3P209

分泌顆粒間の Homotypic fusion の分子機構

○柏原 愛子、中川 裕之、宮本 茂昭（九工大 情報工 生化学システム）

内分泌系は神経系とともに内部環境の二大調節系を成している。情報伝達の方法は両者の間に違いがあり、内分泌系では、細胞内に伝達物質を蓄積した分泌顆粒を多量に持ち、伝達物質は放出後、血流を通じて全身の組織に運ばれる。分泌顆粒は、分泌刺激により顆粒膜と細胞膜との融合によって開口放出されるが、顆粒同士は融合しないと考えられていた。しかし、顆粒同士が融合して効率よく細胞外に伝達物質を放出している現象が観測された。そこで、本実験では、内分泌顆粒として、クロマフィン顆粒を用いて顆粒間の融合にどのような物質が関与し、融合を促進しているかを観察するとともに、顆粒同士の融合と、顆粒と細胞膜との融合メカニズムの違いを解析することを試みた。実験牛の副腎髄質のクロマフィン細胞より分泌顆粒及び形質膜を単離精製した。融合量の測定には脂溶性の蛍光色素である Octadecyl Rhodamin B(R18) を使用し、その蛍光 dequenching 量を分光蛍光光度計にて測定・解析した。平行して、蛍光顕微鏡下で蛍光 dequenching による蛍光量の増加を可視化解析にて行った。結果 (1) Ca^{2+} , AA, Calmodulin 等が顆粒同士の融合に深く関係していることが示唆されました。Mg-ATP, PLA2 など、他の条件を付加することによって顆粒間融合促進ファクターとして働くことも示唆されました。(2) 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Forskolin, Protein Kinase C (PKC), cAMP, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (PMA) 等を使用した実験により顆粒間の融合と顆粒と細胞膜の融合には何らかのメカニズムの違いがあることが分かった。

A.Kashihara, H.Nakagawa, S.Miyamoto : Molecular Mechanism of homotypic fusion between secretory vesicles

3P211

分泌小胞輸送を推進するアクチンの重合一再編

○神崎 秀宜、緒方 貴宏、野住 素広、中川 裕之、宮本 茂昭（九工大・情報工・生化学システム）

細胞がエンドソーム、ファゴソーム、ピノソーム等の小胞を取り込む際、アクチン重合一再編によって得られる推進力を利用して取り込みが行われていることが知られています。また最近では、エキソサイトーシスにおいても分泌小胞輸送にアクチン重合一再編による推進力が利用されていることが分かってきました。その際、アクチン細胞骨格再編の制御分子として知られる WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) ファミリータンパク質が重要な働きをしているのではないかと考えられています。そこで我々は、モデル細胞として RBL-2H3 細胞を用い分泌顆粒とアクチン分子の関与について調べました。さらに牛副腎髄質クロマフィン細胞より分泌小胞であるクロマフィン顆粒を単離精製し、Western Blotting、蛍光抗体法により重要因子の有無を調べました。その結果、RBL-2H3 細胞に抗原刺激を与えると分泌顆粒周辺にアクチンの分布が見られました。またクロマフィン顆粒上に、アクチン分子の存在を確認できました。アクチン細胞骨格再編の制御因子として、WASP ファミリータンパク質の 1 つである N-WASP (neural WASP) の存在を確認しました。さらに N-WASP の制御因子の 1 つとして知られる Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の Cdc42 の存在を確認しました。これよりエキソサイトーシスの際、アクチン重合一再編による推進力が利用され分泌顆粒輸送が行われている可能性が考えられます。

H.Kouzaki, T.Ogata, M.Noizumi, H.Nakagawa, S.Miyamoto : The movement of secretory vesicles by actin polymerization and reorganization

