

○ プロジェクト研究 0634-1

研究課題 「生体内での物質輸送・代謝過程に関する基盤研究」

サブテーマ 「高分子物質のエンドサイトーシスによる
細胞内取り込み・輸送過程の形態学的検討」

○研究リーダー 医科学センター 教授 馬場 健

○研究分担者 医科学センター 嘱託助手 古矢直己

○研究年度 平成18年度

(研究期間) 平成18年度～平成20年度(3年間)

1. 研究目的

環境の異なる内と外とを細胞膜で仕切ることにより、細胞は成り立っている。生命維持のためには、細胞膜を越えた物質のやり取りが必須であり、そのため生体は特別な輸送構造を細胞膜内に備えている。たとえば、トランスフェリンやLDLに代表される生命維持に必須な高分子物質はエンドサイトーシスにより能動的に細胞内に取り込まれている。このような生体内物質輸送機構の解明にむけて、本サブテーマでは急速凍結技法と形態学的手法を用いた検討を行うことを目的とする。

馬場らはこれまで脂質特異的プローブを用いて細胞膜脂質の2次元分布を解明してきたが、脂質そのもののエンドサイトーシスはこれまで十分には検討されていない。その大きな要因は、脂質が化学固定されにくく、詳細な形態学的検討を妨げてきたことがある。本プロジェクト研究では、積極的に凍結技法を用いて脂質分子の固定を目指し、より精密な形態学的検討により、これまで解明されていなかった取り込み過程の瞬間像とそれを支える細胞膜裏打ち構造の動的変化を解析できる可能性が高い。

平成18年度には、種々のタンパク質および脂質の細胞内取り込み過程を検討するためのプローブ試薬の作成と検討、および急速凍結固定の確立を目指し、来年度以降の本実験に向けた機器・設備の設定を行う。

2. 研究方法

平成18年度は以下の計画に従って研究を進めた。

1. コロイド金標識プローブの作成

- ①脂質特異的プローブとしてライセニンおよびコレラトキシンBフラグメントを、タンパク質取り込みマーカーとして抗トランスフェリン受容体抗体D65を用いる。
- ②それぞれのマーカーを5mMBoraxで透析する。
- ③直径10nmのコロイド金粒子はタンニン酸・クエン酸法で作成し、高速遠心により集めた。
- ④各マーカーとコロイド金を混合、結合させ、BSAにより非標識部分をブロックした。
- ⑤ショ糖密度勾配遠心法により、標識金粒子を洗浄・精製し、50%グリセリン溶液として冷凍保存した。
- ⑥金粒子の分散性と直径の均一性は、Formvar膜張りに溶液を吸着させ、透過型電子顕微鏡で観察することにより検定した。
- ⑦十分に均一で分散した金標識物のみを用いて以下の検討を行った。

2. プローブの反応性の確認と検討

- ①ヒトT細胞株Jurkat細胞を培養し、4℃で各種濃度の金標識プローブとインキュベートする。
- ②冷PBSで洗浄し、一定時間加温後急速凍結し、新規購入する液体窒素凍結保存容器に保存する。
- ③4酸化オスミウム含有アセトンで凍結置換し、型どおりエポン包埋試料を作成する。
- ④超薄切試料を作成し、透過型電子顕微鏡で観察・写真撮影を行う。

3. 研究結果

平成18年度は、おもに本学での研究環境の整備と試薬の作成・検討に費やしたため、新しい実験結果は少ないが、来年度以降の研究につながる以下の成果を得た。

- ①ライセニン、コレラトキシン、抗トランスフェリン抗体D65ともに、十分に均一でよく分散したコロイド金標識物を作成することができた。
- ②これらの金標識物を用いて、Jurkat細胞における免疫学的シナプスの形成過程を検討し、それぞれのプローブが特異的な局在を示していることを発見した。
- ③細胞を急速凍結するための液体窒素冷却イソペンタン・プロパン混合寒剤の作成装置を自作し、十分良好な細胞凍結ができることを、予備実験により確認した。
- ④凍結置換専用の-80℃フリーザーを確保し、それを用いて凍結置換固定が良好に行われることを確認した。

4. 考察（結論）

本年度で研究の実施に必要な試薬・機器の設定はほぼ完了した。来年度以降は実際に実験を行い、種々の検討課題を解明していく予定である。

5. 成果の発表（学会・論文等，予定を含む）

- 1) Fujii Y, Ohno N, Li Z, Terada N, Baba T, Ohno S. Morphological and histochemical analyses of living mouse livers by new 'cryobiopsy' technique. J Electron Microsc (Tokyo). 2006. 55:113-122.
- 2) Terada N, Ohno N, Fujii Y, Baba T, Ohno S. Dynamic study of intramembranous particles in human fresh erythrocytes using an "in vitro cryotechnique". Microsc Res Tech. 2006;69:291-295.
- 3) Terada N, Ohno N, Li Z, Fujii Y, Baba T, Ohno S. Application of in vivo cryotechnique to the examination of cells and tissues in living animal organs. Histol Histopathol. 2006;21:265-72.
- 4) 馬場 健、古矢直己. 免疫学的シナプス形成時における脂質ラフト動態の検討. 日本解剖学会関東支部第94回学術集会（神奈川）2006年10月.