3P233

Ras の分子内過程の 1 分子イメージング

○新井 由之¹、横田 浩章²、岩根 敦子³、和沢 鉄一²、片岡 徹⁴、石井 由晴²、柳田 敏雄^{1,2,3} (¹ 阪大・院基礎・システム人間系、² 科学技術振興事業団、³ 阪大・医学系・情報整理、⁴ 神大・医学系・第 2 生理)

Ras は低分子量 G タンパク質の一つで、細胞増殖や分化の促進に重要な役割を果たしている。Ras は通常 GDP が結合した不活性型であるが、細胞外刺激により GTP が結合した活性型となり多数の標的タンパク質と相互作用する。しかし、Ras がどのようにして選択的に標的タンパク質を選んでいくかはわかっていない。近年、NMR を用いた研究から、活性型 Ras には動的構造多型性があり、多様な機能との関連が示唆された。

本研究では全反射型エバネッセント照明を用いた 1 分子蛍光エネルギー移動 (FRET) イメージングにより、Ras タンパク質 1 分子の構造変化の直接観察を目的とした。H-Ras(1-171) を大腸菌で発現・精製し、そのチオール基を IC5(アクセプター) で特異的に蛍光標識した。また、Cy3(ドナー) を用いて蛍光性ヌクレオチドアナログである Cy3-GTP 及び Cy3-GDP を合成した。蛍光標識した Ras が活性を保持していること、Cy3-GTP が GTP アナログとして機能していることは、Ras の標的タンパク質の一つである Raf との *in vitro* binding assay により確認した。Cy3-GTP あるいは Cy3-GDP 結合型の IC5-Ras を蛍光観察したところ、どちらの分子種も FRET が起こり、1 分子レベルで可視化することができた。

Ras の活性化・不活性化型の構造の違いや、Ras の標的タンパク質である Raf や RalGDS との結合時の構造変化の可視化を行うことで、Ras の構造と機能の相関関係を明らかにするために実験を行っている。

Y.Arai, H.Yokota, A.H.Iwane, T.Wazawa, T.Kataoka, Y.Ishii and T.Yanagida : Single molecule processes of Ras

3P235

変異型コレステロール酸化酵素を用いた細胞膜ラフトの可視化

○坪井 久恵¹、山下 光雄²、室岡 義勝²、実松 史幸³、喜多克洋¹、楠見 明弘^{1,3} (¹ 科技振 ERATO、² 阪大院工 応用生物、³ 名大院理)

細胞膜上の「ラフト」は、極めて多くのレセプター経路において、シグナル伝達のためのプラットフォームとして大きな役割を果たしていると考えられている。ラフトの形成のためにはコレステロールの存在が必須であるが、細胞膜上におけるコレステロールの分布や動態は殆どわかっていない。もしコレステロールが可視化できれば、これらの知見も得られ、ラフトの可視化の道も開けるであろう。従来、ラフトの直接的な可視化は免疫系の細胞でしか出来なかったため、ラフトの研究の大きな障害となっていたのである。そこで、我々は、コレステロール酸化酵素の変異体で、コレステロールに結合はするが酵素活性が極めて低い V145Q 変異体をコレステロールプローブとして使用する可能性を検討した。V145Q はコレステロールを含むリポソームには結合したが、含まないリポソームには結合しなかった。また、培養細胞 ECV を免疫染色すると細胞膜上のカベオラは殆どすべて V145Q でラベルされた。さらに、T 細胞系の培養細胞では、刺激前には V145Q は細胞膜全面にわたって斑点状 (免疫系以外の細胞ではこのような比較的大きい斑点は見られない) の分布を示したが、T 細胞受容体をクロスリンクすると、共局在して大きな凝集体を作った。また、RBL 細胞では、クロスリンクされた Fcε 受容体が凝集体を形成する条件で、その部位に濃縮された。これらの結果は、V145Q がコレステロールとラフトのプローブとして有用であることを示唆している。

H.Tsuboi, M.Yamashita, Y.Murooka, F.Sanematsu, K.Kita, and A.Kusumi : Visualization of cholesterol and cholesterol-enriched raft domains in the plasma membrane using a cholesterol oxidase mutant as a probe

