2P093

ニワトリ胚背根節由来の神経成長円錐における Cy3 NGF-受容体コンプレックスの挙動：1 分子可視化技術を用いた観察

○谷 知己¹、宮本 善一²、藤森 一浩³、田口 隆久³、柳田 敏雄²、佐甲 靖志^{2,4}、原田 慶恵¹ (¹ 東京都臨床研、² 阪大院・医学系、³ 産総研・関西センター、⁴ PREST.JST)

神経軸索の先端に存在する成長円錐と呼ばれる構造は、運動性を持ち、1 時間に数十ミクロンの速さで移動する。この成長円錐の運動活性やその移動方向は、神経成長因子や、ガイダンスキューと呼ばれる分泌性蛋白質の空間分布に依存している。これらの物質に対する成長円錐の運動制御機構を明らかにする目的で、ニワトリ胚背根節由来の神経成長円錐を実験材料として、Cy3 によって蛍光ラベルされた神経成長因子 NGF と、成長円錐膜上の受容体との相互作用を、1 分子可視化技術を用いて観察した。NGF のフリーのカルボキシル基をメルカプト基に置換し、ここに共有結合で Cy3 を導入することによって Cy3 NGF を合成した。培養溶液から NGF を除くと、成長円錐の運動は停止するが、この後に 1nM の Cy3 NGF を投与すると、投与から 10 分以内に成長円錐からラフリング膜が発生し、成長円錐の運動が再開される。運動を再開した成長円錐膜上には多数の Cy3 NGF が結合しているが、その分布は成長円錐表面全体に様で、局所的な差異は認められなかった。成長円錐膜上に結合した Cy3 NGF のふるまいは、明瞭に区別することが可能な 2 つの様式に分類出来た。ひとつはブラウン運動で、その拡散係数は約 $0.18 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。もうひとつは成長円錐の先端から成長円錐と軸索の結合部に向かう一方方向性の運動であった。この一方方向性の運動は特に葉状仮足（ラフリング膜）上で顕著に認められた。この運動の結果、Cy3 NGF は、成長円錐と軸索の結合部、すなわちアクチン系と微小管系が接する部分に蓄積される。このような Cy3 NGF-受容体コンプレックスの挙動と、NGF による成長円錐の運動制御機構との関係について考察した。

T. Tani, Y. Miyamoto, K. Fujimori, T. Taguchi, Y. Sako, T. Yanagida and Y. Harada : Movement of Cy3 NGF-receptor complex on the membrane of chick DRG growth cone: observation using single molecule visualization technique.

2P095

上皮成長因子受容体の動的会合体形成と情報伝達の 1 分子可視化

○佐甲 靖志^{1,2}、箕口 滋³、吉村 昭彦³、柳田 敏雄¹ (¹ 阪大院・医学系・情報生理、² PRESTO, JST、³ 九大・生医研)

我々は先に細胞内 1 分子イメージング法を開発して、蛍光標識した上皮成長因子 (EGF) の受容体 (EGFR) への結合を解析し、EGFR が 2 量体化し自己リン酸化する以前から、細胞膜上で会合しているという結果を得た。今回、EGFR 分子の組織化と情報伝達反応を解析するため、EGFR と GFP の融合タンパク質遺伝子を構築し、内在的な EGF を持たない細胞 (CHO-K1) に発現させて、EGFR の 1 分子イメージングをおこなった。

全反射蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞表面には様々な明るさの EGFR-GFP のスポットが存在することがわかった。最も暗いものは、明るさがほぼ揃っており 1 段階で褪色することから、1 分子の EGFR-GFP であり、より明るいものは EGFR-GFP の会合体であると考えられた。会合体の 98% は 6 量体以下であり、単量体は全スポットの約 20% (全分子の 8%)、平均会合分子数は 2.3 であった。また、2,4,6 量体を形成するものが 1,3,5 量体よりも多く、2 量体が 1-3 個集まってより大きな会合体が形成されていることが多いと考えられる。ストレスファイバーに沿って配列した会合体があること、アクチン線維の破壊によって単量体の割合が大きくなること、大きな会合体は運動性が低い傾向があることなどから、会合体形成は細胞骨格に依存しているようであるが、骨格系との相互作用は弱く、同一会合体が運動と静止を交代することや、会合体間の融合・分裂も観察された。

EGF は、EGFR 単量体よりも会合体に優先的に結合し、細胞内への取り込みも会合体に優先的に起こることを示唆する結果が得られている。

以上のことは、同一種の分子であっても、細胞膜上での構造形成によって、動的な機能分化が起こり得ることを示している。

Y. Sako, S. Minoguchi, A. Yoshimura & T. Yanagida : Dynamics and Signal Transduction of EGFR Clusters Visualized by Single-molecule Imaging Techniques

