

東北大学大学院理学研究科物理学専攻・数学専攻・天文学専攻

21世紀 COE 拠点形成プログラム

「物質階層融合科学の構築」

平成15年度リサーチ・アシスタント (RA) 研究報告書

氏名	秋山 信治
学籍番号	
専攻	東北大学大学院理学研究科 物理学 専攻
学年	博士課程後期3年の課程 3 年
指導教官	宮田 英威
研究題目	エバネッセント波蛍光顕微鏡法を用いた細胞骨格系ダイナミクスのリアルタイム観察
<p>I. 研究発表 (学術雑誌に15年度中に発表または掲載決定したもの、および15年度中の学会等での本人の発表)</p> <p><u>秋山 信治</u>, Andreas Jeromin, John Roder, 宮田 英威  <b>PC12 細胞の底膜近傍に見られる PIP<sub>2</sub> が局在した小胞の動態</b>          日本細胞生物学会, ピアザ淡海滋賀県立県民交流センター, 2003 年</p> <p><u>秋山 信治</u>  <b>エバネッセント波励起蛍光顕微鏡法による細胞骨格動態のリアルタイム観察</b>          東北大学附属浅虫臨海実験所・東北大学大学院理学研究科生物物理研究室合同セミナー,          東北大学理学総合棟, 2004 年</p>	

## II. 研究活動結果の概要

エバネッセント波蛍光顕微鏡法を用いて PC12 細胞の微小管のダイナミクスを観察した結果、細胞が突起を形成している活動的な部位においても、突起の形成が起こらない静的な部位においても非常に活発に微小管が重合、脱重合を繰り返している様子が確認された。また、アクチン皮層の観察では、アクチンフィラメントが数本束化して形成されるアクチンバンドルと思われる構造体が、静的な部位において運動している様子が確認された。これらは通常の落射蛍光顕微鏡法では全く確認することのできなかったものである。いずれの細胞骨格についても、細胞の動的な部位だけでなく、静的な部位においても活発に運動をする様子が観察されたことは興味深い。エバネッセント波蛍光顕微鏡法で観察される細胞の静的な部位は、細胞がガラス基質に比較的安定に接着している領域であると考えられる。そこでは細胞は接着構造を形成し、接着構造は微小管やアクチンフィラメントと相互に関係し合っていることが示唆されている。特にアクチンフィラメントが多数束化して形成されるストレスファイバーは、その一端が接着構造と相互作用して安定することが知られている。PC12 細胞は繊維芽細胞とは異なり、ストレスファイバーは形成されず、また明確な接着構造を形成しないという報告もあるが、その詳細は明らかになっていない。そのため、今後の研究では、観察された細胞骨格のダイナミクスが接着構造とどのように関係しているのかを明らかにしていく必要がある。

また、PC12 細胞における自家蛍光の観察において、輝点として観察される構造体が活発に運動する様子を捉えることに成功し、この輝点の運動の性質を画像解析により解析した。その結果、5 分間の観察時間内での各輝点の最大速度の平均は  $\sim 0.4 \mu\text{m/s}$  であり、最大で  $1.0 \mu\text{m/s}$  に達するものがあることが明らかになった。薬剤処理によって細胞骨格を破壊した細胞を用いて同様に輝点の観察を行なったところ、アクチンフィラメントを破壊した場合には、その運動の性質がほとんど変化しなかったのに対し、微小管を破壊した場合には、運動する輝点がほとんど観察されなくなった。このことから、この輝点の運動は微小管に依存した運動であることが明らかになった。実際、観察された輝点の移動速度は、過去に報告されている、モータータンパクを介して微小管上を移動する小胞の速度とよく一致することから、同様の機構で運動しているものであることが示唆された。

一方、この輝点として観察される構造体の正体を明らかにするために、間接免疫蛍光法によって、この構造体に多く存在していると考えられるタンパク質の調査を行なった。500nm 程度の波長の自家蛍光は、主にフラビンを持つ生体分子が発していると考えられている。また細胞内では、FAD や FMN といったフラビンを持つ分子が、様々な酸化酵素の補酵素として働くことが知られている。そこで、酸化酵素が多く存在していると考えられるペルオキシソームを可視化するために、抗カタラーゼ抗体による染色を行なった。ペルオキシソームも微小管に依存した運動を行なうことが知られている。しかし、ペルオキシソームの分布と自家蛍光を発する輝点の分布には相関が見られなかった。また、抗クロモグラニン B 抗体により、運動の性質が輝点のそれと類似している分泌顆粒の可視化も行なったが、その分布は一致しなかった。このため、自家蛍光を発する輝点の正体の解明には、さらなる研究が必要とされる。

今回の研究により、エバネッセント波蛍光顕微鏡を用いることで、PC12 細胞における細胞骨格のダイナミクスを詳細に観察できること、またそれらの細胞骨格に依存した細胞内小器官の輸送の動態も詳細に観察することができることが明らかになった。今後はこの方法を用い、細胞のエンドサイトーシス過程におけるエンドソームの運動の解析と、細胞骨格の役割との関係について研究を進めて行く予定である。