3P217

シロイヌナズナの重力感知の分子メカニズム

○豊田 正嗣¹、古市 卓也¹、辰巳 仁史^{1,2}、曾我部 正博^{1,3,4} (¹ 名大院・医・細胞生物物理、²CREST, JST、³ICORP/ SORST 細胞力覚, JST、⁴生理研・分子生理)

多くの高等植物は重力方向を感知して成長方向を制御する重力屈性を示す。重力感知の機構は不明であるが、特化した細胞(内皮細胞、コルメラ細胞)内に含まれるデンプン粒(アミロプラスト)の重力による沈降を利用して重力方向を感知するという「デンプン平衡石仮説」が有力仮説である。この仮説は多くの遺伝学的知見により支持されているが、アミロプラストの沈降が細胞内シグナルに変換される機構は未知である。そこで、Ca²⁺ レポータータンパク質であるエクオリンを導入したシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を用いて、植物に対する重力方向の変化で生じる[Ca²⁺]_{cvt}(細胞内Ca²⁺濃度)変化の測定と解析を通してその機構を探った。植物個体を重力方向に対して180度回転させると、一過的に[Ca²⁺]_{cvt}が上昇し、ゆっくりと減衰することが見出された(減衰時定数: 60秒)。この[Ca²⁺]_{cvt}上昇は植物をCa²⁺キレーターであるBAPTAで処理すると完全に消失し、機械刺激受容チャネルの阻害剤であるGd³⁺で処理すると可逆的に抑制された。また植物ホルモン処理でアミロプラストを消失させた場合にも、[Ca²⁺]_{cvt}上昇が抑制された。更に光量子蓄積(VIM)カメラを用いて植物全体をイメージングしたところ、アミロプラストを含有する内皮細胞が豊富な胚軸および葉柄に強いCa²⁺応答が認められた。以上の結果から、シロイヌナズナの地上部における重力感知は、アミロプラストの沈降による細胞膜上のCa²⁺透過性機械刺激受容チャネルの活性化と引き続くCa²⁺流入によって実現しているものと思われた。

M. Toyota, T. Furuichi, H. Tatsumi and M. Sokabe : Molecular mechanisms of gravity sensing in Arabidopsis seedlings

3P219

立体構造解析に向けたほ乳類 Exocyst 複合体の調製

○深井 周也¹、白川 龍太郎²、堀内 久徳²、大川 克也²、三尾 和弘³、丸山 雄介³、佐藤 主税³、瀧本 理¹ (¹ 東工大・院生命理工、² 京大・院医、³ 産総研・脳神経)

開口放出は、神経細胞での神経伝達物質の放出や免疫細胞での顆粒の放出、受容体やトランスポーターなどの細胞表面への呈示、さらには、細胞の形態変化に応じた膜の供給に関わる生命現象であり、積荷を載せた小胞が、細胞膜と融合することにより起きる。小胞と細胞膜との融合は、繫留因子と呼ばれるタンパク質複合体が、小胞膜と標的膜とを可逆的にゆるく繋ぎ留めた後、小胞膜上のSNAREタンパク質と標的膜上の別のSNAREタンパク質が複合体を形成し、小胞膜と標的膜が互いに引き寄せられることによって生じると考えられている。これら一連のタンパク質-タンパク質相互作用によって行われる膜融合反応は、各段階において、Rabファミリーを初めとする特定のsmall GTPaseとの相互作用によってGTP依存的に制御される。Exocyst複合体は、開口放出で働く繫留因子で、8つのサブユニットから構成される分子量約700 kDaのタンパク質複合体である。ほ乳類のExocystは、TC10, Ral, Rab11と相互作用する。TC10との相互作用は、脂肪細胞でのグルコーストランスポーターGlut4の細胞表面への呈示、Ralとの相互作用は、上皮細胞でのEGF受容体の細胞側底面への輸送やPC12細胞での顆粒放出に重要であることが示されている。われわれは、small GTPaseによる開口放出での膜融合制御機構の構造基盤を確立することを目的として、X線結晶構造解析あるいは低温電子顕微鏡によるExocyst複合体の立体構造決定を目指している。これまでにGST-RalAをbaitとするアフィニティークラムにより、ヒト血小板、ラット脳およびブタ脳からのExocyst複合体の精製方法を確立し、予備的ではあるが電子顕微鏡の負染色像を得たので、報告する。

