3P213

化学刺激に対する大腸菌アスパラギン受容体の分子ダイナミクスと運動ダイナミクスの1細胞計測

○井之上 一平¹、塩見 大輔²、川岸 郁朗³、安田 賢二¹ (¹ 東大院・総合文化、² University of Texas Medical School、³ 名古屋大院・理)

外界の刺激に対して細胞は、ストレス応答性蛋白質の修飾、局在、発現量の変化などで対応する。大腸菌のように細胞分裂周期が数十から数百分程度の生物では、ある世代に環境変化によって発現量や修飾などが変化した蛋白質が細胞質成分として次の世代へ伝わり、細胞の振る舞いに影響を与える可能性がある。本研究では、走化性に関わる蛋白質であるアスパラギン酸レセプター Tar に着目した。Tar はアスパラギン酸がない条件において大腸菌の両極に局在する事が知られている。そして、外界の刺激に対する先祖細胞内の Tar 変化が、どのように子孫細胞に分配され、どの程度各細胞の振る舞いに影響を与えるのかを調べることで、細胞内蛋白質成分に依存した「情報」の世代間伝承の性質を明らかにすることを目的として本研究を行った。

今回、1細胞長期培養観察系を用いて、細胞内の Tar 蛋白質が蛍光蛋白質により可視化された大腸菌を1細胞レベルで培養観察した。そして、1細胞内の Tar 局在ダイナミクスと細胞運動能を同時に経時計測することに成功した。1細胞培養された大腸菌にアスパラギン酸刺激を与えるとタンブリング頻度が低下し、Tar 局在が刺激開始後 80 分で消失する素過程が1細胞レベルで観察された。アスパラギン酸刺激停止後、タンブリング頻度は上昇し、Tar 局在は 250 分かけて再度形成する様子も経時的に計測することができた。ここで局在の再形成には数世代かかった [1]。

本年会では、更に、細胞内部における蛋白質局在変化が大腸菌の運動能に与える影響等の実験結果を報告し、細胞内蛋白質レベルでの情報の世代間伝承を議論したい。

[1] Inoue, I., Shiomi, D., Kawagishi, I., and Yasuda, K. (2004) *J. Nanobiotechnology* 2, 4.

I. Inoue, D. Shiomi, I. Kawagishi and K. Yasuda : Simultaneous measurement of dynamics of sensor-protein localization and motility behavior in individual *Escherichia coli* cells

3P215

アカハライモリ嗅覚受容体遺伝子のクローニング

○高島 大貴¹、澤田 研¹、中村 整²、岩佐 達郎¹ (¹ 室蘭工大・材料物性、² 電通大・量子物質)

嗅覚受容体はそのアミノ酸配列の相同性により、2つのグループに分類されている。魚類などの水棲生物の嗅覚受容体は、class I と分類され、マウスなどでクローニングされている嗅覚受容体 (class II 受容体) とは、異なるサブファミリーを形成している。ところが、両生類である *Xenopus* では、class I と class II の両方の受容体が存在することが知られている。このことから、class I 嗅覚受容体は水性の匂い物質を、class II 嗅覚受容体は揮発性の匂い物質を認識する受容体であると考えられている。

我々は、両生類であるアカハライモリの嗅覚受容体遺伝子をクローニングし、それらの生理機能を解析することを目的としている。既知の *Xenopus* 嗅覚受容体で保存されているアミノ酸配列からデザインした縮重プライマーを用い、アカハライモリ嗅上皮 cDNA ライブラリーに対して、nested PCR を行い、5 種類の嗅覚受容体遺伝子断片の単離に成功した。また、これらから推測されるアミノ酸配列をもとに、既知嗅覚受容体との分子系統樹を作成したところ、これら 5 種類の遺伝子のコードする受容体は class II に属することがわかった。

その内、Cp-OR1 と名付けた遺伝子の全長配列を得た。Cp-OR1 の遺伝子配列より予測されるアミノ酸配列をもとに、立体構造の明らかになっている G タンパク質共役型受容体であるウシロドプシンのアミノ酸配列とアライメントをとり、7 回膜貫通領域を推定できた。現在 Cp-OR1 の全長タンパク質と、細胞外第 2 ループから C 末端までのフラグメントの発現を試みている。

