1P217

再生フィブロインの平面膜に対する作用

○都島 美行、玉田 靖（農業生物研・昆虫新素材）

絹フィブロインは蚕の絹糸腺、特に後部絹糸腺で合成され、その後に中部絹糸腺へ貯留される。昨年の年会で、後部絹糸腺から採取した絹フィブロインがリン脂質膜を透過することを報告したが[1]、中部絹糸腺から採取した試料は膜に作用しない。後部絹糸腺の試料は些細な取り扱いミスで凝集するが、凝集した試料は平面膜を破りやすい。このように、リン脂質膜に対する絹フィブロインの作用はバラエティーに富む。その裏返しに native（絹糸腺から採取）な絹フィブロインは扱い難く、操作上の制約が多い。繊維化した絹フィブロインは高濃度の臭化リチウム水溶液に溶解するが、同方法で得られる絹フィブロイン水溶液を再生フィブロインと呼ぶ。再生フィブロインの場合、native 状態に比して分子量は広範に減少するが、繊維化・結晶化特性においては native と同等であり、調製等の取り扱いが容易である。故に様々な知見が再生フィブロインで得られており、2 次構造も把握されている[2,3]。我々は 2 次構造への依存性を意識しつつ、平面膜法による再生フィブロインの測定を開始した。現時点までに判明したことは、1) 調製直後の再生フィブロインはリン脂質膜へ作用するが、その測定結果は大きくばらつく、2) 調製から 30 日程度経過するとリン脂質膜へ全く作用しない、という 2 点である。今後も測定を行い、年会ではより詳細な結果を報告する。 [1] Y. Toshima, *Biochim. Biophys. Acta* 1713 (2005) 1-4; [2] M. Canetti et al., *Biopolymers* 28 (1989) 1613-1624; [3] G. Li et al., *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 6600-6606

Y.Toshima, Y.Tamada : Effect of regenerated fibroin on planar bilayer membrane

1P219

ミトコンドリア融合因子 Mitofusin の構造機能解析

○小柴 琢己（九大院・理学・生物科学）

真核生物の細胞内にはミトコンドリアと呼ばれるオルガネラが存在し、その主な生理的役割は生体内における ATP の産生である。このミトコンドリアはダイナミックに分裂と融合を繰り返しているが、この平衡状態の異常に伴い、様々な疾患に関与する事が近年数多く報告されている。発表者はカルフォルニア工科大学 (David Chan 研究室) にて、マウス・ミトコンドリアの融合現象に着目し、その膜融合メカニズムの一端を解明した (Koshiba et al., *Science* 2004)。発表者は、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた細胞の融合実験から、ミトコンドリアの融合の際に Mitofusin (Mfn) 分子 (ミトコンドリアの外膜上に存在し、分子量約 8 万の膜蛋白質) が trans (異なるミトコンドリアの膜上で) に相互作用することをつきとめた。また発表者は X 線結晶構造解析より、Mfn 分子の C 末端領域 (HR2 領域) は coiled-coil 構造により二量体に会合することを明らかにした。変異体を用いた実験により、coiled-coil 構造による二量体形成は、Mfn 分子の機能に不可欠であることも示した。以上の結果から、申請者は Mfn 分子が HR2 領域により二量体を形成することで、二つのミトコンドリア同士が融合前に一定の距離で保たれた tethered 状態を経て、その後の融合へと移行するモデルを提案した。このミトコンドリアの膜融合メカニズムは、他のオルガネラとは異なる独自のシステムを採用しており、ミトコンドリアの進化的起源を知る意味でも非常に興味もたれる。

T.Koshiba : Structure-function analysis of mitochondrial fusion component, Mitofusin

