1PA093

成長円錐の filopodia の運動の履歴は、アクチン束の形として記録される。——新しい偏光顕微鏡による成長円錐の観察
○加藤 薫 (電子技術総合研究所, R. Oldenbourg (Marine Biological Laboratory, Woods Hole)

成長円錐は、伸張している神経突起の先端に現れる構造である。神経の伸張や navigation に重要な役割を果たしている。この運動にアクチンの活性が関与していることは、よく知られているが、その運動の仕組みは未だ議論の対象となっている。その原因の一つは、生きている神経細胞内でアクチンの動態を観察することが難しいことである。

そこで、我々は新しい偏光顕微鏡 (New Pol-Scope) を用いて、生きている成長円錐内部のアクチン束を、無染色かつ定量的 (束中の繊維の本数とその方向がわかる) に観察できる系を作り、成長円錐内部のアクチン束の運動を微速度映画に記録し、アクチン束の運動を報告した (Katoh et al. MBC (1999) vol 10 p197-210)。我々は、成長円錐の運動に伴うアクチン束の生成、移動、束化、見かけの滑り、retrograde flow, intrapodia を捉えた。同時に、我々の画像の空間分解能は、ローダミンファロイジンで染色したサンプルと同等かそれ以上で有ることも報告してきた。

今回は、成長円錐のアクチン束の運動をコンピュータで解析し、filopodia の運動、アクチン束の運動、そしてその結果として生じるアクチン束の形の関係を明らかにしたので報告する。すなわち、アクチン束は細胞膜の付近で作られた時点で形が決まり、その形を殆ど変えることなく成長円錐の内部へ運ばれることを見いだした。細胞膜付近のアクチン束は、filopodia と繋がっている。この観点から、細胞膜付近での filopodia の振る舞いとアクチン束の形の関係を調べたところ、過去数分間の filopodia の動きが、アクチン束の形という痕跡となって、成長円錐の内部に残っていることを見いだした。この関係を用いると、既に出版された電子顕微鏡写真 1 枚から、それが撮られる前の数分間の filopodia の動きを推測できる (Katoh et al. PNAS (in press)). Filopodia には神経伸張のセンサーが有ると言われており、その動きを知ることは神経系の形成機構を知る上で極めて重要である。以上のことについて video movie も交えて示す。

K. Katoh, R. Oldenbourg: Shape of actin bundles shows a history of filopodial movement in growth cone of Aplysia bag cell neuron.

1PA095

グリア細胞の細胞間接着過程についての AFM および免疫細胞化学的解析
○山根ゆか子¹, 志賀葉月¹, 阿相皓晃², 芳賀永¹, 川端和重¹, 阿部和厚³, 伊藤悦朗¹ (¹北大・院理, ²都老人研, ³北大・医)

アストロサイトは生体内においても培養下でも、細胞間で情報伝達を行う機能的シンシチウム (融合細胞) を形成することが知られている。このシンシチウムが形成される過程を調べるために、本研究では、まず、ラット培養アストロサイトが細胞間で接着していく様子を AFM 観察した。AFM (コンタクトモード) では、生きたアストロサイトの形態変化を液中観察で追うことができた。AFM と免疫細胞化学法を併せて行うことにより、アストロサイト同士が接着していく過程では、はじめに (1) アクチンフィラメントを骨格とする突起が一方の細胞に伸び、その先端にはコネキシン 43 (アストロサイトで主に発現しているギャップジャンクションを形成するタンパク質) が局在すること、さらに接着が進むと、(2) 二つの細胞にまたがってアクチンのストレスファイバーが整列すること、そのときにもコネキシンがアクチンの近くに局在することが示された。これはアストロサイトの細胞間接着の過程で、コネキシン 43 とアクチンフィラメントが何らかの相互関係を持って働いていることを示唆している。このことをさらに詳しく調べるために、ギャップジャンクションのブロッカーである、 α グリチルレチン酸 (100 μ M) または、オクタノール (300 μ M) を添加した条件下でアストロサイトを培養した。その結果、ブロッカー存在下では、コントロールに比べ、細胞の境目の部分でのアクチンの整列が有意に阻害された。このとき、コネキシンの局在には差が見られなかった。これらのことはアストロサイトの細胞間接着過程では、隣り合った細胞間でアクチンの整列がおこるためにギャップジャンクションが働くことが必要であることを示唆している。

Y. Yamane, H. Shiga, H. Asou, H. Haga, K. Kawabata, K. Abe, E. Ito: Atomic force microscopic and immunocytochemical study of glial cell to cell adhesion.

