

受賞者

近藤 久雄

九州大学医学研究院分子生命科学系部門細胞工学

研究テーマ

細胞内小器官・小胞体の形成維持の分子機構

### 1. はじめに

小胞体は細胞内におけるタンパク質の生産並びに品質管理の拠点であり、細胞機能の根幹を司る細胞内小器官である。その形態は大変に特徴的で、小胞体は網状構造をとって細胞質全体に広がっている。この小胞体の網状構造は酵母から哺乳類まで幅広く見られることから、この複雑な構造はその機能と密接に結びついていると考えられる。我々は、この小胞体の特徴的な構造がどのように形成され、そしてその構造がどのようにその機能と結びついているのかという問題を明らかにするべく、p97ATPaseによる膜融合機構の発見・解明を通して現在まで研究を行ってきた。p97による膜融合は現在まで知られる唯一の小胞体における膜融合機構であるが、それを発見して実際にin vivoで世界に先駆けて示したのは我々である。

しかしながら、小胞体の形成・維持機構は依然として不明であり、その異常による病態生理的意義も明らかになっていない。小胞体の構造に関する研究が進まない大きな理由は、オルガネラの構造が小胞輸送による動的平衡状態で保たれており、二次的・三次的に様々な要因の影響を受けやすいということにある。従って、他のオルガネラや様々な要因の影響を除外するために、純粋に小胞体形成そのものを観察できるin vitro系を用いての解析が不可欠である。しかしながら現実的には試験管内における小胞体の再構成系の構築は大変に困難であり、本研究では我々独自の方法でその確立を試みた。

### 2. 方法

小胞体を生細胞で可視化する系を既に確立していたので、その生細胞をsemi-intact化する方法も考えられた。しかしながら、そのsemi-intact系では、系自体がcrudeであるため、詳細な解析が困難であると考えられた。そこで、カエル卵から調整した小胞体膜とHeLa培養細胞からの細胞質上清並びに各種精製因子を用いて、試験管内で小胞体特有の網状構造を形成することを試みた。形状過程を、リアルタイムで見たいという考えから、反応を二枚のカバーガラスで挟んだ狭い間隙で行っている。その間隙距離を決定するために、半導体製造に用いられるスペーサーを用いて、最適な間隙距離を決定できた。また、カバーガラス表面には、小胞体膜の分岐部のみが接着するような特殊なコーティングを見つけることが出来た。

### 3. 結果・考察

小胞体の網状構造を形成する分子機構を研究するために、我々は従来より小胞体を可視化できる細胞を用いて研究してきた。ただ、このin vivoでの方法には大きな制約があるので、本研究ではまず試験管内での再構成を試みた。細胞骨格の代わりにコーティングしたカバーガラス表面を支持体として小胞体の網状構造を形成させて、それを共焦点顕微鏡で観察・定量する方法を確立した。

この方法で小胞体の形成過程をリアルタイムで観察したところ、網状構造の形成は以下の三つの素

過程からなることが分かった。

- ① 小胞同士が融合して大きな球状膜となる。
- ② 大きな球状膜からチューブが形成。
- ③ チューブの両端が他のチューブと融合して網目の形成。

加えて、これらの素過程のそれぞれにおいて反応を停止させることにも成功したので、網状構造の形成過程を素過程に分けて解析することが可能になった。

また、このin vitro系を確立する過程で、Ca-カルモジュリンの重要性が明らかとなった。カルモジュリン阻害剤のW-7は上記の素過程②と③は阻害するものの、素過程①は阻害しない。これから、素過程①と素過程②③とは膜融合の過程そのものが異なることが示唆された。反対にカルシウムを過剰添加するとシート状の小胞体が形成されることから、素過程②と③においてCa-カルモジュリンが重要な働きをしていることが明らかとなった。

現在は、このin vitro系を用いて、小胞体の網状構造の形成に必要な因子の単離同定を行っている。