

(別紙様式1)

平成15年度東北大学21世紀COE特別研究奨励費 研究活動結果報告書

21世紀COE拠点リーダー

鈴木 厚人 殿

(ふりがな) 氏名	あきやま しんじ 秋山 信治	所 属	資格 (いずれかを囲む)
		物理学 専攻	COE フェロー (博士課程)
研究課題名	スフィンゴリエリン分解酵素によって細胞に誘導される小胞輸送機構の解明		
研究指導者	所 属 部 局	職 名	氏 名
	大学院 理学研究科	助教授	宮田 英威

## 研究活動結果の概要

研究計画調書に記載した研究目的及び実施計画に対し、その結果・実績について具体的に記載すること。

CHO-K1 細胞を水溶性の蛍光色素であるルシファーイエローを添加した培養液中で 3 分間培養し、洗浄した後にこれを蛍光顕微鏡法で観察することにより、エンドサイトーシスによって形成された小胞の動態の観察を行なった。しかし、この方法では、観察を開始するまでに洗浄後約 4 分を要してしまうため、この間に小胞の輸送が進行してしまい、注目しているアクチンフィラメントに依存した輸送系から微小管に依存した輸送系への移行過程を観察することが困難であった。そこで、前持ってサイトカラシン B を処理してアクチンフィラメントを脱重合させた細胞にルシファーイエローを取り込ませて観察を行なったところ、多くの小胞が微小管に依存した輸送系へ移行せずに、形質膜近傍に滞っている様子が確認された。さらに、サイトカラシン B を除去し再びアクチンフィラメントの重合を誘起させることで、これらの小胞の多くが急激に、かつ非常にダイナミックに運動を開始することが確認された。ところが、蛍光顕微鏡法による観察では、強い励起光を細胞に照射するために細胞内に活性酸素が生じ、数分間の観察時間内に輸送活動の停止、あるいは急激な細胞の収縮が起こってしまい、小胞運動の解析を行なうことが困難であった。

そこで我々は、活性酸素の除去作用のあるオキシラーゼを培養液に添加することでこの問題を克服し、小胞運動の解析を行なった。小胞の位置は得られた蛍光画像の輝度重心によって決定し、これを元に一分間の観察における各小胞の速度の最大値を計算した。その結果、サイトカラシン B 存在下における、形成直後の小胞の速度の最大値の平均は  $0.26 \mu\text{m/s}$  であったのに対し、サイトカラシン B 除去後すぐ(小胞の形成直後から 5 分後)の観察では、平均  $0.72 \mu\text{m/s}$  と非常に大きな値を持つことが確認された。一方、サイトカラシン B を除去せずに 5 分間培養した細胞では平均  $0.27 \mu\text{m/s}$  と、小胞の形成直後のものとほぼ同じ結果が得られた。過去の報告によると、アクチンに依存した小胞運動の速度はおよそ  $0.3 - 0.4 \mu\text{m/s}$  であり、微小管に依存した小胞運動の速度はおよそ  $1 \mu\text{m/s}$  であることが知られている。このため、サイトカラシン B 除去後に観察された小胞の速度は、微小管に依存した運動が支配的になっていることを反映していると考えられる。実際、ノコダゾールやコルヒチンによって微小管を破壊した細胞では、このような速い小胞運動は観察されなかった。これらの結果から、アクチンフィラメントの存在は、エンドサイトーシスによって形成された小胞を、微小管に依存した輸送系へ速やかに移行させるといふ、非常に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

今後の研究では、アクチンフィラメントに依存した輸送系から微小管に依存した輸送系への移行過程をより直接的に観察するために、エバネッセント波蛍光顕微鏡法によって、小胞とアクチンフィラメント、あるいは小胞と微小管とを同時に可視化することを計画している。実際、高い分解能の得られるこの方法により、小胞、アクチンフィラメント、微小管のそれぞれが十分観察可能であることは既に確認できている。エンドサイトーシスにおける、これらの輸送系の関係を明らかにすることは、小胞輸送を介して制御される情報伝達や、これに関連した細胞の形態形成・維持などの解明につながるため、非常に重要な研究であると考えられる。

研究発表

(学術雑誌に15年度中に発表または掲載決定したもの、  
および15年度中の学会等での本人の発表)

秋山 信治, Andreas Jeromin, John Roder, 宮田 英威

PC12細胞の底膜近傍に見られる $PIP_2$ が局在した小胞の動態

日本細胞生物学会, ピアザ淡海滋賀県立県民交流センター, 2003年

秋山 信治

エバネッセント波励起蛍光顕微鏡法による細胞骨格動態のリアルタイム観察

東北大学附属浅虫臨海実験所・東北大学大学院理学研究科生物物理研究室合同セミナー,  
東北大学理学総合棟, 2004年