3N1430

PC12細胞におけるPIP2ダイナミックスの近接場励起蛍光顕微鏡による観察

Jeromin Andreas², Roder John², 秋山 信治¹, 平田 宏聡¹, 〇宮田 英威¹ (¹ 東北大・院・理、²Mol. Immunol. Dept. Mt. Sinai Hosp.)

ホスファチジルイノシトール4,5-2リン酸(PIP2)は主に細胞膜内葉に存在し、低分子量 G 蛋白質が関与する細胞骨格配列変化において重要な役割を果たすことが近年の多くの研究により明らかにされている。これらの研究においては固定した細胞が対象となっていることが多く、PIP2 ダイナミックスについての研究は遅れている。われわれは YFP とホスホリバーゼ C の PH ドメインとの融合蛋白質を定常的に発現した PC12 細胞に神経成長因子 (NGF) を与えた後に細胞膜上の PIP2 分布がどのように変化するかを落射蛍光および近接場励起蛍光顕微鏡によって観察した。近接場励起法では励起範囲が培養基質から 100nm 程度に限られるため、観察される蛍光はもっぱら細胞底膜からのものとなる。細胞を無血清中 16 ないし 20 時間培養したのち底膜を近接場蛍光法で観察すると大きさ 1 ミクロン程度の細かい明パターンがやや暗い背景蛍光の中に分布していた。この状態で 50ng/ml NGF を加えると、数分で細胞体からラメリポディアが盛んに突出する様子が見られ、底膜の近接場励起蛍光強度が 20 ないし 50 % 増大した。蛍光強度を定量した結果、底膜蛍光強度の増加は主に背景蛍光が増大したためであることがわかった。落射蛍光でも蛍光増大が確認された。したがって NGF 刺激により PIP2 の細胞膜上での濃度が上昇したことが示唆される。ただし蛍光強度増大の時間経過は細胞ごとにかなり異なっていた。低分子量 G たんぱく質 Rac のドミナントネガティブ体を発現した細胞では蛍光増大は抑えられた。また活性化 Rac を発現した細胞では蛍光増大が上述の場合に比べて長く続いた。これらの結果は NGF 刺激に始まる細胞内アクチンの再配列において Rac から PIP2 にいたる流れが重要であることを示唆する。

A. Jeromin, J. Roder, A. Akiyama, H. Hirata and H. Miyata : PIP2 dynamics in NGF-stimulated PC12 cells as revealed by evanescent-excitation fluorescence microscopy

3N1500

細胞膜の外層と内層にあるラフト分子間のカップリング

〇小山 郁子^{1,2}、飯野 亮太¹、村越 秀治^{1,2}、藤原 敬宏¹、梶川 絵理子¹、吉村 昭彦³、小林 剛¹、楠見 明弘^{1,2} (¹ERATO, JST、²名大院・理・生命理学、³九大・生体防御)

低分子量 G タンパク質 H-Ras は細胞膜の細胞質側の層に存在し、一部はラフトに分配する。一方、スフィンゴ脂質 GM1 は細胞膜の外層に存在し、多くはラフトに分配する。細胞膜の外層にある 2 種の分子については、同時にそれぞれの分子種をクロスリンクすると、両方がラフトに入って共局在するという例が多く知られている (Harder ら, 1999; Verkade ら, 2000; Mayor ら, 1994)。そこで我々は、GM1 と H-Ras が細胞膜の表裏間で相互作用する可能性、特に、各々がクロスリンクされたときに、ラフトを介した相互作用によって共局在が増加する可能性を検討した。細胞膜内層にある H-Ras を多量化するために Schreiber らの dimerizer の方法 (ARIAD) を用いた。すなわち、FKBP2-GFP-H-Ras (FGH-Ras) を HeLa 細胞に発現させ、FKBP に結合するクロスリンカー AP20187 (AP) を添加すると、細胞内で FGH-Ras の多量体が形成される。細胞外から蛍光標識したコレラトキシン B (CTXB, GM1 を最大 5 分子クロスリンク) を加え、FGH-Ras と CTXB の一分子同時観察を行った。AP だけを添加して FGH-Ras だけをクラスター化しても、GM1 (CTXB) の共局在は誘導されなかった。一方、抗 CTXB 抗体を加えて GM1 をクラスター化すると、FGH-Ras (1 分子) の共局在が生じた。さらに FGH-Ras の多量体を誘導したが、共局在は増えなかった。対照として、ラフトに分配しにくいリン脂質 DOPE を細胞膜外層に導入し、クラスターを誘導したが、FGH-Ras との共局在は起こらなかった。この結果は、細胞膜外層のラフト分子のクラスター化によって、細胞内のラフト型シグナル分子がクラスターと結合し得ることを示唆する。

