

1 分子可視化技術を利用した核膜孔と輸送運搬体分子の相互作用を解析

今本尚子、徳永万喜洋、十川久美子

背景と目的

核—細胞質間分子輸送の基本メカニズムは明らかにされてきた。その一方で、分子が巨大な核膜孔複合体を通過するメカニズムについては激しく議論されているものの、未だに一致した見解は得られていない。本研究では、薄層斜光照明法 (highly inclined laminated optical sheet:HILO) により細胞内で1分子イメージング可能な顕微鏡システムを開発した徳永万喜洋博士との共同研究で、核膜孔複合体を通過する分子を直接観ることで、通過のメカニズムを明らかにすることができるかを試みた。

成果

従来の全反射顕微鏡では、細胞のガラス接着面を観察することができても、細胞内を観察することはできなかった。しかし、レーザーの照射角度を変化させると、顕微鏡の視野に細胞の厚みよりも薄い光 (厚み7-10 ミクロン) でスポットすることが可能になる (図1参照)。この薄層斜光照明法方法では、細胞観察で広く普及している顕微鏡の落射照明法よりも、8倍の高感度で蛍光観察が可能となる。界面活性剤ジギトニンで処理して作成したセミインタクト細胞を、核—細胞質間輸送の運搬体分子 importin- β と反応させると、細胞質と細胞核を隔てる核膜に存在する核膜孔複合体に集積する。GFP 標識した importin- β とセミインタクト細胞を反応すると、化学固定せずに核膜孔複合体を可視化できる (図2)。GFP 標識した importin- β と、その50倍量の未標識 importin- β を加えると、核膜孔複合体と相互作用する単一の GFP-importin- β 分子を、輝点の点滅として捉えることができる (図3)。一方、未標識の importin- β を加えずに、GFP-importin- β をセミインタクト細胞と反応させると、核膜孔複合体に集積するため、濃度に依存して輝点の蛍光強度が増加し、やがて飽和する (図4)。GFP-importin- β を結合させた1つの核膜孔複合体と、GFP-importin- β 1分子の定量的解析から、1つの核膜孔複合体には100~200分子の importin- β が結合し、その結合定数は1nm~数十nMと極めて高いことが明らかになった。

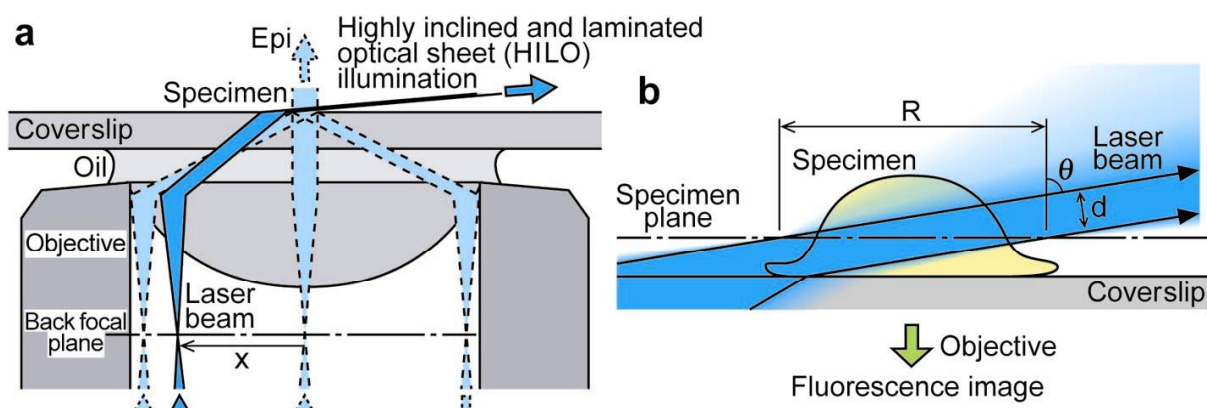


図1：左) 薄層斜光照明法を利用した、細胞内で1分子観察を可能にする顕微鏡システム。TIR:従来の全反射顕微鏡、Epi:一般に普及している落射照明法、HILO: 薄層斜光照明法。右) 薄層斜光照明法は細胞の厚みよりも薄いレーザー光 ($d=7-10\mu\text{m}$) で、顕微鏡の視野にスポットできるため、高感度観察が可能になる。

