

I A-9

時間分解顕微蛍光法による培養細胞中の
膜小胞の融合の研究村田昌之¹ 佐甲靖志¹ 辻 明彦² 楠見明弘³¹京大・理・生物物理 ²浜松ホトニクス・
研究部 ³東大・教養・基礎科学科

生きている細胞内に於て、膜小胞同士の融合を観測する方法を開発したので報告する。これには、前の講演で述べた時間分解顕微蛍光法を用いて、共鳴エネルギー移動 (RET) を測定する方法を用いた。培養細胞 (NIH/3T3) にRETのエネルギー供与体 (NBD-PEを含むリポソーム) をエンドサイトーシスによって取り込ませ、洗浄後、さらに受容体 (スプレジン、水溶性) を取り込ませた。蛍光顕微鏡下では、色素を内水相に含む多数の膜小胞が点状に見られた。細胞中の直径1.6 μm のスポットを選択し、なるべく単一の膜小胞について、供与体の蛍光減衰曲線を測定した。受容体を加えた細胞中では蛍光減衰がRETのために速くなっており、これは先に形成された供与体を含む小胞と、後に形成された受容体を含む小胞との融合によるものと考えられた。また、単一細胞内に於ても、RETの程度は個々の膜小胞により異なっていた。膜小胞の融合は、小胞内の酸性化を NH_4Cl によって阻害しても観察されたが、サイトカラシンDで細胞を処理すると見られなくなった。このように、生きている単一細胞中の特定の部位における膜融合を、ほぼリアルタイムで (測定時間<1分) 追跡できることが、本法の大きな利点である。

I A-10

TMPase活性を有する管状ライソゾームについて

小林俊博、岡田暉彦、
*西山正司、瀬口春道
(高知医大・第二解剖、
*耳鼻科)

我々はらせん靱帯の線維芽細胞において、 β -glycerophosphateを基質とし pH5.0で活性を示すacid phosphatase (ACPase) 活性陽性のライソゾーム以外に、pH3.9で活性を示すtrimetaphosphatase (TMPase) を有し、pinocytosisに關与する管状ライソゾームの存在について既に報告した。細胞内のライソゾーム構築を解明するためにはACPase活性と共にTMPase活性を利用する必要がある。モルモットの内耳蝸牛管上皮でACPase活性とTMPase活性の局在を比較検討した。ACPase活性検出にはRobinsonとKarnovskyのセリウム塩法を、TMPase活性検出にはDoty et alの鉛塩法その他、セリウム塩法 (20 mM acetic acid buffer、pH3.9、2 mM CeCl_3 、1mM trimetaphosphate、5% sucrose、0.00015% Triton X-100) を用いた。蝸牛管上皮においてACPase活性とTMPase活性はほぼ同様の局在を示したが、血管条辺縁細胞とコルチ器支持細胞の細胞質に散在する管状構造物、外ラセン溝上皮の根細胞の集積した管状構造物およびヘンゼン細胞基部形質膜直下に集積した球状構造物はTMPase活性を有するがACPase活性陰性であることが明らかになった。