2P217

細胞質-核間輸送の1分子イメージングによる活性部位の定量

○徳永 万喜洋^{1,2,3}、今本 尚子⁴ (¹ 遺伝研、² 総研大、³ 理研・免疫センター、⁴ 理研・細胞核機能)

細胞質-核間輸送の速度に関して、従来言われていた値よりも約100倍速いという報告が出され、議論となっている。従来の値は、核内濃度の増加率として1～数uM/minであり、これはほぼ数～10分子/s/核膜孔に対応する。近年、数百分子/s/核膜孔と、二桁速い輸送速度の研究結果が出されている。

輸送速度と活性部位に関して議論がある理由の一つは、核膜孔複合体が、約30種類の構成蛋白質各複数分子からなり、全体の分子量約125 Mdaと複雑なためである。また、核膜孔構成蛋白質の多くに含まれるFGリピート(Phe-Gly繰り返し配列)が、輸送分子との多数の結合部位を提供しているが、輸送活性との関係が必ずしも明らかになっていないためでもある。

1 細胞レベルでの輸送活性と、1分子イメージングでの輸送中の核膜孔滞在時間との相関を調べた。核あたりの輸送活性(uM/min)は、細胞の蛍光像から求めた核膜孔の密度・核の表面積と体積とから、核膜孔あたりの輸送速度(molecules/s/核膜孔)に変換できる。1分子イメージングの滞在時間の逆数(1/s)は、単位時間あたりの輸送頻度を表す。両者の相関係数から、8分子/核膜孔という値が得られた。

これは、1核膜孔あたりの活性部位の数を意味する。条件等により、1分子の滞在時間が変わり、その結果輸送速度も変わるということがわかった。数百分子/s/核膜孔という非常に速い輸送活性は、生理的な濃度より1～2桁濃い濃度で得られているが、8分子/核膜孔という値を用いて、速度の濃度依存性を考慮すれば、非常に速い輸送活性も説明できる。

1分子イメージングにより、細胞内の活性と活性部位分子数が定量でき、その結果は細胞質-核間輸送のダイナミックな特性を説明する。

M. Tokunaga and N. Imamoto : Molecular mechanism of nucleocytoplasmic transport elucidated by single molecule imaging

2P219

熱耐性 MAPs の突起領域による微小管動的不安定性の制御

Permana Sofy^{1,3}、久永 真市²、○伊藤 知彦¹ (¹ 名大院・理・生命理学、² 首都大・生命科学、³ Brawijaya Univ., FMIPA)

MAP2、MAP4、tauを主要なメンバーとする熱耐性MAPsは、微小管の重合速度を促進させるとともに、脱重合を抑制する動的不安定性の制御因子である。これらは全て微小管には直接結合しないN末側突起領域(PJD)とC末側微小管結合領域(MTBD)からなる共通の構造を持つ細長い繊維状のタンパク質であり、互いに相同性が見られるのはMTBDのみである。微小管には直接結合せずに突き出した状態をとるPJDは、長いこと微小管ダイナミクスの制御とは無関係と考えられてきた。しかしながら最近、いくつかのPJD部分欠失MAP4変異体存在下での微小管動態比較から、我々はPJDも微小管の動的不安定性制御に関与する可能性を示唆する結果を得た。(Permana *et al.*, 2005)。突起領域の短い熱耐性MAPであるMAP2c存在下での微小管動態を観察したところ、MAP4存在下で見られる、長い重合相と脱重合相が比較的低頻度で繰り返される動的不安定性とは異なり、短い重合相・脱重合相が高頻度で繰り返される、長さ変化の小さな動的不安定性が見られた(Permana *et al.*, 昨年度年会)。今回は、この違いがPJDによるものかを調べるため、MAP2cとMAP4の間でPJDを交換した2種類のキメラMAP(MAP2cのPJD+MAP4のMTB: 2cP-4B、MAP4のPJD+MAP2cのMTB: 4P-2cB)を作成し、暗視野顕微鏡を用いて個々の微小管動態を比較した。その結果、MAP2cのPJDをもつ2cP-4BではMAP2c存在下とよく似た、小刻みな動的不安定性が観察されたのに対して、MAP4のPJDを持つ4P-2cB存在下では、MAP4の場合と同様のゆったりと大きな動的不安定性だけが見られた。これらの結果は、PJDが微小管の動的不安定性の詳細を決める、いわば「動態スイッチ」である可能性を強く示唆するものである。