1P218

脂質ベシクルの分裂、成長、増殖

○上野 雅晴、スリオンシタノント スパボン、チュンチャロ
ワッタナ スパバン、柏木 寛、茶木 弘一（富山医薬大・薬）

(序) 脂肪酸は水中で pH によりミセル、ベシクル、液滴の集合体を形成する。オレイン酸ナトリウムは純水中でミセルを形成し溶解する。このとき pH は 10 程度である。このミセル溶液を pH 8 付近に下げるとベシクル状の凝集体を形成する。ベシクル形成には長時間を要し、完成するのに 30 分以上を必要とする。形成したベシクルのサイズ分布は広い。一方、予めベシクル (リン脂質 (PC) ベシクル又はオレイン酸ベシクル) が存在するとベシクルの形成速度が著しく短縮され、そのサイズは予め存在するベシクルのサイズに依存する。この機構を解明する目的で研究を開始した。(実験結果) サイズ既知の PC ベシクルにオレエートミセルを加えると濃度比が 1 : 1 のとき元のベシクルより小さいベシクルが新たに生成した。濃度比が 1 : 5 の時は新たに元のベシクルより小さいベシクルと大きいベシクルが生成した。一方サイズ既知のオレイン酸ベシクルにオレエートミセルを加えると濃度比が 1 : 1 のときは小さいベシクルが、濃度比が 1 : 5 のときは大きいベシクルのみが生成した。サイズ既知の PC ベシクルとサイズ既知のオレイン酸ベシクルを混合すると新たにいずれのサイズより小さいベシクルが生成した。さらに PC、オレエート混合ミセル溶液からベシクルを形成させると混合比が 1 : 9 付近で生成するベシクルサイズが最小であった。以上の知見に基づき、予めベシクルが存在するときオレエートミセルまたはオレイン酸ベシクルからオレエート分子がベシクルに移り、ベシクルが分裂増殖する経路とオレエートミセルに予め存在する PC ベシクルの一部が可溶化され PC を含むオレエートミセルがすみやかに小さいベシクルを形成する 2 つの経路が存在することがわかった。どちらの経路が優勢かは混合比により決定される。

M.Ueno, S.Sriwongsitanont, S.Chungcharoenwattana, H.kashiwagi, H.Chaki : Fission, growth and multiplication of lipid vesicles

1P220

単離 SNARE 蛋白質を用いたマスト細胞脱顆粒機構の解析

○崎山 祥紀、中西 守、平嶋 尚英（名市大院・薬）

【目的】マスト細胞は、炎症性メディエーターを開口放出により分泌 (脱顆粒)、アレルギー反応を引き起こす。近年我々は、マスト細胞の開口放出に SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) とよばれる蛋白質群及びこれらに結合する蛋白質が関与することを明らかにしてきた。しかしながら、マスト細胞の開口放出における分泌顆粒膜と形質膜の融合機構の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、単離精製した SNARE 蛋白質を用いた実験系を構築し、脱顆粒機構を解明することを目的とした。【方法】マスト細胞の SNARE 蛋白質として分泌顆粒膜側には VAMP7,8 が、形質膜側には Syntaxin3,4、SNAP23 が発現していることが報告されている。まず、これらの SNARE 蛋白質を大腸菌発現系で GST ないし His タグ結合蛋白質として発現し、単離・精製を行った。各 SNARE 蛋白質間の相互作用を GST pull down assay を用いて調べた。また、SNARE による膜融合を解析するためにリボソームに精製 SNARE 蛋白質を組み込み、リボソーム間の膜融合を FRET 法でモニターする系を構築した。【結果】GST 結合 SNAP23 を用いて GST pull down assay を行ったところ、VAMP8、Syntaxin3、SNAP23 が相互作用することが示唆された。更にこれらの蛋白質の膜融合能を調べるために、NBD、Rhodamine で蛍光標識したリボソームに VAMP8 を、無標識のリボソームには Syntaxin3、SNAP23 を組み込み、両リボソーム間の膜融合に伴う FRET の解消をモニターする系を構築できた。現在、種々の外液条件下での膜融合効率の測定を行っている。

H.Sakiyama, M.Naknishi and N.Hirashima : Analysis of Mast Cell Degranulation using isolated SNAREs