3P210

インフルエンザウイルスの細胞内膜融合過程の可視化解析

○堺 立也¹、今井 正樹²、川崎 一則³、黒田 和道⁴（¹川崎医科大学・微生物学、²感染研・ウイルス第一部、³産総研・分子細胞、⁴日大・医）

インフルエンザウイルスはゲノムを宿主細胞に注入するため自らの膜を細胞の膜と融合させる。ウイルスの膜融合は弱酸性条件で活性化されることから、ウイルスがエンドサイトーシスされた後エンドソーム内腔の酸性化により融合がおきると考えられている。しかしその直接的証拠は示されておらず、また複数種存在するとされるエンドソームのどれと融合するかは特定されていない。インフルエンザウイルスの膜融合がいつどこでおきるかをあきらかにするため、我々は細胞内の個々のウイルス粒子の膜融合が顕微鏡下で検出可能な独自の方法により、融合の時間と場所の特定をおこなった。インフルエンザウイルスは A/PR/8/34 を用い脂質指向性の蛍光試薬によりウイルス膜を標識した。この標識では、蛍光試薬の濃度依存的な蛍光スペクトル変化を利用し、ウイルスが膜融合し膜脂質中の試薬濃度が低下するとウイルス粒子の蛍光色に変化するよう設計した。この標識ウイルスを HeLa 細胞に与えウイルス粒子の蛍光色の継時変化を観察した。その結果、膜融合の時間に関し以下の (1) を、融合場所に関し (2), (3) を得た。(1) ウイルス粒子の色が変化（膜融合）する時間は取り込み後約 10 分であった。(2) 色変化の程度から見積られた蛍光試薬の稀釈率は 2.6 倍、つまりウイルスは自身の膜面積の 2.6 倍の面積を持つ膜と融合した。(3) 融合直後のウイルス粒子とエンドサイトーシスのマーカーとの共存率はトランスフェリンで 5% 以下、EGF で 20% 以下であった。以上の結果は、ウイルスが融合する相手が従来考えられていた後期エンドソームよりはるかに小型（直径 130nm）のエンドソームで、トランスフェリンや EGF のプロセッシングとは異なる経路に属するあるいはこれらが集められる以前の初期段階に属するエンドソームであることを示唆する。

T. Sakai, M. Imai, K. Kawasaki and K. Kuroda : Membrane fusion of influenza viruses in host cells

3P212

セミインタクト細胞を用いた小胞体の細胞周期依存的なダイナミクスの再構成

○村田 昌之¹、加納 ふみ^{1,2}、近藤 久雄³、細川 暢子⁴、永田 和宏⁴（¹生医研・分子生理、²京大院・理・生物物理、³ケンブリッジ大・医科学研究所、⁴京大・再生研）

小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) はチューブが three-way junction でつながった網目構造を持つオルガネラである。細胞分裂時においても ER はその連続性を保ったままであることが報告されている。では、どのように網目構造が 2 つの娘細胞へと分配されるのであろうか？我々は、ER に局在する HSP47 と GFP (green fluorescence protein) の融合タンパク質をに恒常的に発現する CHO (Chinese hamster ovary) 細胞株 CHO-HSP を樹立し、細胞周期依存的な ER の動態を共焦点顕微鏡を用いて経時的に観察した。すると、細胞分裂時には ER は連続性を保ちながらも部分的に切断されていることがわかった。またサイトキネシスが終了してすぐに、切断されたチューブ同士が再融合し、元の網目構造に戻ることも観察された。そこで、形質膜を部分的に透過性にした CHO-HSP 細胞 (セミインタクト CHO-HSP 細胞) を用いて、ER の細胞分裂時における部分的切断と、間期でのネットワーク再形成を再構成した。M 期細胞質 / ATP 再生系の添加によって、ER 網目構造の部分的切断が誘導された。この部分的切断は GTPγS に非依存的で、さらにノコダゾールによる微小管の破壊を前処理として必要とした。次に、M 期細胞質を洗い流し新たに間期細胞質を添加すると、切断された ER が互いに融合し網目構造を形成することを再構築できた。ネットワーク構造の再構成は GTPγS に依存的であり、また興味深いことに微小管の再構築なしに、網目構造が作られた。我々はさらに ER 網目構造形成過程に関与する融合タンパク質の同定も行った。これらの再構成系とそこから得られた生化学的因子の解析結果について、発表する。

M.Murata, F.Kano, H.Kondo, N.Hosokawa and K.Nagata : Reconstitution of cell cycle-dependent morphological changes of the endoplasmic reticulum in semi-intact CHO cells