1K1445

免疫細胞の原子間力顕微鏡による観察

○田口 修一、若山 信行 (桐蔭横浜大・工)

原子間力顕微鏡は、生理的条件、またはそれに限りなく近い条件で細胞を研究する装置の一つとしても広く期待され、未修飾の細胞表面を高分解能で観察する可能性がある。ところが、基板への固定が難しいことが細胞観察を難しくしている。本研究では遠心固定法1)が生理的条件下で高分解能で観察できる最も優れた方法であると考え、この遠心固定法を用いて免疫細胞の観察を行っている。免疫細胞の形態および性質の変化を原子間力顕微鏡で探ることが、免疫応答などの新しい研究方法となると考えている。まず初めに、EL4(マウス胸腺の白血病由来のT細胞系細胞)の観察を試した(下図)。さらに、ConcanavalinAなどにより活性化しその結果も報告する。1995年に Matsuoka らによって新しい細胞死についての論文が発表された2)。それは、体細胞にモノクローナル抗体を作用させたところ、これまでに知られている壊死やアポトーシスとは異なる細胞死がおこり、その細胞の走査型電子顕微鏡の画像では、細胞正面に直径1 μ m 程度の穴が空いているように見えることが記されている。この新しいタイプの細胞死についても観察し、その結果も報告する予定である。1) Hideki Iwamoto and Nobuyuki Wakayama Jpn.J.Appl.Phys.,36(1997)6B Part1,3872-3876 2) Shuji Matsuoka, et al. J.Exp.Med Volume 181 June 1995 2007-2015

10 μ m x 10 μ m

S.Taguchi,N.Wakayama : Observation of immunocyte by Atomic Force Microscope

1K1515

MAP キナーゼの核移行に及ぼす細胞骨格蛋白質の影響

○鬼澤 忍、古野 忠秀、平嶋 尚英、中西 守 (名市大・薬)

【目的】 MAP キナーゼは、細胞内シグナル伝達の中核を担うセリン/スレオニンキナーゼで、細胞増殖、細胞分化など多彩な系で中心的役割を果たしている。MAP キナーゼは通常は細胞質に存在しているが、細胞が活性化されると、細胞質から核内へ移行することが知られている。しかし、MAP キナーゼの核移行の分子機構については未だ明らかにされていない。そこで本研究では、細胞骨格蛋白質の重合阻害剤が MAP キナーゼの核移行に及ぼす影響を追究した。【方法】 細胞には YFP (Yellow Fluorescent Protein)-MAPK を恒常発現させたマスト細胞 (RBL-2H3) を用い、DNP-BSA で抗原刺激を行なった。カルシウムイオンの蛍光指示薬として Fura Red-AM を用いた。測定には共焦点レーザ顕微鏡を用いた。アルゴンイオンレーザ (488nm) で励起し、YFP の観察には 505nm~530nm の蛍光を、Fura Red-AM の観察には 585nm 以上の蛍光を検出した。微小管重合阻害剤としてノコダゾールを、アクチン重合阻害剤としてサイトカラシン D を用いた。【結果】 YFP-MAPK を恒常発現したマスト細胞を抗原刺激すると、刺激直後に細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、それに引き続き、刺激後 10 分以内に MAP キナーゼの一過的な核移行が観察された。ノコダゾール処理した細胞では抗原刺激後、未処理の細胞と同様に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と MAP キナーゼの核移行が起こった。一方、サイトカラシン D 処理した細胞では、カルシウムイオン濃度は上昇したものの MAP キナーゼの核移行が著しく抑制された。このことから、抗原刺激に伴う MAP キナーゼの核移行にアクチンが関与していると推察された。

S.Onizawa,T.Furuno,N.Hirashima,M.Nakanishi : Effects of cytoskeletal proteins on the nuclear translocation of MAP kinase in mast cells

