1H1650

オンチップ細胞長期培養観察系による細胞動態のタイムラプス計測

○金子 智行、服部 明弘、高橋 一憲、井之上 一平、山野 泰子、森口 裕之、杉尾 嘉宏、若本 祐一、小島 健介、梅原 千慶、松村 和典、綾野 賢、安田 賢二（東大院・総合文化）

生物が生きていくうえで個体間のコミュニケーションは重要な役割を果たしている。細胞においても、多細胞生物では細胞増殖因子などの細胞外情報伝達因子や細胞間接着因子などによって細胞間でコミュニケーションをとっていることが知られている。最近では大腸菌などの単細胞生物においても細胞間コミュニケーションがあり生存戦略を持った社会構造の存在が示唆されており、コミュニティ・エフェクトと分化の問題が注目されている。

我々は微細加工技術によって作成したマイクロチップ上で細胞数や細胞間コミュニケーション、異種細胞同士の相互作用を制御しながら培養することにより、孤立化した一細胞の動態や特定の形状に配列した細胞集団の動態を顕微鏡下で長期連続観察している。

本会では実際に我々が行っているオンチップ細胞長期培養観察系を用いた研究の幾つかを紹介する。1. 分化をしない最もシンプルなモデル細胞として大腸菌を用いて、一定環境下における特定の一細胞の成長・分裂を世代間で比較した。2. 栄養条件を変えた時の大腸菌の形状・分裂周期の変化を一細胞レベルで継代観察し、細胞集団で起きている細胞長の変化が実際に一細胞レベルでどのように起きているかを明らかにした。3. 細胞株を用いた実験では神経系クローン細胞であるPC12細胞をアガロースマイクロチャンパー内で分化誘導し、神経様突起が分岐した迷路状のトンネルの中で試行錯誤しながら経路を選択し他の細胞とネットワークを形成する過程を可視化することを可能にした。4. 初代培養を用いた系では、神経細胞を微小電極アレイ上に特定のネットワークパターンを形成させて活動電位の測定を試みた。さらに5. 一次的に配列させた心筋細胞の拍動周期の計測や、6. ラット胚性幹細胞の分化誘導パターンを一細胞で観察した。

T. Kaneko, A. Hattori, K. Takahashi, I. Inoue, Y. Yamano, H. Moriguchi, Y. Sugio, Y. Wakamoto, K. Kojima, S. Umehara, K. Matsumura, S. Ayano and K. Yasuda : Time-lapse observation of cell dynamics using on-chip cell-cultivation system

1I0900

常温菌由来 RRF と好熱菌由来 RRF の α ヘリックスバンドルの熱安定性

○大島 淳¹、内山 進²、河地 正子¹、中野 博明²、吉田 卓也¹、大久保 忠恭¹、小林 祐次¹（¹ 阪大院・薬、² 阪大院・工）

タンパク質生合成の最終段階において、リボソームを再利用するのに不可欠なタンパク質であるリボソーム再生因子（RRF）は、3本の α ヘリックスからなるドメインIと主に β シートからなるドメインIIの2つのドメインからなっている。昨年度の本年会で、キメラタンパク質を用いた研究からRRFのドメインIとドメインIIは細菌の種類に関わらずそれぞれ独立した熱安定性を持っていることを報告した。今回我々は、タンパク質の構造モチーフのひとつである α ヘリックスバンドルの熱安定性の機構を解明するために、RRFのドメインIをモデルとして研究を行った。今回の実験では常温菌 RRF として *E. coli* RRF (EcRRF) を、また超高度好熱菌 RRF として *T. maritima* RRF (TmRRF) を使用し、両者のドメインIを用いその熱安定化要因の違いを明らかにすることを試みた。解析を容易に行うために、両者のドメインIに対応する領域の遺伝子をそれぞれ構築し、大腸菌を用いた大量発現系により試料を調整した。EcRRFのドメインI (EcD-I) とTmRRFのドメインI (TmD-I) について、CDにより二次構造の違いを比較し、野生型とほとんど同じヘリックス含量であることがわかった。また、示差走査熱量計 (DSC) を用い熱測定も行った。熱測定の結果からEcD-I、TmD-Iともその野生型以上の熱安定性を持っていることがわかった。更に野生型の熱変性は中間状態が存在する三状態変性であったが、ドメインIの熱変性は二状態変性であることがわかった。本年会では、EcD-I と TmD-I の熱測定の結果から得られる熱力学量と立体構造に関する知見とを合わせ、超好熱菌がどの様にしてヘリックスバンドルの熱安定性を大きく上昇させているかを報告する。