1PA094

神経成長因子による PC12D 細胞の分化過程での膜流動性の画像解析
○木内泰、大場哲彦、大木和夫 (東北大・理・物理)

神経細胞は細胞体、樹状突起、軸索、シナプスの各膜構造で様々な膜機能をダイナミックに発現している。これらの多様な膜機能を維持するため又はその結果として、神経細胞の膜流動性は空間的及び時間的にも変動していると予想される。しかし、実験的にはその知見はほとんど得られていない。そこで、本研究では PC12D 細胞 (rat adrenal pheochromocytoma cell) を神経細胞のモデルシステムとして用い、神経成長因子 (NGF: Nerve Growth Factor) 刺激後の細胞分化に伴う膜流動性の空間分布の変化を測定した。

膜流動性の測定には膜環境感受性蛍光色素 Laurdan を用い、蛍光顕微鏡下での 2 波長の蛍光画像から膜の流動性を G.P (Generalized Polarization) というパラメータで数値化した。PC12D 細胞は、NGF を取り込むと 10 分以内に神経突起を伸ばし始め、NGF 存在下では数週間にわたって突起を伸ばし続ける。本実験では NGF 未刺激、刺激直後 (1 時間以内)、6 時間刺激後、2 日間刺激後の PC12D 細胞について Laurdan で染色し、G.P 画像を取得した。

NGF 未刺激の PC12D 細胞の G.P 画像より、形質膜は細胞内小器官より膜流動性は低く、突起部はさらに低いことが示された。そして刺激直後では、細胞全体で膜流動性が上昇した。さらに NGF 刺激を 6 時間、2 日間続けると未刺激と比べて細胞全体で膜流動性が減少した。以上の結果より PC12D 細胞には、様々な膜流動性をもった膜構造が存在し、また NGF 刺激により膜流動性を変化させることが示された。

T.Kiuchi, T.Ohba, K.Ohki: Imaging of membrane fluidity during NGF-induced differentiation of PC12D cells

1PA096

ショウジョウバエ視細胞におけるシナプス小胞の再形成過程
志水英之・佐藤明子・河村悟・尾崎浩一 (大阪大・院理・生物)

細胞はエンドサイトシスによって常に細胞膜や外界の分子を取り込んでいる。これらの分子は、その後、分解されるカリサイクリング経路によって再び細胞膜へと送り返される。神経細胞が形成するシナプス小胞もまた伝達物質を放出した後、エンドサイトシスによって再形成されることが知られている。しかし、その再形成経路についてはまだ議論が分かれており、一般的なエンドサイトシス経路によりエンドソームを経て再形成されるモデルと、細胞膜から直接に再形成されるモデルが提唱されている。

本研究では、これら 2 つのモデルについての検討を行うために、シナプス小胞の再形成に対する RAB5 の関与を調べた。Rab タンパク質は細胞内小胞輸送の各経路を特異的に制御しており、中でも RAB5 は細胞膜からエンドソームへの小胞輸送に関与すると考えられている。また、この RAB5 の GTP 結合部位の 1 つに点変異を導入した変異 rab5 タンパク質は、野生型の RAB5 の機能を阻害することが知られている。そこで我々は、この阻害作用を持つ変異 Rab タンパク質 (RAB5N142I) を発現するショウジョウバエを作成して、電子顕微鏡観察による解析を行った。その結果、Rab5 変異体の視細胞においてエンドソームの減少と光受容膜の増幅が観察され、光受容膜の代謝が RAB5 依存的なエンドサイトシス経路を利用していることが示された。これに対し、視細胞軸索ではシナプス小胞の密度に野生型との差が見られなかった。そこで、エンドサイトシスを温度によって可逆的に制御可能な shibire 変異体を利用して、シナプス小胞の再形成についてより詳細な検討を行った。その結果、RAB5N142I はシナプス小胞の再形成の過程に全く影響を与えず、RAB5 がその再形成に関与していないことが示された。以上の結果から、ショウジョウバエ視細胞の光受容膜の代謝が、エンドソームの関与する一般的なエンドサイトシス経路を経るのに対し、シナプス小胞の再形成は、エンドソームの関与しないシナプス部位特有のエンドサイトシス経路によることが明らかになった。

H.Shimizu, A.K.Satoh, S.Kawamura, K.Ozaki: Recycling pathway of synaptic vesicles in the Drosophila photoreceptor cells.