

○山岸 舞¹、村山 研^{2,3}、坂本 明彦¹、新井 孝夫³、鈴木 和男²、船津 高志¹ (¹ 東大・院薬・分析、² 国立感染症研究所・生物活性物質、³ 東京理科大・理工)

【背景と目的】炎症は、局所的に刺激が加えられた際における生体反応であり、局所より産生される炎症性サイトカインや炎症因子が白血球の浸潤、活性化を誘起することで生じる。主要な白血球である好中球は、最も早く炎症局所に動員されるため、炎症の惹起や促進に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、その分子メカニズムはあまり解明されていない。活性化好中球の細胞内に存在する分子として知られる CD69 のノックアウトマウスにおいて、野生型マウスで誘導されるタイプ II コラーゲン誘導関節炎が発症せず、野生型マウス由来の好中球を投与すると関節炎が誘導されることから、好中球の炎症反応に関与している可能性が示唆されている。我々は、*Ex vivo* において、炎症性サイトカインなどの刺激剤で活性化した好中球が、その細胞表面に CD69 分子を発現する現場を、斜光照明蛍光顕微鏡を用いてイメージング解析した。

【方法】ヒト末梢血から比重分離法によって分離した好中球を、PDMS 樹脂とカバーガラスで作成したマイクロチャンバー上に接着させた。その後、PMA (100 ng/ml)、fMet-Leu-Phe (1 μ M) 等の刺激剤を添加して活性化させた後、Cy5 標識抗 CD69 抗体を添加、斜光照明法により経時的に顕微観察した。

【結果と考察】刺激剤添加2分後の好中球において、すでに CD69 分子の細胞表面での発現が観察された。従来法である FCM や組織免疫染色法による解析ではこの時間分解能は得られず、本方法によって初めて好中球の迅速な反応を観察することができた。生体内においても、炎症の初期段階で CD69 分子を細胞表面に発現することが予想され、この分子が炎症の初期反応に関与する可能性が示唆された。

M. Yamagishi, K. Murayama, A. Sakamoto, T. Arai, K. Suzuki, T. Funatsu : Imaging of CD69 translocation to the cell surface on the activation of neutrophil

2P284

1 分子蛍光法における 2 色同時共局在観察法の開発

○小山・本田 郁子^{1,2}、Ken Ritchie^{1,2}、藤原 敬宏^{1,2}、飯野 亮太¹、村越 秀治^{1,2}、笠井 倫志^{1,2}、楠見 明弘^{1,2} (¹ ERATO/SORST-JST 名大院理、² 名大高等研究院)

1 分子蛍光法を用いて、生細胞の細胞膜上で 2 種の分子の共局在(結合や集合を示唆)を調べる方法を開発した。2 種類の色素の例として GFP と Alexa 633 を用いた。波長の異なるレーザー光で同時に全反射照明し、蛍光シグナルをダイクロイックミラーで底面と側面ポートに分離した。各ポートの画像は、イメージインテンシファイアで増倍し EBCCD カメラで撮像した。カメラからの読み出しは同期させてビデオレートで行った。2つの画像を正しく重ね合わせるためには以下の操作を行った。まず 5 μ m ごとの格子点上に直径 1 μ m の光学窓を持つマスクを準備し、このマスクの明視野像を底面と側面のポートで同時に得た。次に、両方の画像とも光学窓の像が 5 μ m ごとの格子点に並ぶように変換する 3 次スプライン関数をそれぞれのポートについて求めた。この関数を各ポートで取得したすべての画像に適用した。この方法により、1 ピクセルが試料上の 50 nm であるとき 13 nm の精度で重ね合わせができるようになった。蛍光 1 分子の位置決定精度は GFP が 34 nm、Alexa 633 が 29 nm であるので、2 色の分子間の距離が 64 (100) nm 以内の時に共局在している分子対の 68 (90) % が検出されることになる。実際、細胞膜上の E-cadherin-GFP と抗 E-cadherin-Alexa 633 の 1 分子同時観察を行い、これが検証された。

I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, R. Iino, H. Murakoshi, R.S. Kasai and A. Kusumi : Fluorescence colocalization imaging of two single-molecules in living cells