1K1545

IP3 誘発性 Ca 遊離に伴う小胞体膜電位変化

○白川 英樹¹、宮崎 俊一^{1,2} (¹ 東京女子医大・第二生理、² 生理研・細胞内代謝)

IP₃ 受容体 Ca チャネルを介した小胞体 (ER) からの Ca 遊離は、数多くの細胞種において細胞内 Ca 濃度上昇にいたる主要な経路として機能している。Ca がイオンである以上、Ca 遊離と Ca 取り込みの過程は電気化学的側面からとらえる必要がある。即ち、ER—細胞質間の Ca flux は濃度勾配だけでなく電位差 = ER 膜電位にも依存する。一般に ER 膜上には Ca 遊離チャネル以外にも K チャネルや Cl チャネルが存在する。これらのチャネルを介した受動的なイオン電流が、Ca 遊離に伴う膜電位勾配形成を軽減する働きをもつと示唆されているが、intact な細胞で Ca 遊離と ER 膜電位の関係を直接解析した例は無い。

今回我々は、膜電位感受性蛍光色素を用いてハムスター卵細胞における IP₃ 依存性 Ca 遊離の際の ER 膜電位変化を光学的に測定することを試みた。ハムスター卵は、1) 種々の細胞に見られる Ca wave および Ca oscillation という時空間的な Ca ダイナミクスを示す、2) リアノジン受容体系は存在せず IP₃ 受容体系のみである、3) 細胞内の ER の分布が均一である、などモデル系としての利点がある。蛍光色素には di-18-2-ANEPPS を用いた。これを大豆油に溶かし卵に注入することにより、ER を選択的に染色した。蛍光測定は 2 波長励起 1 波長蛍光および 1 波長励起 2 波長蛍光の 2 つのレシオ測定モードで行った。細胞内 Ca 濃度変化は、ボルテジクランプをした卵の Ca 依存性 K 電流によりモニターした。IP₃ の微量注入したところ、Ca 遊離に伴い ER lumen-negative な膜電位変化を示す蛍光シグナルが検出された。また、細胞質中の K チャネル阻害剤が IP₃ 誘発性 Ca 上昇に及ぼす影響についても調べたので、併せて報告する。

H. Shirakawa and S. Miyazaki : Changes in ER membrane potential during IP3-induced calcium release

1K1630

リボソーム内での MDV- RNA 複製反応

○佐藤 周知¹、若林 真紀¹、丸山 一雄²、卜部 格¹、四方 哲也^{1,3,4} (¹ 阪大院・工・応用生物、² 帝京大・薬・薬、³ 科技研・さきがけ研究 2 1、⁴ 東大・総合文化)

生物が自己の遺伝子を増幅しそれを子孫に伝えていく現象を、リボソームを使って作り上げることはできないだろうか。リボソームは生体膜モデルとしてよく研究に使われており、構造および大きさともに細胞に近いものを作ることができる。また、リボソームの分裂や融合といった実験も報告されている。そこで、リボソームを用いてその中で遺伝子増幅を行わせさらに、分裂や融合といったことを起こさせることで、自己の遺伝子が増幅しそれを子孫へ伝えていくというような現象を作り出すことを考えた。本研究においては、その第一段階として、まずリボソーム内で遺伝子を増幅させることを目的とした。

実際の実験におけるリボソームの形成には、eggPC:cholesterol:DSPE-PEG2000=2:0.5:0.18 (モル比) の混合脂質を用いた。またリボソームに封入する反応溶液中には、遺伝子増幅の鋳型となる MDV-RNA とそれを増幅させるための酵素 Q β レプリカーゼ、およびその他増幅に必要な成分を加えた。また、増幅反応を知るためにフェナントリジン系の色素を加えた。リボソームの形成の際は、封入時における複製反応を抑えるために 4℃ の下で行い、封入の後 37℃ で 1 時間反応させた。また、リボソーム外部に RNase を加え、リボソーム外部における複製反応の阻害実験についても同時に行った。そして、これらのリボソームにおける反応の差異についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による観察についても行った。これにより、リボソーム内部における遺伝子増幅の可能性が示唆された。今後、リボソームの分裂や融合における実験を行い、遺伝子が子孫へ伝わるという現象を起こすことに挑戦していきたい。

K.Sato, M.Wakabayashi, K.Mariyama, I.Urabe, T.Yomo : MDV-RNA repulication in liposomes

1K1615

メラノサイト細胞膜における SCF 受容体の運動の 1 分子解析

○小林 剛¹、村上 瑞奈^{1,2}、入江 かおる¹、飯野 亮太¹、藤原 敬宏¹、楠見 明弘^{1,2} (¹ 科技団・ERATO、² 名大院・生命理学)

