1P197

1分子イメージングによるPTENの細胞膜結合およびPI(3,4,5)P₃脱リン酸化過程の解析

○松岡 里実¹、Francisca Vazquez²、上田 昌宏¹、桑山 秀一¹、Peter Devreotes²、柳田 敏雄¹ (¹ 阪大院・生命機能・ナノ生命科学、² ジョンズホプキンス大・医)

腫瘍抑制因子PTENは脱リン酸化酵素であり、生細胞における主な基質はphosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P₃)である。これまでの研究から、PTENが細胞膜中のPI(3,4,5)P₃レベルを下げることによって、PI(3,4,5)P₃の下流の細胞分裂・生存を促進する情報伝達系が不活性化し、ガン化が抑制されると解釈されている。一方、PTENはいくつかの細胞質タンパク質に対しても脱リン酸化活性を示し、これによって細胞運動が制御されていることも知られている。このように、PTENによる腫瘍抑制作用は、細胞膜近傍および細胞質において発揮されると考えられる。しかしながら、これまでの蛍光標識PTENの細胞内局在解析によると、PTENは専ら細胞質に存在しており、細胞膜との相互作用については不明な点が多い。はたしてPTENは細胞膜のPI(3,4,5)P₃の脱リン酸化を触媒しうものだろうか。

私達は、PTENが細胞膜に局在しない理由として、通常の光学顕微鏡では検出できないほど低頻度しか細胞膜移行が起こっていないのではないかと考えた。そこで、少数分子による反応を1分子レベルで検出できる全反射蛍光顕微鏡を用いて、細胞膜に結合したPTEN-YFP分子の1分子イメージングを行った。その際、YFPとの融合によってPTENが脱リン酸化活性を失っていないことを裏付けるために、*pten* 遺伝子を欠損する粘菌細胞を用いて解析を行った。結果として、細胞膜に結合するPTEN分子が存在することを証明できた。さらに、1分子計測の結果から、PTENが細胞膜上でPI(3,4,5)P₃の脱リン酸化を触媒していること、PTENへのリン酸化によって細胞膜移行が抑制されていることが明らかになってきた。

S. Matsuoka, F. Vazquez, M. Ueda, H. Kuwayama, P. Devreotes and T. Yanagida : Single-molecular analysis of membrane-binding and enzymatic kinetics of PTEN

1P199

新規シリコンナノ粒子の開発による1分子追跡法の大幅な改善

○西村 博仁^{1,2}、Ritchie Ken^{1,3}、後藤 美樹²、楠見 明弘² (¹ 名大院・理・生命理学、² 京大再生研/JST-ICORP 膜機構、³ Dept. of Phys., Purdue Univ.)

化学エッチングとHPLCにより、赤色蛍光 (605 と 650nm) を発する直径3nmのほぼ均質なシリコンナノ粒子 (SiPR) を作製することに成功した。シリコンナノ粒子の光吸収スペクトルは広く、光励起によってサイズ依存的 (1-3nm) に違う波長での蛍光を発する。我々は、SiPRを用いることによって、1分子追跡の3つの難問、すなわち、蛍光プローブの退色とブリンキング、粒子プローブによるクロスリンクを基本的に解決することを目指している。まず、SiPRは全反射顕微鏡下で15分間、退色も1度もブリンキングすることなく観察できた。次に、SiPRをトランスフェリン (Tf) に結合させ、このSiPR-Tf複合体を、生きているNRK細胞の細胞膜上のトランスフェリン受容体に結合させた。細胞膜上でのSiPR-Tfの拡散運動を全反射顕微鏡を用いてビデオレートで観察し、これを、Cy3-Tf標識によるトランスフェリン受容体の1蛍光分子追跡と比較した。位置決定精度 (追跡のS/Nの目安) は同等であり、拡散係数も一致した。これはSiPRによってトランスフェリン受容体をほとんどクロスリンクすることなく、1分子追跡できたことを意味する。また、3分間、1度もブリンクすることなく (時間分解能3ミリ秒の範囲で) 追跡が可能であった (膜の凸凹のため、3分後にフレーム落ちが生じた)。これらの結果は、1分子追跡法が、SiPRによって、飛躍的に改善される可能性を示唆している。

H.Nishimura, K.Ritchie, M.Goto and A.Kusumi : Improvement of single-molecule tracking by the development of new fluorescent silicon nanoparticles

