3P213

セミンタクト細胞を用いた ER-ゴルジ体小胞輸送の解析

○加納 ふみ^{1,2}、村田 昌之¹ (¹生理研・分子生理、²京大院・理・生物物理)

小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) で合成された膜タンパク質・分泌タンパク質は、小胞輸送を介してゴルジ体へと輸送される。近年、ER とゴルジ体の形態は、ER-ゴルジ体小胞輸送のバランスによって制御されている可能性があることが示唆されている。例えば、細胞分裂時、娘細胞へのゴルジ体の均等配分を促進するためにゴルジ体の小胞化や ER への吸収が起こっているが、これはゴルジ体→ER 逆行輸送過程を利用していると考えられている。我々は ER-ゴルジ体小胞輸送と ER・ゴルジ体形態形成の関与を明らかにするため、形質膜を透過性にしたセミンタクト細胞系と GFP (green fluorescence protein) による可視化技術を用いて、ER-ゴルジ体小胞輸送過程を再構成した。我々は連鎖球菌毒素ストレプトリシン O (SLO) により形質膜を透過性にしたセミンタクト細胞を用いている。この細胞の利点は外部より新たに調製した細胞質・タンパク質 (抗体・蛍光標識タンパク質など) を導入し、セミンタクト細胞内で起こるタンパク質機能の生化学的・生物物理的解析ができることである。例えば、間期セミンタクト細胞に M 期細胞質を添加することにより、細胞内環境を M 期に同調することができ、M 期に細胞内で起こる現象を再構成することが出来る。我々は ER とゴルジ体をリサイクルするガラクトシルトランスフェラーゼと GFP の融合タンパク質を CHO (Chinese hamster ovary) 細胞に発現させ ER-ゴルジ体小胞輸送を可視化したのち、細胞をセミンタクトにした。そこへ外部より新たに間期細胞質と ATP を添加することにより、ER-ゴルジ体小胞輸送過程を再構成することに成功した。また M 期細胞質存在下では、ER→ゴルジ体順行輸送は停止するものの、ゴルジ体→ER 逆行輸送は起こることがわかった。本発表ではこの再構成系から得られた知見について議論する。

F.Kano and M.Murata : Reconstitution of the ER-Golgi vesicular transport in semi-intact CHO cells

3P215

Spingomyelinase 処理に起因するエンドソームの運動の経時観察

○太田 郁、大木 和夫、宮田 英威 (東北大学・院理・物理)

通常、細胞のエンドサイトーシスはその過程で ATP を必要とし、細胞を何らかの処理で ATP 欠乏状態にした場合、エンドサイトーシスは全く起こらなくなる。しかし、CHO 細胞では Sphingomyelinase による処理 (SMase 処理) を細胞に施すことにより、細胞膜が内側にくびれ込み、その表面にエンドソームと似た構造を作り、内側に物質を保持する。またその後、細胞を通常の状態に戻したとき、この構造は通常のエンドサイトーシスと同じように細胞内部に輸送されることが確認されている。(Zha et al 1998 Sphingomyelinase treatment induces APT-independent endocytosis. J.Cell.Biol.140:39-47)

今実験では、あらかじめ ATP 欠乏状態にした細胞に SMase 処理を行うことで細胞表面にベシクルを形成させ、水溶性の蛍光色素を保持させて可視化した。その後、細胞の環境を通常に戻してやり、作られたベシクルのその後の運動の様子を経時観察した。

ベシクルの運動は 2 つの段階に分けることができた。

まず初期には、細胞の周辺部でベシクルが主に細胞の縁に沿った方向に活発に運動を行っている様子が観察された。ベシクルは運動と停止を繰り返し、経路上で往復運動のような動きを見せるものが多く見られた。これらの運動は観察の初期 (10 分以内) に活発に見られ、時間と共に弱まっていった。活発な運動が弱まると共に、ベシクルが時間と共に徐々に細胞の中心方向に移送されていく様子が観察された。30 分後には細胞の周辺部に存在していたベシクルのほぼ全てが細胞の中心部に移送された。これらの運動にはアクチン、チューブリンなどのタンパクの作る構造や重合等が関わっていると考えられるためこれらのタンパクの重合阻害剤がベシクルの運動に与える影響等も、発表時には報告するつもりである。

K.Ohta, K.Ohki and H.Miyata : Observation of endosome movement induced by sphingomyelinase treatment.

3P214

細胞内輸送小胞の捕捉及び運動測定

○笠原 秀明¹、村田 昌之²、石島 秋彦¹ (¹名大院・工・応用物理、²岡崎国立共同研究機構・生理学研究所)

細胞内小胞輸送過程において、輸送を担う小胞 (輸送小胞) は、小胞表面に存在するキネシンなどのモータータンパク質によって微小管などの細胞骨格に沿って移動していると考えられている。この輸送小胞は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) によるイメージング技術を用いることにより、生細胞中でのリアルタイム蛍光観察が可能となっている。^(*)我々は、多様な輸送小胞を動かしているモータータンパク質の同定と機能解析を目指し、以下のような実験を進めている。ガラクトシルトランスフェラーゼ (GT) と GFP との融合タンパク質 (GT-GFP) を恒常的に発現している CHO-K1 細胞の細胞膜を局所的に破壊して、GT-GFP によって蛍光標識された輸送小胞は細胞外に放出させる。この浮遊してきた蛍光性の小胞をレーザートラップで捕捉し、これに予め準備した微小管と相互作用させ、結合性・運動性の評価を行っている。

(*) 村田昌之 加納ふみ: 実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座 3: 259-265, 2000

H.Kasahara, M.Murata and A.Ishijima : Manipulation of a transport vesicle in semi-intact CHO-K1 cells

3P216

生細胞膜からのタンパク質抽出法

○Afrin Rehana、猪飼 篤 (東工大院・生命理工・分子生命科学)

Extraction of membrane proteins using an AFM tip modified with bifunctional covalent cross-linkers was successfully done and the force curves obtained on the cell surface showed a long extension of cell membrane up to 200-300 nm before the final separation of the tip from the cell surface. The force required for the separation was in the range of 300-1000 pN, smaller than required for covalent bond breakage but larger than for the separation of non-covalently bonded pairs. The presence of extracted protein molecules on the tip was proved by measuring force curves between used tips for extraction and a modified silicon surface with amino-reactive bifunctional reagents. Washing the tips with SDS before force curve measurements denatured the adsorbed proteins but did not remove them from the tip. The force at the final breakaway was in the range of 1.5-2 nN, verifying that the proteins were cross-linked to the tip through covalent bonds as expected. This method will be useful to study time-space distributions of membrane proteins on a living cell without sacrificing it.

Reference:

A.Ikai, R.Afrin, A.Itoh, Y.Hayashi, H.Thogersen, T.Osada, Colloids and Surfaces B:Biointerfaces (in print) (2001).

R.Afrin,A.Ikai : Extraction of Proteins from the Cell Membrane of Living Cells