1J1130

上皮成長因子に応答した cRaf-1 キナーゼの細胞内局在変化の可視化解析

○日比野 佳代¹、佐甲 靖志²、岩根 敦子²、岡田 知代³、片岡 徹³、柳田 敏雄^{1,2} (¹ 阪大・基礎工・システム人間系、² 阪大院・医・情報生理、³ 神戸大・医・第2生理)

細胞増殖、分化に関与するセリン/スレオニンキナーゼ cRaf-1 は(以下 Raf1 とする) 低分子量 G 蛋白質 Ras からのシグナルを MAP キナーゼ経路へ伝える。細胞膜の Ras が上皮成長因子 (EGF) 等の細胞外刺激で活性化されると、細胞質にある Raf1 は活性型 Ras に結合し、その後、膜下の因子により活性化されると考えられている。しかし、生きた細胞内での Raf1 の局在変化の制御機構や、Ras と Raf1 の相互作用の様子は不明である。

我々は、GFP と Raf1、GFP の変異体 YFP と Ras との融合タンパク質を HeLa 細胞に発現させ、その細胞内分布変化を蛍光顕微鏡で観察した。恒常的活性型変異体 Ras^{V12} と共発現すると GFP-Raf1 は細胞膜に局在した。また、EGF 刺激で野生型 Ras を活性化すると、GFP-Raf1 は刺激後 5-10 分で細胞質から細胞膜へ局在変化した。この局在変化は微小線維や微小管を破壊しても同様な時間経過で起きた。これより、Raf1 の局在変化は細胞質中を拡散する Raf1 が細胞膜の活性型 Ras に補足されて起こると示唆された。

次に YFP-Ras と GFP-Raf1、あるいは蛍光 EGF と GFP-Raf1 を同時観察すると、蛍光 EGF 結合や、YFP-Ras の局在がみられる部位でも、GFP-Raf1 が濃縮しないところもあった。刺激後 30-60 分で GFP-Raf1 の細胞膜への濃縮はほとんど解消されたが、葉状仮足や膜ラフリング部位では 60-90 分後も YFP-Ras、GFP-Raf1 が共局在した。すなわち、GFP-Raf1 の細胞膜への局在変化は、細胞膜全体に均一に起きるのではなく局所的に起きる。これは、細胞膜の部位により Ras の活性化状態が異なることを示し、細胞内情報伝達経路の時間的・空間的な特性の理解につながると考える。

K. Hibino, Y. Sako, A. H. Iwane, T. Okada, T. Kataoka and T. Yanagida : Spatiotemporal dynamics of Ras/cRaf-1 interaction in the plasma membrane of living cells

1J1315

エバネッセント場蛍光顕微鏡による GFP チューブリン動態のリアルタイム観察

○秋山 信治、大木 和夫、宮田 英威 (東北大・院理・物理)

培養基質上の繊維芽細胞の移動および形態形成には、微小管に依存した様々な制御機構が関与している。最近、新たに微小管が焦点接着の消失や底膜の凹凸構造の形成過程に関与していることを示唆する報告があった。しかし、それらの過程における微小管の具体的な動態や機能については不明な点が多い。そこで我々は、細胞の底膜近傍における微小管の動態をより詳しく観察することを目的に、エバネッセント場蛍光顕微鏡を用いたリアルタイム観察を試みた。

本研究では、GFP チューブリン遺伝子を導入・発現した Swiss 3T3 Cell を flow chamber 内に培養し、落射蛍光顕微鏡およびプリズム型のエバネッセント場蛍光顕微鏡 (レーザー光の波長: 473nm) の下で数分おきに 2-3 時間観察を行った。落射蛍光法では、核近傍で非常に明るく、細胞内のそれ以外の領域では、ある程度一様に蛍光が分布していることが見られた。しかし、エバネッセント場励起により、培養基質面から距離にして 100nm 程度の範囲内に存在する GFP チューブリンの輝度分布を観察すると、落射蛍光法で観察した時とは異なるむらが見られ、主に細胞の核近傍に見られる暗い領域と細胞の周辺部に現れる線状の明るい構造体が確認された。むらの原因としては細胞底膜と基質との距離が一様でないことが考えられる。同一細胞を連続して観察した結果、基質に対する細胞移動と形態変化に伴って輝度分布も変化した。核近傍の暗い領域を含めて、観察時間内では基質に対してほとんど移動しない暗い領域が確認された。この輝度分布の変化は、落射蛍光顕微鏡による観察との比較から、細胞の底膜構造と基質面との距離の変化を反映した結果であると考えられる。

