1H0940

GPI アンカー型タンパク質がかかわる 3 種のラフトの 1 分子可視化解析

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

ラフトは細胞膜上の情報伝達のプラットフォームとして注目されているが、ラフトの実体についてはほとんど何も分かっていない。例えば、ラフト分子であるかどうかの判定は、通常、界面活性剤を用いた生化学的分画法に基づいておこなわれるが、この「ラフト」画分が生細胞中のラフトとどういう関係にあるのかさえ不明である。このような研究状況から脱却できない限り、ラフト研究の本質的な意味での進歩はない。本研究では生化学的には「ラフト」分子と定義された GPI アンカー型タンパク質 CD59 の細胞膜上での挙動を 1 分子レベルで追跡した。特に、細胞外からの刺激の前後での変化に注目した。1 分子毎に観察する強みは、その分子がラフトに出入りする様子を時々刻々と観察できるところにある。これは、多数分子の平均挙動を見たのでは分らない。実際、以下の知見が得られた。(1) 外部からのシグナル入力がないとき、モノマーの CD59 がかわるラフトは小さく (数分子のサイズ)、寿命は短い (1 ミリ秒以下) (small unstable rafts)。(2) シグナル入力により、クラスター化した CD59 はコレステロールを集積し、安定ラフトを形成する (core receptor rafts)。(3) Core receptor rafts も細胞膜上をゆっくりと拡散するが、1 分間に平均 20 回程度、一時的停留ゾーン (TCZ, signaling rafts) に入って停留するようになる。コレステロール除去やアクチン骨格の部分破壊によって TCZ はなくなるが、細胞内シグナルもなくなる。(4) signaling rafts において、core receptor raft とシグナル分子の 1 分子共局在がおこる。これらのビデオによって、ラフト分子の挙動について、直感的な理解を持ていただくことを期待している。

K. Suzuki, F. Sanematsu, T. Fujiwara, M. Edidin and A. Kusumi : Single molecule observation of three types of GPI-anchored-protein associated rafts.

1H1020

クラスリン被覆ピット構成分子 (アダプター、受容体) 局在化過程の 1 分子イメージング

○藤原 敬宏¹、飯野 亮太¹、大島 智香¹、小林 剛¹、Keen James³、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技振・ERATO、² 名大院理、³ Thomas Jefferson University)

細胞膜上の多くの受容体はアダプター分子 AP2 と結合することによってクラスリン被覆ピット (CCP) に局在化し、細胞内に取り込まれると考えられている。しかし、AP2 や受容体の CCP への集積過程とタイムコース、集積の機構 (CCP の形成とこれらの分子の集合は並行して協同的に起こるのか、あるいは形成された CCP にこれらの分子がとりこまれるのか、など) は全くわかっていない。1 分子イメージングの手法は、これらの疑問を解決するのに非常に有効な技術であると考えられる。そこで、CCP から取り込まれるトランスフェリン受容体 (TfR) と AP2 が CCP に出入りする過程を 1 分子ごとに追跡した。本講演では、以下の画像データを用いて、上記の問題を解決するための研究の現状を紹介する。

(1) YFP 融合 AP2、HcRed 融合クラスリンを EJ1/T24 細胞に発現させ、同時観察をおこなった。HcRed-クラスリンが細胞膜上で形成する集合体を CCP のマーカーとして、YFP-AP2 が細胞質から細胞膜へリクルートされて、CCP へ出入りする過程を 1 分子ごとに調べた。AP2 はモノマーとして細胞質から細胞膜へやってきて、すぐに細胞質へ去っていく。この期間に形成中の CCP に組み込まれた AP2 は膜上に安定に存在するようになる。また、タイムラプス観察により、いったん CCP に組み込まれた AP2 が細胞膜上の拡散で CCP から出て行って、別の CCP に再び入る過程が可視化できた。(2) GFP 融合クラスリンの集合体を CCP マーカーとして、Alexa 標識トランスフェリンを結合した TfR が CCP に出入りする過程を 1 分子ごとに調べた。TfR は細胞膜上を拡散して頻繁に異なる CCP に出入りし、最終的にどこかの CCP から取り込まれた。

