3L1315

視神経の軸索ガイダンスにはたらく忌避物質は誘引物質でもある

○本多 久夫 (兵庫大学)

網膜の視神経が軸索を出し中脳視蓋でおこなうシナプス結合は、トポグラフィック・マッピングとよばれる巧妙な結合関係を形成する。視蓋には膜タンパク性のリガンド (ephrin-A2) が前後軸にそって密度勾配を、網膜にはそのリセプターが鼻側から耳側に密度勾配を形成している。リセプター密度の低い視神経の軸索はリガンド密度の高い視蓋細胞に結合する (*vice versa*)。この現象を説明するためにサーボ機構モデルを提出した (Honda, *J. Theor. Biol.* 192:235-246, 1998)：視神経の成長円錐はリセプターを持ち視蓋表面を這いまわり、視蓋細胞のリガンドと結合しシグナルを得る。リセプターおよびリガンドの密度を R, L とすると受けるシグナル強度は両者の積 RL である。視神経はすべての視神経細胞に共通な標準値 S を持っていて、成長円錐は現時点でのシグナル強度とその標準値との差 $|RL-S|$ を感知しながら差が小さくなるように動く。時間が経つと成長円錐は視蓋の $L=S/R$ の位置にたどり着く (サーボ機構モデルの骨子)。差 $|RL-S|$ が小さくなるように動くのは、成長円錐からランダムに幾つかの突起が出て、そのうち $|RL-S|$ が小さい方の突起が生き残り、他は縮退する過程が繰り返されれば実現できる。今回、差 $|RL-S|$ を自然に表現できる分子機構を提案する： RL に基づいて形成される分子と標準値 S を示す分子は共に突起を縮退させる活性があり、かつ、両分子は互いに化学量論的に作用してその活性をマスクし合うというものである。両方の分子数のバランスがどちらに欠けても突起を縮退する活性があらわれることになる。また、このリガンドは忌避物質であるという逆説的な事実が知られているが、サーボ機構モデルによれば、忌避・誘引機能は同じリガンド分子の密度の違いによるものである。密度によってはリガンドは誘引機能を示すこともある。

HONDA Hisao : Repellents working in the axon guidance also act as attractants

3L1345

PC12細胞におけるNGF受容体の動態解析

○平嶋 尚英, 西尾 将史, 中西 守 (名古屋市・薬)

【目的】神経成長因子(NGF)受容体には、高親和性受容体である TrkA と低親和性受容体である p75 があり、神経の分化、成長、維持に関わる一方で、p75 は独自に細胞死に関わっていることが明らかになってきた。多くの神経細胞では TrkA と p75 の両方が発現しており、両者の働きと神経細胞の生と死関係については未だに不明な点が多い。そこで本研究では、TrkA と p75 の細胞内における分布と動態の観点からこの問題を検討することを目的とした。【方法】PC12細胞は TrkA と p75 の両方を発現しており、神経細胞の分化、成長や細胞死の研究に適した細胞である。本研究ではラットの TrkA と p75 をコードする DNA をスペクトル特性の異なる蛍光蛋白質 (yellow fluorescent protein; YFP, cyan fluorescent protein; CFP) の発現ベクターに組み込み、PC12細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて単一生細胞における NGF 受容体の細胞内動態を観察・解析した。【結果】PC12を NGF で分化させる前は TrkA、p75 とともに細胞膜への均一な分布が見られた。次に、NGF を添加して PC12細胞を神経細胞様に分化した状態での分布を調べた。その結果、TrkA、p75 とともに細胞体、神経突起、成長円錐のいずれの領域においても細胞膜への一様な分布が認められた。さらに、軸索や成長円錐からは多数のフィロポディアが突出し、活発に動いているのが観察され、このような部位にも NGF 受容体の発現が認められた。TrkA、p75 を共発現させた場合も単独発現の場合と同様、細胞膜への一様な分布がみられた。神経様に分化した細胞では細胞体で合成された TrkA を成長円錐まで運ぶ輸送小胞 (順行性輸送) と成長円錐から細胞体の方へ運ぶ輸送小胞 (逆行性輸送) が観察された。これらの運動の様子の詳細も合わせて報告する。

N.Hirashima, M.Nishio and M. Nakanishi : Analysis of the dynamics of NGF receptor in PC12 cell

