2P105

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) による Rho GTPases 活性化の実時間観察

○宮内 崇行¹、佐甲 靖志^{1,2}、柳田 敏雄^{1,3} (¹阪大院・医学系・情報生理、²PREST・JST、³ICORP・JST)

我々は、低分子量 GTP 結合蛋白質 (small GTPases), 特に Rho GTPases の活性を可視化して、細胞が空間的な情報を伝達する過程の解析を進めている。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して、「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し、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、YFP 融合 Rho GTPases (RhoA, Rac1, Cdc42) と蛍光標識 GTP との間で FRET が生じ、それは GTPases の活性化を反映していることを確認した。

YFP 融合 Rho GTPase を発現させた培養細胞に蛍光標識 GTP を導入し、細胞外刺激を加えたところ FRET の蛍光が細胞内局所的に上昇した。FRET の蛍光は、アクチン細胞骨格再編成に先んじて、またはほぼ同時に、再編成が活発な領域で顕著であった。細胞内における FRET の強度は、内在性 Rho GTPases の活性化の程度とよく一致していた。

以上の結果は、我々の開発した手法によって Rho GTPases の局所的な活性化の検出が可能となったことを示しており、本年会では、活性化の可視化によって判明した細胞の形態形成における Rho GTPases の機能について報告する。MDCK 細胞を用いて検討した細胞間接着への関与と、神経突起進展中の PC12 細胞における機能を中心に示す。

T. MIYAUCHI, Y. SAKO, and T. YANAGIDA : Real time imaging of Rho family small GTPases activation by using fluorescence resonance energy transfer (FRET)

2P107

シグナル分子 H-Ras 活性化の 1 分子可視化解析：生細胞内での局所的な情報伝達のみニズム

○村越 秀治^{1,2}、飯野 亮太¹、安井 智香¹、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} (¹ERATO・科技振、²名大院・理、³九大院・医)

細胞内シグナル伝達分子 H-Ras の活性化を個々の分子毎に可視化した。H-Ras は細胞膜に多く局在する低分子量 G タンパク質であり、GTP/GDP Exchange Factor (GEF) によって GTP が結合することにより活性化される。H-Ras 1 分子の活性化の瞬間を生細胞中でとらえるため、BodipyTR-GTP が YFP-H-Ras に結合したときにおこる、YFP から BodipyTR への 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を観察することにした。すなわち、YFP-H-Ras を発現させた KB 細胞に BodipyTR-GTP を顕微注入し、EGF 刺激を行なった。EGF 刺激後、約 30 秒から 5 分頃にかけて (すなわち、生化学的解析で H-Ras の活性化がおこる時間帯に)、1 分子 FRET をおこす H-Ras 分子が多数観察された。さらに、GTP 結合後には、H-Ras の拡散係数が 10 分の 1 に減少することが見出された。EGF 刺激後 1-2 分で、拡散速度が小さいか、止まっている粒子の割合は約 5% (EGF 刺激前) から 20% へと増加した。H-Ras のオリゴマー化や EGF 受容体周辺の信号複合体への結合がおこり、H-Ras が膜骨格フェンスに囲い込まれる効果が大きく増加することによって拡散が減少したものと推定される。H-Ras の信号は細胞増殖だけではなく細胞骨格の再編成にも関わっており、局所的な、あるいは極性をもった再編成にはこのような信号の局在が重要であると考えられる。

H. Murakoshi, R. Iino, C. Yasui, M. Murakami, T. Kobayashi, S. Mino-gushi, A. Yoshimura and A. Kusumi : H-Ras Activation and Induction of Localized Signaling As Studied by Single Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer

2P106

EGF 刺激による Ras と cRaf-1 の相互作用の細胞内可視化解析

○日比野 佳代¹、佐甲 靖志^{2,3}、岩根 敦子²、片岡 徹⁴、柳田 敏雄^{1,2,5} (¹阪大院・基礎工・システム人間系、²阪大院・医・情報生理、³PRESTO・JST、⁴神戸大・医・第二生理、⁵ICORP・JST)

