1B1500

大腸菌と細胞性粘菌を用いた強制的な共存において見られる新しい形質の創発 II-b

○東 陽一郎¹、等々力 政彦¹、川瀬 芳恵¹、前田 ミネ子²、ト 部 格¹、四方 哲也^{1,3} (¹ 阪大・院工・応生、² 阪大・院理・生物、³ さきがけ 21・東大・総合文化)

大腸菌と粘菌は捕食被食の関係にあるが、われわれは、粘菌とグルタミン要求性の大腸菌を最少固体培地上で共に培養することで、独特な粘性を持った共存コロニーが創発されることを発見した。このコロニーの中では、大腸菌と粘菌が分散して存在している。粘菌は大腸菌を餌としていていると考えられるが、粘菌の数が極端に増加する事無くコロニーが成長する。前回の学会において、コロニーの形成の過程について報告したが、今回はタイムラプスビデオや蛍光顕微鏡を用いてこの過程について観察したので報告する。大腸菌と細胞性粘菌を、大腸菌用の完全合成培地で培養すると、まず、大腸菌が増殖し、培地の表面を覆い尽くす。続いてそれを捕食し、細胞性粘菌が増殖してほとんど総ての大腸菌を食べ尽くす。その後、餌がなくなり粘菌も減少するが、やがて粘性を持った独特なコロニーが現れる。このコロニーの中には大腸菌と粘菌の両方が見られ、粘菌が大腸菌を食べ尽くす事無く共存し、コロニー自体が大きくなってゆく。粘菌には運動性があるが、その動きは極めてゆっくりしているため、リアルタイムでの観察では、その動きはほとんど分からない。現在、タイムラプスビデオを用い、コロニー形成に至るそれぞれの段階での粘菌の運動する様子や捕食の様子、共存状態になるコロニーの形成過程、コロニー中での粘菌と大腸菌の動態を観察している。

Y. AZUMA, M.TODORIKI, Y.KAWASE, M.MAEDA, I.URABE, T.YOMO : Emergence of a new phenotype through a forced coexistence of *Escherichia coli* and *Dictyostelium discoideum* II-b

1B1540

光ピンセットが *Escherichia coli* に与えるダメージの検討

○若本 祐一¹、井之上 一平²、大沼 清²、柏木 明子³、四方 哲也³、金子 邦彦¹、安田 賢二² (¹ 東大・教養、² 東大院・総合文化、³ 阪大院・工・応用生物)

[目的] 光ピンセットは特定の生物試料を任意にコントロールする強力な手段として近年盛んに用いられている。しかし、特に *in vivo* 観察系においては、捕獲に用いるレーザーが生物試料にダメージを与えたとの報告もあり [1]、光ピンセットの今後の応用を考える上で、直接トラップされた細胞の機能損傷と、レーザー強度、照射時間の関係を知ることは非常に重要である。今回我々は GFP 発現系を導入した大腸菌を光トラップして、細胞分裂過程と GFP タンパク質の発現効率の変化を観察した。これにより光トラップが大腸菌の機能(細胞分裂機能と GFP 発現)に与える影響を調べ、今後の応用のためのトラップの条件を検討した。

[方法] 光トラップの光源には Nd:YAG (1064nm) レーザーを用いた。損傷を検討するために照射光の強度 (3-150mW, *Obj.*)、照射時間を変えて捕獲し、大腸菌のその後の分裂能、GFP 発光量の変化を調べた。さらに、トラップに用いたレーザーの連続波をチョッパー技術によりパルス波にすることでダメージがどの程度変化するかも検討した。試料には、半減期 40 分の GFP(LVA)(CLONTECH 社) 遺伝子をもつプラスミドで形質転換した DH5 α 株を用いた。

[結果] 分裂を開始した大腸菌をレーザー強度 100mW (*Obj.*) の強さで光トラップしたところ、分裂が確認された。次に分裂前の大腸菌をレーザー強度 25mW (*Obj.*) の強さで光トラップし続けた。分裂は 2 時間経っても開始されなかったが、GFP 発現量の減少も観察されなかったため、少なくとも光トラップによる GFP 発現への影響はない可能性がある。更に分裂能に与える影響については本会にて発表する。

[1] K. Neuman, et al. *Biophys. J.*, **77**, 2856-2863, (1999)

Y. Wakamoto, I. Ippei, K. Ohnuma, A. Kashiwagi, T. Yomo, K. Kaneko and K. Yasuda : Studies on photodamage to *Escherichia coli* in optical traps

