2P221

Fアクチンメッシュからストレス線維が形成される自己組織機構の解析

○平田 宏聡¹、辰巳 仁史^{2,3}、曾我部 正博^{1,2,4} (¹生理研・細胞内代謝、²名大院・医・細胞生物物理、³CREST・JST、⁴SORST・細胞力覚・JST)

ストレス線維はFアクチンやミオシンから構成される束状の構造体で、その長さは細胞長にも相当し、向きは概ね細胞の長軸方向に揃っている。このような高次構造体が、その構成要素であるアクチンやミオシンからどのように構築されるのかはよく分かっていない。これまでに我々は、ストレス線維を解消させた後セミインタクト化した繊維芽細胞の突出ラメラ部において、Mg-ATP、Ca²⁺処理によりFアクチンの束が既存のFアクチンのメッシュからミオシンII依存的に形成されることを示した。このFアクチン束はストレス線維と同様にミオシンを含み細胞長軸方向に向いているので、セミインタクト細胞はストレス線維構築の機構を調べるための良いモデル系になる。今回我々は、セミインタクト細胞のFアクチンを量子ドットでまばらに標識して単粒子追跡することで、Fアクチン束形成過程におけるFアクチンの運動モードを調べた。ラメラ部におけるFアクチンの運動は、小さい時間スケール (Dt < 10s) では変位量も方向も互いに無関係であったが、大きい時間スケール (Dt > 100s) では、Dt 毎空間変位量においてFアクチン間で相関がみられるようになり、運動の方向も揃うことが観察された。このことは、100秒以上の時間スケールでは系全体が方向性をもってゆっくりと変形・再構築すること、短い時間スケールではFアクチンが個別・局所的に運動することを示している。一方、ラメラ部を細胞体から切断すると、大きい時間スケールでの系全体の変形・再構築過程が阻害された。この時、Fアクチンの束は形成されたが、束同士の向きは揃っていなかった。これらの結果から、Fアクチンの局所的運動によりFアクチン束は形成されるが、Fアクチン束の向きが揃うためには方向性のある張力場に基づいた自己組織機構が重要であると考えられた。

H.Hirata, H.Tatsumi and M.Sokabe: Self-organization of stress fibers from F-actin meshwork

2P223

テトラヒメナ繊毛形成に関与する新奇アクチン関連タンパク質 tArp

○箕浦 高子¹、栗原 さやか²、加藤 舞²、沼田 治² (¹東大・院総合・生命環境、²筑波大学・生命環境)

アクチンは進化的に最も古くから存在するタンパク質の一つであり、真核生物の細胞運動において、様々な重要な局面を担っている。またアクチンは、アクチン関連タンパク質 (Arp) とともに巨大な遺伝子ファミリーを形成することでも知られている。繊毛虫テトラヒメナでは、これまでにコンベンショナルアクチンが1種報告されていたが、最近のTIGR テトラヒメナゲノムプロジェクトの進展及び、我々の探索・クローニングにより、計12種のアクチン様タンパク質の配列が同定された。これらの配列を系統解析すると、コンベンショナルアクチンが4種、Arp4が2種、Arp1、Arp2、Arp3、Arp5、Arp6が各1種となり、さらに既知のどのArpにも属さない新奇Arp (tArp) が含まれる。我々はこれまでにtArpが既知のArpとは異なり、繊毛に多く含まれること、脱繊毛時にその発現が顕著に増加することを見だしている。今回は繊毛の生化学的分画と免疫電子顕微鏡法により、より詳細にtArpの繊毛内局在を観察した。tArpは主として周辺微小管分画に見いだされ、これはコンベンショナルアクチンが主にダイニン分画に含まれるのとは異なった。免疫電子顕微鏡法ではほとんどの金粒子が周辺微小管と中心対微小管上に認められた。以上の結果はtArpが繊毛の形成過程と構造維持に関わるユニークなArpであることを示唆している。

T.Kato-Minoura, S.Kuribara, M.Kato, and O.Numata: Identification of a novel actin-related protein in Tetrahymena cilia

2P222

クライオ電子顕微鏡写真からアクチンフィラメント端の三次元構造を決定するための新しい画像処理法

○成田 哲博¹、山下 敦子²、前田 雄一郎² (¹科学技術振興機構、²理化学研究所)

アクチンフィラメントの端には、CapZ, gelsolin, formin, mDia, Arp2/3 複合体等、様々なタンパク質が結合し、アクチンフィラメントの分布やダイナミクスを制御している。その結合様式については、結晶構造等を元にモデルが提唱されているものもあるが、アクチンフィラメントの端の三次元構造をダイレクトに決定する方法がなかったために、未知の部分がほとんどである。私たちは今回、クライオ電子顕微鏡写真から、アクチンフィラメントの端の三次元構造を決定する新しい画像処理法を開発した。シミュレーションにおいて、この画像処理法は非常に高い成績を示した。私たちはこの画像処理法をActin-CapZ複合体の実際のデータに適用し、その構造を25 Å分解能で解くことができた。この構造マップには結晶から得られたCapZの構造が非常に良くフィットし、Actin-CapZの結合様式の新しいモデルを提唱することができた。

A. Narita, A. Yamashita and Y. Maeda: A new image analysis to determine three dimensional structures of ends of actin filaments from cryo electron micrographs

2P224

ハイドロゲルの微細加工技術を用いたトポグラフィー制御培養下の細胞形態変化ダイナミクスの構成的研究

○森口 裕之、金子 智行、安田 賢二 (東大院・総合文化・広域科学)

【目的】多細胞生物の表現型について説明し理解するために、個体や組織を分析し還元的に説明する分析的アプローチに加え、1細胞を最小構成単位として人工的に組織を再構成し、その比較から生命現象を理解する構成的アプローチの実現が期待される。この考えから我々は、立体的な微小構造を自在に配置することによって細胞集団の形状や空間配置を制御し細胞間相互作用を人工的に構成して観察できる実験系の開発を進めてきた。その結果、培養中にも使用可能な集束光加熱による非接触のアガロースゲル微細加工技術である Photothermal Etching 法を開発し、実際にそれを用いて細胞集団の構成的な培養観察を行い、形態形成過程のダイナミクスに内在する成長、変化、安定性について考察している。

【方法】Photothermal Etching 法でアガロースゲルに微小なチャンパーとそれらを連結する微小なトンネルを作成し、チャンパーに神経ネットワーク形成のモデルとしてPC12細胞を搬入し培養した。

【結果】細胞間の接触と突起の伸展パターンは微小構造で制御され、トンネル内を伸長する突起の数日間わたる伸縮過程が観察された。1本の突起は遅い伸長と速い縮退を繰り返した (図)。結果、考察等の詳細については、本会にて報告する。

H. Moriguchi, T. Kaneko and K. Yasuda: Constructional research for the morphogenetic dynamics of topographically controlled cells by using hydrogel microfabrication method