2P097

細胞膜上のコレステロールの運動と局在： θ -toxin 蛍光誘導体の 1 分子解析

○実松 史幸¹、飯野 亮太²、勝野 達也¹、嶋田 有紀子^{3,4}、岩下 淑子³、楠見 明弘^{1,2} (¹ 名大理・生命理学、² 科技振 ERATO、³ 都老人研蛋白質生化学、⁴ 科技団)

細胞膜上には「ラフト」と呼ばれる、コレステロール依存性の膜ドメインが存在し、細胞膜におけるシグナル伝達のプラットフォームとして重要な働きをしていると考えられている。ラフトの形成にはコレステロールの働きが重要であるが、細胞膜上でのコレステロールの動態はほとんど分かっていない。本研究ではコレステロール結合性の θ -toxin (perfringolysin O) をサブチリシンとビオチン化により無毒化したもの (Iwamoto et al., BBA 1327: 222-230, 1997) を Alexa で蛍光標識し、1 分子蛍光観察法をもちいて細胞膜上でのコレステロールの挙動を追跡した。ビデオレート (33 ミリ秒分解能) での観察ではコレステロール- θ -toxin 複合体はときどき停留するような動きを示し、その停留点間は単純ブラウン運動 (不飽和脂質と同程度の拡散速度 $\sim 0.17 \mu\text{m}^2/\text{s}$) を示した。停留領域 (Transient Confinement Zones=TCZs) 内の存在確率は 11 %、1 回の平均滞在時間は 0.33 秒、1 分間に平均 16 回程度 TCZs に出入りした。TCZs の平均直径は 160 nm であった。TCZs はカベオラ内では観察されないこと、M β CD 処理すると TCZs の割合も減少することより、TCZs はラフト様ドメインの可能性がある。さらに標識されたコレステロールの 2 つの輝点が 1 つになってしばらく (平均 0.38 秒) とともに動いた後、再び離れていくのも頻繁に見られたが、不飽和脂質ではほとんど見られなかった。このような現象が見られることは、コレステロールが極めて頻繁に集合、離散を繰り返していることを示唆する。

F. Sanematsu, R. Iino, T. Katsuno, Y. Shimada, Y. Ohno-Iwashita, A. Kusumi : Single molecule visualization of movement of cholesterol which probed theta-toxin fragment

2P099

ラフト構成分子は細胞膜上で速い拡散運動をしている

○飯野 亮太¹、時田 由紀子¹、実松 史幸^{1,2}、吉住 玲¹、Metz-Honda Katrin¹、村越 秀治^{1,2}、笠井 倫志^{1,2}、村上 瑞奈^{1,2}、小林 剛¹、箕口 滋³、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・生体防医研)

細胞膜上でシグナル分子が働く場としてラフトが注目されている。ラフト構成分子は、界面活性剤不溶低密度膜画分 (DRM 画分) に回収されると考えられているが、細胞膜上でのラフトの分子組成、寿命、分子の交換の頻度、大きさなどの知識は乏しい。本研究では、DRM 画分への分配の有無、細胞膜外層 (Cy3 で標識) または内層 (GFP 融合タンパク質を利用) への局在の異なる分子を選び、ECV304 細胞や CHO 細胞膜上での挙動を 1 分子蛍光観察した。用いた分子は、G α_{i2} (内, 60%DRM), Lyn (内, 40%DRM), H-Ras (内, 20%DRM), K-Ras (内, 1%DRM), CD59 (外, 99%DRM), 不飽和リン脂質 (外, 非 DRM), 飽和リン脂質 (外, DRM), トランスフェリン受容体 (TfR, 膜貫通, 1%DRM) である。1 秒間のビデオレート観察では、TfR を除く全ての分子が、DRM 画分に回収される割合とは無関係に高い運動性を示し、(見かけの) 単純拡散運動を行っていた。一方、TfR の 25% は (一時的な) 停留を示していた。さらに重要な傾向は、内層の分子の拡散速度が外層の分子よりも大きいことであった。内層の分子の軌跡は、これらが膜と水層間を往復しながら速く拡散していることを示唆した。また、DRM 分子の拡散速度は非 DRM 分子と同等かより大きかった。膜分子の運動制御機構として我々が提唱している「アンカー膜タンパク質ピケットモデル」を考慮すると、今回の結果はラフトの動的な性質すなわち、ラフトの寿命は短い (ミリ秒のオーダー) / ラフト内外での分子の交換は速い (ミリ秒のオーダー) / ラフトは数分子程度の大きさしかない等を示唆する。

R. Iino, Y. Tokida, F. Sanematsu, R. Yoshizumi, K. Metz-Honda, H. Murakoshi, R. Kasai, M. Murakami, T. Kobayashi, S. Minoguchi, A. Yoshimura, and A. Kusumi : Rapid diffusion of raft molecules in both the outer and inner leaflets of the plasma membrane