1B1520

顕微培養観察装置系を用いた一定栄養条件下での大腸菌分裂の個体レベル観察

○井之上 一平¹、若本 祐一²、大沼 清¹、柏木 明子³、四方 哲也^{1,3}、金子 邦彦¹、安田 賢二¹ (¹ 東大院・総合文化、² 東大・教養、³ 阪大院・工・応用生物)

[目的] 大腸菌の増殖速度の変化や定常期にいたる原因の究明を行っている。定常期にいたる原因として容器内栄養状態の変化が指摘されているが、他に化学的・物理的な個体レベルでの相互作用の影響も考えられる。そこで我々は栄養状態などの培養環境をコントロールでき、かつ個体レベルの観察も可能な顕微培養観察装置系を新たに開発し、細胞運動、細胞分裂の経時変化について計測した。

[実験装置・方法] 倒立蛍光顕微鏡 (Obj. $\times 60$) に小型培養チャンバを装着し、このチャンバ内の大腸菌の数、サイズ、運動能力などの経時変化を観察した。小型培養チャンバは、大腸菌培養部 (容量 25 μ l) と培養液循環部 (容量 1ml) からなり、これらは大腸菌を逃さずに培養液を交換するため MW14,000 の半透膜で仕切られている (液交換の効率は計算値では 1 秒程度)。サンプルには大腸菌 JM109 株を使用した。**[結果・考察]** (1) 培養チャンバの培養液交換能力の検討: 培養チャンバの膜を介して大腸菌に IPTG を加え GFP 蛋白質を発現させたところ、発現時間は直接 IPTG を大腸菌に加えたものと時間差 (分オーダー) は見られなかった。これより培養チャンバの膜透過能力は培養環境をコントロールするのに十分であると考えられる。

(2) 対数増殖期における大腸菌増加の実時間解析: 濃度 1×10^6 (匹/ml) からの大腸菌数の増加を 30 分毎に顕微観察、解析した。その結果、培養チャンバ栄養飽和条件下 (25 $^{\circ}$ C) での大腸菌分裂周期は約 35 分であった。これに対して従来のバッチ条件下での分裂周期は約 55 分であった。このことは環境の栄養が変化することで分裂の速度も遅くなることを示唆している。本会では、さらにこの装置系を用いた一細胞レベルでの経時観察の結果を中心に大腸菌が対数増殖期・定常期へと変化する過程について発表する。

I. Ippei, Y. Wakamoto, K. Ohnuma, A. Kashiwagi, T. Yomo, K. Kaneko and K. Yasuda : Observation of cell division and movility in microculture of a *Escherichia coli* using novel microchip-microscopy system.

1B1600

GRE モデルによる形態予測を用いたアメーバ運動異常の高感度検出法

○水野 敬文、吉岡 恭子、川崎 一則 (工技院・生命研)

ばらつきの非常に大きなアメーバ運動を分子の動態から理解するためには、アメーバ運動の異常を高感度に検出する方法の開発が必須である。Lee ら (Nature 362:169-171, 1993) は単純な形態と運動様式を持つ表皮細胞ケラトサイトの運動に伴う外形の変化を数学的に記述する GRE (Graded Radial Extension) モデルを提案した。これは細胞全体の形態・運動とアクチンの動態とを関連させて理解することのできる唯一のモデルである。私たちは、ヒト好中球仮足断片の輪郭上の微小な構造の軌跡の解析から、好中球でも GRE モデルが働いていることを見だし、GRE モデルがアメーバ運動一般に適用できる可能性を示した (Mizuno et al., Cell Motil. Cytoskeleton 35:289-297, 1996)。この GRE モデルを使うと、細胞各部の微小な構造の将来の位置を予測することができる。そこで私たちは、ケラトサイトの実際の運動に伴う形態変化を GRE モデルで予測される細胞の形態変化からの差異として定量化すれば、アメーバ運動の異常を高解像度で評価できるのではないかと考え、本研究を開始した。まず、細胞の輪郭線についてのみ GRE モデルで予測することを試みた。予測した輪郭線と実際の輪郭線との差異を定量化した結果、直進モードの細胞でも、重心をほぼ直進させたまま細胞体を左右交互にわずかに傾かせながら移動していることが明らかになった。そこで、この新たに見いだされた現象を “Wobbling” と呼ぶことにした。このように GRE モデルを利用した輪郭線予測の方法は細胞運動・細胞変形の異常を高感度で検出できる実際に有効な方法である。

T. Mizuno, K. Yoshioka and K. Kawasaki : High-resolution analysis of keratocyte motility using GRE model