S2J2

核膜と染色体のダイナミクス

志見 剛^{1,2,3}、原口 徳子^{1,2,3}、○平岡 泰^{1,2,3}（¹通信総研、²阪大院・理、³科技団CREST）

真核生物の染色体は細胞核に収納され、核膜によって細胞質と隔られている。分裂間期において、細胞核は遺伝子機能が発現するための空間的な場を提供する。このような機能的な間期の細胞核構造が、細胞分裂期でいったん崩壊し、染色体分離の後、再構築される。崩壊した核構造が正しく再構築されることは、次の分裂間期で細胞が正しく機能するために重要である。遺伝子機能発現における細胞核構造の役割を理解するために、われわれは蛍光顕微鏡を用いて、染色体と細胞核のダイナミクスを解析してきた。核膜および染色体に局在するいくつかのタンパク質にGFPを融合させ蛍光タンパク質を作製し、核膜の崩壊と再構築の過程を生きている細胞で追跡した。核膜タンパク質としてはlamin B receptor (LBR)、emerinを用い、染色体タンパク質としてヒストン、HP1を用いた。また、emerinと相互作用するDNA結合タンパク質barrier-to-autointegration factor (BAF)についても解析を行った。これにより、染色体が核膜の周囲に再構築される過程を生きている細胞内で追跡できた。さらに、Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) によって、これらの蛍光タンパク質の細胞内での動きを計測した。これにより、核膜内での核膜タンパク質の移動度や核内での染色体の動きを計測できた。得られた結果を動画像で紹介する。

T. Shimi, T. Haraguchi and Y. Hiraoka : Dynamics and mobility of chromosomes and the nuclear envelope

S2J4

単一エンドソームの細胞内輸送イメージング

○山田 慎^{1,3}、川戸 佳^{2,3}（¹杏林大・医・物理、²東大院・広域・生命（物理）、³CREST（科技団））

副腎皮質細胞では、コレステロールを基質としてステロイドホルモンを合成している。このコレステロールは低密度リポ蛋白質（LDL）によって血中を運ばれて、LDLレセプターを介して細胞内に取り込まれ、エンドソームとして細胞内を輸送される。このLDL-エンドソームの細胞内輸送過程を蛍光-ビデオ顕微システムにより可視化して、単一粒子解析法により解析した。LDLは牛血漿から精製し、蛍光色素DiIで標識した。

副腎皮質細胞では、DiI-LDLを細胞内に取り込ませて30～60分でエンドソームが観察できるようになった。このエンドソームは瞬間的な速さは $0.065 \sim 0.260 \mu\text{m/s}$ であったが、前進、後退、停止を頻繁に繰り返すために、核の周りに集合するまでに3時間かかった。また、ステロイドホルモン産生を促進する副腎皮質刺激ホルモンで刺激すると、2時間で核の周りに集合した。このDiI-LDLの細胞内輸送はノコダゾールにより核への集合が阻害された。また、ダイニン抗体によりエンドソームは細胞周辺部に集合し、キネシン抗体により核周辺部への集合が促進された。以上の結果より、このエンドソームは同一のエンドソームにダイニン様及びキネシン様モーター蛋白質が結合し微小管上を輸送されていることが分かった。

最近、脳においてもステロイドホルモン合成系が存在し、脳内で合成されていることが明らかになりつつある。そこで、ラット脳アストログリア細胞におけるDiI-LDLの細胞内輸送を可視化し解析したところ、基本的には副腎皮質細胞でのエンドソームの運動と同じであったが、核の周りに集合するのに6時間かかった。

