B345

膜小胞における球状部と膜突起の共存条件

○稲葉 岳彦¹、石島 秋彦²、滝口 金吾¹、宝谷 紘一¹ (¹名大院・理・生命理、²名大院・工・応物)

我々は先に、光ピンセットと人工膜小胞(リポソーム)を利用し、脂質膜の変形とその変形に必要な力を測定する系について報告した(生物物理 2002 年会)。リポソーム内部の2つのビーズを光ピンセットで操作しリポソームに力を加えると、球形のリポソームはまずレモン形に変形した。さらに変形が進むとレモン形の端より管状の膜突起が形成された。膜突起の形成により、球状部と管状部の2つの部位を持つ形態へと変化したことになる。この過程は微細管による膜突起形成と同じである。膜突起形成後、膜突起を徐々に短縮すると、膜突起が消失しレモン形のリポソームへと形態が復帰した。これらの変形に必要な力は、球形からレモン形に変形している間徐々に上昇した。その力が臨界値に達すると膜突起が生じ、直ちに減少する。それ以降、膜突起の伸長と短縮に関わらずほぼ一定であった。意外なことに、膜突起が消失する時に力が発生していることが分かった。

今回特に、膜突起の形成と消失前後のリポソームの形態に注目し、レモン形リポソームと膜突起をもつリポソームの球状部の各長軸の長さを測定した。やはり、膜突起の伸長と短縮に関わらず、球状部の長軸の長さもほとんど変化しなかった。そして、リポソームが変形し膜突起が形成される直前のレモン形と、膜突起が消失した直後に復帰したレモン形は、どちらのレモン形リポソームも長軸の長さがほぼ同じであった。このレモン形リポソームから最初に形成された膜突起の長さと同程度まで膜突起が短縮すると、膜突起が突然消失し、レモン形に復帰することがわかった。

これらの結果は、球状部と膜突起の共存には一定長より長い膜突起が必要であることを示している。また、膜突起消失時に発生する力は、臨界長以下の膜突起が不安定で存在できず、形態がレモン形へと強制復帰するためと考えられる。

T. Inaba, A. Ishijima, K. Takiguchi and H. Hotani : Coexistence of spherical and protrusive portions on a liposome.

B347

二つの相同なアミノ酸レセプターによるリガンド識別機構の解析

○田島 寛隆、加藤 実穂、堀田 韻虹、本間 道夫、川岸 郁朗 (名大院・理・生命理学)

大腸菌は、セリンとアスパラギン酸を誘引物質として認識し、走性を示す。これらのアミノ酸は非常に相同性の高い二回膜貫通型レセプターである Tsr と Tar に結合し作用する。この二つのアミノ酸は、側鎖がそれぞれ-CH₂OH、-CH₂COOH でありよく似ているが、Tsr はセリンを Tar はアスパラギン酸を特異的に認識している。当研究室の服部は、この正確なリガンド識別のメカニズムを解明するために様々なキメラレセプターを構築した。その結果、Tsr の 61 から 90 番の残基を Tar の対応する残基と入れ替えたキメラレセプター Tsasr はアスパラギン酸応答を媒介したが、その逆の Tasar はセリン応答もアスパラギン酸応答も媒介しなかった。本研究ではまず、この応答の違いが本当にアミノ酸結合能の違いによるものかを調べた。具体的には、リガンド結合部位にある Thr を Cys で置換し、チオール基修飾蛍光試薬 IAF により修飾、検出できるようにした。そして、この修飾反応に対してセリンやアスパラギン酸が保護効果を持つかどうかを調べた。その結果 Tsasr-T156C はアスパラギン酸によって保護されたが、セリンには保護されなかった。これはアスパラギン酸が結合し、セリンは結合しないことを示している。また、Tasar-T154C はどちらにも保護されなかった。弱いながらもトリプトンによる保護効果が見られたが、すべてのアミノ酸について調べても保護効果は確認できなかった。そこで、切り替え部位を 56 から 142 番の残基に広げた Tasar を構築したが、やはりセリンもアスパラギン酸も結合しなかった。現在、これらの Tasar キメラにランダム変異を導入して、セリンを認識する Tasar を単離しようと試みている。これと並行して、ペリプラズムドメインのみのフラグメントを作製、精製した。このフラグメントを用いて、リガンド結合能についてより詳細に解析している。