S. Fukai, R. Shirakawa, H. Horiuchi, K. Mio, Y. Maruyama, C. Sato, O. Nureki : Preparation of the mammalian Exocyst complex for the three-dimensional structure determination

3P218

破骨細胞分化過程の情報伝達におけるosteopontinの関与

○鈴木 恵子¹、Sodek Jaro²、山田 庄司¹ (¹ 昭和大・歯・歯科薬理、² CIHR in Matrix Dynamics, Fac. of Dent., Univ. of Toronto)

骨吸収を担当する唯一の細胞である破骨細胞は単球・マクロファージ系の造血幹細胞から形成される。単核の前駆細胞が融合して多核の成熟破骨細胞になったのち、骨表面に接着して細胞直下にプロトンおよびプロテアーゼを分泌して骨を吸収する。この分化・活性化の過程では細胞移動・融合、ポドゾームおよびシーリングゾーン形成など細胞骨格再構築が活発に行われており、これらの反応は時空間的に厳密に制御されていると考えられる。そこで、骨髄細胞から誘導した破骨細胞を免疫蛍光染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、この過程に関与する分子の細胞内局在について検討した。その結果、前駆破骨細胞は多数の細胞突起を形成して移動・融合を繰り返すこと、融合過程にある細胞のみでosteopontinとβ3 integrinが共局在する(図)ことが示された。またこれらの部位では低分子量GTPaseであるRac, Cdc42およびそのリン酸化体の局在も観察された。さらにosteopontin遺伝子欠損マウスにおいては前駆破骨細胞の突起伸長や細胞融合が顕著に低下していることから、osteopontinが破骨細胞の細胞骨格再構築に大きく関わっていることが示唆された。

K.Suzuki, J.Sodek and S.Yamada : Critical Role of osteopontin in osteoclast differentiation and activation.

3P220

マスト細胞の刺激分泌連関における分泌顆粒輸送機構と分泌部位の構造的特徴

○平嶋 尚英、中西 守 (名市大院・薬)

マスト細胞はエクソサイトーシスによって炎症性メディエーターを分泌し、花粉症や喘息等の即時型アレルギーを引き起こす。炎症性メディエーターを含有する分泌顆粒は刺激後、形質膜との融合部位に輸送され、そこで内容物を分泌する。従って、分泌顆粒の輸送機構と形質膜上の分泌部位の構造はエクソサイトーシスの機構を明らかにする上で極めて重要な点であり、さらに両者には密接な関わりがあると考えられる。そこで本研究では、分泌顆粒の輸送機構と形質膜上の分泌部位の構造的特徴を調べ、両者の連携の可能性を追究することを目的とした。近年、分泌細胞内の分泌小胞の輸送においてRabの関与が示唆されている。そこでマスト細胞におけるRabの発現をRT-PCR及びウエスタンブロッティングにより調べた。その結果、すでに報告されているRab3のほか、Rab8、Rab10、Rab11、Rab27Aの発現が確認された。またRab27と結合してアクチン上の小胞輸送を担うMyosinVの発現も確認され、さらに免疫沈降法により両者がマスト細胞において相互作用していることが明らかとなった。一方、マスト細胞の形質膜には神経終末でみられるアクティブゾーンの様な特徴的な構造は見いだされていない。しかしながら、分泌顆粒と形質膜の融合装置であるSNARE蛋白質のラフトへの局在、コレステロール除去によるエクソサイトーシスの阻害など形質膜上の構造の関与が示唆されている。そこで、アクティブゾーン蛋白質であるMunc13のマスト細胞での発現を調べたところ、Munc13-1が発現していることが明らかとなった。さらにこれをラフト領域に強発現させるとエクソサイトーシスが增強されることが示された。これらのことから融合部位はラフト様の特徴をもつ構造である可能性が示唆された。この融合部位の特徴と分泌顆粒のそこまでの輸送機構にどのような連携が考えられるか議論する。

N. Hirashima and M. Nakanishi : Transport mechanism of secretory granules and structural characteristics of secretion site in stimulus-secretion coupling of mast cell