3P234

1 分子蛍光法によるインターロイキン 6 刺激後の gp130 信号複合体形成機構の解析：アクチン線維との相互作用

○藤田 至彦¹、伊藤 裕恵¹、飯野 亮太¹、中西 華代¹、田賀哲也²、楠見 明弘^{1,3} (¹ 科技振・ERATO、² 熊大本・発生医学研究センター、³ 名大院理・生命理学)

gp130 は IL6 タイプのサイトカインに共通の膜貫通型受容体コンポーネントであると同時に、細胞内領域に会合する Janus キナーゼを活性化する役割を担っている。IL6 は、まず IL6 受容体に結合し、次いで gp130 と結合してこの分子の 2 量体形成を誘導するが、この 2 量体化がキナーゼ活性の誘導には必須である。これが引き金となって、転写因子の STAT3 がリン酸化されて核へ移動し、転写が開始される。本研究では、IL6 刺激によって (1) さらに大きな会合体が形成されるか、(2) シグナル伝達にラフト様ドメインが関与するか、(3) 細胞骨格/膜骨格がリン酸化信号の局在化に関与するか、を調べた。このため、IL6 受容体および gp130 を COS1 細胞に一過性に共発現させ、gp130 の会合状態と運動を cy3 ラベルした抗 gp130 抗体 Fab を用いた 1 分子蛍光法により追跡した。IL6 刺激後、gp130 の輝点の約 20 % は直線状に分布し、gp130 の拡散係数は中央値で 0.060 から 0.013 mm²/s へと大きく低下した。このような変化はアクチン線維の部分的脱重合や、gp130 の細胞内ドメインの大部分を欠失させることによって消失した。これは、gp130 信号複合体とアクチン線維との密接な相互作用を示唆している。現在、アクチン線維による信号の局在化の生物学的意義について検討中である。一方、ラフト様ドメインに gp130 の信号複合体が濃縮することはなかった。

Y. Fujita, H. Ito, R. Iino, K. Nakanishi, T. Taga, A. Kusumi : gp130 Signaling Complex Formation Analysed by Single Fluorophore Dynamic Imaging: Its Interaction with Actin Filament

3P236

細胞膜上のラフト様ドメインはシグナル入力のない時極めて動的 (数分子/ミリ秒) である

○鈴木 健一¹、実松 史幸²、藤原 敬宏¹、Michael Edidin³、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技団・ERATO、² 名大・院理、³ The Johns Hopkins University)

最近、細胞膜上で情報伝達分子群が局在して働く場としてラフトが目されている。しかし、その構造、安定性、機能、組成などはほとんど分かっていない。それらを解明するため我々は 85% 以上が detergent-resistant membrane (DRM) 画分に回収される GPI アンカー型膜タンパク質 CD59 と全く DRM 画分に回収されないリン脂質 DOPE を金粒子で標識し、細胞膜上での拡散運動を 1 分子レベルで時間分解能 25 μs で追跡した。両者とも、膜骨格にアンカーされた膜タンパク質のピケラインが形成する直径 110nm のコンパートメント間をホップ拡散 (平均 25ms に 1 回) していた。このようなホップ拡散は膜骨格の存在しない膜 bleb 上では見られなかった。脂質のホップ拡散は我々が既に報告 (昨年の年会 2K1615) しているところで驚くべきことではないが、驚くべきは CD59 と DOPE が同じホップ頻度を示したことである (細胞外のドメインや ECM も関与しない)。すなわち、85% の CD59 は DRM 画分に回収されるので、普通に考えるとほとんどいつもラフトにはいつている。従って、CD59 のホップ頻度はラフト全体のそれと考えられ、これが単分子の DOPE と同じというのが著しい発見であった。この結果はラフトは数分子程度の大きさしか持たない、ミリ秒以下の単位で生成/分解、かつ/または、CD59 が出入りしていることを示している。

K. Suzuki, F. Sanematsu, T. Fujiwara, M. Edidin and A. Kusumi : Raft-like domains are unstable (a few molecules/milliseconds) on resting cell membranes