2P101

EGF 刺激によるカベオラ数の減少：急速凍結ディーブエッチ電子顕微鏡法による観察

○諸根 信弘¹、池 博司¹、馬場 健²、大野 伸一²、臼倉 治郎³、楠見 明弘^{1,4} (¹ERATO・JST、²山梨医大、³名大・院医、⁴名大・院理)

細胞膜の細胞質側表面には膜骨格のネットワークが全面にわたって存在し、膜に強度を与えるだけでなく、膜分子の運動や集合の制御を担っていることがわかってきた。一方、細胞膜上にはラフト様ドメイン、カベオラ、クラスリン被覆ピット、接着構造、信号複合体など様々な構造が存在している。このようなドメインが細胞膜上にどのように分布し膜骨格と相互作用しているか、膜内分子がこのような構造体上にどのように分布しているか、という知見は極めて重要である。そこで、我々は細胞膜の細胞質側表面の全体像を高分解能で電子顕微鏡観察し、同時に分子を同定するため免疫金コロイド標識を用いて(急速凍結・ディーブエッチ・免疫レプリカ電顕法)これらの問題を検討してきた。細胞膜上の特定の一部分ではなく全体像をとらえ様々な構造体の分布や相関を調べるとい点が重要である。細胞は培養繊維芽細胞 NRK を用いた。主にアクチンから成る膜骨格はカベオラとクラスリン被覆ピット(各々膜面積全体の約1%)と結合しながらネットワークを形成していた。アクチン線維上にはスペクトリン及びアンキリンプロープの結合が見られた。一方、EGF 受容体はアクチンの反矢尻端に結合するが、63%が膜骨格上か10nm以内に、15%がカベオラに、残りがクラスリン被覆ピット(3%)とバルクの細胞膜(19%)に局在していた。EGF 刺激すると25分後には、カベオラの個数は約半数まで減少した。これに伴って、カベオラに局在するEGF 受容体は1/6まで減少した。受容体の減少は既報の生化学的解析と定性的には一致する(Mineo, Gill, and Anderson, 1999)が、彼等は、正常ヒト線維芽細胞でのカベオリンの量はEGF 刺激に影響を受けないと報告している。現在、NRK 細胞でのEGF 刺激後のカベオリン量について検討中である。

N.Morone, H.Ike, T.Baba, S.Ohno, J.Usukura, and A.Kusumi : Reduction of Caveolae on the Dosal Cytoplasmic Surface After Epidermal Growth Factor-Stimulation

2P103

神経細胞の軸索イニシャルセグメント細胞膜に存在する拡散障壁の形成機構：1分子観察・操作による研究

○中田 千枝子¹、Ritchie Kenneth^{1,2}、藤原 敬宏¹、堀田 陽子¹、飯野 亮太¹、山口 和彦³、楠見 明弘^{1,2} (¹ERATO・JST、²名大院・理・生命、³理研・BSI)

神経細胞の、細胞体/樹状突起と軸索という領域における機能的な分化は、極性のある形態や分子の局在によって保たれている。細胞膜において分子の局在を維持するためには、軸索起始部(軸索の最も細胞体側、イニシャルセグメント、IS)の細胞膜に、細胞膜分子が拡散によって混合するのを妨げる仕組みが必要なのはである。しかしこれまで文献では結論がわかってきた。そこで拡散障壁の存在と作動機構を調べるため、我々は培養海馬細胞を用い、拡散抑制が難しいと思われる不飽和リン脂質(DOPE)の運動を1分子レベルで調べた。その結果、DOPEの拡散係数は、培養後6~10日目にかけて、ISにおいてのみ1/500程度に減少した。この結果は金コロイド及び1分子蛍光プローブとも同じであった。また培養後10日以降のIS膜では、光ピンセットで金コロイドDOPEプローブを牽引することが全くできなかった。すなわち、拡散障壁は(1)リン脂質に対しても機能し、(2)ISの細胞膜に発達段階依存的に、形成されることがわかった。更に、拡散障壁の形成は、膜骨格分子(アンキリン α)と膜骨格結合型の膜タンパク質(電位依存性Na⁺チャネル)のIS膜での密度増加と並行しておることがわかった。ISにおける他の膜タンパク質の運動を1分子レベルで観察した結果、および我々が拡散の遅延の機構として提案しているanchored-protein picket modelを考慮すると、ISの膜骨格上に、発達に伴い膜タンパク質群が密に集積することにより、細胞膜内に拡散障壁が築かれることが示唆された。一方、論争となっていたdII(C12, C16)の挙動については、dIIは拡散障壁を乗り越えて、極めて速い拡散を示すことがわかった。

C. Nakada, K. Ritchie, T. Fujiwara, Y. Hotta, R. Iino, K. Yamaguchi, and A. Kusumi. : Developmental formation of a diffusion barrier in the axonal initial segment membrane of the neuron; a single molecule approach.