H.Tajima,M.kato,Y.Hotta,M.Homma,I.Kawagishi : Analysis of the ligand discrimination mechanism of the two related amino acid chemoreceptors

B346

新規人工平面膜法の開発

○井出 徹¹、市川 杜彦²、柳田 敏雄³ (¹ 科学技術振興事業団・戦略創造、² 阪大院・基礎工、³ 阪大院・生命)

人工脂質平面膜法は、単一チャネル電流の解析、特に、パッチクランプ法の適用が困難な、内膜系チャネルの電流解析に用いられ、多くのチャネルタンパクの電気生理学的性質を明らかにしてきた。また、我々は、人工膜法と蛍光顕微鏡による 1 分子観察法を組み合わせ、単一チャネルタンパクの電気・光学的同時計測法の開発に成功している(1-3)。さらに、最近、人工膜に組み込んだチャネルを用いて、センサーを作製しようという試みも盛んになされている(4)。人工膜法は、脂質や溶液の組成を自由に制御できるという長所を持っている反面、膜形成やチャネルの組み込みに熟練を要し、1 回の試行に少なくとも数十分程度を要するなど、効率の高い計測系であるとは言えない。本研究では、チャネルタンパクの 1 分子同時計測系を基にした高感度なバイオセンサーの開発を念頭に、簡便でコンパクトな人工膜形成法の開発を行った。従来、数分から数十分を要していた人工二重膜の形成は、数秒に短縮され、数百 ml から数 ml 必要であった測定溶液は、ml 程度で十分となった。これにより、極く少量の検体を用いて、より迅速な計測が可能になり、さらには、計測の自動化も期待される。(1)Biochem Biophys Res Commun. 1999 265(2):595-9 (2)Single Molecules 2002 3(1): 33-42 (3)Jpn J. Physiol. 2002 52(5): 429-34 (4)Nature 2001 413(6852):226-30

T. Ide, T. Ichikawa and T.Yanagida : Novel Techniques for Forming Artificial Planar Bilayers

B348

ケモカイン受容体 CXCR4 はリガンド非依存的に多量体を形成する

○Iskandar Silvia、木脇 圭一、青木 大輔、東條 正、多田隈 尚史、船津 高志 (早大、理工、物理)

幅広い機能を果たす G タンパク質共役型受容体 GPCR family が単量体として働くか多量体として働くかについては議論の余地がある。そこで我々は HIV-1 の共受容体として注目を集めている CXCR4 の多量体形成を分子蛍光観察により検討した。CXCR4 の C 末端側に緑色蛍光タンパク質(EGFP)を融合して CXCR4-EGFP を作成し、これを CHO-K1 細胞に強制発現した。リガンドを加えると一過的に細胞内 Ca²⁺濃度が上昇したことから CXCR4-EGFP が機能を有することを確認できた。対物エバネッセント顕微鏡を用いてリアルタイム観察を行ったところ CXCR4-EGFP が細胞膜上をブラウン運動する輝点として観察された。この輝点の輝度分布を解析することにより CXCR4 がリガンド非依存的に多量体化していることが示された。次に、二量体化しにくい mutant EGFP(A206K)を用いて同様の実験をしたところ、CXCR4-EGFP(A206K)もまた多量体化していることが示された。これにより、多量体形成は EGFP によるものではなく、CXCR4 の自己特性であることが示された。我々は以前 FPR1、CXCR1、CCR5 についても同様の結果を報告した。これらより多量体化は ClassA Rhodopsin like GPCR family に共通な特性であると考えられる。

S.Iskandar, K.Kinowaki, D.Aoki, T.Tadashi, N.Tadakuma, T.Funatsu : Chemokine receptor CXCR4 oligomerizes independent of ligand binding