V2E1400

ミオシン V 及びミオシン VI の 1 分子運動イメージング-ミオシン VI はプロセッシブモーターである-

○西川 そう¹、本間 和明²、小森 靖則¹、岩城 光宏³、田中 裕人⁴、喜多村 和郎⁴、岩根 敦子^{3,4}、池辺 礼子²、池辺 光男²、柳田 敏雄^{1,3,4} (¹ 阪大院・基礎工、² Dept. of Physiol., Univ. of Massachusetts Medical School、³ 阪大院・医・第一生理、⁴ 科技振・1 分子過程プロジェクト)

ミオシン V は 1 分子で F-アクチン上を B 端方向にプロセッシブに運動することが知られ、6 つの軽鎖を結合する長いネックを使って大また (35nm) で歩行するモデルが提唱されている (首振り説)。一方、1 つの軽鎖を結合する短いネックを持ったミオシン VI は、F-アクチン上を逆向き (P 端方向) に移動することが示唆されているが、1 分子でプロセッシブに運動するか否かはわかっていない。今回、我々は全反射顕微鏡を用いて、GFP を融合したミオシン V およびミオシン VI の 1 分子の運動を直接観察した。ミオシン V については、これまでの報告と同様、F-アクチンに沿ったプロセッシブな運動が確認された。また、ミオシン VI は 1 分子で P 端方向にプロセッシブに運動することが観察され、レーザートラップを用いたナノメトリによるステップサイズは 35 nm であった。長いネックを持たないミオシン VI が、大きなステップでプロセッシブに運動することは、ミオシン V で提唱されたような歩行モデルでは説明できず他の運動メカニズムを示唆するものである。本講演では 1 分子イメージングの解析結果およびステップサイズの詳細について紹介し、プロセッシブモーターの運動メカニズムについて議論する。

S.Nishikawa, K.Homma, Y.Komori, M.Iwaki, H.Tanaka, K.Kitamura, A.Iwane, R.Ikebe, M.Ikebe, T.Yanagida : Imaging of Single Myosin V and VI Moving along Actin Filaments

V2E1440

Assembly of individual Toxin Monomers into Oligomers on Human Red Blood Membrane visualized by Single Molecule Fluorescent Microscopy
○Nguyen Vananh, Higuchi Hideo, Kamio Yoshiyuki (Faculty of Agriculture, Tohoku university)

LukF (F) and Hlg2 (HS), which are bi-component proteins of Staphylococcal gamma-hemolysin (gHL), bind and assemble into channel-forming oligomers, thereby bursting human red blood cells. Using total internal reflection fluorescent microscope combining with fluorescent labeled single cysteine replacement mutants: TRM-F-S45C (Rhodamin, Ex:540nm, Em:570nm) and IC5-HS-K222C (Ex: 650nm, Em: 670nm), properties of single F, HS monomers and individual F+HS oligomers on ghost cells in aqueous buffer were imaged. We reported that TRM-F and IC5-HS, which existed in aqueous solution as monomers, could spontaneously bind onto membrane even at low protein concentration of about 500pM and 2nM respectively. Their membrane-bound monomers both had three different states: (i) unconfined bilateral diffusion (D), (ii) restricted movement (R), which was close to immobilization and (iii) combination of restricted and free movement (D-R). This result indicates the interaction of F and HS with both lipid and cytoskeleton-achored membrane protein upon their binding on membrane. The membrane-bound F+HS oligomers, which obtained at low concentration of F and HS about 2nM, exhibited only (R) state. About 80% FRET efficiency between TMR of F and IC5 of HS occurred in agreement with a close distant less than 5nm between F and HS in a oligomer, which potentially further assemble into a pore. New insights are brought concerning the distribution, molecule interaction dynamic, motion, of gamma-hemolysin components in assembly process on red blood cell membrane.

Vananh T. Nguyen, Hideo Higuchi and Yoshiyuki Kamio : Assembly of individual Toxin Monomers into Oligomers on Human Red Blood Membrane visualized by Single Molecule Fluorescent Microscope

V2E1420

上皮成長因子受容体を介した情報伝達反応の 1 分子可視化解析

○森松 美紀¹、太田 康友²、一ノ瀬 純也¹、日比野 佳代²、宮内 崇行³、上村 武²、佐甲 靖志^{1,3}、柳田 敏雄^{3,4} (¹ PRESTO・JST、² 阪大院・基礎工、³ 阪大院・医学系・情報生理、⁴ ICORP・JST)