S.Permana, S. Hisanaga and T. J. Itoh : Regulation of the dynamic instability of microtubules by the projection domain of heat-stable MAPs

2P218

分子ものさしを用いた核小体内の微環境とその生理条件の影響の解析

○白 燦基、斉藤 健太、田村 守、金城 政孝(北大・電子研)

細胞の中に存在する核は細胞内外の刺激に応じて、発現すべき遺伝子をタイミングよく、且つ適切に発現するなど化学反応系の制御と、細胞分裂時には遺伝子を2カ所に分け、そしてまた集めるなど時空間的な制御も行っている。それに加えて、核内では恒常性を保つため常に数多くのタンパク質がそれぞれの役割を果たし、ダイナミックに周りとの微環境と相互作用をしていると考えられる。このように細胞核は非常にダイナミックな場所であるが、リアルタイムにその内部で何が起きているかは実は良く分かっていない。我々はいった未知の核内微環境を知るためにはまず動き易さの『ものさし』となるものを構築することが必要だと考えた。そのために我々は蛍光性タンパク質(GFP)を用いて、分子ものさし(Molecular Ruler; MR)を構築し、蛋白質の長さ按比例して動き易さが定量的に変化し、溶液系において動き易さの指標になることを示した。今回の報告ではMRや蛍光相関分光法を用いて生細胞核内をさらに核質と核小体に分けて解析できること、また核小体内の微環境は細胞質や核質とは大きく異なり細胞内のエネルギー状態やRNAポリメラーゼI型の特異的な阻害にも大きく依存していることなどが示された。これらの結果はMRが核内の微環境の解析並びに細胞の生理的変化をリアルタイムで捉えるプローブとしても有効であることを強く示唆している。細胞の生きている状態とは細胞内の微環境と蛋白質の機能に反映しているため、核内微環境とMRの拡散運動定量化の手法が確立すれば今後様々な生理条件下における核内微環境の変化を始め、多様な核蛋白質の動きの解析から直接その機能も調べられると期待できる。

C.Pack, K.Saito, M.Tamura, and M.Kinjo : Analysis of the cell nuclear microenvironment and the effects of physiological conditions in cell using Molecular Rulers

2P220

アクチンの光化学的内部切断による重合能の消失とDNase1阻害活性の著しい低下

林 健介、○岡本 洋(室蘭工大・工・応化・生物工学)

Gアクチン(ウサギ骨格筋)をリン酸アナログのパナジン酸存在下で光照射(360nm)すると、202番目のスレオニン残基で光化学的切断が生じ、重合能が消失した。一方、Fアクチンに対して同様の光照射を行っても切断は生じない(Okamoto, Y. & Sumita, T. (1991))。アクチンのThr202はサブドメイン4のループに存在し、会合に寄与(Holmes *et al.* (1990))するので、Fアクチンが切断されないのは、会合がこの部位をマスクしたためであろう。ここでThr202はDNase1結合のminor contact site (Kabsh *et al.* (1990))でもあるため、切断によってアクチンのDNase1親和性が増加した可能性がある。そこで、両者の相互作用をDNase1酵素活性のアクチンによる阻害効果(Lindberg *et al.* (1978))から調べた。GアクチンのDNase1阻害活性は光照射時間依存的に顕著に低下していた。さらに、アクチンとDNase1の結合親和性を水晶振動子センサーによって測定した結果、光切断に伴いアクチンのDNase1との結合親和性も著しく低下していた。これはDNase1に対してminor contact siteといわれているThr202ループ領域が、アクチンによるDNase1活性の阻害に重要な役割を果たしている可能性を示すものである。即ち、major contact siteの有るサブドメイン2とDNase1の結合が、サブドメイン4に生じた切断によって顕著に弱くなったものと考えられる。尚、切断部位に関連して、Physarum actinのpointed endではThr201-203がactin kinaseでリン酸化され、fragmin-actin複合体が不活性化することが報告されている(Furuhashi, K. *et al.* (1992))。さらに、光化学的切断されたアクチンの高次構造がintactな状態からどの様に変異したか、について調べていきたい。

K.Hayashi and Y.Okamoto : A photochemical cleavage on actin lose both polymerizability and inhibitory action for DNase1