I.Koyama, R.Jino, H.Murakoshi, T.Fujiwara, E.Kajikawa, A.Yoshimura, T.Koyabayashi and A.Kusumi : Inter-leaflet coupling of lipid raft molecules in the cell membrane

3N1445

短時間安定ラフトの担う神経細胞の T-カドヘリンシグナリング：一分子イメージング法によるアプローチ

〇玉田 一生¹、鈴木 健一²、実松 史幸¹、Barabara Ranscht³、武内 恒成¹、楠見 明弘^{1,2} (¹名大院・理、²科技振・ERATO、³Burnham Institute)

T-カドヘリンはカドヘリンファミリーに属する膜タンパク質であるが、GPI-アンカー型タンパク質であるという特徴を持つ。すなわち細胞質ドメインを持たず、アクチン骨格と結合できないため、接着分子としては機能できず、むしろシグナル受容体として働く可能性がある。さらに、そのシグナリングにラフトが関与する可能性も考えられる。本研究ではこの可能性を検討するために、ニワトリ後根神経節細胞の細胞膜上で、T-カドヘリンの挙動、および他のシグナル分子の挙動との相関を 1 分子可視化法を用いて調べた。まず、T-カドヘリンをクロスリンクするために、多数の抗 T-カドヘリン IgG 抗体を結合させた直径 40nm の金コロイド微粒子 (IgG-Gold) を細胞に加えると、添加後 1 ~ 3 分にわたって細胞内のカルシウムイオン濃度が著しく増加した。これはクロスリンクを誘導しない少数の Fab 断片を結合させた金コロイドでは起こらなかった。また T-カドヘリンをクロスリンクした後、免疫沈降すると信号伝達分子 yes が共沈し、さらに細胞を蛍光染色すると T-カドヘリンのクラスターの約 13% が yes の輝点と共局在した。一方 IgG-Gold で T-カドヘリンの運動を観察したところ、成長円錐/軸索において、平均 6 秒間に 1 度 0.5 秒程度ずつ、一時停止しては又動き出すという変わった拡散運動をしていた。このような一時停止領域の出現とカルシウム応答は非常によく相関しており、コレステロールの部分除去やアクチン線維の部分的脱重合、SFK 阻害剤である PP2 の添加によって両者とも殆どなくなった。これらの結果は、T-カドヘリンのシグナリングは、この一時停止領域を介して行われていること、この領域は yes によって誘起されるアクチン線維に結合したラフト領域であることが示唆された。

I.Tamada,K.Suzuki,F.Sanematsu,B.Ranscht,K.Takeuchi,A.Kusumi : Neural T-cadherin signaling based on transient but stabilized rafts : a single molecule imaging approach

3N1515

CD44 を介したシグナル入力によるラフトの安定化と意義：一分子可視化解析による研究

〇溝口 裕邦¹、堀田 陽子²、鈴木 健一²、Ritchie Kenneth²、実松 史幸¹、藤原 敬宏²、楠見 明弘^{1,2} (¹名大・院理、²科技団・ERATO)

近年、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。我々は、GPI アンカー型タンパク質 CD59 の載っているラフトは、外部からの信号入力のない状態の CD59 モノマーについては極めて不安定 (ミリ秒以下の寿命) で小さい (数分子) ことを示した。一方、外部信号により CD59 が活性化されてクラスターになると、それを核とした小さな安定ラフト (core receptor raft) が形成され細胞内を動き回ることで、この core receptor raft は src family kinase 依存的にアクチン線維と相互作用して、直径 90nm 程度の transient confinement zone (TCZ) を作って一時的に動きを停止し、そこで下流への信号をトリガーすることを報告した。これらは CD59 を一分子レベルで観察してはじめて分かったことである。しかし、この機構がラフトに関わる他の受容体にも当てはまるのかは分からない。そこで本研究では定常状態でラフトに 50 % 程度が入ることが知られている膜貫通型タンパク質 CD44 を取り上げ、TCZ の形成とシグナル伝達への関与を調べた。金コロイドにより強くクロスリンクされた CD44 は平均 3.5 秒に 1 回 0.5 秒ほど一時停留を頻繁に繰り返して拡散運動をしていた。このような一時停留は、金コロイドに結合した抗体量を減らし、CD44 のクロスリンクの程度を抑えた場合には見られなかった。また、コレステロールの部分除去、アクチン線維の部分破壊、src family kinase 阻害によってもこのような一時停留は殆どなくなった。これらの結果は何れも CD59 の場合と同様であり、TCZ を介したシグナル伝達はラフトに分配する受容体に共通の機構であることが示唆されている。

H.Mizoguchi,Y.Hotta,K.Suzuki,R.Kenneth,F.Sanematsu,T.Fujiwara and A.Kusumi : Stabilization of rafts in signal transduction via CD44 as studied by single molecule observations.