細胞膜上に存在する上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor、以下 EGFR) は、EGF と結合すると、自己リン酸化を引き起こす。すると細胞内ではアダプター分子が EGFR のリン酸化チロシン残基を認識して結合し、更にその情報を細胞内に伝達する。今までこれらの情報伝達についての研究は、細胞全体での平均的な反応を追うのが主であった。しかし、本来細胞内の反応は不均一なものであり、情報伝達を担う分子の局在性やその反応の時間経過には偏りがあるかもしれない。従って、生きた細胞内での 1 分子の動態を調べることで、1 分子ごとの結合・解離速度、結合頻度などの知見が得られ、より詳細に解明することが可能になるであろう。

今回我々は、EGFR とアダプター分子である Grb2 と Shc の相互作用を 1 分子レベルで可視化することに成功した。細胞は、培養上皮細胞 (A431) の細胞膜を Streptolysin O 処理により部分的に透過性にしたセミンタクト細胞を用いた。Cy5 でラベルした EGF で細胞を刺激した後に、リン酸化チロシン残基を認識する Grb2 と Shc の SH2 ドメインをそれぞれ大腸菌で発現させ精製し Cy3 でラベルしたものを、細胞内に導入した。EGFR の位置は Cy5-EGF の結合位置で確認し、その後 Cy3-SH2 ドメインを観察した。今回はこの結合、解離の様子をビデオでお見せし、解析結果を示す。

また合わせて、細胞膜上での EGFR の動態の 1 分子観察、EGFR のリン酸化とその増幅の 1 分子観察、Ras と Raf1 1 分子の細胞膜上の動態、FRET による Rho GTPases の可視化、細胞に結合した EGF とカルシウム応答、などについての動画を上映し、EGFR の情報伝達反応のメカニズムについて考察する。

M.Morimatsu, K.Ota, K.Hibino, T.Miyauchi, T.Uyemura, Y.Sako and T.Yanagida : Single molecule analysis of signal transduction through epidermal growth factor receptor

V2E1500

1 分子蛍光法による、クラスリン被覆ピット構成分子 (アダプター、受容体) 局在化過程の可視化解析

○藤原 敬宏¹、村越 秀治²、飯野 亮太¹、Gaidarov Ibragim³、Keen James³、楠見 明弘^{1,2} (¹ 楠見膜組織能プロジェクト・ERATO・JST、² 名大院・理・生命理学、³ Thomas Jefferson University)

アダプター分子 AP2 は、受容体の細胞質部分とクラスリン分子の両方に結合する。このため、受容体のクラスリン被覆ピットへの局在化を担っていると考えられているが、その機構は全く解っていない。本研究では、AP2 が細胞質から細胞膜へリクルートされピットに組み込まれる過程、受容体と相互作用する過程、それらへの膜骨格の関与を 1 分子レベルでの可視化解析により明らかにすることを目的とした。本講演では、AP2 とトランスフェリン受容体がクラスリン被覆ピットに組み込まれる過程を調べた 1 蛍光分子イメージング、及び、多分子蛍光イメージングのうちから、以下のトピックに関する画像データを紹介する。

(1) GFP 融合 AP2 を ECV304 細胞に発現させ、AP2 が細胞膜上で形成する集合体 (ピット) の動態を落射蛍光法で観察した。これらの集合体は、細胞膜上の特定の場所の近傍で 20-80 秒おきに形成/消失を繰り返しており、しかもゆっくりと拡散運動していた。この運動は蛍光スポットの輝度 (即ち集合した AP2 の個数) の増加とともに抑制された。(2) 1 分子蛍光法を用いて AP2-GFP の 1 分子運動を観察したところ、AP2 はモノマーで細胞質から細胞膜へのリクルートされることがわかった。このリクルートはピットへ直接、あるいはピットの近傍でおこなわれていた。(3) ピットへ直接入る他にも、細胞膜上を拡散してピットに (から) 入っていく (出て行く) 成分の両方が存在する。このときの膜上を動いている AP2 の拡散係数は、トランスフェリン受容体と同程度であった。蛍光標識トランスフェリンとの 2 色同時 1 分子観察により、トランスフェリン受容体の一部は、ピットに取り込まれるまでに細胞膜上で AP2 と挙動を共にすることが示唆された。

T. Fujiwara, H. Murakoshi, R. Iino, I. Gaidarov, J. Keen, and A. Kusumi : Single molecule imaging of localization processes of receptors and adaptor molecules AP2 into clathrin-coated pits