1PD045

レーザーが誘起する脂質チューブの振動
○野村 慎一郎(京都大・院・理)

脂質二分子膜で構成されるチューブ構造体が、光ピンセットによって光軸方向に捕捉されること、およびその際に振動現象が生じることを見出したので報告する。このチューブは直径数 μm 、長軸長が数十～百数十 μm の長さの多重膜構造をとっている。二分子膜を構成する脂質分子(今回用いたのはPC, DOPC)が誘電体としての性質によってレーザー光束の電場勾配に引き付けられ、これによってリボソームや脂質チューブが捕捉される。

脂質チューブは、被捕捉時にその長軸方向がレーザーの光軸に平行になるように立ち上がる。その際、チューブがX-Y方向(顕微鏡のステージ平面方向)に振動する現象が観察された(図)。重水溶媒中では振動現象が観察されないことから、振動の原因としては、捕捉用レーザーの波長(830nm)の倍音領域に水の0-H伸縮振動が吸収帯を持つことに起因して焦点付近で生じる局所熱の影響が考えられる。また、振動の周期はレーザーの出力に依存して変化することが明らかになった(グラフ)。この振動のメカニズムについて考察する。

図. 脂質チューブに対する光トラップの様子。矢印がレーザーの焦点を示す。上段: 捕捉されゆく脂質チューブ。時間間隔は4秒。下段: 振動するチューブ(影の部分)。時間間隔は1秒。スケールバーはそれぞれ10 μm 。

グラフ. レーザー出力に依存する脂質チューブの振動周期の変化の様子。焦点付近の1画素あたりの光学濃度の時間変化により計測した。

S. Nomura: Laser induced Phospholipid-Tube Oscillation.

1PD047

Single Particle Orientational Tracking (SPOT) of Membrane Bound Molecules,

○Ken Ritchie¹ and Akihiro Kusumi^{1,2}

(¹JST-ERATO, ²Nagoya University, Science Dept.)

By attaching single colloidal gold particles to single (or few) integral membrane proteins and tracking their diffusion individually, insight has been gained into the role of the underlying membrane skeleton in the organization of the proteins in the fluid bilayer. From such studies it is believed that the cytoskeleton organizes the membrane through both direct binding to the cytoskeleton and through steric interactions that tend to temporarily corral the membrane constituents inside skeleton formed fences. Although much can be explained through this simple and elegant model, still many proteins undergo an anomalous diffusion through the bilayer that does not fit easily in the above picture. To further probe the interaction of integral membrane proteins with the underlying network, lipid domains and other membrane proteins, we have developed single particle orientational tracking (SPOT) where the translational and rotational diffusion of single/few membrane proteins is simultaneously monitored. A $\sim 1\mu\text{m}$ piece of fluorescent actin is attached to an antibody or ligand for a membrane protein through a colloidal gold particle and is used as a reporter of orientation. Preliminary work on the diffusion of the transferrin receptor in normal rat kidney (NRK) cells will be discussed as a prototypical example.

1PD046

膜融合初期過程の分子動力学シミュレーション

○太田里子¹, Marta Pasenkiewicz-Gierula², 高岡雄司³, 宮川博夫³, 北村一泰³, 楠見明弘^{1,4} (¹ERATO, JST, ²ヤギョウオ大学, ポーランド, ³大正製薬・創薬研, ⁴名大院・生命理学)

膜融合は細胞内の膜系の至る所で生起しており、タンパク質によって媒介されている。我々は、これらのタンパク質の主な役割は二つの膜表面を十分に引き寄せることであり、二枚の膜を密着させれば、リン脂質膜自体の性質として融合が進むと考えている。そこで我々は、膜融合の初期において、二枚のリン脂質二重層膜が密着した時、どのような脂質分子の配置変化と運動が起こるのかについて分子動力学シミュレーションを用いて検討してきた。

初期構造として二枚の膜を並べ、膜間の水分子の数をかえた3つの系を作成した。DMPC一分子あたり5個の水分子が水素結合することがわかっているため、膜間の水分子を5個/lipid(W5)、2個/lipid(W2)、0個/lipid(W0)とした。3つの系の2nsの平衡化の後、次のような大きな膜構造の変化が生じた。

膜が接している内側の層では、アルキル鎖を末端のC14からC10まで疎水部分の外へ出したDMPC分子が現れた。そのような分子の数は、56分子中7分子(外側の層では56分子中1分子)であり、膜間の水分子を減らすとともに増加した。

さらに、DMPC-DMPC、DMPC-水分子間相互作用の変化について検討した。W5、W2、W0全ての系において、膜が接している内側の層では、コリン基と向かいの層のDMPCのリン酸基とのソルトリンクの形成が見られた。W5、W2では、リン酸基に水素結合している水分子がはずれ、コリン基とのソルトリンクに交換する様子が見られた。交換は数百ps程度で生じた。W0では全ての分子が層間でソルトリンクを形成した。その数は1分子あたり3.6対にも達し、層内で作る対の数よりも多かった。

これらの結果は、二枚の膜を、それらの間に水分子が少なくところまで密着させると、水素結合した水分子がはずれ、膜の間でソルトリンクが形成されることが、また、脂質分子の配向に変化が生じて膜融合が進む可能性がある、ということを示す。

S. Ohta, M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitagawa, A. Kusumi: Molecular dynamics simulation of the initial stages of membrane fusion

1PD048

エンドソーム内のトランスフェリン分子数の測定

—密度のゆらぎを利用した分子の計数法—

○堺立也 (川崎医大・微生物)

エンドソームは、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれた分子の選別をおこなう膜器官である。エンドソームは自身の一部の領域に分子を集めさせ、次にその領域を膜分裂させることで特定の分子を他から分けている。エンドソームの選別装置としての性能を知る上で、選別を受ける分子が一個のエンドソームに何分子存在し、そのうち何分子が膜分裂の領域に集まるかを明らかにすることは重要である。

本報告では、エンドソームに含まれるトランスフェリン分子数を、その分布の偏りを利用して測定したので報告する。トランスフェリンは受容体媒介エンドサイトーシスによりエンドソームに取り込まれる。エンドソーム内ではトランスフェリンは常に受容体を介し膜に結合している。そこで蛍光標識したトランスフェリンを培養細胞(A431)に与え、エンドソーム膜上での分布を共焦点顕微鏡顕微鏡を用い観察した。エンドサイトーシスされた蛍光トランスフェリンの多くは、2-5 μm の管状のエンドソームに観察された。またエンドソーム内の蛍光の分布は均一ではなく密度の差が存在した。しかし10-30秒間の時間平均を取ると蛍光はエンドソーム全体にほぼ均一に分布した。これは密度の差が一時的なもので、分子のランダムな運動で生じる偏りであることを示している。次に、偏りの程度から分子数を計算するため、エンドソームを0.3 μm 間隔のユニットに分割し各時間の各々のユニットに含まれる蛍光強度を測定した。全ユニットの蛍光強度の分布が二項分布にしたがうと仮定し、その分散からエンドソームに含まれる分子数を計算すると、エンドソーム1 μm 当たり40-120分子のトランスフェリンが含まれることが分かった。

T. Sakai: Counting of Transferrin Molecules in Endosome