SCF 受容体 (SCFr) は、レセプター型チロシンキナーゼ III 型に分類される分子量 145~160 kDa の膜 1 回貫通型タンパク分子で、細胞内にチロシンキナーゼ部位を含む 432 個のアミノ酸からなる構造を持つ。造血系細胞、生殖細胞、メラノサイトに発現が見られ、リガンドである SCF (幹細胞成長因子) と結合することにより 2 量体化・自己リン酸化し、PI3 キナーゼを含めた細胞内情報伝達系を活性化し、細胞の増殖・生存・正の走化性を誘導する。本研究では、培養メラノサイトの細胞膜上で SCFr の運動を 1 分子レベルで追跡した。Cy3 標識した抗 SCFr 抗体 Fab 断片を観察培地に添加し、生きている培養メラノサイトを対物レンズ型全反射顕微鏡を用い観察・画像化したところ、細胞膜上に蛍光スポットが多数見られた。その結合は、未標識の抗 SCFr 抗体 Fab 断片や SCFr 細胞外部位を観察培地中に添加することにより抑えられ、又、SCFr を発現していない培養繊維芽細胞上では結合が見られなかった。従って、Cy3 標識抗 SCFr 抗体 Fab 断片は特異的にメラノサイト細胞膜上の SCFr を認識していると判断した。33 ms の時間分解能で得た画像を解析したところ、SCFr の運動の拡散係数は 0.1~0.2 μ m²/s であった。また、1 粒子追跡法によっても SCFr の運動の解析を行った。抗 SCFr 抗体 Fab 断片を結合した金コロイドを培養メラノサイト細胞膜上の SCFr に結合させ、その光学顕微鏡像を観察した。金コロイド上に結合させる Fab 断片の量を調節することにより、金コロイドが SCFr に特異的に結合し、かつ、その運動の拡散係数が蛍光 1 分子観察で得られた値と等しくなる条件を得た。その条件において、33 ms の時間分解能で得た約 10 秒間の SCFr の軌跡には、ホップ拡散や制限された運動は見られず、ほとんどのものが単純拡散運動を示した。現在、リガンド処理を含めた各種刺激の SCFr の運動に対する効果を解析中である。

T. Kobayashi, M. Murakami, K. Irie, R. Iino, T. Fujiwara, A. Kusumi : Diffusional movement of SCF receptor in melanocyte membranes as studied by single molecule tracking.

1K1645

GFP を用いた神経細胞における NF- κ B の核移行機構の研究

○古野 忠秀、平嶋 尚英、中西 守 (名市大・薬)

【目的】転写因子 NF- κ B は通常は細胞質に局在しているが、細胞の刺激応答に伴って細胞質から核に移行し、機能を発揮する。しかし、NF- κ B の核移行に至るシグナル伝達機構に関しては、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、腫瘍壊死因子 (TNF) 刺激に伴う NF- κ B の細胞内動態を神経細胞分化のモデル細胞株 (PC12 細胞) を用いてリアルタイムで可視化解析し、NF- κ B の活性化機構を追究することを試みた。【方法】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 (NF- κ B1) と蛍光蛋白質 GFP (green fluorescent protein) のキメラ蛋白質 (GFP-p105) を作製し、これを安定発現した PC12 細胞を樹立した。GFP-p105 の細胞内動態は共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。【結果・考察】GFP-p105 は PC12 細胞の細胞質に局在していた。この細胞を TNF- α で刺激すると、GFP-p105 は細胞質から核に移行したが、その効率は低かった。一方、神経成長因子 (NGF) で 7 日間培養して分化させた PC12 細胞を TNF- α 刺激すると、GFP-p105 の著しい核移行が起こった。GFP-p105 は 10 分程度の lag-time の後に細胞質から核に移行し始め、45 分後には核への局在が飽和に達した。この核移行はプロテアソーム阻害剤の lactacystin により完全に抑制された。さらに、未分化の PC12 細胞を NGF で刺激したところ観察時間内 (刺激後 1 時間) には GFP-p105 の核移行が起こらなかったが、NGF と TNF- α で共刺激すると分化した細胞と同程度の顕著な核移行が起こった。このことから、PC12 細胞において、NGF は TNF- α による NF- κ B の核移行を増強する役割を果たしていると推察された。

T.Furuno, N.Hirashima and M.Nakanishi : The mechanism of nuclear translocation of NF- κ B with GFP in PC12 cells.