低分子量 G 蛋白質 Ras とセリン/スレオニンキナーゼ cRaf-1 (Raf1) の相互作用は、細胞増殖、分化において重要な情報伝達反応の一つである。YFP-Ras と GFP-Raf1 を共発現した HeLa 細胞を上皮成長因子 (EGF) で刺激すると、Ras の活性化を介し、刺激後 5~10 分で細胞質の GFP-Raf1 が細胞膜へ局在変化する。

今回、YFP-Ras と GFP-Raf1 が細胞膜や特に膜ラッフル部位で直接結合する事を FRET で検出した。これより、Raf1 の膜への局在変化は活性型 Ras に捕捉されて起こる事が示唆された。また、過去の報告で Ras の活性が刺激前のレベルに戻ると言われる刺激後 30 分以降も、膜ラッフル部位では FRET が検出され、Ras の活性が持続していた。この活性型 Ras は全体の 3~5% と見積もられ、刺激前の値と一致した。以上より、Ras は刺激後 30 分以降でも局所的に活性を持続し、Raf1 と相互作用していることが明らかになった。

次に、全反射型蛍光顕微鏡を用いて GFP-Raf1 と YFP-Ras の 1 分子を可視化した。EGF 刺激の有無に関わらず Ras は細胞膜-細胞質間をターンオーバーし、細胞膜では拡散運動していた。また、ターンオーバーは Ras の濃縮した膜ラッフル部位でも見られた。一方、Raf1 も細胞膜-細胞質間をターンオーバーしていたが、Ras^{V12} との共発現や EGF 刺激により細胞膜に滞在する分子数が増加した。Raf1 の拡散の様子は Ras や Ras^{V12} と異なっており、Ras により細胞膜へ捕捉された Raf1 が細胞膜の他因子に引き渡される事が示唆された。今後、EGF 刺激前後の Ras、Raf1 各々の運動を 1 分子毎に詳細に解析し、Ras から Raf1 への情報伝達反応の理解につなげたい。

K. Hibino, Y. Sako, A. H.-Iwane, T. Kataoka, and T. Yanagida : Signal transduction from Ras to cRaf-1 in EGF-stimulated cells

2P108

1 分子 FRET 法による生細胞における H-Ras 活性化のイメージング

○村上 瑞奈^{1,2}、小林 剛¹、大島 智香¹、村越 秀治^{1,2}、佐久間 麻由子¹、武田 美江¹、飯野 亮太¹、箕口 滋³、吉村 昭彦³、楠見 明弘^{1,2} (¹科技団・ERATO、²名大院・理、³九大・生体防御)

我々は、細胞膜に多く局在する低分子量 G タンパク質 H-Ras のシグナル伝達経路、下流の Raf キナーゼ活性化の機構、シグナルの局在化機構の解明を目指している。本研究では、まず、生細胞中で、活性化された H-Ras をバルクの H-Ras と区別して 1 分子可視化する方法を開発した。それには、個々の H-Ras 分子を可視化し、さらに、活性化している H-Ras にだけ結合する RBD (Raf1 の Ras binding domain) の結合を見ることにした。このため、GFP-H-Ras を培養メラノサイトに発現させて 1 分子蛍光法によって可視化し、さらに、Alexa で蛍光標識した RBD を顕微注入し、YFP から Alexa への 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動 (1 分子 FRET) を観察した。実際、リガンド刺激によって、生化学的解析で Ras が活性化する事が示された時間帯に、FRET シグナルが顕著に増加した。さらに、FRET を起こしている分子は、FRET を起こしていない (あるいは刺激前の) 分子に比べて運動性が 1/100 以下と劇的に減少し、ほとんど停止した (活性化していない H-Ras の拡散運動はリン脂質並に早い)。常時活性化型 H-Ras 変異体では、動いていない分子の割合が多かった。Ras の下流には増殖シグナルの他に、細胞骨格の再編成など空間的信息が重要な経路があり、Ras の運動停止にはシグナル入力的位置情報を保持する意味があると考えられる。

M. Murakami T. Kobayashi C. Ohshima H. Murakoshi M. Sakuma Y. Takeda R. Iino S. Minoguchi A. Yoshimura A. Kusumi : Single molecule imaging of H-Ras activation in living cells