B533

1 分子観察によるリガンド添加直後の G タンパク質 共役型受容体の挙動

○笠井 倫志¹、飯野 亮太¹、藤原 敬宏¹、中西 華代¹、Eric Prossnitz²、楠見 明弘¹ (¹ 科技振 ERATO / 名大院理、² Univ. of New Mexico)

リガンド添加直後の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の挙動の理解のため、GPCR の一つであるフォルミルペプチド受容体 (FPR) を CHO 細胞膜上で 1 分子レベルで追跡した。ほとんどの受容体にアゴニストが結合する条件では、アゴニスト添加後、20、40、60 秒後には、それぞれ、既に 46、55、70% (一つの細胞内取込み装置に複数個の分子が同時に存在することも多いので、輝点数ではなく、分子数に換算されている。アゴニスト添加前には、15% の FPR-GFP が静止していたことがわかっている) もの FPR-GFP の拡散運動が停止した。一方、受容体の細胞質ドメインにおいてリン酸化の可能性があるセリン/スレオニンを全てアラニンとグリシンに置換した変異体 ΔST では、アゴニスト添加前には同じ割合 (15%) の静止成分があったが、アゴニストを添加しても、静止成分の割合は変化しなかった。すなわち、静止成分の増加には GRK による受容体のリン酸化が必須であり、β アレスチン結合の関与が示唆された。これは、通常被覆ピットへの取り込みを意味するが、FPR の挙動ははるかに複雑であった。即ち、AP2-GFP (クラスリン被覆ピットマーカ)、caveolin-GFP (カベオラマーカ) を発現させ、蛍光リガンドを添加して 60 秒後に、2 色同時の 1 分子イメージングをおこなったところ、静止している分子の約半数は被覆ピットに、約 1/4 はカベオラに局在し、1/4 はこれらと局在しなかった。ちなみに、この時間では、細胞内に取り込まれる FPR はほとんどない。これらは 1 分子観察によるはじめて得られる知見であり、活性化された GPCR の挙動についての従来の理解の再組織化を迫るものである。

R. Kasai, R. Iino, T. Fujiwara, H. Nakanishi, E. Prossnitz, A. Kusumi : Single molecule observations revealed new behaviors of G protein-coupled receptor after ligation

B535

生細胞内での Ras 活性化の 1 分子 FRET 観察とシグナル複合体形成の検出

○村越 秀治^{1,2}、飯野 亮太¹、小林 剛¹、藤原 敬宏¹、大島 智香¹、吉村 昭彦³、楠見 明弘^{1,2} (¹ ERATO・科技振、² 名大院・理、³ 九大院・医)

本研究の目的は、細胞膜に多くが局在する低分子量 G タンパク質の Ras (H-と K-Ras) が活性化する瞬間を、生細胞内で 1 分子毎に可視化すること、活性化された Ras 分子と他の分子との相互作用を明らかにすること、である。まず、YFP-H(K)-Ras を発現させた KB 細胞に BodipyTR-GTP を顕微注入し、EGF 刺激によって BodipyTR-GTP が YFP-H(K)-Ras に結合したときにおこる、YFP から BodipyTR への 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動を観察することに成功した。EGF 刺激後に 1 分子 FRET をおこす Ras 分子は一過的に増加し、このタイムコースはバクシ生化学アッセイによるものと同じであった。さらに、Ras は活性化にともなって拡散運動が劇的に、しかし、一時的に抑えられた。この運動抑制は 1 秒程度つづいた。これは、Ras が活性化されると、SUR-8 や galectin (これは主に H-Ras) などのスクヤフォールドタンパク質と複合体を形成し、そこに下流のエフェクターがリクルートされてくるというモデルを支持する。また、EGF 刺激後には、p120RasGAP-YFP も細胞膜に 0.5 秒程度リクルートされ、しかも、ほとんどすべてが膜上で静止していた。さらに、H-Ras を多量に発現させると、細胞膜にリクルートされる p120RasGAP-YFP の数は約 20 倍増えたが、それらもすべて静止しており、滞在時間は 0.5 秒程度であった。これらは、Ras から下流へのシグナル伝達は、分子のランダムな衝突ではなく、短寿命の活性化 Ras シグナル複合体の形成と、そこへのエフェクター分子のリクルートによって起こることを示唆する。

H. Murakoshi, R. Iino, T. Kobayashi, T. Fujiwara, C. Ohshima, Yoshimura and A. Kusumi : Single-molecule imaging of Ras activation and detection of signaling complexes in living cells

