1PA061

細胞性粘菌 *Dictostelium discoideum* のファゴサイトーシスを支配する物理的因子
○石川淳司、宮田英威、大木和夫
(東北大・院理・物理)

細胞性粘菌 *Dictostelium discoideum* はその表面に接触した物体を内部へ引き込む、いわゆるファゴサイトーシス（食食）を示す。物体はファゴソームに包まれて引き込まれるが、このファゴソーム周囲にはアクチンの集積が起こっている。アクチンが物体の引き込みに果たす役割の解明を最終目的としてまず $1\ \mu\text{m}$ 、 $2\ \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックスビーズを用いて顕微鏡下で食食の観察を行ったところ、それらの間では大きな違いが見られた。光ピンセットで保持したビーズを細胞に接触させ、その後食食されるかどうかを10分間、各々の細胞について観察した。 $1\ \mu\text{m}$ ビーズの場合は57%、 $2\ \mu\text{m}$ ビーズの場合は18%の割合で食食された。このように $1\ \mu\text{m}$ ビーズは $2\ \mu\text{m}$ ビーズ比べて頻繁に食食される。葉酸を共有結合でコートした $2\ \mu\text{m}$ ビーズを用いた場合には45%とかなりの割合で食食を示した。以上の結果について我々は、ビーズが取り込まれるかどうかは細胞がビーズを引き込もうとする力と引き込む際にビーズが細胞から受ける抵抗力との大小関係によって決まると考えている。コートなしのビーズの食食は細胞表面の非特異的レセプタとビーズとの結合が引き金になると言われている。従って同じ材質のビーズに対しては引き込みはビーズの大きさに関係なく起こってよいはずである。そうならないのは $2\ \mu\text{m}$ ビーズのほうが抵抗がより大きいと推測している。一方、葉酸コートした $2\ \mu\text{m}$ ビーズの場合は葉酸に対して特異的なレセプタと結合するためコートしていないビーズに比べて引き込む力が強いのではないかと推測している。

J.Ishikawa, H.miyata, K.ohki : Physical factors governing phagocytosis in *Dictostelium discoideum*

1PA063

Importin- β 変異体の結晶構造と機能
李守宰¹、今本尚子³、○酒井宏明¹、山本雅貴²、熊坂崇²、米田悦啓³、月原富武¹、(1)阪大蛋白研、(2)理研、(3)阪大医

真核細胞では細胞質と核が核膜により隔てられている。核はDNAの複製やRNAの転写、プロセッシング等遺伝子機能発現の場である。核内で機能する核蛋白質は細胞質にて合成された後、核膜に存在する核膜孔複合体を通じて核内へ輸送される。輸送される蛋白質の多くは核内へ局在化するために必要なシグナル構造 (Nuclear Localization Signal :NLS) を自身に持つ。NLSは核蛋白質輸送担体である importin α により特異的に認識され、importin α と結合し、更に importin β が importin α と核膜孔複合体構成因子の両方と結合することにより、核蛋白質を3者の複合体として核膜孔ヘターゲットする。

importin β はそのN末端側に低分子量GTP結合蛋白質Ran、及び核膜孔複合体構成因子と相互作用する機能領域を持つ。Ranは核蛋白質輸送担体に結合して働き、核蛋白質輸送に必須の因子である。この機能領域を含む importin β -deletion mutant (449アミノ酸残基) は importin α との結合領域は持たないが、自身は核膜孔通過能を持つ。これは様々な核蛋白質輸送経路を担う輸送担体に共通の性質と考えられている。

我々は輸送担体の構造の解明、及び核膜孔構成蛋白質、及び低分子量GTP結合蛋白質Ranとの相互作用機構の解明を主目的とし、本 importin β -deletion mutant のX線結晶構造解析を行った。結晶構造の特徴、及び機能に関する考察を報告する。

Lee Soo Jae, Naoko Imamoto, Hiroaki Sakai, Masaki Yamamoto, Takashi Kumasaka, Yoshihiro Yoneda, Tomitake Tsukihara: Structure and function of importin- β mutant

1PA062

GFP誘導体とのキメラ蛋白質を用いたNF- κ Bの核移行機構の研究
○古野忠秀、平嶋尚英、中西 守 (名古屋市・薬)