T. Fujiwara, R. Iino, C. Ohshima, T. Kobayashi, J. Keen, and A. Kusumi : Single molecule imaging of recruitment and localization of adaptor and receptor molecules into clathrin-coated pits

1H1000

細胞内膜小胞でのレセプター型チロシンキナーゼ活性化を担う新規細胞内取込み機構: SCF 受容体 1 分子観察によるアプローチ

○小林 剛¹、村上 瑞奈^{1,2}、武田 美江¹、大島 智香¹、吉村 昭彦³、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技団・ERATO、² 名大院理・生命科学、³ 九大・生体防御)

Stem cell factor (SCF) 受容体は、EGF 受容体同様にレセプター型チロシンキナーゼ (RTK) である。RTK は、細胞膜上でリガンド刺激によって活性化された後、細胞膜上で細胞内へのシグナル伝達を誘起するだけでなく、細胞内に取込まれた後に endocytic vesicle 上でも下流シグナルをトリガーすることが知られている。ひとつの入力シグナルから、細胞内の部位によって異なるシグナル経路が惹起され、協同的に細胞応答を引き起こすと考えられているのである。ところで、リガンド刺激後に RTK は、クラスリン被覆ピットを介して細胞内に取り込まれるが、これは negative feedback 機構である。本研究において、我々は、1 分子観察法を用いて SCF 受容体が、リガンド刺激直後に、クラスリン非依存的な経路で細胞内に取り込まれ、endocytic vesicle に入った後も活性化状態 (リン酸化) を保持していることを見出した。受容体を down regulation するクラスリン依存的な細胞内取込みは刺激後 2 分以内には殆どおこらず、それ以降に生起する。したがって、細胞内小胞での RTK 下流シグナルの活性化は、この新規な取込み機構によってリガンド刺激直後に取込まれる活性化 RTK が担っていると考えられる。本演題では、(1) リガンド刺激後の SCF 受容体の拡散運動運動停止・細胞内への取込み、(2) 運動停止した SCF 受容体とクラスリン被覆ピットとの同時観察、(3) クラスリン依存的な細胞内取込みを特異的に抑えた場合や細胞内取込みを広く抑えた場合の SCF 受容体の挙動、(4) 取込まれた SCF 受容体の細胞内小胞への集積、などの画像をとおして、この新規な細胞内取込み機構の特徴を紹介する。

T. Kobayashi, M. Murakami, Y. Takeda, C. Yasui-Ohshima, A. Yoshimura and A. Kusumi : A new internalization pathway delivers activated SCF receptor into signaling endocytic vesicles: observation by a single molecule method

1H1040

ダイナミン活動のエバネッセンス顕微鏡による観察

坪井 貴司、○寺川 進 (浜松医大・光子量子医学)

開口放出反応後に生ずる過剰な細胞膜が細胞質に戻るためのリサイクル反応では、ダイナミン I がピットを細胞膜から遊離させはたらきをすると考えられている。その実際の過程を、ダイナミンを緑色蛍光蛋白 (GFP) 化することによって観察した。PC-12 細胞を培養し、ダイナミン I と GFP とを融合した蛋白と、シナプトブレビンと GFP の融合蛋白とを、それぞれ単独または共発現させ、超高開口数の対物レンズを使ったエバネッセンス顕微鏡で観察し、微小ガラス管を使って電気刺激した。シナプトブレビンは顆粒に発現しており、刺激後に開口放出反応を示した。ダイナミンは細胞質に多く、刺激後は、10 分子以上のクラスターとなって細胞膜に結合した。開口放出数よりダイナミンクラスターの数は優っていたが、その出現位置は多くの例で一致しなかった。ダイナミンのクラスターはブラウン運動を示し、細胞膜上を 3 ミクロン以上の幅をもって移動してから消失した。リボン状のクラスターや、リング状の波が広がるようなクラスターも見られた。ダイナミンはクラスターとなって形質膜上を横方向に移動し、それによって、散在するピットを掃除するように処理することがわかった。

T. Tsuboi and S. Terakawa : Dynamin activity observed by evanescent microscopy