1P225

平面核膜再構築系の開発により明らかになった細胞質-核間輸送の非対称性

○小此木 孝仁^{1,2}、廣島 通夫⁴、椎名 伸之^{1,2}、小瀬 真吾³、今本 尚子³、徳永 万喜洋^{1,2,4} (¹遺伝研、²総研大、³理研・細胞核機能、⁴理研・免疫センター)

細胞質-核間輸送の新しい *in vitro* assay 系を開発し、核膜孔複合体が核内移行と核外移行で非対称な相互作用をすることを見いだした。アガロース表面に *Xenopus* egg extract を用いて核膜を再構築し、輸送活性を importin α / β / NLS 複合体の Ran 依存的な核内輸送で確認した。従来のセミインタクト細胞系ではできなかった、核側の分子濃度を変化させることが可能となった。核内輸送活性の RanGTP 濃度依存性を計測した結果、RanGTP に対し協同性が見られた。核膜孔複合体の複数ある活性部位間で構造変化が起こっていることが示唆される。

核膜孔複合体と輸送される分子との相互作用を、細胞質側からと核側からとで比較した。importin α を RanGTP 非存在下で細胞質側から加えると、十分な時間経過後にも、核側との濃度差が残ったままとなった。核側から加えた場合には、濃度差は生じず、核側と細胞質側とで同濃度になった。この非対称性は、生理的に核内に輸送されない importin α 単独あるいは importin α と NLS 複合体のみで観察された。生理的に核内に輸送される importin α / β / NLS 複合体や β -catenin 単独では、この非対称性は観察されなかった。また、十分な時間経過後に濃度差が残っている状態で、さらに importin α を加えても、細胞質側からと核側とで、同様に非対称な結果となった。核膜孔複合体が、細胞質側からと核側からとで、向きにより非対称な相互作用をすることを意味している。生物学的にも物理学的にも興味深い新しい知見である。

A. Okonogi, M. Hiroshima, N. Shiina, S. Kose, N. Imamoto, M. Tokunaga : Asymmetric nucleocytoplasmic transport revealed by a novel assay system using planner reconstituted nuclear envelope.

1P227

膜輸送イメージングのための脂質二分子膜デバイス

○富名腰 敬、鈴木 宏明、竹内 昌治 (東大・生産研)

細胞膜を介した物質輸送機構を分子レベルで解析を行うためには、細胞内外の溶液組成や膜電位などの条件をコントロールする必要がある、これまで多くの人工膜モデルが提案されてきた。本研究では、新たな人工膜系を構築するチップデバイスを製作した。膜形成原理は、Oil / Water の界面に形成された2つの脂質単分子膜を接触させることにより二分子膜を形成する方法である。ここでは、アクリル基板中に加工したマイクロチャンネルに Phosphatidylcholine (0.5 mg in 1ml decane) の脂質溶液を注入し、その中で2つの水溶液の液滴を形成させた。その結果、液滴界面を張り合わせても融合せず、薄膜構造が形成していることが確認できた (Fig.1 の Y-Z 平面に二分子膜が形成)。その際、膜を挟んだ2つの溶液間の断面が観察可能であった。形成された膜に対して電圧矩形波を与えた結果、二分子膜特有の膜キャパシタンス応答値が得られた。次にチャネル形成能をもつペプチド (gramicidin A) を添加した結果、ペプチドチャネルによる膜通過電流を確認できた。これらの結果より、本デバイスによって、膜断面を直接観察可能な二分子膜系の構築が達成されたとと言える。

Fig. 1 Schematic of the lipid bilayer formation with microscopic system.

