1PA065

クラスリン被覆ピットとカヴェオラの力学的強度
○佐藤 智(京大院・理)、Emmanuel Farge (Institut
Curie, Paris, France)、馬場 健(山梨医大・解剖)

クラスリン被覆ピットとカヴェオラは、形質膜上に存在する情報伝達に関与する膜ドメイン構造で、それぞれクラスリン、VIPs を足場に、特異的な受容体とアダプター、G タンパク質、キナーゼ類が集中している。これらの構造の形成原理と動的変化の物理的背景の解明は細胞情報伝達機構研究においても非常に重要なテーマである。

我々は、親水性残基ポリエチレングリコールを持つコレステロール誘導体(PEG-Chol)を細胞に投与し、クラスリン被覆ピットとカヴェオラを解析した。

(1)PEG-Chol を用いて細胞膜外葉の面積を数%増加させるだけでヒト細胞株における bulk membrane flow による液相エンドサイトーシスは顕著に低下した。カヴェオラの梨型フラスコ構造も PEG-Chol 投与によって平板化した。これに対し、クラスリン被覆ピットは強固で、そのエンドサイトーシスは、細胞膜外葉の面積を 20%増加させるほど投与して初めて低下しはじめた。

(2) エンドサイトーシスが低下すると、クラスリン被覆ピットは、その開口度が増加したものが出現し、その分布は bimodal であった。ただし、被覆の完全な平板化も被覆構造の数적減少も認められなかった。

これら結果を membrane tension asymmetry の導入による小胞化誘導モデルにもとづいて解析し、クラスリン被覆の力学的強度を計算した。クラスリン格子構造は脂質 2 分子層膜の 100 倍の力学的強度があると見積もられた。これに対しカヴェオラは、はるかに柔らかい構造体であった。この結果はクラスリンの集合による脂質層の加工がクラスリン依存性エンドサイトーシスの駆動源であることを強く示唆し、脂質膜の自発的変形→球状化にタンパク質の被覆化が付随するモデルはあてはまらない。

Satoshi B. Sato, Emmanuel Farge and Takeshi Baba: Distinct elastic strength of the clathrin-lattice and the caveolae.

1PA067

細胞膜の情報伝達受容体分子 2 量体化反応の 1 分子可視化解析
○佐甲靖志、柳田敏雄(阪大院医・情報生理)

多くの細胞内情報伝達受容系において、細胞膜の受容体の 2 量体化が情報伝達に不可欠であるとされているが、従来の生化学的手法では、この 2 量体化反応の詳細を明らかにすることは難しい。我々は、in vitro における蛍光 1 分子画像化法を改良し、生きている細胞で情報伝達蛋白質を 1 分子画像を得る方法を開発した。この方法を利用して、細胞膜受容体の 2 量体化とそれにつづく情報伝達反応の分子機構を解明することを目指して研究をおこなっている。

蛍光色素 Cy3 または Cy5 で 1:1 に標識した上皮成長因子(EGF)を生きている培養上皮細胞(HeLa, A431)の細胞膜に結合させ、対物レンズ型の全反射蛍光顕微鏡によって画像化した。1 分子が検出できていることは、1 蛍光スポットの褪色が 1 段階で起こること、それらの蛍光強度分布が量子化されていることにより確認された。

1 分子画像化により、Cy3-EGF の結合した EGF 受容体(EGFR)の運動を 1 分子毎に実時間追跡することができる。EGFR は 2 量体化により細胞内に情報を伝達するが、細胞膜上の 2 分子の EGFR が衝突によって 2 量体を作ることはまれであり、多くの 2 量体は溶液中の Cy3-EGF が細胞膜上の Cy3-EGF と EGFR の複合体近傍に結合することによって形成される。これは、EGFR が EGF の結合以前に、何らかの複合体を形成している可能性を示している。

さらに、Cy3-EGF から Cy5-EGF への蛍光励起エネルギー移動の測定により、EGFR 2 量体中に結合した EGF 2 分子間の距離の変化をナノメートルレベルの空間分解能で検出することが可能になった。エネルギー移動効率のゆらぎから、EGFR 2 量体の構造が秒オーダーでゆらいでいることが示唆された。

Y.Sako, T.Yanagida : Dimerization of signal transduction complexes in the plasma membrane of living cells analyzed by single molecule techniques.

