B361

オンチップ1細胞長期培養系用のマイクロバルブ付きPDMSマイクロチャンバーの開発

○折田 一樹¹、高橋 一憲²、松村 和典²、安田 賢二² (¹ 東大・教養、² 東大院・総合文化)

[目的] 細胞の適応過程は生物が生存し続けるために最も重要で必須な過程の一つであるが、これを理解するためには、着目した細胞を長期間観察する必要がある。しかし従来の集団培養から得られる平均化した情報では、適応が1世代内で起きているか世代を経て起きているか、また、適応の過程に細胞間のコミュニケーションが存在するか否か、を判断するのは困難である。そこで本研究室で開発された1細胞培養系を改造し、高い泳動能を持つ単細胞緑藻類クラミドモナス野生株の適応過程を観察することが可能な、細胞の通過を顕微鏡下で完全に制御できるような可動性のバルブをもつ新規の1細胞培養マイクロチャンバーを開発した。これを用いて、環境を制御しながら、クラミドモナス1個体を長期間培養し、成長・運動・分裂を指標とした適応過程の解析を行った。

[実験方法] マイクロチャンバーは、フォトリソグラフィーを用いて作成した鋳型に、高分子樹脂であるポリジメチルシロキサン (PDMS) 溶液を塗布し加熱・固化させ、これをはがしガラス板に接着させて作成した。マイクロバルブは流路と空気のリザーバーを設けることで実現した。リザーバーに圧力を加えると流路が狭まり、逆に陰圧にすると流路は広がった。この動きは構造が平面に収まっている為、顕微鏡下で見ることができ、2つのバルブ間に観察領域を設け、リザーバーの圧力調節と培地の灌流を組み合わせることで、細胞を孤立させ、分裂後には不要な細胞を除去する事ができる。

[結果] 遊泳するクラミドモナス1細胞をマイクロチャンバーに閉じ込めることに成功した。培養系の詳細と細胞の断面積・位置・分裂の連続的観測の結果および考察については、本年会にて発表する。

K.Orita, K.takahashi, K.Matsumura and K.Yasuda : Development of the PDMS micro-chamber with micro-valve for single-cell long-term cultivation system

B363

ナノ粒子-タンパク質分子複合体の動的挙動

○佐々木 裕次^{1,2}、奥村 泰章^{1,2,3}、大石 昇^{2,4} (¹SPRING-8/JASRI 生物医学G、²JST/CREST 佐々木チーム、³ 信州大学大学院(工)、⁴ 帝京大学医学部生物工学研究センター)

X線1分子計測法(Diffracted X-ray Tracking :DXT)は、1分子内の構造変化及び分子内揺らぎを実時間で、かつ～pm (1/1000nm) の精度で計測することができる。直径数十nm程度のナノ結晶をタンパク質分子にその機能を損なわないように特定の部位に標識し、そのナノ結晶からのラウエ斑点を指標に、着目したタンパク質分子の動きを時分割トレースする。DXTにおいて、検出しているのは1分子内の計測したい部位に標識された1つのナノ結晶の運動である。従って、検出された運動がナノ結晶自身の運動なのか、被標識体の運動なのかの評価をしなければならない。DXTの研究の過程において、ナノ結晶とタンパク質分子の相互作用を取り扱うことになるのは必須である。取り扱ったのは、アクチン繊維(F-アクチン)と金ナノ結晶との動的相互作用。両者の結合部位は、G-アクチンのC末端付近にある反応システイン残基に反応するHg化合物(PCMB)を用いて1-2箇所に制御できる。また、水溶液条件(Ca系とMg系)を変化させることで、上記実験の再現性、信頼性を向上させた。アクチン繊維-金ナノ結晶系の一連の実験結果から、ナノ結晶をG-アクチンと同様に考えて、F-アクチンの一部をナノ粒子(結晶)に置換しても、F-アクチンの動的挙動は変化しないという結論が導かれた。一見意外な組み合わせであるが、最近のナノ粒子研究の多様化を考えると意外とナノ物質系とタンパク質分子の複合材料系は、非常に面白い物質特性を示すかもしれない。以上の実験は、大型放射光施設SPRING-8(BL-44B2)で行なった。検出器は、X線イメージンテンシファイヤーを使用し、数ミリ秒の積算時間で1秒間(ビデオレート)の連続計測を行った。測定温度は5度に設定してすべての実験を行った。

