1N1000

走化性刺激による受容体アフィニティーの変調：1分子可視化解析

○上田 昌宏¹、松岡 里実²、宮永 之寛²、柳田 敏雄²（¹ 科技振・さがけ、² 阪大院・生命機能）

細胞性粘菌DictyosteliumはcAMPに対して走化性を示し、そのセンサーとして三量体G蛋白質共役型受容体（GPCR）がはたらいている。我々はこれまで、cAMPと受容体の結合・解離反応を生きた細胞上で1分子イメージングし、誘引物質濃度勾配の認識過程における受容体1つ1つの振舞いを調べてきた。その結果、受容体の結合・解離反応が細胞上の場所によって異なり、濃度勾配の方向に沿ってその活性が調節されていることが分かってきた[Ueda et al., (2001)]。これは、細胞が走化性を定常的に行なっているとき、すなわち細胞の運動方向がすでに決まっているときに顕著に観察される。しかしながら、誘引物質の濃度勾配を与えた直後など、細胞の運動方向が次第に決まていく過程での受容体の反応状態を捉えることはできていない。そこで、走化性刺激を与えた直後のcAMP受容体の反応状態を調べた。ケージドcAMPを用いて細胞に応答を引き起こし、その応答過程での蛍光cAMPと受容体の結合・解離反応を1分子イメージングした。ケージドcAMPの光分解により未標識のcAMPを急激に上昇させると、その約5秒後に、蛍光cAMPの結合数が一過性に増加した。受容体のアフィニティーが一時的に高くなると考えられる。この結果は、細胞にいったん誘引物質が結合しはじめると、その領域で誘引物質の結合をさらに増幅するようなフィードバック機構があることを示唆する。受容体のアフィニティーを時間的空間的に変調することによって、誘引物質の濃度差を増幅して受容する可能性について議論する。

M. Ueda, S. Matsuoka, Y. Miyanaaga and T. Yanagida : Affinity modulation of chemoattractant receptors by chemotactic stimulation

1N1030

ケラトサイトの形態と運動に及ぼすスタウロスポリンの効果

○水野 敬文、孫 怡、関 尚子、川崎 一則、吉岡 恭子（産総研・分子細胞工学）

魚類や両生類の表皮のケラトサイトは、半円形の大きな仮足を肩状に広げ、細胞全体の形態や大きさを変化させずに、基質の上を滑るように移動することができる。これはLeeらのGRE（Graded Radial Extension）モデルで説明できる。つまり、細胞の前半部で「勾配を持った放射状の拡張」が起こると同時に、細胞後半部で「勾配を持った放射状の収縮」が起こるからである。

われわれは金魚のケラトサイトの収縮性を抑制するために、比較的低濃度のスタウロスポリン（10-25 nM）でケラトサイトを処理したところ、仮足の横幅が少しずつ長くなる現象を見出した。例えば、ある細胞では10分間で仮足の横幅が約2倍になった。運動にともなう細胞形態変化を解析したところ、この横幅の増加と細胞の移動とは相関があった。これはGREモデルにおいて、細胞前半部で起こる「勾配を持った放射状の拡張」から「勾配」が消失したことに相当する。

それに対して、仮足の長さ（前後方向）はほとんど変化しなかった。細胞後半部の「勾配を持った放射状の収縮」は、能動的な収縮というよりはむしろ受動的なものである可能性を示唆する。

ところで、ケラトサイトでは仮足の後端、細胞体との境界付近に、アクチンフィラメントが左右方向に並んで蓄積し、移動方向とは直角の左右方向内側へ大きな牽引力を発生していることが知られている。なぜ移動方向とは直角の左右方向に大きな牽引力を発生しなければならないのか、これまでは明らかでなかったが、われわれの結果は、ケラトサイトの細胞の大きさと形態が一定に保たれるのは、この左右方向への牽引力に依存していることを示唆する。

