生体内タンパク質分子動態観測技術開発研究

Technological Development for *in vivo* Imaging the Dynamics of Protein Molecules

研究代表者　前 田 雄 一 郎
MAÉDA Yuichiro
（前田構造生物化学研究室）
(Structural Biochemistry Laboratory)

生命活動を理解する上で最も重要なことの１つは，細胞内でのタンパク質の“動き”を理解することである。本研究課題では，２つのタイプのタンパク質の動きに焦点をあて，最先端の光学的方法を駆使してそれを計測する新規観測技術を開発し，タンパク質の動きについて新しい概念を得ることを目的とする。第一は，タンパク質分子の形態変化を，蛍光分子の方位決定法や，蛍光寿命測定法を用いて計測する。これはタンパク質分子の構造変化を光学顕微鏡で観測する最初の試みである。第二は，細胞内での特定のタンパク質分子が機能を果たす際の動態を，高速スキャン共焦点蛍光顕微システムを使ってリアルタイムで追跡する。これは 1～数個のタンパク質分子の細胞内輸送をミリ秒の時間分解能で見るという前人未踏の技術である。本研究は，具体的で重要な生物学の課題を推進する力と，最先端の技術と装置作りを進める力という，理研内の２つの力（5 研究グループの力）を結集してはじめて可能となる。理研外ではなかなか実行できない研究である。

1.　タンパク質複合体の構造変化のリアルタイム観測

研究担当者：前田，山本，Popp[*1]，中村[*2]（前田構造生物化学研究室）

アクチンフィラメント上にあるトロポニンはカルシウムを受容しそのシグナルはアクチンフィラメント全体を“活性化”し，筋収縮を開始する。我々の結晶構造解析の結果は，トロポニンはヘリックスに富むタンパク質であり，カルシウム結合による構造変化のために多くのヘリックスが方向を大きく変化すると示唆される。ヘリックスの方向変化を直接観測するため蛍光単分子方位計測顕微法を開発している。本年度は以下の問題の解決に取り組んだ。(1) 顕微鏡の装置開発としては，四次元光学顕微鏡に全反射励起蛍光（TIRF：Total internal reflection fluorescence）観察用のレーザ入射光学系を株式会社 ニコンとともに開発した。(2) 機能を損なわない範囲でフィラメントの熱揺動を最小に抑える方法を検討したが，これについては未解決に終わった。(3) 2 価の蛍光標識分子を 2 種類合成した（京都大学 山本行男研究室との共同研究）。本研究に用いる蛍光色素は，一方では蛍光双極子がタンパク質表面に対していつも一定の方向に固定される必要があり，他方ヘリックスの形態に大きな歪みを与えない，すなわち機能を大きく損なわないとの要件を満たす必要がある。2 種類の蛍光分子は互いに“足”の長さが異なる。今後，どちらが上記要件をよりよく満たすか検討する必要がある。

本研究で開発した TIRF 顕微鏡を使って，1 本のアクチンフィラメントの実時間観察を行い，親水性のガラス表面で，かつ高分子の crowding agent（メチルセルローズ等）が存在すると，重合速度もフィラメント同士の結合 annealing 速度も，大きく加速される現象を発見した。細胞内の体積の 30%まではタンパク質，DNA，リボソーム，膜などで占められている。この体積から溶質分子は排除され，その熱力学的効果のために，細胞内ではタンパク質相互作用は加速されることが知られているが，アクチンの特性の変化の定量的な解析は初めてであり，細胞内でのアクチンの機能を解析する上で重要な示唆を与える。

蛍光寿命顕微鏡の開発では，ストリークカメラを用いた蛍光寿命顕微鏡システムを構築した。さらに，種々の蛍光ラテックス球を含んだ試料の蛍光寿命マッピングにより，その基本動作を確認した。

2.　高機能共焦点レーザー顕微システム時間分解能と空間分解能の改良開発

研究担当者：中野，松浦[*1]，竹内[*1]，上田[*2]，市原[*2]（中野生体膜研究室）；和田，斎藤[*1]（固体光学デバイス研究ユニット）；川井[*1]（戎崎計算宇宙物理研究室）

ニポウ式共焦点顕微鏡について，405 nm 励起用のレーザーを導入し，視野内の直径 1 mm 程度のスポットに任意の時間照射できるシステムを構築した。これにより，Kaede で標識した生細胞試料に光刺激を加え，緑→赤の蛍光変化を利用して，膜系のダイナミックな融合過程等をリアルタイムで観察することが可能になった。酵母のゴルジ体の槽間の膜の交換が非常に活発であること，一方植物のエンドソーム間では完全な融合は起こりにくく，kiss-and-run 様の相互作用が起こっていることを示した。

[*1] 協力研究員，[*2] 客員研究員

In this joint-project, we are developing new methods and instruments for optical microscopy to be used in biological research. On one hand, a single molecule analysis is to be established to measure structural changes of individual protein molecules/complexes. On the other hand, a confocal laser microscopy has been developed in order to observe directly the motion of lipid vesicles carrying a small number of protein molecules, in living cell and at msec time resolution.

In order to establish a system for single fluorophore

analysis for determining the orientation of a particular helix of a protein: (1) A TIRF (total internal reflection fluorescence) illumination system has been designed and added to our 4D microscope, with the help of Nikon. (2) Two species of fluorophores with two reactive groups have been synthesized. (3) Various methods have been tried to reduce the Brownian movement of actin filaments, which makes it impossible to determine the orientation of fluorophores, on objective glasses without spoiling the functions of actin filaments. We have not yet found a solution for this problem.

Using the other TIRF microsope, properties of isolated actin filaments in the presence of high molecular weight crowding agents near the surface of a hydrophilic glass surface. We have found that under such conditions, the rate of polymerization as well as of annealing are extremely accelerated.

A fluorescence life-time microscope equipped with a streak camera has also been constructed and tested.

The Nipkow confocal microscope was newly equipped with a 405-nm laser, whose irradiation could be applied to a *ca.* 1-mm diameter spot in the field. This system enabled us to photoconvert Kaede-labeled proteins from green to red fluorescence in organelles of living cells and to observe dynamic membrane fusion processes. We found that (1) membrane mixing between cognate Golgi cisternae occurs very rapidly and (2) plant endosomes undergo kiss-and-run type interaction.