3L1330

神経発達依存的に軸索起始部の細胞膜に形成される拡散障壁：脂質 1 分子レベルでの検討

○中田 千枝子¹, 野崎 ますみ¹, 山下 英俊¹, 山口 和彦², Ritchie Ken^{1,3}, 楠見 明弘^{1,3} (¹名古屋大・院理・生命理学, ²理研・BSI・記憶学習, ³楠見膜組織能プロジェクト・ERATO・JST)

神経細胞は、樹状突起／細胞体と軸索とが大きく異なった分子組成をもち、極性のある構造をとっている。細胞膜において分子の局在を維持するためには、軸索起始部 (軸索の最も細胞体側) の細胞膜に、細胞膜分子が拡散によって混合するのを妨げる仕組みが必要不可欠である。このような拡散障壁の存在と拡散抑制の機構を検討するため、我々はリン脂質 (不飽和 PE) の拡散運動を、1 分子レベルで調べた。培養ラット海馬細胞を用い、軸索起始部を含め細胞膜上の様々な部位で、また神経回路網発達との関連を調べるために培養日数を変えて観察した。起始部における拡散係数は、培養後 6~10 日目にかけて、0.2 から 0.005 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ と大きく減少した。すなわち、起始部の細胞膜には、(1) 脂質分子に対しても機能する拡散障壁が、(2) 発達段階依存的に、形成されることがわかった。文献中で障壁の有無について意見が分れてきたのは、培養日数と発達段階への依存性のためだと考えられる。同時期に、電位依存性ナトリウムチャネルが、起始部に著しく集積することが、免疫蛍光染色により示された。一方、このチャネルを含め、さまざまな膜タンパク質を膜骨格にアンカーするアンキリン G は培養後 4 日目頃から軸索起始部に局在化していた。我々が拡散の遅延の機構として提案している anchored-protein picket model を考慮すると、膜蛋白質群が起始部の膜骨格上に発生段階依存的に集積されることによって、細胞膜内に拡散障壁が築かれる事が示唆された。ナトリウムチャネルの起始部への集合が、電気信号の発生と同時に、それに必要な細胞膜中での分子局在をも担っているのは含目的で興味深い。

C. Nakada, M. Nozaki, H. Yamashita, K. Yamaguchi, K. P. Ritchie, and A. Kusumi : Developmental formation of a diffusion barrier in the plasma membrane of the axonal initial segment: single lipid molecule approach.

3L1400

ショウジョウバエの糖受容体遺伝子の同定

○石元 広志, 松本 顕, 谷村 禎一 (九州大・院理・生物)

化学感覚受容機構の分子メカニズム解明には受容体分子の同定が必須である。近年、G タンパク質共役型の膜貫通タンパク質が、嗅覚受容体ファミリーを構成していることが明らかになっている。嗅覚では受容体分子の同定が受容分子メカニズムの解明へ大きく貢献している。嗅覚受容体と同様に、味覚受容体も G タンパク質共役型の膜貫通タンパク質であると考えられている。我々は、キイロショウジョウバエの *porn* 突然変異体を利用した differential screening によって、新規の G タンパク質共役型の膜貫通タンパク質をコードする *Tre1* を同定した。ショウジョウバエの DNA データベースから、*Tre1* 遺伝子の上流領域に P 因子が挿入された系統を検索し、P 因子を転移させて *Tre1* 遺伝子欠失系統 (Δ *Tre1*) を作製した。味覚感度を行動レベルで定量化できる 2 者選択行動実験から、*Tre1* 遺伝子の欠失がトレハロース味覚感度の低下を引き起こしたことが明らかになった。 Δ *Tre1* の影響がトレハロース特異的であることを調べるために、4 種類の糖を用いた吻伸展反射実験で検証した。その結果、 Δ *Tre1* 系統はトレハロース特異的に味覚感度が低下していることが示された。さらに、ヒートショックタンパク質のプロモーター下流に *Tre1* 遺伝子をつなげ、 Δ *Tre1* 系統に導入した。熱ショック後のトランスジェニック系統は味覚感度が回復した。また、組織 in situ hybridization によって、*Tre1* 遺伝子は味細胞において特異的に発現していることが明らかになった。以上の結果から、我々は今回得られた *Tre1* 遺伝子が、トレハロース特異的な受容体タンパク質をコードするとの結論に達した。

H.Ishimoto, A. Matsumoto and T. Tanimura : Molecular Identification of a Taste Receptor Gene for Trehalose in Drosophila