T.Mizuno, Y.Sun, T.Seki, K.Kawasaki and K.Yoshioka : Effect of staurosporine on moving keratocytes

1N1015

細胞性粘菌移動体の走光性 ― 多細胞体の移動運動と環境応答 ―

○三浦 耕太^{1,2,3}、Siegert Florian²（¹ 阪大院・理・生物、² ミュンヘン大・動物・細胞発生、³ EMBL ハイデルベルク ドイツ）

細胞性粘菌*D. discoideum*の多細胞期は細胞の集合に始まり、マウンドの形成、移動体の移動運動を経て、子実体を形成する。この過程を通じて、cAMPを用いた細胞間シグナリングが多細胞の運動を協調させている。移動体の形は細長い砲弾状である。移動体内を前端から後端に向かって伝播する周期的な細胞外cAMP波に対する細胞の走化性応答によって、10万にのぼる数の細胞が協調して三次元的に運動する。その結果、移動体は移動する。移動体は光にむかって移動する走光性応答を示す。我々は、光照射により移動体がcAMPを放出することを発見した。さらに方向転換する際の移動体の形態変化と、その内部の細胞の動きを詳細に解析した。側面に光があたると移動体前部部の屈曲が起こり、方向転換をする。この屈曲の際に、一部の細胞が光照射側面から反対側の側面へと移動することを明らかにした。細胞の移動が非照射面の体積を増やし、屈曲がてこのように生じるといふ仮説を立てた。以上の結果から、光誘導cAMPが移動体内のcAMP波と干渉し、細胞の運動方向を変えることで移動体が光にむかって方向転換すると結論

した。移動体・細胞の動きを3次的に解析するため、光学流動検出法による運動の解析技術を目下開発している。

K. Miura & F. Siegert : Phototaxis of *Dictyostelium discoideum* Slugs - Migration and Environmental Reaction of Multicellular Organism -

1N1045

細胞性粘菌キメラ集合体の蛍光観察

○吉岡 恭子、孫 怡、水野 敬文（（独）産業技術総合研究所）

細胞性粘菌は飢餓状態に陥ると、それまで単独で栄養増殖していた細胞は運動性を増し集合体を形成する。この集合体は一連の形態変化を経て、約24時間かけて胞子を持つ子実体となる。この細胞性粘菌の発生過程における形態形成は、細胞の胞子細胞あるいは柄細胞への分化と、それぞれの細胞の集合体中での決められた位置への移動が複雑に組み合わせることで達成されることが知られている。また、細胞運動および集合体の形態形成には、細胞骨格が重要な役割を果たしていることは明らかである。我々は、あるアクチンの変異体（細胞性粘菌とテトラヒメナのキメラアクチン）を発現する粘菌細胞で、細胞運動および発生が異常であるものを発見した。その変異株は、集合期での運動速度が野生株にくらべ著しく低下し、集合体の発生は、マウンド形成期で停止し最終的に胞子形成できないものであった。この変異株と野生株とを混合して形成された集合体（キメラ集合体）は、混合比に応じて胞子のうの位置や形態、成熟した胞子の割合が異なっていた。また、成熟した胞子はすべて野生株由来のものであった。今回、我々はキメラ集合体の中での個々の細胞の位置や運動の様子を観察する目的で、CMFDA（5-chloromethylfluorescein diacetate）により細胞の一部を蛍光染色し、混合発生させた。集合体の観察は、共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss LSM410）を用いた。キメラアクチンを発現する変異株細胞は、形成されるマウンドの周辺、移動体の後部、子実体の基部に多く存在し、胞子のうにはほとんど含まれないこと、一方、野生株の細胞は集合体中に均一に存在することがわかった。今後は、ストリーム中や集合体中での細胞の運動速度や形態、運動の軌跡などの運動の詳細も調べ野生株と比較する予定である。

K. Yoshioka, Y. Sun and T. Mizuno : Observation of developmental morphogenesis of chimeric aggregates of *Dictyostelium discoideum*