2P098

多量体化した H-Ras と CD59 の細胞膜上での運動とラフトへの局在

○小山 郁子¹、飯野 亮太²、村越 秀治^{1,2}、梶川 絵理子²、堀田 陽子²、箕口 滋³、吉村 昭彦³、小林 剛²、楠見 明弘^{1,2} (¹ 名大院理、² ERATO.JST、³ 九大院医)

低分子量 G タンパク質 H-Ras は、細胞の増殖や細胞骨格の再構成の信号を担う重要なタンパク質である。しかし、その細胞膜上での局在、特にラフトドメインへの分布には異論が多い。一方、細胞の外に出ていた分子については、クロスリンクが誘導されたときにのみラフトに入るという例が多く知られている (Harder ら, 1999; Verkade ら, 2000; Mayor ら, 1994)。そこで我々は、H-Ras がモノマーと多量体とで局在を変える可能性を検討した。多量体を誘導するために Schreiber らの dimerizer の方法 (ARIAD) を用いた。すなわち、FKBP2-GFP-H-Ras を HeLa 細胞に発現させ、FKBP に結合する 2 価のクロスリンカー AP20187 を添加し、細胞内で FKBP2-GFP-H-Ras の多量体を作らせた。細胞膜上での運動と局在は、1 分子蛍光法を用いて観察した。各蛍光スポットの蛍光強度から単量体と多量体を区別した (Iino ら, 2001)。実際、クロスリンカーの添加によって多量体が形成された。FKBP2-GFP-H-Ras とラフトマーカである GPI アンカー型タンパク質 CD59 の一分子同時観察を行った。すると、通常状態でも、約 6 % の FKBP2-GFP-H-Ras と CD59 が共局在していた。さらに、FKBP2-GFP-H-Ras と CD59 を同時にクロスリンクさせたとき、FKBP2-GFP-H-Ras と CD59 の共局在する輝点が、通常状態の約 2 倍に増加した。この結果は、細胞内の信号伝達分子が細胞膜外層にあるラフトと結合し得ること、また、そのサイズは非常に小さいものでも有効であることを示唆する。

I.Koyama, R.Iino, H.Murakoshi, E.Kajikawa, Y.Hotta, S.Minoguchi, A.Yoshimura, T.Kobayashi and A.Kusumi : Diffusion and localization of oligomerized H-Ras and CD59 in the cell membrane

2P100

G タンパク質の関与する走化性の 1 分子解析

○笠井 倫志^{1,2}、村越 秀治^{1,2}、飯野 亮太¹、藤原 敬宏¹、中西 華代¹、吉住 玲¹、伊丹 憲史²、小林 剛¹、芳賀 達也³、Prossnitz Eric⁴、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技振・ERATO、² 名大・院・生命理学、³ 学習院大・理、⁴ Dept. of Cell Biol. and Phys., Univ. of New Mexico Health Science Ctr.)

脊椎動物内での細胞の走化性による移動は、長時間にわたって信号分子と受容体が働き続けることによって実現される。このような長時間、長距離にわたる走化性を理解するためには、短時間に起こる細胞内シグナル伝達と同時に、ダウンレギュレーションやリサイクルについての知識が重要である。本研究では、G タンパク質共役型のフォルミルペプチド受容体 (FPR) による走化性の機構を 1 分子可視化によって検討した。まず、FPR-GFP 融合タンパク質を CHO 細胞に発現させ、FPR-GFP の運動を 1 分子蛍光法によって追跡した。リガンド刺激後約 1 分で、約半数の受容体の拡散係数はリガンド刺激前の約 1 / 10 に減少した。この原因として、G タンパク質、アレステン、GRK の結合などが考えられ現在検討中である。5 分後には、約 80 % の受容体がクラスリン被覆ピットに、約 20 % がカベオラに入っていることが蛍光抗体染色でわかった。次に、G α の活性化の瞬間を生細胞内で 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動法 (1 分子 FRET) により捉えた。活性化された受容体は G α に対する GEF として働き、G α に GTP が結合することによって G α は活性化される。そこで、G α -GFP を CHO 細胞に発現させ、蛍光ラベルされた GTP (GTP-BodipyTR) を顕微注入して、リガンド刺激した。細胞膜上にある G α -GFP への GTP-BodipyTR の結合を GFP から BodipyTR への 1 分子 FRET を観察することによって検出した。FRET を起こしている輝点は細胞膜上で拡散せずとまっていた。すなわち、走化性信号は空間的に制御されていた。

R.Kasai, H.Murakoshi, R.Iino, T.Fujiwara, H.Nakanishi, R.Yoshizumi, N.Itami, T.Kobayashi, T.Haga, E.Prossnitz and A.Kusumi : Single molecule analysis of G-protein-coupled chemotaxis