K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi : A device of lipid bilayer formation for membrane transport imaging

1P226

急速凍結レプリカ法による Na^+/K^+ -ATPase の観察

○川崎 一則¹、小林 恵美子²、酒巻 有里子³、田原 義和⁴、林 雄太郎⁴ (¹産総研・生物機能、²産総研・光技術、³日本産業技術振興協会、⁴杏林大・医・生化学 (1))

【目的】急速凍結レプリカ法では、膜貫通部分の大きな膜内在性タンパク質を膜内粒子 (intra-membrane particle, IMP) として観察できる。我々は、 Na^+/K^+ -ATPase の膜内における存在状態を調べるために、精製した Na^+/K^+ -ATPase 膜断片のレプリカ観察を行っている。まず、IMP 観察に適したレプリカ作製条件を検討した。【方法】ブタ腎臓髄質外層より得たミクロソーム分画から希薄 SDS 処理によって表在性膜タンパク質等を除去し、純度 97% 以上で Na^+/K^+ -ATPase の膜結合標品を得た。試料を液体 He によるメタルコンタクト法で急速凍結し、凍結割断装置 Balzers 400D によって白金レプリカを作製し、透過型電子顕微鏡 Philips CM200UT による高分解能観察を行った。【結果】白金厚 6nm の条件で白金蒸着角度を 60、45、25° と変化させたところ、膜断片の全体像 (直接倍率 6 万倍) ではコントラストが大きく変化し、25° で最も良好な画像を得た。一方、膜の断面に多数存在する IMP に着目しより高倍率で観察した場合には (直接倍率 12 万 5 千倍)、いずれの蒸着角度でも直径 8nm 程度の IMP 像を明瞭に捉えることができた。次に、蒸着角度条件に 45° を選択し白金厚を 6、5、4nm と減少させたところ、IMP サイズには顕著な変化は見られなかった。【考察】レプリカによる IMP 観察手法について本検討のような諸条件の再整備を行いながら、 Na^+/K^+ -ATPase の IMP 観察を進めれば、今後、このタンパク質の膜貫通領域の性状や、膜上でのオリゴマー形成の研究に役立つものと期待される。

K. Kawasaki, E. Kobayashi, Y. Sakamaki, Y. Tahara, Y. Hayashi : Electron microscopic observation of Na^+/K^+ -ATPase using quick-freezing replica technique

1P228

固体 NMR 分光法による PLC- δ 1 EF-hand ドメイン-脂質膜間相互作用の解析

○田中 聡子、岡田 雅司、八木澤 仁、辻 暁 (兵庫県立大院・生命理)

EF-hand ドメインは、生体膜中の $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を加水分解しセカンドメッセンジャーである IP_3 と DAG を産生する PLC- δ 1 に含まれるドメインの 1 つである。アミノ酸配列からこのドメインは α -ヘリックスで構成される EF-hand モチーフ 4 つを含み、 Ca^{2+} を結合すると予想されるが、PLC- δ 1 結晶構造中ではドメインの一部は構造が見出されておらず、 Ca^{2+} の結合の有無や膜上における立体構造等は明らかにしていない。本研究では PLC- δ 1 EF-hand ドメインフラグメント (133~281) に ^{13}C 安定同位体標識を導入し ^{13}C 固体 NMR を用いて脂質膜上におけるドメインの構造と膜との相互作用を解析した。その結果、EF-hand ドメインフラグメントは単独で PC 膜と強く結合し、膜結合時の主要な構造は EF-hand 構造ではなく高い運動性をもつ無秩序なランダムコイル構造であることが固体 NMR スペクトルにより見出された。また、EF-hand ドメインの膜結合により極性頭部、アシル鎖部分を含む脂質分子全体の NMR 信号が分子運動の増加を反映して減少することから、EF-hand ドメインは脂質膜中に侵入し膜構造を乱していると考えられる。DMPC 膜のゲル-液晶転移温度に対する EF-hand ドメインの影響を観測したところ、EF-hand ドメイン結合 DMPC 膜では転移温度の分布が見出された。これは上記のドメインが膜内部に侵入するというモデルに一致する。また、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの二価カチオンの有無は EF-hand ドメインによる膜の動的構造の変化には影響しないことから、EF-hand ドメインと脂質膜の相互作用は二価カチオンには依存しないことが見出された。

S. Tanaka, M. Okada, H. Yagisawa and S. Tuzi : Solid state NMR study of interaction between PLC-delta1 EF-hand domain and lipid bilayer