【目的】転写因子NF- κ Bは通常は細胞質に存在しており、転写制御の際に核に移行して機能を発揮する。我々は、NF- κ Bのサブユニットの一つであるp50の前駆体蛋白質(p105)とGFP(Green fluorescent protein)のキメラ蛋白質をCOS-7細胞に発現させ、刺激応答に伴うNF- κ Bの細胞質から核移行への移行を可視化解析することに成功した¹⁾。ここでは、NF- κ Bの核移行機構をGFPとp105のキメラ蛋白質、および、GFP誘導体(YFP; Yellow fluorescent protein)とp105のキメラ蛋白質を用いてさらに詳細に検討することを試みた。

【方法】ヒトのp105にGFP(またはYFP)を結合させたGFP(YFP)-p105、および、p105のI κ B様領域を欠損したp50にGFP(YFP)を結合させたGFP(YFP)-p50を発現するプラスミドDNAを作製した。これをCOS-7細胞やPC12細胞に導入してキメラ蛋白質を発現させ、その細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

【結果】細胞に発現させたp50は核に移行していたが、p105は細胞質にとどまったままであった。これは、p105がI κ B様領域を有しているためであると考えられた。p105を発現した細胞をTNFまたは過酸化水素で刺激したところ、p105は約10分のlag-timeの後、細胞質から核へ移行し、少なくとも1時間程度は核に局在したままであった。これは、p105が細胞質でプロテアソームによってp50に分解されて核に移行し、核内でDNAと結合しているためであると推察された。当日は、GFPより長波長側に蛍光極大を持つYFPとのキメラ蛋白質を用いた結果や、他の核移行蛋白質との細胞内動態の違いについても述べる。

1) Tenjinbaru, K., Furuno, T., Hirashima, N., Nakanishi, M. FEBS Lett., 444, 1-4. (1999)

T.Furuno, N.Hirashima, M.Nakanishi : The mechanism of nuclear translocation of NF- κ B using green fluorescent protein derivatives.

1PA064

肥満細胞におけるTrpホモログおよびシンタキシンの発現とその役割
○平嶋尚英、日比輝正、中西 守 (名古屋市・薬)

肥満細胞や好塩基球は抗原刺激によりエクソサイトーシスによってヒスタミン等のメディエーターを放出し、これが即時型アレルギー反応を引き起こす。このエクソサイトーシスの機構は未だに明らかではないが、細胞外からのCaイオンの流入が必須である。このCaイオン流入を担うCaチャネルは同定されていないが、細胞内のCaストアの枯渇によって活性化されるCaチャネルであることが知られている。そこで、Caストアの枯渇によって活性化されるという同様の性質をもつショウジョウバエの変異から見出されたTrp (transient receptor potential) タンパクのホモログが肥満細胞に発現しているかどうかを調べた。

一方、神経終末では、エクソサイトーシスに関与するCaチャネルがシンタキシンと呼ばれる膜融合に関与する蛋白と結合していることが知られており、近年、神経終末と同様のタンパク質が肥満細胞においても見出されつつある。そこで、肥満細胞におけるシンタキシンの発現もあわせて検討した。

肥満細胞のモデル細胞として良く用いられるラット好塩基球細胞(RBL-2H3)を用いて、Trpホモログとシンタキシンの発現をそれぞれのタンパクのサブタイプ毎にプライマーをデザインしてRT-PCR法によって調べた。その結果、Trpの哺乳類ホモログではTrp 1、2、6の発現が、シンタキシンではsyntaxin 3、4の発現が確認された。

次にTrpの阻害剤であるSK&F96365の作用を調べた。IgEで感作したRBL-2H3細胞をSK&F56963存在下で抗原刺激すると、刺激直後のCa濃度上昇の初期相には変化がなかったが、外液からのCa流入による持続相のCa濃度上昇を著しく阻害した。

現在、シンタキシンと蛍光タンパクであるGFP (green fluorescent protein) の融合タンパクをRBL-2H3に発現させ、抗原刺激した際の細胞内動態の解析から、シンタキシンのエクソサイトーシスにおける役割を検討中である。

N. Hirashima, T. Hibi, M. Nakanishi: Expression of Trp homologues and syntaxin in mast cells and their roles in exocytosis.