1PA057

プレフェルジンAのバルス投与によるニワトリ松果体細胞の
メラトニン合成阻害の分子機構

○広田毅^{1,3}, 鍵和田聰^{2,3}, 笠原和起^{1,3}, 岡野俊行^{1,3},
深田吉孝^{1,3}, 村田昌之^{2,3} (¹東大・院理・生化,²生理研,³CREST)

メラトニンは主に松果体において合成されるホルモンであり、その分泌量は昼少なく夜多いという日周変動を示すため、時刻情報を体内に伝達すると考えられている。メラトニン合成系の酵素群は生化学的に詳しく解析されてきたが、メラトニンの分泌機構は未だに不明である。我々は、ゴルジ体由来の小胞輸送がメラトニン分泌に関与している可能性について、ゴルジ体由来の小胞輸送の阻害剤であるプレフェルジンA (BFA)を用いて検討した。これまでに、BFAをバルス投与すると、投与の時間帯に依存してメラトニン放出が一過的に抑制されることを見出し、この抑制はメラトニンの分泌過程ではなく、メラトニン合成の阻害に起因することを明らかにした。本研究では、BFAのバルス投与がメラトニン合成を阻害する原因を分子レベルから解析した。

松果体細胞が放出するメラトニン量を経時的に追跡したところ、BFA投与中はメラトニンが正常に放出されていることが判明した。この結果から、メラトニンの分泌過程にはゴルジ体由来の輸送小胞は関与していないと考えられた。また、メラトニン放出はBFA除去直後から抑制されることが判明した。さらに、蛍光染色したゴルジ体の形態を経時的に観察したところ、ゴルジ体の再構築に必要な時間がメラトニン放出の抑制時間と非常によく一致することを見出した。つまり、ゴルジ体の再構築過程においてメラトニン放出が抑制されると考えられた。次に、メラトニン合成系酵素であるNATとHIOMTの活性に与えるBFA除去の効果を調べたところ、HIOMT活性は影響を受けないが、NAT活性は顕著に抑制されることが判明した。さらに、NATのmRNA量がBFA除去に伴って急減することを見出した。この結果は、BFA除去による小胞体—ゴルジ体間の膜輸送の活性化がNAT mRNA量の減少を引き起こすことを示唆している。NATタンパク質の代謝は非常に速いことが知られており、以上の結果をふまえると、BFA除去によるNAT mRNA量の減少がNATタンパク質量の減少に迅速に反映され、その結果としてメラトニンの合成量が低下したと考えられた。

T. Hirota, S. Kagiwada, T. Kasahara, T. Okano, Y. Fukada, M. Murata :
Inhibition of melatonin synthesis in chick pineal cells by pulse treatment with brefeldin A

1PA058

深海模倣高水圧環境下での培養細胞の応答

○三輪哲也、小山純弘、Mitra Sohrad、*相澤益男（海洋科学技術センター、*東工大・生命理工）

水深10,000mを越える海底において多細胞生物が生存することが、潜水探査機「かいこう」によるマリアナ海溝深海環境探査において確認された。そこで最も注目される問題、なぜ1,000気圧(100 MPa)の水圧に細胞が適応しているのかは謎である。これらの深海性多細胞生物と環境応答の研究を行う場合、サンプリングの問題（回収回数・空間的・時間的距離・保圧・保温回収など）により組織そのものがダメージを受け、その解析を行うことは困難を極める。深海における極限微生物の研究からは、常圧にする増殖しないような好圧細菌等が見つかり、常圧環境とは異なる細胞内応答特性が見いだされている。そこで、多細胞生物においては、通常の培養細胞を用い、深海環境の再現を行い、その細胞応答特性を検討することが、意義のあることと考えられる。我々は、培養細胞であるマウス3T3-L1細胞を用い、その細胞の圧力による形態変化の観察を行った。一般的に多くの細胞は40MPa前後の水圧が付加すると、細胞の骨格構造の維持がむずかしくなり、細胞形態が崩壊することが報告されている。マウス3T3-L1細胞においても、加圧による圧力刺激により、細胞形態に大きな変化が見られた。その後常圧で培養を行った場合、細胞形態は通常に戻ることが確認できた。さらに、70MPaの圧力刺激をマウス3T3-L1細胞に与えることにより、細胞形態が不可逆になることを見いだした。一方、熱刺激タンパク質70 (HSP-70)プロモーターとルシフェラーゼをコードしたプラスミドをマウス3T3-L1細胞に導入し、圧力刺激に対する応答特性を検討した。その結果、プロモーター発現が、細胞形態変化と相関性があることを観察した。さらに我々は、多種の培養細胞に対し、深海環境と同程度の圧力刺激を与え、細胞の水圧に対する挙動について報告する。

T. Miwa, S. Koyama, M. Sohrad and M. Aizawa: Survival of tissue culture cells under deep-sea environment of extremely high pressure.

