2N1600

細胞内膜小胞でのSCF受容体活性化を担う新規エンドサイトシス機構：1分子法による発見

○小林 剛¹、村上 瑞奈^{1,2}、武田 美江¹、大島 智香¹、入江 かつお¹、佐久間 麻由子¹、藤原 敬宏¹、川崎 拓実²、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）

レセプター型チロシンキナーゼ (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、及び、細胞内に取込まれた膜小胞上で、下流への情報伝達をトリガーすることが知られている。このように同じ入力シグナルからでも、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 RTK の一種の stem cell factor (SCF) 受容体が、リガンド刺激直後に、活性化されたまま、クラスリン非依存的な経路で細胞内に取込まれる事を見出した。細胞膜上の SCF 受容体を 1 分子観察すると、定常状態では単純拡散運動を行っていたが、リガンド刺激によって活性化された SCF 受容体は、刺激後 2 分以内に運動を停止し、細胞内に取込まれた。しかし、予想に反して、運動停止した SCF 受容体はクラスリン被覆ピットと共局在せず、また、クラスリン依存的な細胞内取込みを抑えても SCF 受容体の取込みは止まらなかった。これらの結果は、刺激後 2 分までの活性化された SCF 受容体の取込みは、クラスリン非依存的な経路を経由していることを示している。また、この取込まれた受容体は、endocytic vesicle に入った後も活性化状態（リン酸化）を数分間保持していた。一方、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。

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

2N1630

Single-Molecule Imaging of Cooperative Assembly of Hemolysin on Erythrocyte Membranes

○ Nguyen Anh Thi Van¹、神尾 好是¹、樋口 秀男^{2,3}（¹ 東北大・農、² 東北大・工、³ 東北大・学際センター）

Single-molecule fluorescence imaging was used to investigate an assembly of *Staphylococcus aureus* LukF and HS monomers into pore-forming oligomers (γ -hemolysin) on erythrocyte membranes. We distinguished intermediates corresponding to small oligomers, pores and clusters of pores from population of the monomers by fluorescence resonance energy transfer between different dyes attached to monomeric subunits. The number of LukF (donor) and HS (acceptor) in an oligomer were deduced from the acceptor emissive intensities under FRET and direct acceptor excitation, respectively. Thus, equilibrium constants of early membrane-binding and sequential oligomerization stages in the assembly pathway were estimated. Several stages exhibit high cooperativeness which is effective to assembly efficiency: dimer-dimer tetramerization, single-pore oligomerization, and formation of clusters containing more than two pores. Finally, with a certain protein concentration applied to the cells, we could predict the theoretical population of intermediates, such as monomers (in solution and on membranes), oligomers, pores and clusters of pores, at equilibrium on the basis of the estimated binding and assembly constants.

A.TV.Nguyen, Y.Kamio and H.Higuchi : Single-Molecule Imaging of Cooperative Assembly of Hemolysin on Erythrocyte Membranes

2N1615

光ピンセットを用いた細胞膜ラフリングの計測

○境 健一、高橋 史典、大木 和夫、宮田 英威（東北大／院／理）

細胞の遊走において、アクチンの重合による細胞膜の伸展がみられる。このとき、細胞先端においてアクチンの重合核が形成され、そこにアクチンモノマーが重合することにより膜が伸展すると考えられている。我々はこのプロセスを詳しく調べるため、SWISS3T3 繊維芽細胞をカバーガラス上に播種し、光ピンセットで直径 1 ミクロンのポリスチレンビーズを保持し突出しつつある lamellipodia の先端付近に位置させ、その運動を Video 記録し解析した。去年までの結果から光ピンセットのバネ定数の増加に伴い、細胞膜の伸展速度が遅くなることから、lamellipodia 先端における細胞膜の揺らぎの大きさが細胞膜伸展速度に大きな影響を及ぼすことが示されたが、今回はこの事実を検証と伸展速度と収縮速度の相関性についてより詳しく解析した結果について述べる。

K.Sakai, F.Takahashi, K.Ohki, H.Miyata : Measurement of fibroblast peripheral motility by optical tweezer

2N1645

細胞分裂時におけるミトコンドリア膜電位変化の観察

○澤井 祐子、太田 善浩（農工大・工・生命工）

M 期における分裂細胞では、細胞周期の他の期間 (G_1 期・S 期・ G_2 期) には見られないような、細胞質微小管の分散・有糸分裂紡錘体の形成・染色体の移動／分裂・微小管の伸縮・クロマチンの分散・細胞質分裂などダイナミックな細胞運動が短時間に起こり、ATP が急速に消費されることが予想される。細胞における ATP 合成のほとんどは、ミトコンドリア内膜を介した膜電位をエネルギー源として行われるので、細胞分裂の間に、ミトコンドリア膜電位に現れる変化をモニターした。我々は、染色体分裂前～細胞質分裂後における C6 グリオーマ細胞を、膜電位感受性蛍光色素 Tetramethylrhodamine ethyl ester(TMRE)、DNA 溝へ結合する蛍光色素 Hoechst33342 により二重染色し、1 個の細胞で細胞分裂時における蛍光強度の経時変化を蛍光顕微鏡下で観察した。また、蛍光蛋白質 ECFP をミトコンドリアに発現させた細胞でも同様の実験を行った。分裂期中期の前後で、TMRE 蛍光強度は著しく減少していた。一方、TMRE に比べて膜電位の感受性が弱いミトコンドリア結合蛍光色素 Mito tracker red CMXRos で染色した細胞や、ミトコンドリア膜電位に蛍光強度が依存しない ECFP をミトコンドリアに発現させた細胞では、蛍光強度はほとんど減少しなかった。これらのことから、TMRE 蛍光強度の減少がミトコンドリア膜電位の減少によりもたらされることがわかった。ミトコンドリア膜電位の減少が、細胞分裂の際に必要な ATP の大量消費・ADP 濃度増加により見られるものか、あるいは、 Ca^{2+} や K^{+} の膜間移動によるものなど他の要素により引き起こされるものか、検討した結果とあわせて、発表したい。

Y Sawai and Y Ohta : Observation of the mitochondria membrane potential changes concurrently with cell division.