1P198

ピューロマイシン類似体を用いたトロンボポエチンのC末端蛍光標識と1分子イメージングへの応用

○坂本 明彦¹、渡辺 隆文²、山岸 舞¹、会沢 洋一²、加藤 尚志^{2,3}、船津 高志^{1,4} (¹ 東大・院薬、² 早稲田大院・理工・生命理工、³ 早稲田大・教育・生物、⁴ CREST・JST)

サイトカインとその受容体の複合体は、標的細胞で内在化し、その後、受容体は細胞膜に再構成される、と考えられてきた。これは放射性同位体で標識されたサイトカインの標的細胞内分布などによって示されてきたが、個々の複合体の挙動を時系列的に観測した直接的な証拠はない。

トロンボポエチン (thrombopoietin, TPO) は、血小板の産生に必須のサイトカインである。血小板の前駆細胞である巨核球系細胞に発現した一回膜貫通型受容体c-MplにTPOが結合すると、巨核球-血小板系細胞の増殖と分化がおこる。このTPO-Mpl系をモデルとし、サイトカイン-受容体複合体の細胞内動態を1分子蛍光イメージング法でリアルタイムに直接観察する系を構築することにした。

マウス完全長TPOのシグナル配列を除くN末端側188残基は、生理活性を有する。この領域をコードした直鎖状の二本鎖DNAを鋳型にし、Alexa Fluor[®] 647で標識したピューロマイシンを含む無細胞タンパク質合成系PURESYSTEM[™] S-Sで、マウス部分長TPOを合成することにより、C末端を特異的に蛍光標識した。この生成物を、マウスc-Mplを強制発現させたマウス顆粒球系細胞株FDC/P2に添加して培養したところ、TPO由来と思われる細胞増殖能が認められた。また、C末端蛍光標識系にtRNA-Lys-BODIPY[®]-FLを加え、生成物を二次元電気泳動と蛍光イメージャーで解析することで、標識効率を測定した。

現在、マウスc-Mplを強制発現させたFDC/P2細胞に、C末端をAlexa Fluor[®] 647で標識したマウス部分長TPOを添加し、蛍光顕微鏡で観察しているので、その結果も報告したい。

A. Sakamoto, T. Watanabe, M. Yamagishi, Y. Aizawa, T. Kato and T. Funatsu : Fluorescence labeling of the C-terminus of thrombopoietin with a puromycin analogue and its application to single-molecule imaging

1P200

ラフト親和性分子のホップ拡散-1分子追跡法による研究-

○梅村 康浩¹、藤原 敬宏²、鈴木 健一²、Vrljic Marija³、Nishimura Stefanie Y.³、Brasselet Sophie³、Moerner W. E.³、McConnell Harden M.³、楠見 明弘² (¹ 名大院・理・生命理学、² 京大再生研/JST-ICORP 膜機構、³ Dept. of Chem. Stanford Univ.)

リン脂質の細胞膜上での拡散係数は、人工膜上と比べて1/5~1/100程度と非常に小さい。この原因は、30年間にわたる大きな疑問となっていた。拡散の抑制機構として、藤原ら (2002) は、細胞膜には、全面にわたって30-200nmの仕切りが入っていること、仕切りは膜骨格とそれに結合した膜貫通型タンパク質の形成するピケットフェンスによること、細胞膜中のリン脂質は、網目に閉じこめられていて、隣の網目に飛び移るまでに時間がかかるため、マクロスコピックな拡散が遅くなっていることを示した (ホップ拡散)。さらに村瀬ら (2004) は、細胞膜の仕切りは、哺乳類細胞に普遍的であるらしいことを示した。本研究では、その中で最もコンパートメントサイズが小さかったCHO-K1細胞で、(1) 非ラフト分子として、膜貫通型タンパク質のMHCクラスIIタンパク質 (MHC) と不飽和リン脂質のL- α -dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) を、(2) ラフト親和性分子として、MHCの膜貫通部位をなくしてGPIを結合させたGPIアンカー型受容体 (MHC-GPI) を、1分子追跡した。細胞外からの刺激が入らない状態では、ラフトへの親和性とは関係なく、すべての分子は、およそ40ナノメートルのコンパートメントを滞在時間1~2ミリ秒で速いホップ拡散をしていた。これは、定常状態ではラフトが小さい、かつ/または、寿命は非常に短いことを示唆する。

T. Fujiwara et al., J Cell Biol. 10, 1071-81(2002)

K. Murase et al., Biophys J. 86, 4075-93(2004)

Y. Umemura, T. Fujiwara, K. Suzuki, M. Vrljic, S. Y. Nishimura, S. Brasselet, W. E. Moerner, H. M. McConnell and A. Kusumi : Single-molecule tracking of raftophilic molecules in the compartmentalized plasma membrane