3P237

活性化された GPI アンカー型膜タンパク質 CD59 は頻繁に SFK 活性とアクチンに依存的なラフトを形成/訪問してまわる

○平野 秀美¹、鈴木 健一¹、実松 史幸²、藤原 敬宏¹、坪井久恵¹、藍原 真弓¹、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技団・ERATO、² 名大・院理)

ラフトは細胞膜中で情報伝達のプラットフォームを提供しているといわれるが、信号入力のないときには非常に不安定であることを我々は示した(本年会)。では信号入力時にはラフトはどのように振る舞うのだろうか? GPI アンカー型膜タンパク質 CD59 (補体制御タンパク質) は 85% が detergent-resistant membrane (DRM) 画分に回収されるので、これをマーカーとして検討を進めた。まず、CD59 を過剰の抗 CD59 抗体でコートした金コロイド (X-linkCG) でクロスリンクしたり、リガンドである C8 を添加して信号入力すると、細胞内シグナルが実際に誘起されることを src ファミリー型チロシンキナーゼ (SFK) の活性化や Ca^{2+} 信号の発生によって確認した。X-linkCG の細胞膜上での拡散を追跡したところ、3 秒に 1 回くらい、一時停留 (平均 0.7 秒) しては動くということを頻繁に繰り返していた。停留領域の大きさは平均 90nm で、カベオラではなかった。コレステロール除去やアクチン線維の部分破壊により一時停留は劇的に減少した。一方、SFK の活性化に関与するリン酸化チロシン部位に対する抗体は X-linkCG と 25% 程度共局在し、これはコレステロール除去により見られなくなった。また一時停留は SFK の阻害剤添加によっても大きく減少した。これらの結果は CD59 は信号入力依存的にまた SFK 活性依存的にアクチン線維依存性のラフトを形成/訪問してまわることを示している。

H.Hirano, K.Suzuki, F.Sanematsu, T.Fujiwara, H.Tsuboi, M.Aihara and A.Kusumi : Activated GPI-anchored membrane protein, CD59, frequently visits/forms rafts which depend on SFK activity and actin

3P239

シナプス小胞の膜融合メカニズム解明の試み

○荒木 信之^{1,5}、伊藤 陽子²、高橋 正身³、吉岡 亨^{4,5} (¹ 富士ゼロックス中央研、² 早大人間科学研究科、³ 三菱化学学生命研、⁴ 早大人間科学部、⁵ 早大理工総研)

これまで、シナプス小胞の膜融合機構を解明するため、タンパク質に注目した様々な研究が行われてきた。しかし、シナプス小胞の膜への融合をトリガーするタンパク質は未だ見つかっていない。そこで我々は、このシナプス小胞の膜融合のトリガーは、脂質自身に対する Ca^{2+} 効果であるという仮説をたてた。このような脂質の候補として、 Ca^{2+} と親和性を有することが知られているホスファチジン酸 (PA) などが考えられる。そこで我々は、PA が Ca^{2+} だけでなく、二価遷移金属陽イオンである Cd^{2+} や Mn^{2+} にも親和性が高いことに注目し、 Cd^{2+} でもシナプス小胞の融合が行われるかを確かめる実験を行った。小脳顆粒培養細胞から、イオノフォア A23187 で処理したとき Cd^{2+} 存在下で放出されるグルタミン酸量を HPLC で計測した。その結果、 Ca^{2+} チャネルブロッカーとして知られる Cd^{2+} 存在下であるにもかかわらず、 Cd^{2+} や Ca^{2+} 非存在下に比べ統計的に有意なグルタミン酸の放出が見られた。また、この実験条件下での Cd^{2+} の細胞内濃度を測るため Fura2/AM を用いての Cd^{2+} イメージングを行った。この実験に先立ち、Cd- Fura2 の蛍光スペクトルを計測し、濃度変化に対するキャリブレーションカーブも作成した。その結果、外液 Cd^{2+} 濃度 $50 \mu\text{M}$ のとき A23187 により細胞内に移動した Cd^{2+} の濃度は $44 \mu\text{M}$ と試算され、小胞の膜融合が Cd^{2+} によって起こったことが確認された。以上より、シナプス小胞の膜融合にリン脂質、特に PA の関与している可能性が示唆された。

