2P217

メリチンの膜トポロジー変換能力：膜への結合様式との関連性

○野村 典正、中村 祐己、宝谷 紘一、滝口 金吾（名大・院理・生命理学）

膜の融合や分裂はトポロジー変換をともなう代表的な現象であり、そのメカニズム解明は重要な課題の一つである。ミツバチ毒の主成分ペプチドであるメリチンは膜融合活性をもち、最も単純な材料として古くからよく研究されてきた。近年、我々は暗視野光学顕微鏡によるジャイアントリポソーム（直径：1 μ m 以上）のリアルタイム観察によって、メリチンの膜作用を再評価した。その結果、メリチンは膜融合活性に加え、多様なトポロジー変換能を有していることを見出した。例えば、塩が存在しない中性 pH 条件下において、ホスファチジルコリン (PC) からなるリポソームでは、閉じた小胞から開いたシートへのトポロジー変換（膜穿孔）が起こった。一方、ホスファチジルグリセロール (PG) と PC (= 1:1, モル比) からなるリポソームでは、リポソームがその輝度を増しながら断続的に縮小（断続的縮小）し、さらに縮小したりリポソーム間での融合が見られた。

これらの現象は、どのようなメカニズムによって起こるのだろうか？ メリチンとリポソームの共沈実験から解離定数 K_d および結合比 (Lipid/Peptide) を求めたところ、膜穿孔が起こる条件では 1.3 mM および 15、断続的縮小が起こる条件は 1.5 mM および 9.5 であり、差は認められなかった。

そこで、今回、上記の条件において、メリチンが膜に対してどのように結合しているかを調べるため、水溶性の蛍光消光剤を用いて、メリチンのトリプトファン蛍光における消光実験を行った。その結果、膜穿孔が起こる条件では、ペプチド濃度に依存せず、トリプトファンの蛍光は消光される。一方、断続的縮小がおこる条件では、消光作用が著しく弱まった。以上のことから、膜の脂質組成によって、ペプチドの膜に対する結合様式が異なり、この結合様式の違いが膜作用の違いとして現れると考えられる。

F. Nomura, Y. Nakamura, H. Hotani, and K. Takiguchi : Melittin determines the topological transformation of liposomes through their binding manner to membrane.

2P219

Silicon nanoparticles: Application to imaging the motion of single molecules in live cell membranes

○ Ritchie Ken、後藤 美樹、西村 博仁、楠見 明弘 (ERATO/SORST-JST 名大院理、名大高等研究院)

Silicon nanoparticles represent a novel inorganic fluorescent particle of size 1-3 nm in diameter that is derived from crumbling the surface of porous silicon. They undergo photo-stimulated emissions with a broad excitation spectrum and an emission spectrum that varies with size from blue at the smallest to red at the largest. We have developed a method for enhancing the production of 605 nm emission particles. Further, silicon nanoparticles do not exhibit blinking (intermittent on/off states) or bleaching under continuous observation for over 15 min. Tracking of single fluorescent nanoparticles has the potential to greatly improve existing methods for tracking single or small groups of molecules in the cell membrane of live cells. We have functionalized these particles by conjugating them to protein ligands or antibody Fab fractions. Continuous imaging over 5 min (under conditions where green fluorescent protein bleaches in 0.5 s) has been achieved with the transmembrane protein transferrin receptor in live NRK cells. The diffusion coefficients of silicon nanoparticle labeling compare well with that found through conventional dye labeling (i.e. use of Cy3).