A. Ohshima, S. Uchiyama, M. Kawachi, H. Nakano, T. Yoshida, T. Ohkubo and Y. Kobayashi : Thermal stability of helix bundle of RRFs from mesophilic and thermophilic bacterium.

1H1710

細胞表面の受容体密度依存的に起こるシグナルの細胞内伝播

○沢野一阪上 朝子^{1,2}、Takayama Shuichi³、松田 道行⁴、宮脇 敦史¹（¹ 理研・脳セ・細胞機能探索技術開発チーム、² (財) 脳科学ライフテクノロジー研究所・脳科学研究部、³ Dep. of Biomedical Engineering, Univ. of Michigan、⁴ 阪大・微研・腫瘍ウイルス研究部）

細胞膜上にある受容体によって受け止められる外界からの刺激は、種々のタンパク質の相互作用を経て、特定のシグナルを発生し、時間的・空間的に特徴的なパターンを伴って細胞内に伝わり、細胞の増殖や分化の発現に関与する。しかしながら、局所刺激を受けた細胞の中でシグナルがどのように伝播していくかは、細胞や実験手法の種類によって結論が分かれるところであった。そこで我々は、増殖にかかわる細胞内シグナル伝達をセンシングする2種類の蛍光指示薬 (Raichu-Ras, Picchu-X) と、細胞に局所的に刺激を与える手段として層流を用いることによって、刺激を受け止めた受容体からのシグナルが、時空間的に細胞内でどのように拡がるのかを解析した。その結果、細胞膜上の受容体の密度、および活性化された受容体を取り込んで刺激をクリアする能力が、“シグナルが刺激部位に留まるか細胞全体に拡がるか”を決める重要な要素となっていることが分かった。増殖にかかわるシグナル伝播のメカニズムは、発生段階の形態形成や、細胞のがん化などの生物現象を議論する際に不可欠な知見であると思われる。

登録された画像は規定の大きさに投稿されなかったため表示できません。（予稿編集集部）

A. Sawano-Sakaue, S. Takayama, M. Matsuda, A. Miyawaki : Lateral Propagation of EGF Signaling after Local Stimulation Is Dependent on Receptor Density

1I0915

不溶性グルカン合成酵素 (GTF-I) におけるドメイン間相互作用の熱力学的解析

○稲積 広平¹、児玉 孝雄²、小松 英幸²（¹ 九工大院・情報科学・生化、² 九工大・情報工・生化）

GTF-IはN端の触媒ドメイン (GSd, 110kDa) とC端のデキストラン結合ドメイン (DXBd, 58kDa) から構成されており、両ドメインの機能的役割により、スクロースのグルコース残基をデキストラン鎖上に α -1,3分岐として高い効率で転移する。本研究では、GTF-IのN端85残基を欠損したGS-DXB, GSdをC端にDXBdをN端に入れ替えたDXB-GS, GSdが単独で発現したGSの3種類について、酵素活性及びDSCによる熱変性に伴う熱容量変化を測定した。その結果、GS-DXBとDXB-GSのスクロース分解活性及びデキストラン結合能には差がなく、デキストランへのグルコース転移活性はGS-DXBがDXB-GSより3倍高い値を示した。また、DXB-GSのDSCは2つのピークを示し、高温側のピーク位置とその大きさはGSとよく一致した。一方、GS-DXBはやや低温に単一ピークを示した。また、 ΔH はGS-DXBとDXB-GSで同じ値を示した。以上の結果、DXB-GSはドメインの独立性が高く、一方、GS-DXBではドメイン間の相互作用が強く、変性の協同性は高いが、それが分子全体の熱安定性には寄与していないと考えられる。

K. Inazumi, T. Kodama : Thermodynamic analysis of the interaction between domains in glucosyltransferase (GTF-I)