

PI-05

Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets

Jinglei Cheng, Akikazu Fujita, Yuki Ohsaki, Michitaka Suzuki,
Yuki Shinohara, Toyoshi Fujimoto

Department of Anatomy and Molecular Cell Biology, Nagoya
University Graduate School of Medicine

The lipid droplet (LD) is an organelle with a lipid ester core and a surface phospholipid monolayer. The mechanism of LD biogenesis is not well understood. The present study aimed to elucidate the LD growth process, for which we developed a new electron microscopic method that quantifies the proportion of existing and newly synthesized triglycerides in individual LDs. Our method takes advantage of the reactivity of unsaturated fatty acids and osmium tetroxide, which imparts LDs an electron density that reflects fatty acid composition. With this method, existing triglyceride-rich LDs in 3Y1 fibroblasts were observed to incorporate newly synthesized triglycerides at a highly uniform rate. This uniformity and its persistence even after microtubules were depolymerized suggest that triglycerides in fibroblasts are synthesized in the local vicinity of individual LDs and then incorporated. In contrast, LDs in 3T3-L1 adipocytes showed heterogeneity in the rate at which lipid esters were incorporated, indicating different mechanisms of LD growth in fibroblasts and adipocytes.

PI-06

細胞質封入体 stigmoid body とその周囲に観察される管腔状構造のオルガネラ起源

柳井 章江, 藤永 竜太郎, 國分 啓司, 篠田 晃
山口大学大学院医学系研究科機能神経解剖学

【目的】細胞質封入体 stigmoid body (STB) は、HAP1 (Huntingtin associated protein 1) が局在し、正常脳内に多数存在している。STB は、ハンチントン病や球脊髄性筋萎縮症を抑制する神経細胞保護作用を持ち、ユビキチンを含まない aggresome とは異なる構造であることが明らかとなってきた。これまでに我々は、電子顕微鏡解析により STB に近接する HAP1 免疫陽性の管腔状構造が認められることを示した。本研究では、STB と周囲に観察された管腔状構造のオルガネラ起源を明らかにする。

【材料と方法】HeLa 細胞及び成獣雄 wistar ラット内側視索前野の神経細胞を対象とした。各オルガネラマーカー蛋白質を用いた蛍光免疫細胞組織化学法によるスクリーニングを共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) により行い、免疫電顕法および電顕 in situ hybridization (ISH) 法による超微形態学的解析を行った。

【結果と考察】CLSM を用いた各オルガネラマーカーと HAP1 との蛍光二重染色によるスクリーニングの結果、用いたマーカーのうち STB 全体に局在するものは認められなかった。ER マーカーのうち、内腔に局在する KDEL 抗体は、STB と重ならなかったが、ER 膜蛋白質である calnexin、管腔状 ER 膜蛋白質の nogo-A においては、STB 外層の一部が HAP1 と重なっており、三次元立体構築像においても認められた。免疫電顕では、STB の外層に一部 calnexin や nogo-A の免疫陽性反応が見られ、特に calnexin では、STB 内部にも免疫陽性の直径約 60–70nm の管腔状構造が観察された。一方、電顕 ISH 法による HAP1-mRNA は、STB 外層の一部や ER の細胞質側に点在していた。

本研究では、STB 全体に局在するオルガネラマーカーは見いだせなかったが、STB 内部に見られる大型の管腔状構造、STB 外層や近接する管腔状構造は、ER 内腔蛋白質が脱落し、ER 膜蛋白質から成る管腔状小胞体起源であることが示唆された。