N.Araki, M.Takahashi, T.Yoshioka : A study of synaptic vesicle fusion mechanism

3P238

細胞膜外葉におけるフォスファチジルセリン分布の時間変化の可視化

○高津 京子、宮田 英威 (東北大・院理)

細胞膜二重層の内葉と外葉とは、その脂質分布に非対称性があることが知られている。膜脂質のうち、フォスファチジルセリン (PS) は特に内葉への偏在が顕著である。このような非対称性の維持にはエネルギーが必要であり、フリッパーゼと呼ばれる一群のタンパク質が関わっていることが示唆されている。一方、細胞を無血清状態におくと、PS が細胞膜外葉に表出してくることが報告されている。細胞膜を横断する脂質分子の移動には時間がかかるため、このような場合にもフリッパーゼが関わっていると考えられている。我々はこのタンパク質の PS 分布維持の機構に興味を持ち、外葉での PS の分布を見ることで、その働きを捉えることができないか考えた。AnnexinV は PS に対して特異的な親和性を持つ。この性質を利用し、細胞膜外葉に表出した PS 分布の時間変化を顕微鏡下で観察することを試みた。実験では CHO 細胞を用いた。有血清培地 (MEM $\alpha+10\%$ NBS) で培養した CHO 細胞をはがし、無血清培地 (MEM α のみ) 中に懸濁する。それをチャンバー内に培養した。その細胞に AnnexinV-Cy3 を投与し、蛍光顕微鏡で観察すると、細胞膜表面に蛍光分布が確認できた。これは AnnexinV が細胞膜外葉に表出した PS に結合したためであると解釈した。一方、有血清培地中で培養した細胞では、蛍光分布はほとんど見られなかった。次に無血清培地中で培養し蛍光染色された細胞を有血清培地中に戻し、数分おきに観察したところ 30 分間に蛍光強度が 50 % 程度まで減少する様子が見られた。これは PS と AnnexinV との結合が切れたためであると考えられる。血清添加によって PS が内葉に戻ったことにより、この結合の切断が引き起こされたのかどうかを今後詳しく検討する予定である。

K.Takatsu and H.Miyata : Visualization of phosphatidylserine dynamics in outer leaflet of plasma membranes.

3P240

近赤外超短パルスレーザーを用いた HeLa 細胞の刺激によるカルシウム波の発生

○金子 智行¹、藤田 克昌²、岩永 茂樹¹、中村 収¹、高松 哲郎²、河田 聡¹ (¹ 阪大・院工・応物、² 京都府医大・二病)

細胞は外的な刺激に応じて様々な反応を示すことが知られている。HeLa 細胞はホルモンや機械的な刺激に応じて細胞内のカルシウム濃度が上昇しカルシウム波を発生させる。我々は近赤外超短パルスレーザーを HeLa 細胞内に集光することにより、細胞内でカルシウム波を発生させることに成功した。HeLa 細胞内のカルシウム動態を調べるためにカルシウム蛍光指示薬である fluo-4/AM を負荷し、蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡を用いて観察した。細胞内に照射するレーザーにはモードロック Ti:Sapphire レーザー (波長 780nm, パルス幅 80fs, 繰り返し周波数 82MHz) を使用した。近赤外超短パルスレーザーを対物レンズを用いて集光した場合、焦点部位において蛍光強度が上昇し、そこを起点とするカルシウム波を確認することができた。この時のレーザー平均強度は 50mW であった。また、連続発振レーザー (波長 780nm) を平均光強度 300mW で照射した場合は、細胞内カルシウム濃度の変化は見られなかった。このことから、ここで見られたカルシウム濃度の局所的上昇は多光子吸収などの非線形光学過程が関与していると考えられる。様々なレーザー強度と照射時間においてカルシウム波の発生確率を測定したところ、カルシウム波の発生確率は照射光の平均強度に強く依存することがわかった。

T. Kaneko, K. Fujita, S. Iwanaga, O. Nakamura, T. Takamatsu and S. Kawata : Calcium wave generation in a HeLa cell stimulated by near-infrared ultrashort-pulsed laser