2P213

MARCKSの細胞膜近傍での1分子挙動の研究

○岩沢 ころろ¹、梶川 絵理子¹、平野 秀美¹、小山一本田 郁子¹、笠井 倫志¹、Ritchie Ken²、三輪 佳宏³、楠見 明弘¹ (¹京大再生研/JST-ICORP 膜機構、²名大院・理・生命理学、³筑波大・人間総合科学)

MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate) はプロテインキナーゼCの主要基質であり、アクチン骨格と膜との相互作用の制御に重要な役割を果たすことが知られている。MARCKSは細胞膜にミスチル鎖と塩基性のCキナーゼエフェクター領域で結合し、特に後者は膜中のPIP₂に選択性がある。一方、アクチン線維には側面結合するため、細胞膜中の分子の拡散を制御するPicket-Fenceの一部として働く可能性も考えられる。そこで我々は、MARCKS-GFPをHeLa細胞に発現させ、細胞膜上と近傍のアクチン線維との相互作用を1分子レベルで調べた。MARCKS-GFPの膜上での拡散係数は0.13 μm²/sであったが、テトラサイクリン型EBVベクターにMARCKS-GFPのcDNAをタンデムに入れて発現量を抑えると、0.22 μm²/sとなった。これは、発現量が多いとGFPがダイマー化するために、拡散が抑えられることを示唆しており、GFPを用いた研究に注意を促す結果である。MARCKS-GFPは細胞膜近傍にある分子と細胞質中にある分子が動的平衡にあり、短時間、細胞膜近傍に出現しては消失した。膜近傍にリクルートされてくるMARCKS-GFPはほとんどが膜上で拡散運動しており、約1割は膜上に100 ms以下の短時間しか滞在しない。これらは、MARCKSが結合するPIP₂を含む膜領域は拡散運動が大きい寿命が短いこと、MARCKSがアクチン線維に結合してPicket-Fenceの一部として働く可能性は少ないことを示唆している。

K. Iwasawa, E. Kajikawa, H. Hirano, I. Koyama-Honda, R. Kasai, K. Ritchie, Y. Miwa and A. Kusumi : Single fluorescent molecule tracking of MARCKS on the cytoplasmic surface of the cell membrane

2P215

蛍光性ナノクリスタルを用いた GLUT4 分子の脂肪細胞内 1 分子イメージング

○藤田 英明、渡邊 朋信、根建 拓、樋口 秀男、神崎 展 (東北大学先進医工学研究機構)

細胞内への糖の取り込みは、インスリン反応性糖輸送担体 GLUT4 がインスリン刺激により細胞膜へ移行することによって亢進される。インスリン刺激の前に、膜貫通型タンパク質である GLUT4 は trans-Golgi network を含む GLUT4 貯蔵 endosome に組み込まれている。インスリン刺激によって GLUT4 はまず運搬小胞を形成し、これが細胞膜へ移行し融合する。本研究では GLUT4 を蛍光性ナノクリスタル (Qdot605) にて標識し、GLUT4 の動態をイメージングした。Myc タグを付与した GLUT4-CFP (Myc-GLUT4) を恒常発現させた脂肪細胞株を作製した。この細胞をインスリンにより刺激することで、細胞膜に Myc-GLUT4 小胞を融合させ、外部に露出した Myc タグと Qdot-myc 抗体を反応させることにより GLUT4 を標識した。インスリン除去3時間後には、GLUT4-Qdot は再び貯蔵 endosome に組み込まれた。これを出発点として、刺激に伴う GLUT4 貯蔵 endosome からの GLUT4-Qdot の運搬過程を高速 3D 共焦点顕微鏡にて観察した。インスリン非存在下では GLUT4-Qdot はゆっくりとした一方向性の動きを見せた

が (図 before)、インスリン存在下ではブラウン運動によるものと思われる動きが増加が観察された (after)。本方法により、GLUT4 の1分子挙動を正確に測定できることが確認された。

H. Fujita, T. Watanabe, T. Nedachi, H. Higuchi and M. Kanzaki : Live cell imaging of single GLUT4 molecule in adipocyte using semiconductor nano crystal