2P102

過酸化水素を用いてアポトーシスを誘導させたPC12D細胞の膜流動性の解析

○田中 拓、木内 泰、大場 哲彦、大木 和夫(東北大・院理・物理)

アポトーシスは遺伝子によって制御された細胞死の一形態である。細胞死シグナルによりカスパーゼが活性化され、ヌクレオソーム単位でDNAが断片して核が凝集し、さらには細胞自身が断片化してアポトーシス小体を形成することが知られている。生細胞では形質膜のリン脂質は非対称に分布しており、ホスファチジルセリン(PS)は形質膜内層に多く存在するが、アポトーシスの初期過程でPSが形質膜外層に表出する。また、アポトーシスの進行した二次的ネクローシス状態では形質膜が壊れ、膜の区画性が崩れる。本研究の目的はアポトーシスに伴うこれら膜系の変化を膜流動性の観点から解析することである。ラット副腎髄質由来褐色細胞種PC12D細胞に過酸化水素(H₂O₂)を与えてアポトーシスを起こさせた。Caspase3の活性、電気泳動によるDNAラダーの形成、Hoechst 33342による核の蛍光顕微鏡観察によってアポトーシスを確認した。形質膜外層に表出したPSはAnnexin V-Cy3を用いた蛍光顕微鏡観察から評価した。形質膜区画性の崩壊はPI染色で評価した。膜流動性の空間分布を解析するために環境感受性色素Laurdanを用いた。Laurdanは周囲のリン脂質がゲル相の時440nm、液晶相の時490nmに発光ピークをもつ。2波長の発光強度の比から計算されるGP値を定義すると、GP値は膜の相状態(膜流動性)を反映する。顕微鏡下で2波長の蛍光画像を同時に撮影し、計算機上で画像演算によりGP画像を得て、膜流動性の空間分布を評価した。具体的には、PC12D細胞にH₂O₂を投与してアポトーシスを起こさせた後、Laurdanで染色し、GP画像を得た。H₂O₂の処理時間によって膜流動性の空間分布がどのように変化し、膜系の変化とどのような相関があるかを報告する。また、A23187処理によるCa²⁺流入および栄養培地の除去によるアポトーシスとの比較についても報告する予定である。

T. Tanaka, T. Kiuchi, T. Ohba, K. Ohki : Analysis of membrane fluidity during Hydrogen Peroxide-induced apoptosis in PC12D cells

2P104

G蛋白質共役型受容体・FPR1はリガンド非依存的に多量体を形成する：一分子イメージングによる研究

○東條 正^{1,2}、青木 大輔¹、多田 限 尚史¹、石渡 信一^{1,2}、船津 高志¹ (¹早大・理工・物理、²早大・理工総研)

従来、G蛋白質共役型受容体は単量体で機能していると考えられていた。ところが最近、分子生物学的生化学的解析の結果から、G蛋白質共役型受容体は多量体を形成しているとの報告がなされつつある。本研究では、G蛋白質共役型受容体の一つであるFPR1(フォルミルペプチド受容体)と蛍光タンパク質・EGFPのキメラをCHO細胞に発現させ、エヴァネッセント蛍光顕微鏡を用いた一分子イメージングにより、FPR1の多量体形成の観察を試みた。

FPR1-EGFP発現CHO細胞の細胞膜を、対物型エヴァネッセント蛍光顕微鏡を用いて観察した。コントロールのCHO細胞に対して、FPR1-EGFP発現CHO細胞では、細胞膜内で側方拡散する輝点が多数認められた。この輝点の蛍光強度時間変化をプロットすると、量子的退色が認められ、本研究で用いた顕微鏡システムがEGFP一分子を捉えていることを示した。輝点の蛍光強度分布から、FPR1-EGFPはリガンド非存在下であるにも関わらず、2~4量体を中心とする多量体を形成していることが示された。FPR1-EGFP発現CHO細胞に、視野に存在する全てのFPR1-EGFPに結合するのに十分な量のリガンドを投与すると、時間依存的にFPR1-EGFPは細胞膜のいたる所に凝集し側方拡散が止まることが確認された。さらに、まだ凝集していない側方拡散しているFPR1の輝点の蛍光強度分布を調べたところ、リガンド非存在下での輝点の蛍光強度分布と統計的有意差(有意水準5%)を認めなかった。

上記の実験結果から、FPR1はリガンド非依存的に多量体を形成し、リガンド結合はFPR1分子間のアフィニティーに変化を及ぼさないことが示唆された。

T. Tojo, D. Aoki, H. Tadakuma, S. Ishiwata and T. Funatsu : Oligomerization of FPR1, a G-protein-coupled receptor, is independent of ligand binding.