2P094

Ca²⁺ 応答を引き起こすために必要な EGF 分子の結合数

○上村 武¹、佐甲 靖志^{2,3}、柳田 敏雄^{2,4} (¹ 阪大院・基礎工、² 阪大院・医学系・情報生理、³ PRESTO・JST、⁴ ICORP・細胞) は多様な情報伝達経路が存在し、現在も新たな情報伝達経路が次々と明らかにされている。例えば、細胞に上皮成長因子 (EGF) を加えると、(EGF) → EGF 受容体 → PLC- γ → (IP₃) → 小胞体上の IP₃ 受容体 → 細胞質 Ca²⁺ 濃度の上昇、という情報伝達が起きる。細胞の情報伝達システムに対する理解をさらに深めるには、情報伝達経路の入力と出力の定量的な関係を知ることが重要であると考えられる。我々は EGF の結合から Ca²⁺ 応答に至る情報伝達経路について、細胞膜に結合する EGF の数を入力、それによって起きる Ca²⁺ 応答を出力として、その入力と出力の関係を解析している。

細胞外溶液を灌流し、蛍光標識 EGF 溶液をパルス的に加えることで、細胞 (HeLa) に EGF 刺激を与え、細胞膜に結合する EGF の数と Ca²⁺ 応答を同一の細胞で測定した。細胞膜に結合した EGF の数は 1 分子蛍光顕微鏡を用いて、また、刺激に対する Ca²⁺ 応答は Ca²⁺ 蛍光指示薬を用いて測定した。

その結果、Ca²⁺ 応答を引き起こすために必要な EGF の結合数は細胞あたり 150 個であることが分かった。この数は細胞の大きさに関わらずほぼ一定であった。これは、Ca²⁺ 応答を引き起こす条件が、細胞に結合する EGF 分子の密度ではなく、EGF 分子の数によって決定されていることを示唆している。また、Ca²⁺ 応答をしなかった細胞と比べると、Ca²⁺ 応答をした細胞では、EGF と結合し、2 量体以上に重合している EGF 受容体の割合が大きかった。この結果は、Ca²⁺ 応答に EGF 受容体の重合形成が情報伝達に必要であるという従来のモデルに矛盾しない。

T.Uyemura, Y.Sako and T.Yanagida : The minimal number of EGF-binding that assures intracellular Ca²⁺ response

2P096

SCF-SCF 受容体の情報伝達における空間情報の制御

○小林 剛¹、村上 瑞奈^{1,2}、入江 かおる¹、佐久間 麻由子¹、大島 智香¹、武田 美江¹、飯野 亮太¹、藤原 敬宏¹、吉村 昭彦³、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技振・ERATO、² 名大院理・生命理学、³ 九大・生体防御)

幹細胞因子 (SCF) 受容体は、膜 1 貫通のレセプター型チロシンキナーゼで、リガンドである SCF が結合すると 2 量体化・自己リン酸化し、下流の PI3 キナーゼや MAP キナーゼなどへとシグナルを伝達する。その結果、細胞の増殖、接着、正の走化性が誘導される。我々は、SCF 受容体の運動を培養メラノサイト細胞膜上で 1 粒子追跡法と 1 分子蛍光観察法を用いて可視化した。それぞれ、抗体の Fab 断片を介して直径 40 nm の金コロイド粒子を、または Fab を介して Cy3 色素を受容体に結合させた。ビデオレート (33 ミリ秒分解能) の観察では、いずれの方法でも、リガンド刺激前には、SCF 受容体は細胞膜上を単純拡散運動しており、拡散係数は脂質の約 1/2 と速かった ($0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 37 °C)。しかし、細胞をリガンド刺激すると、刺激後 2 分までに SCF 受容体の運動は劇的に減少し、膜上のコンパートメントに閉じ込められたような運動、または、拡散運動の停止を示した。リガンド刺激依存的な運動停止は、キナーゼ活性を持たない SCF 受容体の突然変異体では見られなかった。リガンド刺激した細胞のシグナル伝達の時間変化を生化学的に解析した結果、SCF 受容体は、下流にシグナルを伝えるのと同時か、それ以前に運動を変えていると結論された。従って、SCF 受容体は運動停止してリガンド入力位置という空間情報を記憶し、局在化されたシグナル伝達をおこなっていると考えられる。

T. Kobayashi, M. Murakami, K. Irie, M. Sakuma, C. Ohshima, Y. Takeda, R. Iino, T. Fujiwara, A. Yoshimura and A. Kusumi : Spatial regulation of stem cell factor (SCF)-SCF receptor signaling in melanocytes