1PA066

細胞内情報伝達過程におけるミトコンドリア膜電位変動の解析

○松山 愛、太田 善浩
東京農工大学大学院 工学研究科 生命工学専攻

《目的》

ミトコンドリアには膜電位を形成する呼吸鎖の電子伝達系が存在し、それを構成する酵素が Ca^{2+} により活性化されることが現在知られている。また、ミトコンドリア内膜には Ca^{2+} を輸送する機構が存在し、小胞体とともに細胞質の Ca^{2+} 濃度を調節する働きを持つ。本研究では、細胞外に ATP を刺激として与えることによりミトコンドリアの膜電位が領域ごとに変動を繰り返すことを見つけた。この膜電位変化を生じさせる要因として Ca^{2+} に着目し、ミトコンドリア膜電位と Ca^{2+} との関係を蛍光顕微鏡によるイメージングを用いて解析することを目的としている。

《実験方法》

細胞はウシ副腎皮質束状層の初代培養細胞を用い、培養 4 日目を使った。実験はミトコンドリアを電位感受性の蛍光色素で染色し、刺激として ATP $1 \mu\text{M}$ 、thapsigargin $20 \mu\text{M}$ 、CCCp5 μM を細胞外に加えて行なった。測定には CCD カメラを用い、一定時間ごとの細胞内ミトコンドリアの蛍光強度を測定して刺激に対する膜電位の時間変化を観察した。

ミトコンドリア膜電位の変化は蛍光色素の輝度変化をその指標としているが、膜電位変化に依存した変化であるかを確認するために Z 軸方向(ミトコンドリアの焦点とその上下 $5 \mu\text{m}$ の 3 点で同時に観察)での時間変化を測定した。

《実験結果》

蛍光色素で染色されたミトコンドリアは細胞全体にわたって網目状に観察された。CCCp の添加によりミトコンドリアの膜電位は消失するため、蛍光色素が拡散し輝度の低下が確認できた。ATP $1 \mu\text{M}$ は細胞外に添加することにより細胞内 Ca^{2+} 信号を引き起こすが、ミトコンドリア膜電位においても約 5 分以内には反応し始め、変動を繰り返す様子が確認できた。この領域ごとの膜電位変化は広がって存在するミトコンドリアで広範囲(細胞面積の約 1/5~全体)にわたって生じた。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる刺激として thapsigargin を添加した結果、ミトコンドリア膜電位の変化が確認できた。しかし ATP の場合とは異なり領域ごとの変化ではなく、ごく狭い範囲(ミトコンドリア 2、3 個単位)で観察された。

Z 軸方向の膜電位変化の観察は、ミトコンドリアの焦点において輝度が低下した際には上下 $5 \mu\text{m}$ の点においても輝度の低下を確認することができた。

現在、このような膜電位変化を生じさせる要因として Ca^{2+} に着目して実験を進めている。ATP 以外の刺激を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を生じさせ、それらに対するミトコンドリア膜電位の変化を観察して行く予定である。

A.Matsuyama, Y.Ohta : Analysis of change in mitochondrial membrane potential on intracellular signal transduction.

1PA068

EGF レセプター活性化の細胞内 1 分子可視化
○箕口 滋、佐甲靖志、柳田敏雄(大阪大学大学院・
医学系研究科・情報生理)

分子量約 170kDa の I 型膜タンパク質である EGF レセプター(EGFR)はチロシンキナーゼ型レセプター分子である。上皮成長因子(EGF)の結合によって EGFR は C-末端領域の 5 つのチロシン残基がリン酸化され活性化型となり、細胞内へ信号を伝達する。我々は EGFR 1 分子の入出力応答特性を検討する目的で、生きた細胞内での EGF の結合と EGFR の活性化を 1 分子レベルで観察できる実験系を構築した。Streptolysin O で膜透過性にした A431 細胞内に Cy3 標識した抗活性化型 EGFR 抗体を導入し、EGF の添加で刺激を与えた。標識抗活性化型 EGFR 抗体の細胞膜への結合を全反射型レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、溶液中の標識抗体はエバネッセント場での高速なブラウン運動のため明瞭な輝点とならないが、細胞膜に結合した抗体は拘束された 2 次元ブラウン運動によって輝点として捕らえる事が出来た。抗活性化型 EGFR 抗体の輝点数は EGF の添加に反応して 5~10 分で有意に増加し、1 時間後までさらに集積し続けた。細胞邊緣部で輝点が数珠状に並んで 1 次元ブラウン運動する様子も観察され、EGFR がアクチン繊維上に拘束されながらブラウン運動していると考えられた。抗体の集積には EGF と ATP の添加が必要なので、観察した輝点は EGFR の活性化に対応すると考えられた。さらに、Cy5 標識した EGF を用いて EGF の結合と EGFR 活性化の同時観察を行った。活性化された細胞では抗活性化型 EGFR 抗体の輝点数は結合した EGF よりも多く、両方の輝点位置の一致頻度も低かったことから、レセプターの一部は直接リガンドの入力なしで trans にリン酸化されて活性化している可能性も示唆された。

S. Minoguchi, Y. Sako, T. Yanagida : Single molecule imaging of EGFR activation in living cells.