

IIA-23

ケラチン、ニューロフィラメントとアクチンが構成する偽単極ニューロンのゴルジ装置周囲網工

岩月宏彦、須田満寿美

川崎医科大学 解剖学教室

【目的】発生初期の神経節の感覚ニューロンの一部でケラチンの発現が報告されている。ウサギ成獣の脊髄神経節でケラチンを検出した結果、一部の感覚ニューロンでケラチンが検出された。本研究では感覚ニューロンでのケラチンの局在と機能、およびケラチンと他の細胞骨格要素との関連を明らかにする。

【方法】成獣ウサギの脊髄神経節でケラチン-5、7、8、14、17、18、20、ニューロフィラメント-H、M、L、ビメンチン、ペリフェリン、 α チューブリンとアクチンをABC法により免疫組織化学的および免疫電顕的に検出した。細胞骨格要素の共存は蛍光免疫二重染色により確かめた。さらに、中間径フィラメントの局在を透過電顕で確認した。

【結果】脊髄神経節の約10%の感覚ニューロンでケラチン-8、ケラチン-14、ニューロフィラメント-M、ニューロフィラメント-Lとアクチンが $1 \times 1 \mu\text{m}$ のリング構造から $1 \times 4 \mu\text{m}$ の長楕円構造として検出された。免疫電顕法によりこの構造はゴルジ装置の周囲に形成された網工であることが確かめられた。さらに蛍光免疫二重染色により、ゴルジ装置周囲網工でのケラチン-8、ケラチン-14、ニューロフィラメント-M、ニューロフィラメント-Lとアクチンの共存が確認された。

【結論】ウサギ脊髄神経節の約10%の感覚ニューロンではケラチン-8とケラチン-14で構成されるケラチンフィラメント、ニューロフィラメント-Mとニューロフィラメント-Lで構成されるフィラメントとアクチンフィラメントが共同してゴルジ装置の周囲に網工を形成し、ゴルジ装置の支持と形態維持に働く。

IIA-24

急速凍結レプリカ法を用いた細胞膜ラフト分子の可視化

藤田 秋一、藤本 豊士

名古屋大学 大学院医学系研究科 機能構築医学専攻 細胞生物学分野

【目的】細胞膜は一様なものではなく、脂質の性質の違いによって形成されるラフトの存在が仮定され、種々の現象において機能ドメインとしての役割を担うことが示唆されている。多くの生化学的実験では、ラフトを構成する分子は非イオン性界面活性剤に難溶性の浮遊性膜画分と等価のものとして扱われてきた。一方、最近の生物物理学的手法による結果は上記の仮定に否定的である。また化学的に固定した後 EM で観察する方法では、ラフトを構成する脂質を生きた細胞の状態で維持できないという欠点がある。そこで我々は細胞を急速凍結し、レプリカを作製することで、物理的に脂質を固定し、*in situ*の脂質分布を超微形態レベルで観察する方法を試みた。【方法】金箔に培養した Mouse embryo fibroblast (MEF) 細胞を液体ヘリウムで冷却した銅ブロックに押し当て急速凍結した。 -95°C で細胞を切断した後、白金/炭素(Pt/C)を蒸着することによりレプリカを作製した。レプリカを 2.5% SDS 溶液で処置したのち標識に用いた。標識には抗 GM1 抗体(AbGM1)と biotin 化 cholera toxin B subunit (b-CtxB)を用い、金コロイド標識した二次抗体と streptavidin によって可視化した。【結果と考察】今回の切断条件では多くの場合、金箔側で細胞膜の外葉側(E面)が観察できた。標識に適する Pt/C 蒸着条件を検討したところ、通常用いられている条件 (Pt/C(2 nm)の後 C(20 nm)を蒸着)ではどのプローブでも標識はほとんどみられず、C(20 nm)の後に Pt/C(2 nm)を蒸着したレプリカで多くの標識が観察された。AbGM1 および GM1 に結合することが知られる b-CtxB による標識は細胞膜の E 面だけにみられ、P 面(細胞膜内葉)では全く観察できなかった。また $\beta 1,4\text{GalNAc}$ 転移酵素遺伝子欠損マウス由来 MEF 細胞のレプリカでは GM1 の標識はみられず、外来性に GM1 を付加すると GM1 の濃度に依存して AbGM1 および b-CtxB の標識が観察できた。このことからこれらの標識は GM1 に特異的であり、細胞膜の GM1 の量を反映していると言える。さらに GM1 標識の分布を Ripley の K 関数によって解析したところ、半径約 20-50 nm のクラスターを形成していることがわかった。methyl- β -cyclodextrin でコレステロールを抽出した細胞では標識がランダムな分布を示す場所が増加し、クラスターを示す部分が著しく減少した。これらの結果より、細胞膜の GM1 がコレステロール依存性のクラスターを形成していることが示された。