1PA059

RBL-2H3 細胞の脱顆粒に対するホルムアルデヒドの効果

○緒方貴宏、中川裕之、宮本茂昭（九工大・情報工・生化）

近年、住宅を建築する際に用いられた新建材や接着剤、また家具に含まれる揮発性有機化合物（VOC）が空気中に揮発し、その結果引き起こされるシックハウス症候群と呼ばれる一種の化学物質過敏症が社会的問題になっており、そういった疾患を引き起こすVOCの一つにホルムアルデヒドがある。シックハウス症候群の患者にはアレルギーの患者と似た症状が現われることが知られている。アレルギーには、主に肥満細胞と好塩基球が関与しておりこれらの細胞から脱顆粒によって放出されるヒスタミン、セロトニンといった生体アミン等がアレルギーの症状を引き起こすと考えられている。この事からホルムアルデヒドとアレルギー反応、特に肥満細胞、好塩基球の脱顆粒の関係を解明することを試みた。肥満細胞のモデル細胞でありアレルギーの研究に広く用いられているラット好塩基球腫由来 RBL-2H3 細胞を用い、種々の濃度のホルムアルデヒドで前処理を行った後、さらに脱顆粒を導くCaイオノホアA23187を作用させた後、細胞内に残された生体アミンの存在率を測定し、ホルムアルデヒドが脱顆粒に及ぼす効果を調べた。

放出される生体アミンの一つヒスタミンに関して測定を行ったところ、ホルムアルデヒド自身がヒスタミン放出を導くということ、また10ug/mlのホルムアルデヒドで前処理後、400nMイオノホアで処理すると、イオノホアを作用させない時と比べヒスタミン放出が増大するという結果が得られた。この結果よりホルムアルデヒドはヒスタミン放出において、放出刺激に対する最大応答が増大することが言える。現在、もう一つの生体アミンであるセロトニンについてもその放出の変化を研究している。また、細胞の脱顆粒応答には細胞骨格、特にアクチンフィラメントの構造が変化するため、GFPアクチンを導入したRBL-2H3細胞を用いてホルムアルデヒドが及ぼす細胞骨格の変化についても解析を進めており、その結果を報告する予定である。

T.Ogata,H.Nakagawa,S.Miyamoto : Degranulation of RBL-2H3 by formaldehyde.

1PA060

ACTH が促進するリボタンパク質輸送運動の
単一エンドソーム追跡法による実時間可視化解析

○市川智光¹、山田慎²、木本哲也¹、川戸佳¹

¹東大院・広域・生命物理、²杏林大・医

ステロイドホルモンは生体の恒常性維持にとって、極めて重要な役割を担っている。この原材料となるコレステロールは低密度リボタンパク質（LDL）によってエンドサイトーシス経路で細胞内を輸送される。この輸送への副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）の関与は未解明であった。

本研究では、ウシ副腎皮質細胞に蛍光標識した DiI-LDL を添加した後のエンドサイトーシスによる細胞内輸送、及び核周辺部への集合過程を実時間単一エンドソーム追跡法により詳細に解析し、以下の事柄を発見した。ACTH 刺激により、LDL エンドソームの輸送は促進され、通常 3 時間必要とされる核周辺部への集合が、刺激を伴った細胞では 1 時間で完了した（1 時間での集合比率：Control:ACTH=26%:65%）。LDL エンドソームは、0.06~0.25 μm 毎秒の速度で、前進/後退/停止という 3 種の運動モードを頻繁に繰り返しながら微小管レール上を滑走していた。また、この運動解析により ACTH 刺激後の運動は、核方向への運動成分が、逆方向の運動成分を上回る比率がわずかに増加する（3%→10%）ことによって担われていることが判明した。

サポニンによって細胞膜に小さな穴をあけて、選択的阻害剤（パナジン酸・AMP-PNP）や運動阻害用抗体を細胞内に導入したところ、エンドソームが前進/後退を繰り返すのは核中心方向、細胞周辺方向への運動を担う 2 種のモータータンパク質、細胞質ダイニン、キネシンが同一のエンドソームに結合していることによって、進行方向が切り替わるためであることが分かった。

本研究の結果により、ACTH 刺激が発生させる 2 次メッセンジャー - Ca²⁺信号と cAMP 信号 - を介して、互いに反対方向に運動する 2 種のモータータンパク質を活性化させることにより、LDL エンドソームの運動比率を上昇させ、リボタンパク質の輸送促進が行われていることが推測される。

T. Ichikawa, M. Yamada, T. Kimoto, S. Kawato: The Real Time Single Endosome Tracing Analysis of Lipoprotein Transport facilitated by ACTH