M. Yamada, S. Kawato : Analysis of a single endosome in adrenocortical cells and glial cells

S2J3

セミインタクト細胞系を利用した小胞体・ゴルジ体のダイナミクス解析

○村田 昌之（岡崎国立共同研究機構・統合バイオ）

光学顕微鏡下の単一細胞内でGFP標識オルガネラのダイナミクスを解析し、かつ生化学的に関連因子を探索するため、「GFP可視化技術」と「セミインタクト細胞系」をカップルさせた単一細胞アッセイシステムを作成した。「セミインタクト細胞系」とは、形質膜を連鎖球菌毒素ストレプトリシンO(SLO)などを用いて、部分的に透過性にし細胞質を流失させた細胞のことである。細胞質流出により細胞質依存的な細胞内イベントは一時的にストップするが、細胞骨格やオルガネラはほぼインタクトのまま保たれているため、外部より細胞質などのタンパク質因子やATP再生系などを添加すれば細胞内イベント全体又はその素過程を再構成することができる。本単一細胞アッセイシステムを用い、細胞分裂期（M期）におけるCHO細胞のゴルジ体、小胞体（ER）の形態変化・娘細胞への分配とオルガネラ再構築過程をGFP可視化した。また、間期・M期細胞質を用いて細胞周期依存的なオルガネラダイナミクスをその形態変化を指標に素過程に分割・再構成することによって制御メカニズムを考察した。その結果、細胞分裂面でERネットワークの一時的切断が起こり、分裂後すぐに切れたネットワーク膜同士の再融合が起こること、そしてその分子基盤としてcdc2キナーゼに制御された細胞周期依存的な膜融合反応が必須であることがなどがわかった。また、M期におけるゴルジ体の形態変化はゴルジ体-小胞体間の小胞輸送ダイナミクスと密接にカップルしている現象であることも判った。本シンポジウムでは、これらM期におけるオルガネラ分配と小胞輸送のダイナミクスをmovieを中心に紹介し、これら過程に関わる細胞質因子や両オルガネラ間の小胞輸送ダイナミクスの細胞周期依存的な変容とゴルジ体・小胞体の形態形成メカニズムを論じる。

M.Murata : Dynamics of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in semi-intact cells

S2J5

オートファジーの膜動態を支える分子群

○鈴木 邦律、大隅 良典（基生研・細胞内エネルギー変換）

オートファジーは、真核細胞に普遍的に備わっている細胞内分解システムであり、細胞内のタンパク質やオルガネラを液胞/リソソームで分解する役割を担っている。オートファジーは、オートファジーの誘導、オートファゴソーム（以下AP）の形成、APの液胞/リソソームとの融合、APの分解という過程からなり、細胞の恒常性の維持、分化などに重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、これまでAP形成に関わるマーカー分子が同定されていなかったため、AP形成の解析は電子顕微鏡観察による形態的記述にとどまり、その分子機構は依然として不明なままであった。

我々は真核細胞のモデル生物として出芽酵母を用い、AP形成に必要なAPG遺伝子群の同定とそれらの機能解析を進めてきた。これまでの解析により、APG遺伝子は、2つのユビキチン様反応系・タンパクキナーゼ複合体・脂質キナーゼ複合体を含むいくつかの機能群に分類できることが明らかとなってきた。また、APのマーカー分子が同定されたため、GFP融合Apgタンパク質を用いてAPの動態を蛍光顕微鏡下で可視化できるようになってきた。その結果、AP形成に必要な新奇の細胞内構造である「前オートファゴソーム構造体（PAS）」が同定された。PASは蛍光顕微鏡下で、2つのユビキチン様反応系とタンパクキナーゼ複合体を構成するApgタンパク質を含む、液胞近傍の微小領域として検出される。また、*apq* 遺伝子破壊株を用いた解析により、脂質キナーゼ複合体を構成するApgタンパク質はPASの形成に関与していることが示唆された。現在電子顕微鏡を用いたPASの微細構造の解析が進行しつつある。一方、高等動物においても、培養細胞や個体のレベルでAPの形成過程を追跡する系が確立されつつある。今回はそれらの結果の一部を紹介する。

K. Suzuki and Y. Ohsumi : Molecules responsible for the membrane dynamics of autophagy