2P165

膜骨格フェンスとそれにアンカーされた膜タンパク質ピケットによる、細胞膜分子の運動制御の普遍性

○近藤 順子¹、藤原 敬宏¹、飯野 亮太¹、村瀬 琴乃²、山下 英俊²、斎藤 美保子²、池 博司¹、村越 秀治²、鈴木 健一¹、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技振 ERATO、² 名大院理)

細胞膜上での分子の拡散は、人工膜上のそれに比べて 1/10 - 1/10,000 位遅い。その原因はこの 4 半世紀の謎であった。我々は、細胞膜が膜骨格によってコンパートメント (compt) 化され、膜分子は compt 間をホップ拡散することを見だし、これが拡散遅延の主因であることを報告した。compt 化の原因は、膜骨格にアンカーされた膜貫通型タンパク質がピケラインのように働き膜内分子の運動を抑制すること (アンカード膜タンパク質ピケットモデル)、膜貫通型タンパク質については、これに加えて、細胞質ドメインが直接に膜骨格と衝突すること (膜骨格フェンスモデル) であった。本研究では、6 種の培養細胞 (PtK2, ECV, NRK, COS1, CHO, FRSK) についてリン脂質とトランスフェリン受容体の拡散運動を 1 粒子追跡法と 1 分子蛍光法を併用して検討し、上記の機構が普遍的であることを見出した。金と蛍光の標識はビデオレート (100 ms スケール) で同じ挙動を示すので、金粒子の拡散への影響は少ないことがわかる。蛍光観察できる時間分解能ではホップする瞬間をとらえることは出来ないため、主に金標識を用い、一分子観察 (多数分子ではホップは見えない) を 25 マイクロ秒分解能で行った。compt の機能の一つは、リガンドが受容体に結合して信号複合体が形成されたとき、膜骨格の囲い込みと結合の効果ために拡散が劇的に抑えられ、シグナルがリガンドの結合位置周辺に局在化することにあると考えている。

J. Kondo, T. Fujiwara, R. Iino, K. Murase, H. Yamashita, M. Saito, H. Ike, H. Murakoshi, K. Suzuki, and A. Kusumi : Fences and pickets formed by the membrane skeleton and its anchored membrane proteins are universally found in various cultured cells

2P167

細胞膜内での拡散障壁の形成：モンテカルロシミュレーションによる研究

○Ritchie Kenneth^{1,2}、藤原 敬宏²、中田 千枝子²、村瀬 琴乃¹、楠見 明弘^{1,2} (¹ 名大院・理、² 楠見膜組織能プロジェクト・ERATO・科技振)

細胞膜は流動モザイク二重層だけではなく、膜直下にある膜骨格や細胞膜の外表面にある細胞外マトリックスなども加わった構造体である。二重層内には膜貫通型タンパク質があり、あるものは自由拡散し、またあるものは膜骨格への結合により運動を停止している。しかし、実は、自由拡散しているように見える膜タンパク質や脂質も、アクチン膜骨格によって作られる膜コンパートメント間をホップするような運動をしていることが解ってきた。本研究では、膜骨格にアンカーされたタンパク質が、運動性のあるタンパク質と脂質の運動を抑制する仕組みを、モンテカルロシミュレーションによって解明することを目指した。第 1 に、膜骨格に結合した動かないポスト (支柱) による立体障害だけでは、他の分子の運動を抑制することは殆どできず、ホップ拡散は誘起できないことを見出した。そのためには、拡散分子と不動性のポストタンパク質の間に流体力学的な相互作用が必要ことがわかった。第 2 に、ポストタンパク質の運動が止まること、それらが膜骨格の線上に並ぶこと、によって、拡散分子の運動が大きく押さえられること、が示された。第 3 に、このような膜骨格に結合した膜タンパク質の集積によって細胞膜内に拡散障壁が誘起され得ること、例えば、神経細胞におけるイニシャルシグメント (IS、軸索の根本の起始部) の細胞膜において発生依存的に形成される拡散障壁のように、細胞膜外層の不飽和リン脂質でさえも移動を阻害するような拡散障壁が形成されることがわかった。

K. Ritchie, T. Fujiwara, C. Nakada, K. Murase, and A. Kusumi : Generation of diffusion barriers in the plasma membrane plane: A Monte Carlo study