M.Takashima, K.Sawada, T.Nakamura and T.Iwasa : Cloning of olfactory receptor genes from the olfactory epithelium of *Cynopus pyrrhogaster*

3P214

イモリ嗅上皮からのリポカリンファミリー遺伝子のクローニングと発現部位の特定

○浦野 和雄¹、岡野 恵子²、竹内 義和¹、高橋 司¹、中村 整²、澤田 研¹、岩佐 達郎¹ (¹ 室蘭工大・材料物性、² 電通大・量子物質)

脊椎動物の嗅覚情報伝達は G タンパク質共役型匂い分子受容体から Gs クラスの G タンパク質を介し、cAMP 感受性カチオンチャネルの開口に至る一連の酵素カスケードとして知られている。しかし、嗅上皮はボウマン腺から分泌される粘液に覆われており、外界から鼻腔に侵入した匂い分子は、嗅粘液表面に付着した後、「匂い分子結合タンパク質」により嗅繊毛まで運ばれ、受容体タンパク質に受容されると考えられている。

我々はイモリ嗅上皮 cDNA ライブラリーから高頻度で見出されるクローンとして、Olfactory specific protein (以下 OSP)、Lipocalin、Odorant binding protein (以下 OBP) にそれぞれ高い相同性を示す 3 種類の遺伝子を得た。推定されるアミノ酸配列より分子系統樹を作成したところ、Lipocalin 類似遺伝子と OSP 類似遺伝子は互いに類似していて、共にリポカリン・スーパーファミリーに属することがわかった。ノーザンブロットング法により、OSP、OBP、lipocalin 類似遺伝子 mRNA の発現の組織特異性を調べたところ、嗅上皮に特異的に発現していることがわかった。また、嗅上皮での *in situ* hybridization を行ったところ、ボウマン腺においてそれぞれの発現が確認された。さらに、イモリの鼻腔の連続切片を用いて OSP と lipocalin 類似遺伝子の発現特異性を調べたところ、発現部位に違いがあった。

Lipocalin タンパク質は脂溶性リガンドと結合し、それを輸送する分泌タンパク質として知られているので、我々は上記 2 種のタンパク質も嗅上皮の異なった部位で「匂い分子結合タンパク質」として働いているものと予想している。現在、OSP と lipocalin 類似タンパク質を発現させて、その生理機能の解析を試みている。

K.Urano,K.Okano,Y.Takeuchi,T.Takahashi,T.Nakamura,K.Sawada and T.Iwasa : Expression of lipocalin family genes in the Newt olfactory epithelium.

3P216

corticosterone がミトコンドリアの電子伝達系に及ぼす直接作用

○市川 文登、寺谷 俊昭、青地 桂、太田 善浩 (農工大・工・生命工)

【背景】corticosterone(CORT)はストレスホルモンと呼ばれ、ストレス時に血中濃度が上昇する。CORT は神経系に作用し、様々な有害性を示すことが知られている。その一つに、活性酸素の発生量が増加することがあるが、その機構は判明していない。そこで本研究では、活性酸素を最も多く発生するオルガネラであるミトコンドリアに CORT が直接およぼす作用を測定した。【方法】ミトコンドリアは、ラット由来の神経細胞株 GT1-7 から遠心分離法により単離した。ミトコンドリアの活性は、ATP 合成量を指標として Luciferin-Luciferase 法により調べた。【結果・考察】単離ミトコンドリアを 1nM 10 μ M CORT とそれぞれ 10 分間インキュベートした後、1mM-malate を添加し ATP 合成量を測定した。その結果 CORT 非存在下と比較して、100nM、1 μ M および 10 μ M では ATP 合成量が有意に低下し約 90 % になったが、1nM と 10nM では変化はなかった。次に、CORT の作用部位を評価するため、複合体 1(malate)、2(succinate)、cytochrome c(ascorbate-TMPD) から電子を流した。その結果、複合体 1、2 から電子を流した場合では、有意に ATP 合成量が低下し約 90 % になったが、cytochrome c から電子を流した場合では変化はなかった。以上のことから、CORT はミトコンドリア呼吸鎖複合体 3 の活性を抑制することが示唆された。そこで CORT の複合体 3 に及ぼす作用、および活性酸素の発生量を増加させる作用について、現在検討中である。

F.Ichikawa, T.Teratani, K.Aochi and Y.Ohta : Direct effects of corticosterone on mitochondrial electron transfer system.