2SC05

モデル脂質膜を用いて GM3 クラスター形成を探る

○松岡 審爾 (札幌医大・医学部・物理)

ガングリオシド GM3 のクラスターが形成する条件、およびそれに対するコレステロールの影響を調べるため、次のようなモデル脂質膜を用いた研究を行ってきた。1 つは一枚膜リポソーム (ULV : 径 100 nm) であり、これに抗 GM3 抗体である M2590 を加えリポソームの凝集が観測されたときに GM3 クラスターが生じているとみなした。もう 1 つは多重層膜 (MLV) であり、この X 線回折からラメラ間隔の GM3 濃度依存性を観測することにより膜間の相互作用についての知見が得られる。細胞中では不飽和アシル鎖をもつホスファチジルコリン (PC) の中に、飽和アシル鎖をもつスフィンゴミエリン (SM) やコレステロールおよび GM3 に富むドメインが形成することが示唆されている。しかし、まず我々はドメイン形成過程ではなく、ドメイン内で GM3 がクラスターを形成する要因が何かを調べるため、2 成分系 GM3-SM 系, GM3-SOPC 系について調べた。まず、抗体による ULV の凝集には GM3 濃度の閾値があることを確認した。また、GM3-SOPC 系の閾値は GM3-SM の閾値の 2 倍ほど大きく異なることを見出した。これは抗体が結合しうる GM3 クラスター形成の要因が単に膜における GM3 の面密度の増加ではないことを示している。また、MLV の X 線回折からは、クラスター形成の閾値を超えたらラメラ間隔の GM3 濃度に対する増加率が鈍化することがわかった。さらに本発表ではドメイン内でのクラスター形成およびドメインそのものの形成に対するコレステロールの影響についても報告したい。

S. Matuoka : Characterization of the GM3 cluster by using model liposome

2SD01

重力応答と分子シャペロン

○小黒 麻美、桜井 隆史、跡見 順子 (東大院・総合文化・生命環境科学系)

骨格筋は力発揮という力学的な仕事をする器官で、運動負荷の変化に応じて機能的かつ形態的に適応することがよく知られている。そして、地球上に生活する生物は常に重力による機械的刺激を受け、動物は重力に抗して運動するために骨格筋組織を発達させている。このように重力は生命に必須因子であるが、骨格筋組織・細胞の重力への適応機構は未だよく分かっていない。そこで我々の研究室では、分子シャペロンから細胞の持続的な重力応答システムを考察した。本研究では細胞内で細胞の張力発揮と収縮機構を生み出す細胞骨格タンパク質に対する α -B-クリスタリンの分子機構、および細胞外での支点形成に必須な細胞外マトリクスの主要タンパク質コラーゲンに対するジャペロン HSP47 の重力負荷、解除への応答を検討した。HSP47 は小胞体内の HSF により発現制御される唯一の分子シャペロンであり、コラーゲンタンパク質の 3 本らせん重合あるいは水酸基の付加、細胞外への分泌のためのプロセッシングなどに必須であることが明らかにされている。HSP47 の発現量について、タンパク質および mRNA のラット後肢懸垂および遠心による過重力に対する応答を見ると、その基質であるコラーゲンの mRNA よりもかなり早い時期に応答を示した。また、コラーゲンは線維芽細胞で合成されていると考えられているが、筋細胞は基底膜構造を有しており、細胞培養系でも同様に検討したところ、重力変化に応答した変化が見られた。このような結果から、コラーゲンの分子シャペロンとして考えられている HSP47 は細胞外における機械的ストレスへのシャペロンとして同時に働いており、細胞外マトリックスではコラーゲン繊維が機械的ストレスに適応し、張力を伝えていると考えられる。

A.Oguro, T.Sakurai, Y.Atomi : Gravitational response and molecular chaperone

2SC06

複合糖質結合型 DDS ナノ粒子の開発と創薬応用

○山岸 登 (産総研 ナノテクノロジー研究部門)