1K1500

マスト細胞 (RBL) のカルシウムシグナル応答へのサブスタンス P の影響

○古川 陽子¹、古野 忠秀¹、手島 玲子²、中西 守¹ (¹名市大・薬、²国立衛研)

【目的】 アレルギー担当細胞であるマスト細胞は結合組織型と粘膜型の2種類に大別され、周囲の環境によって両者の性質が相互に変化すると言われている。しかし、マスト細胞の性質を変化させる因子についてはまだほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、このような因子として神経ペプチドであるサブスタンス P に着目し、この物質が粘膜型マスト細胞の性質を持つ RBL 細胞 (ラット好塩基球白血病細胞) のカルシウムシグナル応答に及ぼす影響について追究した。【実験】 RBL 細胞をサブスタンス P (0.5 μ M) 含有培地で培養した。カルシウム指示薬として fura-2 AM を用い、コンパウンド 48/80 刺激した際の細胞内カルシウムイオン濃度変化を Argus/HiSCA で単一細胞について測定した。【結果】 結合組織型マスト細胞にカルシウムシグナルを誘導することが知られているコンパウンド 48/80 で通常培養の RBL 細胞を刺激した場合、細胞内カルシウムイオン濃度変化を示す細胞はほとんど見られなかった (約 5%)。しかし、サブスタンス P 含有培地で培養すると、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する細胞応答の割合が増大し、5~7 日目では 4~5 倍に達した。カルシウムシグナル応答を獲得した RBL 細胞は、顆粒内蛋白質である β -ヘキソサミニダーゼの放出に関しては通常の RBL 細胞とほとんど変わらなかった。そこで、顆粒膜と細胞膜に存在する膜蛋白質 CD63 と GFP の融合蛋白質を用いて、カルシウムシグナル応答性を獲得した細胞の ruffling による形態変化を追究し、応答性を獲得した RBL 細胞の特質を明らかにした結果を報告する。

Y.Furukawa, T.Furuno, R.Teshima, M.Nakanishi : Effects of substance P on the calcium signal in mast (RBL) cells

1K1530

シグナル伝達における GPI アンカー型膜タンパク質 CD59 のラフトへの出入り

○鈴木 健一¹、実松 史幸²、藤原 敬宏¹、楠見 明弘^{1,2} (¹EARTO・JST、²名大・院理)

細胞膜上の情報伝達のプラットフォームとして、ラフトに注目が集まっている。しかしラフトの実態 (構造、安定性、機能) はほとんど分かっていない。状況証拠は、ラフトは GPI アンカー型タンパク質、スフィンゴ糖脂質、コレステロールを多く含んでいることを示唆している。本研究では GPI アンカー型膜タンパク質の CD59 (補体制御タンパク質) の細胞膜上での拡散運動を 1 分子レベルで時間分解能 25us で追跡し、ラフトとバルクの膜部分間の出入りと信号伝達との関連を検討した。CD59 はバルク膜部分では 122nm のコンパートメント間を平均 8 ミリ秒に一度ホップする拡散運動をしていた。信号入力時 (抗体によるクロスリンク、またはリガンド刺激時) には、これに加えて、直径約 90nm の膜領域に 1 分間に 17 回程度、1 回あたり 0.7 秒位、一時的に停留するようになった。ラフトに入らない脂質分子の DOPE をクロスリンクしてもこのような停留は見られない。また、膜中コレステロールを減少させる操作によって停留と下流 Ca^{2+} 信号は劇的に減少した。これらは停留領域がラフトであること、ラフトが CD59 の信号伝達に重要であることを示唆する。さらにアクチン線維の部分的脱重合を誘導する処理によって停留はほとんどなくなること、停留領域での CD59 は 5.9pN/um のバネ定数をもつ調和型ポテンシャルで捕捉されていることがわかった。これらは CD59 またはラフト自体がアクチン骨格による制御を受けていることを示している。

K.Suzuki, F.Sanematsu, T.Fujiwara and A.Kusumi : Frequent visits of a GPI-anchored protein CD59 on rafts during signaling events