1P329

微粒子の運動を三次元的に検出する新しい光学顕微鏡の開発

○水谷 佳奈¹、岡田 薫¹、上野山 敦子¹、政池 知子¹、宮田 真人^{2,3}、西坂 崇之^{1,3} (¹学習院大・理・物理、²大阪市立大・院理・生物地球、³JST・さきがけ)

従来の顕微鏡観察では、試料の運動について二次元の情報しか含まれず、垂直方向の位置を正確に知ることはできなかった。そこで我々は、微粒子の変位をナノメートルオーダーで三次元的に検出する新しい光学顕微鏡、MIEZOU (Microscopy Evolving into Z-direction by dOUBLE images)を開発した。この光学顕微鏡で捉えた蛍光単粒子の像は、プリズムによって二つに分けられており、それぞれの像の位置は画像処理により独立に計算される。蛍光微粒子が水平方向に移動した場合は、二つの像は平行に移動するが、垂直方向に移動した場合は、プリズムの軸に対して対称に移動する。従って平行移動量から水平方向の変位、相対移動量から垂直方向の変位が、独立かつ同時に検出できるのである。この顕微鏡の最も特徴的な点は、一枚の画像から三次元の情報を得られることである。また蛍光微粒子による標識によってあらゆる蛋白質に応用できるため、今後、一分子生理学への大きな貢献が期待される。

現在MIEZOUを用いて、寄生性のバクテリアである *Mycoplasma mobile* の運動について調べている。*M. mobile* は細胞やガラスの表面において $2.5 \mu\text{m/s}$ (体長の約4倍) の速度で滑走運動を行うが、これまで知られているいかなる分子モーターも運動に関わっておらず、滑走メカニズムは未知のものだと考えられている (本年会・上野山の発表を参照)。そこで接着器官に微粒子を付け、その動きをMIEZOUで三次元的に観察し、運動を生み出す蛋白質の動きを分子レベルで捉えることを試みている。発表では、MIEZOUの詳細な原理と、MIEZOUによって検証している *M. mobile* の新しい滑走メカニズムについて報告する。

K. Q. T. Mizutani, K. T. Okada, A. Uenoyama, T. Masaie, M. Miyata and T. Nishizaka : Advanced Microscopy capable of detecting three-dimensional movement with nanometer-scale accuracy

1P331

FRETを利用した細胞内チューブリンの重合状態の可視化

○新野 祐介、井口 崇生、岡 浩太郎 (慶大院・生命理工)

細胞の移動や形態変化、細胞分裂などの生命現象において、微小管の再構成は、アクチンフィラメントとともに重要な役割を担う。チューブリンの重合・脱重合の状態が、注目している現象中に、細胞内でどのように分布しているかは重要な情報となる。よく用いられる蛍光スペckル法では、微小管上の重合・脱重合に関する情報しか得られず、また共焦点 (二光子) レーザ走査顕微鏡の観察系には不向きといえる。そこでFRETを利用し、細胞内チューブリンの重合状態を可視化する手法を確立した。CFPおよびYFPでタグをしたチューブリンを共発現させることで、重合チューブリンをFRETにより検出する。アクセプターブリーチング法によりFRETの確認を行った。またnocodazoleによる微小管崩壊に伴うFRETシグナルの減少、微小管安定化薬剤taxolによるFRETシグナルの上昇を観察した。本手法により、ラッフルの形成に伴い、細胞の先端端 (leading edge) においてチューブリンの重合状態が上昇することを見出した。他の蛍光イメージング手法とともに、本手法は細胞骨格動態およびその制御系のシグナル伝達を理解する上で有用と考える。

Y.Niino, T.Iguchi and K.Oka : A FRET-based technique for imaging polymerized state of intracellular tubulin

1P330

シロイヌナズナにおける重力情報伝達のリアルタイム可視化解析

○齊藤 健太¹、綿引 雅昭²、山本 興太郎²、永井 健治¹ (¹北大・電子研・ナノシステム、²北大・理学・形態機能I)

