1B0940

1 分子蛍光観察による生細胞形質膜上の膜タンパク質の運動と局在の可視化解析

○飯野 亮太¹、小山 郁子²、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技団・ERATO、² 名大院理・生命理学)

膜タンパク質は細胞膜上で一様な分布をしているわけではなく、細胞間/細胞-基質間接着構造、クラスリン被覆構造、カベオラなどのように、機能発現のために特定のタンパク質が集合して膜ドメインを形成することが多い。これらの膜ドメインの形成には、膜タンパク質の拡散運動を制御し細胞膜の特定の領域への局在化を誘導する機構が不可欠である。本講演では、生細胞形質膜上の膜タンパク質の運動と局在について、1 分子蛍光観察によって得られた最近の知見を紹介する。主なトピックは以下の3つである。

- 1) 細胞間接着を担う E-カドヘリンと GFP との融合タンパク質 (E-cad-GFP) 1 分子を可視化し、接着領域以外の自由表面においても E-cad-GFP が会合体を形成していることを見いだした。また、会合数の増加とともに E-cad-GFP の運動性が大きく減少した。
- 2) E-カドヘリンの細胞間接着領域への集合を Cy3 標識抗 E-カドヘリン Fab を用いて観察した。細胞外 Ca^{2+} イオンを上昇させた時に新規に誘導された細胞間接着領域にトラップされる E-カドヘリンが観察された。
- 3) 上皮成長因子受容体 (EGFR) がカベオラやラフトなどの膜ドメインに局在することが情報伝達の制御にかかわっているとの報告がある¹。EGF または抗 EGFR 抗体を蛍光標識して 1 分子観察し、EGFR の情報伝達に伴う膜ドメインへの局在の変化を観察した。

1. C. Mieno, G. N. Gill and R. G. W. Anderson. 1999. JBC. 272. 30636.

R. Iino, I. Koyama, A. Kusumi : Single molecule imaging analysis of the movement and localization of membrane proteins in the plasma membrane of living cells.

1B1020

細胞内情報伝達反応の 1 分子観察

○佐甲 靖志¹、上田 昌宏¹、一ノ瀬 純也³、宮内 崇行¹、上村 武²、日比野 佳代²、太田 康友¹、柳田 敏雄^{1,2,3} (¹ 阪大・院医、² 阪大・院基礎工、³ ICORP・1 分子過程)

我々は細胞内情報伝達反応の分子機構を明らかにするために、1 分子蛍光イメージング法を利用して、細胞内の情報伝達分子の動態を 1 分子解析している。

本講演では、

- (1) 上皮成長因子受容体の 2 量体化と自己リン酸化反応
- (2) 上皮成長因子受容体とアダプタータンパク質の相互作用
- (3) 上皮成長因子による細胞内カルシウム応答
- (4) 低分子量 G 蛋白質 Ras からリン酸化酵素 Raf-1 への情報伝達
- (5) Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性化
- (6) cAMP による細胞性粘菌の走化性応答

について、1 分子イメージングその他の画像を紹介する。情報伝達分子の細胞内での局在、運動、局在変化、結合・解離、会合、化学反応などを個々の分子について観測することが可能になってきている。

Y.Sako, M.Ueda, J.Ichinose, T.Miyauchi, T.Uyemura, K.Hibino, K.Ohta and T.Yanagida : Single-molecule imaging of intracellular signaling.

1B1000

GPI アンカー型タンパク質 CD59 のラフトへの出入りとシグナル伝達の可視化解析

○鈴木 健一¹、実松 史幸²、藤原 敬宏¹、楠見 明弘^{1,2} (¹ EARTO・JST、² 名大・院理)

多くの膜タンパク質の機能は、膜タンパク質が適切に局在・集合することによってはじめて発現する。さらに、機能の調節が局在・集合によっておこなわれることも多い。最近、情報伝達分子はたらくプラットフォームと考えられるようになったラフトはまさにこのようなやり方で機能の発現や調節をおこなっている可能性がある。しかし、ラフトの大きさ、寿命、構造、組成 (GPI アンカー型タンパク質、スフィンゴ糖脂質、コレステロールなどが多いと言われている)、分子の出入りなどの基本的な情報が全くない。ラフトは可視化する方法が未だなく、これはラフトが数 10 から数 100nm と小さい、一つのラフトの中に同じ分子種が少数しかないので免疫電顕で分子の濃縮が見えない、寿命が短い/分子の滞在時間が短い、各ラフトで組成が異なる、などが理由であると考えられる。これらの問題を避けてラフトの構造と機能の問題にアプローチするため、GPI アンカー型タンパク質 CD59 の運動を 1 分子レベルで 25us の時間分解能で追跡した (一粒子追跡法)。一般講演 (本年会鈴木ら) で要点はまとめるが、本講演では画像データを紹介する。

- (1) リガンド刺激をすると、CD59 は一時的 (約 0.3-1 秒) に直径 130nm ほどの領域に一分間に平均 12 回位停留するようになった。コレステロール除去後やアクチン線維脱重合後にはこの一時停留は劇的に減少した。
- (2) CD59 をクロスリンクする金コロイド標識は、結合して約 2 分で運動が止まった。静止した金コロイドはしばしば直線上に並んでいた。この直線上に、(1) の一時停留した金コロイドがくることも多かった。
- (3) 細胞内へ取り込まれ、その後一方向性の移動をする CD59 が観察された。
- (4) CD59 の一時停留と細胞内カルシウム濃度上昇の相関を検討した。

K.Suzuki, F.Sanematsu, T.Fujiwara and A.Kusumi : Imaging analysis of frequent visits of a GPI-anchored protein CD59 on rafts in signal transduction

1B1040

サイズ・パターン制御されたニワトリ胚培養心筋細胞ネットワークの研究

○新原 岳雄¹、大沼 清²、石渡 信一¹、安田 賢二² (¹ 早大・理工・物理、² 東大・院・総合文化)

【目的】神経細胞は刺激に対する応答のヒステリシスをネットワークパターン中に記憶することが一般に知られている。心筋細胞も培養を行うとネットワークを作り、同調拍動し始めることは知られているが、形成されたネットワークの形状パターンが、刺激に対する拍動応答にどのようなヒステリシスをもたらすかは未だ詳しく研究されていない。そこで我々は培養心筋細胞群のサイズやパターンを自在に制御する手法を新たに開発し、形成した心筋細胞ネットワークの形状・サイズと拍動ヒステリシスの関係を明らかにしようとしている。

【実験方法】培養皿のガラス底面をアガロース (0.15%) で一度コートした後、その上にコラーゲン溶液 (0.05%) を任意の形状に塗布することで心筋細胞ネットワークの形状を制御した (下の写真はマイクロアイランド法によるもの)。この培養系では細胞 (ニワトリ胚培養心筋細胞) はアガロース上には張り付かず、アガロース表面に点状するコラーゲン上にはのみ張り付くため、さまざまなサイズやパターンの心筋細胞ネットワークを作成することができる。そこで様々なパターンのネットワークについて電気的摂動に対する拍動応答のヒステリシスを調べた。本年会ではそれらの詳細な結果を報告する。

T.Shinbara, K.Ohnuma, S.Ishiwata and K.Yasuda : Studies on size- and pattern-controlled network of embryonic chick myocardial cells in culture