2P214

微小管一本の力学特性の直接顕微計測

○尾崎 友治¹、下澤 東吾²、小口 祐伴³、石渡 信一² (¹早大院・理工・物理応物、²早大・理工・物理、³早大院・理工・生命理工)

微小管はα, β-tubulin が重合して形成される外径 25nm の中空管構造をなす細胞骨格であり、モータータンパク質であるキネシン・ダイニンのレールとしての役割を担う。しかし近年、ATP 存在下においてキネシンと微小管との協同的な結合が示唆され (Muto ら, 2005)、微小管は分子モーターにとって単なるレールではなく能動的な機能を持つことが示唆された。我々は、キネシンの結合などにより引き起こされる微小管の状態変化を、微小管一本の力学特性 (曲げ剛性) の変化として検出することを目指して実験を行った。微小管は、豚脳から精製した tubulin を、ローダミン色素によりアミノ基ラベルし重合させ、さらに taxol により安定化した。顕微操作は光ピンセットを導入した光学顕微鏡で行った。高さ数 μm の台地状に加工したガラス基盤 (以降、ガラス台地)、に微小管の一端を固定し、もう一端に直径 1 μm のラテックスビーズを結合し、光ピンセットにより操作した。位相差像からビーズに加えた力を、蛍光画像から微小管の変形を同時観察し、画像解析から曲げ剛性を算出した。ガラス台地と微小管はビオチン化 tubulin を用いたアビジン-ビオチンにより固定することで、またビーズと微小管の結合は tubulin 抗体をコートしたビーズを用いることで再現性よく実験を行うことが可能になった。その結果、曲げ剛性率として EI = (6.6 ± 1.8) × 10⁻²⁴ N · m² (n=3) の値を得た。この値は既に報告されている値とほぼ等しい。現在、キネシンが結合した場合など、いくつかの条件下での曲げ剛性率を測定中である。

Y. Ozaki, T. Shimozaawa, Y. Oguchi and S. Ishiwata : Mechanical properties of a single microtubule measured by optical tweezers

2P216

1 蛍光分子追跡法によるシグナル分子 Rac1 の接着斑への短寿命リクルートの検出

○柴田 明裕¹、永井 理恵²、成瀬 恵治³、立松 律弥子³、小林 剛¹、楠見 明弘¹ (¹京大再生研/JST-ICORP 膜機構、²名大院理、³名大院医)

我々は、「細胞膜の機能の多くは、細胞膜上でのさまざまな分子の動的な複合体やナノドメインの形成によって担われている」という仮説をもとに、それらを具体的に解明することを目指している。特に、細胞膜上の、数百ナノメートルを超える大きさの膜領域、例えば、細胞-基質間や細胞-細胞間の接着構造、シナプスなどは、光学顕微鏡で観察できるため、それらの再編成の研究は進めやすいと考えられ、格好の研究対象としている。本研究では、培養細胞が基質に接着したり移動する際に、細胞-基質間接着を担うフォーカル・アドヒージョン (FA) におこる分子の再編成の機構の検討を始めた。すなわち、FA とアクチン細胞骨格の再編シグナルの鍵である低分子量 G タンパク質 Rac1 に着目し、1分子追跡法をもちいて、GFP-Rac1 の FA へのリクルートを直接観察した。モノマー化した RFP (mRFP) を融合させた mRFP-paxillin が FA 上で集合するのでこれを FA マーカーとし、同時に GFP を融合させた Rac1 を HeLa 細胞に発現させた。GFP-Rac1 は FA の外周の 120 nm 以内の領域に高密度にリクルートされた。このような、短寿命のリクルートは、1分子法以外では検出が難しい。現在、Rac1 のリクルートの機構や滞在時間についての活性化が起こる部位についての検討を進めている。

A. Shibata, R. Nagai, K. Keiji, M. Tatematsu, T. Kobayashi, A. Kusumi : Detection of Rac1 recruitment to focal adhesion by single fluorescent molecule tracking