3P209

キャッピングタンパク質 (CapZ) のアクチンフィラメント結合機構の解析

○武田 修一¹、成田 哲博¹、森井 博史¹、前田 雄一郎^{1,2,3}
(¹ERATO,JST、²理研播磨、³名大院理)

細胞内におけるアクチンフィラメントの重合は主にその B 端で起こる。近年、B 端に関与してそのダイナミクスを制御するタンパク質が数多く発見されてきている。キャッピングタンパク質は α , β サブユニットからなるヘテロダイマーで、B 端に強固に結合することによってフィラメントの重合、及び脱重合を阻害する。以前に我々のグループによってキャッピングタンパク質 CapZ(chicken α 1 β 1) の結晶構造が明らかになった。その結果、各サブユニットの C 末端部がアクチンフィラメントに対する結合において重要であることが示唆された。その後の生化学的実験からその仮説が検証されているが、詳細な複合体の結合様式は明らかとはなっていない。そこで我々はクライオ電子顕微鏡像の単粒子解析法を用いてアクチンフィラメントと CapZ 複合体の三次元構造解析を試みた。得られた構造情報とアミノ酸配列情報から CapZ 上のアクチン結合に関与していると思われる残基を新たに予測した。本研究ではそれらの残基の変異体 CapZ を作成してそのフィラメント結合活性を測定したのでこれを報告する。

S.Takeda,A.Narita,H.Morii,Y.Maeda : The binding mechanism of CapZ to actin filament.

3P211

蛍光標識物質のトランスポーター通過能を利用した細胞種識別・分離技術の開発

○安西 悠、服部 明弘、岡野 和宣、安田 賢二 (東大院・総合文化)

近年、抗体を用いない細胞種識別・分離技術の一つとして、DNA 標識蛍光色素 Hoechst 33342 を用いた骨髄からの造血幹細胞分離技術が紹介され、抗体ベースの手法が主流であった細胞種識別技術が飛躍的に進歩した。これは造血幹細胞が他の血球細胞に比べてトランスポーターを介した Hoechst 33342 の排出能が大きいためであり、結果として蛍光輝度が非常に小さい分画 (side population, SP 分画) を示すためであると考えられている。この排出能は種や組織を超えて保存されているため、特に種間での適用に拘束があった従来の免疫蛍光法の短所を克服しており、新たな細胞種識別法として発展が期待されている。

われわれはこのような細胞状態を反映した細胞膜トランスポーターの状態を実時間で計測することで、表現型などの従来識別が難しかった細胞の相違を識別する技術の開発を進めている。Hoechst 33342 と同様な生細胞標識色素に、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内オルガネラを標識する蛍光色素が存在するが、本研究ではこのような標識蛍光色素を用いて、細胞の標識色素排出能に注目した細胞種識別・分離を目指した。モデル細胞として、マウス (系統: BALB/c) 脾臓に含まれる血球細胞に注目した。先行研究として、Hoechst 33342 の蛍光輝度の差によって Thy1.2⁺ 細胞と Thy1.2⁻ 細胞の識別・分離が可能であることが知られている。本研究では、細胞内オルガネラ標識蛍光色素の濃度や温度、排出させる時間などの条件を検討し、蛍光輝度や蛍光部位の局在に注目することで、特に Thy1.2⁺ 細胞のさらに詳細なサブセットである CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞との相違を検討した。本会では各細胞種における蛍光輝度や蛍光部位の局在、識別・分離のための標識条件を中心に報告する。

Y. Anzai, A. Hattori, K. Okano and K. Yasuda : Development of cell type identifying and sorting by using transporter-mediated labeling reagent

3P210

細胞サイズのリン脂質 W/O エマルジョン内におけるアクチンフィラメント凝集構造

○長谷 政彦 (京大院理)

アクチンフィラメントは細胞の形状・強度・運動に関わる負に帯電した剛直荷電高分子であり、細胞中に多く分布し様々な形態をとっている。生体膜に付着しているアクチンフィラメントは膜タンパク質によって繋がれると考えられているが、近年マイクロスケールの巨大リポソーム (Giant Liposome: GL) の内部に封入されたアクチンフィラメントがホスファチジルコリン (PC) からなる膜との静電相互作用により膜表面に多く分布することが示された。また生体膜で PC は細胞膜の外膜に多く、内膜にはフォスファチジルエタノールアミン (PE) やフォスファチジルセリン (PS) が多く分布しており、このような脂質分布の非対称性は細胞機能に重要な働きがあると期待されている。細胞分裂時には細胞内膜の脂質の分布変化と膜直下のアクチンフィラメントの凝集構造変化が同期して起こっているとの報告もあり、アクチンフィラメントの凝集構造に対する膜界面の重要性が示唆されている。従来、安定な GL を作製するためには自発曲率の小さな PC を用いる必要があり、負の自発曲率が大きな PE や PS だけでは作製が困難であった。そこで我々はマイクロスケールの微小水滴をオイル中に作製し、オイルとの間に脂質の境界面を作ることによって水滴を周辺から分離し、かつ細胞の界面状況を模倣した細胞類似のマイクロ空間を構築した。この脂質膜で囲まれた細胞サイズの油中水滴 (Water-in-Oil Giant Emulsion: W/O:GE) は脂質の自発曲率や溶媒条件によらず安定に作製できる。我々は内膜に多い PE や PS などのリン脂質が構成する膜表面とアクチンフィラメントとの相互作用を調べるため内部にアクチンフィラメントを封入した W/O GE を作製し、多価カチオン存在下での脂質膜とアクチンフィラメントの凝集構造を調べたのでその結果を当日報告する。

M.Hase : Structural Transition of Actin Filament in a Cell-Sized Water Droplet

3P212

アノイーキス開始を妨げる培養条件

○江本 由美子 (九大院・理・生物科学)

生体組織から取り出した (付着性の) 細胞は、組織中で付着していたのと類似の基質に付着させない限り、アポトーシスを起こして死んでいく。この現象はアノイーキスとよばれる。細胞があるべき場所から離れると死んでしまうことは、生体組織の恒常性維持に重要な役割をもつ。細胞が足場 (基質) から遊離してからアポトーシス実行系を活性化させるまで (アノイーキス開始) の仕組みについてはよく解っていないが、比較的広く受け入れられている説明として、細胞が適切な基質に付着した状態ではアポトーシスを抑える信号が存在するが、基質から遊離した状態ではアポトーシス抑制信号が無くなるので (いつでも準備状態にある) アポトーシス実行系が働き出す、というものがある。

MDCK 細胞はアノイーキスが報告された最初の細胞系のひとつであり、正常細胞のアノイーキス研究のモデル系としてよく用いられている。私は最近、MDCK 細胞の培養条件を変えると、アノイーキスの起こりにくい場合があることを見出した。この培養条件では、細胞が浮遊状態 (polyHEMA coated 皿) で生き続け、浮遊後に再び接着可能皿 (通常の未 coated 培養皿) に移すと、再接着して増殖を始める。この結果は、足場依存性細胞が接着信号を失っても生存できることを示し、細胞接着によるアポトーシス抑制信号が無くなることで (デフォルトとなり) アポトーシスが起ることという上記の通説に対して新しい見方を導入する可能性がある。私は現在、アノイーキスの起こりにくい条件と起こりやすい条件とで細胞内蛋白質の動態がどう変化するのかを調べている。本年会では、アノイーキス開始の仕組みについて、これまでに示唆されている説との関連を含めて議論したい。

Y.Emoto : A cell culture condition which prevents anoikis of anchorage dependent cells