「生物は如何にして重力を感じし個体にフィードバックしているのか？」その生物物理学的メカニズムは驚くほど未解明の部分が多い。生物はどのようにしてナノメートルレベルの生体分子の世界において極めて微弱な力である重力を知覚し生物個体の形作っているのであろうか？植物の重力屈性反応は、(1) 重力の感知、(2) 重力刺激の細胞内での情報変換、(3) 細胞間情報伝達、(4) 屈曲反応の4つに分けられる。しかし特に(2) 重力刺激の細胞内での情報変換、及び(3) 細胞間情報伝達の分子メカニズムについては近年になりCa²⁺やIP3が関与するという報告があるものの、いまだはっきりとわかっていない。生きた植物個体内での情報変換機構及び細胞間情報伝達機構のためのリアルタイム可視化計画が期待されている。本研究では重力という極めて小さな力がどのようにナノメートルレベルの生体分子の機能や局在変化を制御し、生物個体の形に影響を及ぼすかを解き明かすことを目的とした。またその目的を達成するために生物個体のリアルタイム可視化技術の確立を行なう。リアルタイム可視化解析の手法としては蛍光イメージング・FRETを利用したものが先行している。しかしながら植物は光感受性が高く蛍光測定の際励起光が植物に作用してしまうという問題を抱えている。そこで、植物には光感受性の少ない励起波長を用いた蛍光イメージング、あるいは励起光を用いない生物発光を利用したイメージングが適していると考えられる。今回、われわれはウミシイケルシフェラーゼ (Rluc) とEGFPの融合蛋白質を用い、生物発光及び生物発光エネルギー移動 (Bioluminescence resonance energy transfer; BRET) による動物培養細胞および植物培養細胞 (プロトプラスト) 内でのイメージングを行った。

K.Saito, M.Watahiki, K.Yamamoto, and T.Nagai : Real-time imaging of the gravity signal transduction in Arabidopsis

1P332

ストレプトアビジン 2 次元結晶膜の完全化とピオチン化プロテインGによる抗体固定

○古野 泰二 (慶大・医・物理)

一昨年開催の本学会において、ストレプトアビジン (SA) 2 次元結晶膜へのピオチン化タンパク質の結合とAFMイメージングについて報告した。そこではまた、SA 2 次元配列のうちの非結晶領域や結晶粒界にはタンパク質分子の非特異吸着が起こりやすく、特異吸着との識別が困難であることを述べた。

本研究では、膜作成条件の再検討により基板表面全面を結晶で覆うことができるようになった。膜作成の方法はすでに発表したように、合成ポリペプチドの一種であるポリベンジルヒスチジン単分子膜をSA溶液界面に展開し、吸着・稠密化を待った後おだやかな加熱・冷却熱により結晶化を促進し、疎水処理シリコンウエハに水平付着法で転写するものである。

今回応用として、免疫グロブリンをSA膜に固定しAFMイメージングを試みた。ピオチン化プロテインG ($10 \mu\text{g/ml}$ 、10mM-HEPES、pH7) を膜に結合後、IgG ($10 \mu\text{g/ml}$ 、0.15M-NaCl) をプロテインGに結合し、純水リンスの後にAFMでイメージングした。その結果、抗体の結合数を像から直接計数することが可能であったが、力学的固定が緩いため結合分子の形状認識は困難であった。

今後、抗原-抗体複合体のAFMイメージングを試み、プロテインチップ基板としてのSA 2 次元結晶膜の利用を検討したい。結晶粒界に非特異吸着したタンパク分子はイメージングを阻害するだけでなく、高S/Nが期待される1分子計数におけるノイズとなるので可能な限り抑制する必要がある。また、結合分子を形状から識別するには固定の方法を改善する必要がある。

T.Furuno : Immobilization of immunoglobulin molecules via biotinylated protein-G bound to a uniform film of two-dimensional crystal of streptavidin