S.Akiyama, K.Ohki and H.Miyata : Dynamics of GFP-tubulin revealed by evanescent wave microscopy

1J1145

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) による低分子量 GTP 結合蛋白質活性化の細胞内観測

○宮内 崇行¹、佐甲 靖志¹、柳田 敏雄^{1,2} (¹ 阪大院・医・情報生理、² 科技振・1 分子過程プロジェクト)

Rho ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白質 (Rho family small GTPase) は、Rho, Rac, Cdc42 などから構成され、主にアクチン系の細胞骨格を介して細胞の形態や細胞間接着など様々な細胞機能を制御している。Rho 分子が特定の領域で選択的に活性化されることが、細胞が空間的な構造を構築する上で極めて重要なプロセスであり、それら「局所的な」活性化の検出を可能にすることは、細胞生物学における重要課題の 1 つに数えられている。

我々は、Rho 分子活性化の検出を実現して、細胞が空間的な情報を伝達する過程を可視化しようと試みた。低分子量 GTP 結合蛋白質は、グアニンスクレオチド交換因子 (GEF) の作用に伴い、通常結合している GDP が GTP へと置換されて活性化型へ構造変化する。「蛍光ラベルした Rho 分子と、蛍光ラベルした GTP との複合体」の細胞内分布と存在量変化を測定することで、内在性の GEF の作用を可視化しようというのが我々の選択した戦略である。

現在までに、培養細胞に YFP 融合 Rho (RhoA, Rac1, Cdc42) を発現させた後、蛍光 GTP を導入して、両者の複合体形成により生ずる FRET を測定することで、細胞外刺激下流の Rho 分子の活性化を可視化することに成功した。細胞は PC12 および NIH 3T3 を使用した。蛍光 GTP の導入にはエレクトロポレーション法を採用し、細胞外刺激には Bradykinin, EGF, NGF, そして LPA を用いた。

現在 Ras をはじめとする他の GTP 結合蛋白質においても我々の開発した手法が応用可能かどうか実験を進めている。*E. coli* に発現させた GST 融合 Rho::YFP を用いて、蛍光 GTP との kinetics 解析、および FRET の評価実験の結果と合わせて報告する。

T. Miyauchi, Y. Sako, and T. Yanagida : *In vivo* observation of the locations of activated small GTPases via fluorescence resonance energy transfer (FRET)

1J1330

MAP2 の微小管への結合様式

○市原 浩司、宝谷 紘一、伊藤 知彦 (名大・院・理・生命理学)

微小管は 13 本の平行なプロトフィラメント (以下 pf) からなる管状のチューブリン重合体であり、その両端で重合・脱重合を自発的に繰り返す動的不安定性を示す。我々はこの動態の制御因子の 1 つである MAP2 が、微小管上にクラスターを形成して結合し、そこで脱重合を停止させることを見出した (昨年度年会)。この脱重合停止の分子機構はどのようなものなのか? 微小管の脱重合の際には、pf が外に向かって「反り」ながらはがれ落ちることが知られている。したがって、クラスター部分では 1) 「反り」が抑えられている、2) pf 間の結合が強くなっている、という 2 つの可能性が考えられる。この詳細を調べるため、チューブリンポリマーの多型性を用いて MAP2 の pf に対する結合様式を検討した。

亜鉛イオンにより形成される Zn-sheet は pf が隣同士互いに逆方向に、しかも裏表を繰り返した構造をしている。我々は管状構造が開いて裏面が露出した C-tubule を用いて、pf の裏面には MAP2 が結合しないことを確認した。そこでもし MAP2 が微小管の隣接する pf にまたがって結合するならば、Zn-sheet の隣の pf には結合できないので Zn-sheet への MAP2 の結合量が低下することが予想される。しかしながら、Zn-sheet には微小管の場合と同程度の MAP2 が結合しており、結合力の塩濃度に関する感受性もほぼ同じであった。

以上の結果から、MAP2 の微小管への結合は、pf をまたがったものであるよりは、pf に沿ったものである可能性が高い。よって、MAP2 は微小管の pf をまたがってそれらを束ねることによって脱重合を止めるというよりはむしろ、pf に沿って結合した多数の MAP2 がそれらの反り返りを抑えることによって脱重合を停止させているものと思われる。

K.Ichihara, H.Hotani and T.J.Ittoh : Mode of binding of MAP2 onto microtubule lattice