生体膜面上の糖蛋白質や糖脂質などの複合糖質の糖鎖構造や密度の変化は細胞間の各種の分子・細胞認識機能に関与していることが明らかになってきており、これらの糖鎖の分子・細胞認識などの生体機能に関する研究が進展するに仕がって糖鎖導入による DDS ナノ材料の高機能化技術の開発が注目されている。本研究では、複合糖質の機能に学んだ分子・細胞認識制御型標的指向性 DDS ナノ粒子としての一連の複合糖質・リポソーム複合体を調製し、その糖鎖構造とレクチンによる分子認識機能並びに生体内動態との関連を調べた。その結果、多種多様な合成/天然糖蛋白質並びに糖脂質とリポソームとの分子組織化によるナノ粒子複合体を調製し、これらのナノ粒子膜面上の糖鎖構造と密度の改変により、DDS ナノ粒子の多価性レクチン分子認識活性並びに担癌マウス生体内動態を制御できることが明らかとなってきた。本技術の対象は、生体内の各種組織の細胞表面上に存在する多様な糖鎖認識糖蛋白質である標的分子レクチンに対して特異的な結合活性を有する糖鎖を導入したリポソーム性 DDS ナノ粒子である。本技術では、リポソーム表面の性質あるいは該表面に結合させる糖鎖およびリンカー蛋白質について数 100 種類の実験、検討を加え、リポソームや糖鎖の構造を分子設計することにより、該ナノ粒子の各種組織へのアクティブ・ターゲティング機能を実際に制御できること、そして、これらをアクティブ・ターゲティング DDS ナノ粒子として利用することにより各種の薬剤や遺伝子などを標的組織や細胞に効率的に輸送できる可能性を見だし、本 DDS ナノ粒子を開発するに至ったので報告する。

N.Yamazaki : Development of DDS Nanoparticles Bearing Complex Carbohydrate Ligands and Their Medicinal Applications

2SD02

機械刺激によるアクチン細胞骨格の動態制御の分子機構

○早川 公英¹、辰巳 仁史^{2,3}、曾我部 正博^{1,2,4} (¹ 科学技術振興機構・SORST・細胞力覚、² 名大・院医/細胞生物物理、³ 科学技術振興機構・CREST、⁴ 生理研・分子生理)

多くの細胞では、周期伸展刺激に応じてストレス線維の急速な崩壊と再構築が生じるが、その仕組みはよく分かっていない。我々は、ジギトニン処理により可溶性細胞質を除いた培養内皮細胞のセミンタクト細胞を用いてその分子機構の解析を試みた。セミンタクト細胞では、マウスの脳抽出物存在下で周期伸展を負荷した場合にのみ、ストレス線維の崩壊が観察された。また、細胞全体を弛緩させるとストレス線維が崩壊したことから、周期伸展刺激の弛緩相(張力消失相)がストレス線維の崩壊を導くことが示唆された。弛緩されたセミンタクト細胞に種々の精製タンパク質を添加した結果、張力消失によるストレス線維の崩壊にはアクチン脱重合因子コフィリンのみで十分であることが判り、アクチン線維が張力消失依存的に脱重合する可能性が浮上してきた。ここで我々は、コフィリンによるアクチン線維の切断を張力が直接抑制する、という全く新しい分子機構を提案する。コフィリンのアクチン線維側面への結合は線維の構造を変化させ、さらなるコフィリンの結合を促進する。我々は、コフィリン結合によるアクチン線維の構造変化が、張力によって阻害されることで、コフィリン結合の正の協同性が抑制されるのではないかと考えた。それを証明するために、ミオシンコートしたビーズを光ピンセットで操作して単一アクチン線維を捕捉し、アクチン線維に張力を負荷しながらコフィリンを添加し、線維切断までの時間を測定した。その結果、コフィリン投与からアクチン線維切断までに要する時間は、張力存在下では張力非存在下(平均: 17 s)の約 2 倍(平均: 43 s)を要したことから、張力が、コフィリンによるアクチン線維の切断を直接抑制することが明らかとなった。このことは、アクチン線維自身が機械刺激を感じて自身の動態を制御するメカノセンサーであることを意味する。

K.Hayakawa, H.Tatsumi, M.Sokabe : Tension dependent regulation of actin dynamics in vivo and vitro