2P166

1 蛍光分子ビデオイメージング法と 1 粒子追跡法を用いたリン脂質のホップ拡散の解析：40 nm コンパートメント間を 5 ミリ秒ごとにホップする

○村瀬 琴乃¹、藤原 敬宏²、飯野 亮太²、村越 秀治¹、Ken Ritchie^{1,2}、楠見 明弘^{1,2} (¹ 名大院・理、² 科技振・ERATO)

ラット培養上皮細胞 (FRSK) の細胞膜におけるリン脂質 DOPE の拡散運動の抑制機構を調べた。SFVI (一蛍光分子ビデオイメージング) で求めた 100 ms レベルでの拡散係数は $0.16 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。これは、人工膜中の拡散係数の 1/50 程度であり、細胞膜中には脂質の拡散を抑制する (ビデオレートでは見えない) 機構が存在することを示唆する。SFVI の S/N 比は低く時間分解能をあげられないので、SPT (一粒子追跡法) を用いて、25 μs の時間分解能で、DOPE の運動を観察した。8 割以上の DOPE が約 40 nm のコンパートメント間を平均 30 ms ごとに跳び移りながらホップ拡散していた。つまり、膜骨格にアンカーされた膜タンパク質が脂質の運動に対してピケラインの様に働くというモデル (anchored-protein picket model) がこの細胞でも支持された。しかし、SPT での 100 ms レベルの拡散係数は $0.023 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、SFVI で得られた値の約 1/7 である。また、細胞外マトリックスと膜タンパク質の細胞外ドメインを除去する処理は運動に影響を与えなかった。これは、SPT で観察される拡散が遅い原因は、金粒子プローブが DOPE をクロスリンクし、そのために、膜骨格にアンカーされた膜タンパク質のピケラインとの相互作用が増大したためと考えられる。これは、我々が提案している oligomerization-induced trapping model (Iino et al. Biophys. J. 80, 2667-2677, 2001) を支持する。SPT で得られたコンパートメントの大きさ 40 nm と SFVI で得られた 100 ms レベルの拡散係数は正しいと考えられるので、この両者からホップの頻度は、平均 5 ms に 1 回と求められた。

K. Murase, T. Fujiwara, R. Iino, H. Murakoshi, K. Ritchie and A. Kusumi : Hop diffusion of phospholipid in the cell membrane as studied by single molecule techniques: Hops among 40 nm compartments every 5 ms

2P168

大腸菌走化性の適応過程におけるシグナル伝達タンパク質の細胞内局在

○塩見 大輔¹、Zhulin Igor²、本間 道夫¹、川岸 郁朗¹ (¹ 名大院・理・生命理学、² Georgia Institute of Technology)

様々なシグナル伝達系において、その構成因子は細胞内で空間的に秩序だって配置されている。それらの因子が刺激に応答して局在を変化させ、シグナルの増幅や刺激に対する適応を引き起こすと考えられる。大腸菌走化性においては、全てのシグナル伝達タンパク質が同定され、ほとんどのタンパク質の三次元構造も決定されている。最近、細胞膜の感覚受容体と細胞質のヒスチジンキナーゼは複合体を形成して桿状細菌の極に局在することが分かっていたが、その制御機構や生理的意義については解析が遅れている。受容体は誘引刺激に応答するとキナーゼを不活性化するが、適応過程において受容体がメチル化されるとキナーゼを再び活性化する。このように受容体のメチル化はシグナル産生能を調節する。私たちは、適応過程におけるメチル化酵素 CheR の細胞内局在について解析するために、GFP との融合タンパク質を作製した。GFP-CheR は受容体存在下でのみ極に局在した。これは、CheR がこの受容体・キナーゼ複合体にターゲティングする事を示している。この局在は CheR の β サドメインと受容体 C 末端配列の結合のみに依存した。さらに、受容体がメチル化されているほど CheR がより極に局在した。すなわち受容体のメチル化の進行に伴って、(1) CheR または (2) 受容体の局在が変化するという可能性が考えられた。当研究室の坂本らは、受容体の局在もメチル化レベルに依存的であることを観察している。しかし、CheR の局在はよりダイナミックに変化した。これは (1) の可能性を示唆しており、未修飾のメチル化部位が少なくなった時により多くの CheR をメチル化部位の周りに集めるために何らかの制御機構が働くのではないかと考えられる。本研究では、さらに脱メチル化酵素 CheB の局在も含め、適応過程におけるシグナル伝達タンパク質の局在について考察する。

D. Shiomi, I. Zhulin, M. Homma, I. Kawagishi : Subcellular localization of signaling proteins in adaptation of E. coli chemotaxis