Y.C.Sasaki, Y.Okumura and N. Ohishi : Dynamical Behaviors of Nanoparticles-Protein Complex

B362

成長・運動同時計測による栄養条件変化への大腸菌一細胞順応ダイナミクス観察

○梅原 千慶¹、若本 祐一¹、服部 明弘^{1,2}、井之上 一平¹、安田 賢二¹ (¹ 東大院・総合文化、² シグマ光機)

【目的】我々は、細胞の後天的情報の獲得と伝承のメカニズムの解明を目指している。本研究はその第一歩として、大腸菌をモデルとして一細胞レベルの順応機構を理解することを目的とする。環境情報に対する細胞集団の順応現象が、一細胞レベルでどのように表れてくるのかを調べることで、集団中の個々の細胞が後天的に性質を変えて子孫に伝承していく可能性を探ることができるからである。そのためには、細胞集団ではなく孤立一細胞について長期連続培養を行い、環境変化に対する大腸菌一細胞の応答ダイナミクスを観察する必要がある。

【方法】我々はこれまでに、環境情報としての栄養条件変化が大腸菌一細胞の成長・分裂に与える影響を、「オンチップー細胞培養システム」を用いて調べてきた^[1]。今回は、細胞成長に加えて細胞運動を同時に計測できるよう装置系を改良し^[2]、栄養条件変化を与えたときの影響を運動という指標を加えてダイナミクス計測を行った。

【結果】栄養条件変化を加えると、成長・分裂とは異なり、運動の応答には時間差が見られた。無栄養条件で成長・分裂が分オーダーで停止した後も、運動は継続し、運動の停止までに時間～日のオーダーを要した。その後、運動を停止した細胞に再び栄養を与えると、運動が回復しないうちに成長・分裂の再開が起こり、数回の分裂を経た後に初めて運動を再開するものが現れた。本会では、成長・運動同時計測系のポテンシャルを示すとともに、無栄養経験が細胞運動に関して刷り込む“世代間を伝承する情報”の可能性まで議論したい。

[1] Umehara *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**(3): 534-540 (2003).

[2] Umehara *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* (2003) in press.

S. Umehara, Y. Wakamoto, A. Hattori, I. Inoue and K. Yasuda : Adaptation dynamics of a single *Escherichia coli* cell visualized by the simultaneous measurement of growth and motility

B364

遺伝子発現用赤外レーザ顕微鏡の開発

○亀井 保博¹、渡邊 建二郎²、船津 高志²、田口 隆久¹、弓場 俊輔¹ (¹ 産総研・人間系・ニューロニクス、² 早大・理工・物理)

顕微鏡下における局所領域で熱ショックプロモーターを用いて遺伝子を発現すれば、限局した細胞における遺伝子の機能を解析することができる。従来は熱ショックプロモーターを駆動する細胞ストレスとして可視光レーザによる光毒性などを用いていた。我々は細胞への光毒性を低下させるため、また、様々な組織の細胞での適用を考えて、水の変角振動数に近い1480nmの赤外光を用いて非侵襲的に細胞を加熱する顕微鏡システムを開発してきた。このシステムでは試料を熱ショックに適した温度に加熱することが重要であるが、赤外レーザの照射による集光部の温度が測定不能であった。そこで、蛍光物質の蛍光強度が温度依存的に変化する性質を用いて、レーザ照射部の温度変化を三次元的に計測する実験系を構築した。具体的方法は以下のとおりである。

温度が上昇するとその蛍光強度が低下する性質を持つ蛍光物質として、緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いた。まず、GFPを発現させた大腸菌をゲル中に固定化し、その温度を上下させて蛍光強度変化と温度との関係をあらかじめ測定しておく。次に、今回構築した赤外レーザ照射・共焦点顕微鏡を用いて、赤外レーザ照射にともなうGFPの蛍光強度変化を三次元的に測定し、レーザ焦点周辺部の温度変化を三次元的に解析した。その結果、z軸方向も含め、10マイクロメートル径程度の局所領域を熱ショックに必要な至適温度に加熱できることが判った。以上により、試料温度をモニタリングしながら確実に熱ショックを加えることができる赤外レーザ顕微鏡システムの完成も目前となった。

Y.Kamei, K.Watanabe, T.Funatsu, T.Taguchi and S.Yuba : Development of IR Laser microscope system for gene expression