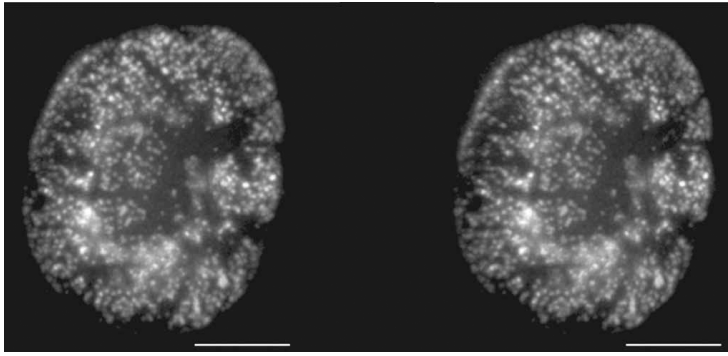


図2：核膜孔の立体配置を薄層斜光照明法で観察し、3次元画像として表示した。輝点が個々の核膜孔。核膜孔と相互作用する輸送運搬体分子（importin β ）に GFP を結合させて観察した。bar: 5 μ m

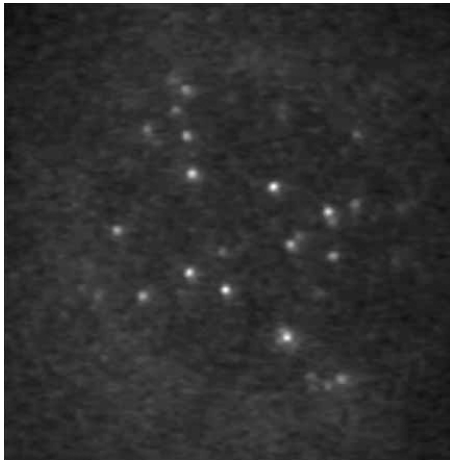


図3：核膜孔と相互作用する GFP 標識した輸送運搬体（importin β ）1分子の観察。ビデオレートの観察、8秒平均像。細胞内だが極めて明瞭な1分子観察ができることがわかる。

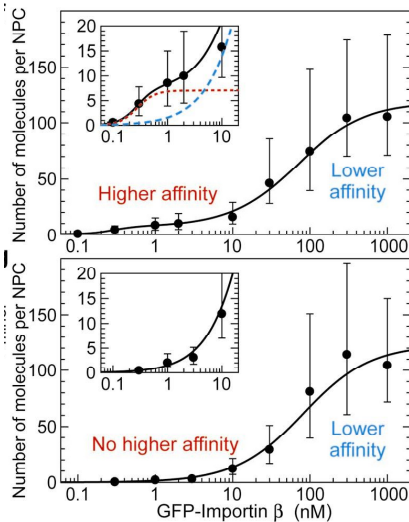


図4：GFP-importin- β を0.1nM～1 μ Mの範囲でセミインタクト細胞に反応させたときに、1つの核膜孔複合体の輝点の蛍光強度をプロットしたもの。GFP-importin- β の濃度に依存して、集積する分子数が増える。GFP-importin- β 1分子の蛍光強度（図3）と1つの核膜孔複合体の蛍光強度（図2）の定量的解析から、核膜孔複合体に結合する importin- β の最大数と結合定数が明らかになる。（上は運搬体単独、下は運搬体に基質を結合したもの）

細胞内には20を越える核内外輸送を担う、importin- β ファミリーが存在する。本研究中に、その中の1つ、CAS (exportin2) は importin- β のように、鮮明に核膜孔複合体に集積しなかった。このことは、同一の細胞の中に存在する、異なる輸送経路を担う各々の運搬体と核膜孔複合体との相互作用が必ずしも同じでなく、何らかの違いがあることが示唆される。輸送経路によって、どのような異なる制御を受けるかを明らかにすることは今後の重要な問題と思われる。

参考文献

- [1] Tokunaga M., Imamoto N., and Sakata-Sogawa K. Nat. Methods **5**, pp159-161 (2008).