B534

走化性刺激依存的な CRAC の膜移行：生細胞内 1 分子イメージングによる解析

○松岡 里実¹、上田 昌宏²、Peter Devreotes³、柳田 敏雄² (¹ 阪大院・理・生物科学、² 阪大院・生命機能・ナノ生体科学、³ ジョンズホプキンス大・医・細胞生物)

細胞性細菌は cAMP に対して走化性を示す。この際、入力情報となる細胞外の cAMP 濃度勾配がゆるやかであっても、G タンパク質共役型受容体などを介した情報伝達過程を経た結果、仮足を伸長させるための情報は細胞外 cAMP 濃度の高い側でのみ出力される。この出力情報に制御されるタンパク質に CRAC があり、これまでに多分子の平均としての挙動が明らかにされている。CRAC は、走化性運動をしている細胞では、前端部分の細胞膜に結合している。また、静止している細胞では細胞質に存在しているが、細胞外 cAMP 濃度の上昇によってすみやかに細胞膜へ移行し、約 10 秒間細胞膜と結合する。これらの結合は PI(3,4)P2 および PI(3,4,5)P3 との間で PH ドメインを介して起こると考えられている。そこで、個々の CRAC 分子の細胞膜への結合が cAMP 刺激依存的に制御される過程について知するために、細胞膜に結合している CRAC の 1 分子可視化解析を行った。GFP を融合した CRAC を発現する粘菌細胞を対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡で観察した結果、ほとんどの CRAC 分子の細胞膜滞在時間は 1 秒にも満たないことを明らかにした。CRAC の細胞膜との相互作用は解離速度の違いによって 2 成分に分けられ、それぞれの解離の時定数はおよそ 100 ミリ秒と 1 秒であった。また、走化性運動をしている細胞の前端部分や cAMP 刺激直後の細胞では、時定数が 100 ミリ秒の成分の密度や頻度が上昇していることがわかった。このように、多分子の平均としては持続的に局在化するように見えた反応は、個々の分子による瞬時の結合が繰り返される過程であった。このことは、細胞外 cAMP の空間分布の変化に素早く対応するために重要であると考えられる。

S. Matsuoka, M. Ueda, P. N. Devreotes and T. Yanagida : Single molecule imaging of CRAC recruitment induced by chemotactic signaling

B536

蛍光相互相関分光法による細胞内分子間相互作用解析

○齊藤 健太¹、和田 郁夫²、田村 守¹、金城 政孝¹ (¹ 北大電子科学研究所 超分子分光分野、² 福島県立医大 生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門)

プロテオミクス研究の中で特に重要な位置を占めているのが蛋白質間相互作用の解析である。真の蛋白質間相互作用の記述には相互作用のタイミング、持続時間、相互作用の強さを in vivo すなわち生細胞において測定する必要がある。蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, 以下 FCS) は蛍光分子が測定領域を通過する際の光強度のゆらぎから、分子の動きの情報 (拡散時間) を測る手法である。一方、蛍光相互相関分光法 (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy, 以下 FCCS) は 2 色の異なる蛍光分子が測定領域を通過する際の光強度変化の同時性 (相互相関) から、分子間相互作用を検出する手法である。本研究では FCS と FCCS を用いた生きた細胞内での網羅的な蛋白質間相互作用検出法の開発を目的とした。FCCS は分子間相互作用を単一分子レベルで測定するため、極めて鋭敏な方法である反面、測定法自体に厳密な調整を必要とする。そこで今回は、FCCS の細胞内での測定条件 (ダイクロイックミラーおよび励起・受光用のバンドパスフィルタの選択と励起光強度) を決めるために EGFP、mRFP の融合した EGFP-mRFP という蛋白質を作成し、溶液中での FCCS 測定を行なった。この結果から、FCCS の測定条件を決定した。また、この融合蛋白質は 1 対 1 の結合を持っているので、2 分子が全て相互作用している状態のモデルと考える事ができる。次に、細胞内に発現した EGFP-mRFP の相互相関検出を試みた。また、EGFP-mRFP へのプロテアーゼによる切断部位を導入したものを作成し、細胞内でプロテアーゼ活性化により細胞内で切断が起こり相互相関が減少していくのを観測する予定である。

K. Saito, I. Wada, M. Tamura and M. Kinjo : Analysis of molecular interactions in a living cell by using fluorescence correlation spectroscopy