Ken Ritchie, Miki Goto, Hirohito Nishimura and Akihiro Kusumi : Silicon nanoparticles: Application to imaging the motion of single molecules in live cell membranes

2P218

マスト細胞の脱顆粒における complexin による制御機構の研究

○崎山 祥紀、田所 哲、中西 守、平嶋 尚英（名市大院・薬）

【目的】アレルギー担当細胞であるマスト細胞は、炎症性メディエーターを Ca^{2+} 依存的にエクソサイトーシスによって細胞外に放出し（脱顆粒）、アレルギー反応を引き起こす。近年この脱顆粒機構に SNARE とよばれる蛋白質群が関与していることが明らかとなってきた。Complexin は、SNARE に結合してその活性を制御すると考えられている蛋白質である。本研究ではマスト細胞における complexin の役割とその脱顆粒制御機構を明らかにすることを目的とした。【方法】マスト細胞としてラット好塩基球株 (RBL-2H3 細胞) を用いた。マスト細胞に発現している complexin II の低発現株をアンチセンス法により得た。脱顆粒量は分泌顆粒内の β -hexosaminidase を定量することによって、また、細胞内の Ca^{2+} 濃度は Fura-2 を用いて測定した。【結果と考察】

抗原刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化には野生株と complexin II の低発現株の間で変化は認められなかったが、脱顆粒量は低発現株において有意に減少していた。また、ホルボルエステル (PMA) とカルシウムイオノフォア (A23187) による刺激においても同様に脱顆粒の減少が観察された。これらのことから complexin II は細胞内への Ca^{2+} 流入以降の過程、すなわち分泌顆粒と細胞膜との SNARE 依存性の膜融合過程を制御していることが示唆された。complexin II と SNARE 蛋白質との相互作用及びそれによる膜融合制御機構について詳細に調べるために、マスト細胞の脱顆粒に関与する SNARE 蛋白質 (syntaxin-3, -4, VAMP-7, -8, SNAP-23) を大腸菌に発現させ、単離精製を行なった。現在この精製 SNARE 蛋白質を用いて蛋白質間相互作用や膜融合活性に対する Ca^{2+} 濃度及び complexin II の影響について検討を行なっている。

H.Sakiyama, S.Tadokoro, M.Nakanishi and N.Hirashima : The mechanism for the regulation of degranulation by complexin in mast cells

2P220

膜流動性イメージング法による CHO 細胞でのスフィンゴミエリンとコレステロールの相互作用の研究

武藤 賢志、大場 哲彦、○大木 和夫（東北大・院理・物理）

【背景と目的】細胞の形質膜にはラフトと呼ばれるミクロドメインが存在し、細胞の情報伝達を担う膜蛋白質が集積していることが報告されている。また、ラフトにスフィンゴ脂質とコレステロールが豊富に存在し、これらはミクロドメインの形成に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、本研究では環境感受性蛍光色素 Laurdan を用いた膜流動性イメージングシステムにより、膜流動性の変化からスフィンゴミエリンとコレステロールの特異的な相互作用を CHO 細胞の生体膜上で明らかにすることを目的とした。【材料と方法】膜流動性の観察には Laurdan の発光波長が生体膜への水分子の浸入により、440 nm から 490nm ヘシフトする変化を数値化した Generalized polarization (G.P.) 値を顕微鏡画像化する自作の装置を用いた。CHO 細胞を使用し、膜脂質の修飾にはコレステロールを生体膜から除去するメチル β シクロデキストリンとスフィンゴミエリンをセラミドに変換するスフィンゴミエリナーゼを用いた。【結果と考察】メチル β シクロデキストリンでは処理濃度 15 mM まで膜流動性の上昇が観察されたが、スフィンゴミエリナーゼでは処理濃度 0.13 U/ml まで膜流動性の変化は見られなかった。ところがスフィンゴミエリナーゼ処理を行った細胞に、単独では膜流動性をほとんど変化させない 1 mM でのメチル β シクロデキストリン処理を施すと、膜流動性の上昇が観察された。この結果は、スフィンゴミエリンがセラミドに変換されたためコレステロールがスフィンゴミエリンとの強い相互作用を失って容易に生体膜から除去されたと考えられる。この研究でラフトの形成に重要な役割を果たすと考えられているスフィンゴミエリンとコレステロールの相互作用を生細胞上で膜流動性変化のイメージングにより示すことができた。

K. Muto, T. Ohba and K. Ohki : Interaction between sphingomyelin and cholesterol in CHO cells inferred by imaging technique of membrane fluidity