B557

一定環境下における大腸菌表現型の1細胞世代間比較計測

○若本 祐一、梅原 千慶、井之上 一平、安田 賢二（東大院・総合分化）

遺伝情報の同じ細胞を同一環境内に置いたとしても、その振舞いや表現型は細胞間で異なる。このことは、同じ遺伝子を持つ細胞間でも表現には冗長性が許されることを示しているが、では、環境条件を一定に定めたとき、遺伝情報によって細胞の表現型はどの程度一意に定められるのだろうか？また、細胞の一時的な平均的な状態からのずれはヒステリシスとしてどの程度子孫へ影響を与えるのだろうか？これらの疑問を明らかにするため、大腸菌の成長・分裂に着目し、オンチップ1細胞培養システムを用いた長期1細胞孤立化観察法によって、特定の1細胞を一定環境条件下で直接観察し、各細胞の世代間で成長・分裂の指標のばらつきの程度、また、一時的な細胞の状態が子孫細胞へ及ぼす影響の程度を明らかにすることを目指した。

昨年までの年会で大腸菌1細胞の分裂間隔時間、成長速度、分裂直後の初期長さは10世代平均すると細胞間に差がなく、またばらつきの程度は変動係数にしてそれぞれ33%、21%、26%と1細胞の世代間でも比較的大きなばらつきを含むことを報告した。今回、これらの指標が子孫細胞へ与える影響度について調べたところ、(1)ある世代の分裂間隔時間は、次の世代の分裂間隔時間へ全く影響を与えない、(2)成長速度、初期長さは2世代程度子孫細胞へ影響が及ぶ、(3)異なる指標間の影響として、初期長さが大きいほどその世代の分裂周期の分布は時間の短い方へシフトすること、が分かった。以上の結果から、大腸菌は分裂時の長さを情報として次の世代へ引継ぎ、次の世代の分裂のタイミングに影響を与える一方、分裂間隔時間という時間情報は次の世代へ影響を与えないと考えられる。成長・分裂以外の指標として、大腸菌の運動パターンの子孫への伝播についても現在検討している。結果については本会にて発表する予定である。

Y. Wakamoto, S. Umehara, I. Inoue and K. Yasuda : Measurement of differences in phenotype of single cells through generations in a constant condition

B559

上頸神経節初代培養細胞と骨髄由来マスト細胞の相互作用に及ぼすNK1受容体の影響

○古野 忠秀¹、Bienenstock John²、中西 守¹（¹名市大院薬、²マクマスター大学）

【目的】生体内の粘膜組織では、神経細胞とマスト細胞が相互作用していると考えられている。神経細胞からマスト細胞への活性化シグナルの伝達には神経ペプチドのサブスタンスPが重要な役割を果たしていることが知られているが、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、上頸神経節初代培養細胞と骨髄由来マスト細胞（粘膜型マスト細胞）のin vitro 共存培養システムを用いて、マスト細胞のNK1受容体（サブスタンスP受容体）の発現量が両者の相互作用に及ぼす影響を追究した。【方法】マウス骨髄細胞を活性化脾臓細胞の培養上清（インターロイキン3（IL-3）が多く含まれている）の存在下で3週間培養し、マスト細胞に分化させた。その後、幹細胞因子（SCF）とIL-4存在下で培養を続け、NK1受容体の発現量が増加したマスト細胞を得た。そして、マウス上頸神経節から単離した神経細胞とマスト細胞を共存培養し、両者の細胞内カルシウムイオン濃度変化を共焦点レーザ顕微鏡を用いて測定した。NK1受容体の発現量はフローサイトメータで測定した。【結果・考察】サソリ毒で神経細胞を特異的に刺激すると、神経細胞でカルシウムイオン濃度が上昇した後、神経突起と接着しているマスト細胞のカルシウムイオン濃度が持続的に上昇した。神経細胞の活性化に伴うマスト細胞の応答率は、NK1受容体がほとんど発現していない場合には極めて低かったが、SCFとIL-4の存在下で培養してNK1受容体の発現量が増加するにつれて増大した。また、このマスト細胞の応答はNK1受容体のアンタゴニストの前処理によって著しく抑制された。これらの結果から、神経細胞からマスト細胞への活性化シグナルの伝達効率はマスト細胞のNK1受容体の発現量に依存していることが分かり、粘膜組織における神経由来の炎症反応誘導機構の一端が明らかになった。

T.Furuno, J.Bienenstock and M.Nakanishi : Effect of NK1 receptor expression on mast cells on nerve-mast cell communication

B558

MAPキナーゼの核シャトルと脱リン酸化反応

○太田 裕子、鬼澤 忍、古野 忠秀、平嶋 尚英、中西 守（名市大院薬）

【目的】即時型アレルギー反応に関与するマスト細胞では、細胞膜上のIgE受容体が抗原によって架橋されると細胞内シグナルが伝達される。細胞質から核へのシグナル伝達を担うリン酸化酵素MAPキナーゼ（MAPK）は、細胞の不活性化状態のときには細胞質に局在しているが、活性化されるとリン酸化されて核へ移行し転写因子を活性化することが知られている。本研究では、マスト細胞に恒常的に発現している脱リン酸化酵素であるHePTPとVHRに着目し、それらがMAPKの不活性化機構に及ぼす影響およびMAPKのリン酸化状態と核シャトルとの関連について追究することを試みた。【方法】細胞にはマスト細胞株RBL-2H3細胞を用い、HePTP、VHRの強発現株を作製した。MAPKの細胞内動態の観察には蛍光蛋白質YFPとMAPKのキメラ蛋白質（YFP-MAPK）を用いた。【結果・考察】マスト細胞を抗原刺激すると、5～7分後にMAPKのリン酸化が最大になり、15分後にはほぼ元の状態に戻った。MAPKの細胞内動態はリン酸化状態と深く関連しており、リン酸化とともに核移行し、脱リン酸化によって細胞質に戻ると考えられた。次にHePTPおよびVHRを強発現させたマスト細胞を用いて、抗原刺激に伴うMAPKのリン酸化を調べたところ、未処理の細胞と比べてリン酸化が抑制されていることが分かった。一方、MAPKをリン酸化するMAPKキナーゼ（MAPKK）のリン酸化は未処理の細胞と同程度であった。このことからHePTPおよびVHRはMAPKの脱リン酸化に重要な役割を果たしていると考えられた。次にHePTP、VHRの細胞内分布を調べたところ、HePTPは主に細胞質に、VHRは細胞全体に均一に分布していることが分かった。現在、細胞内分布の異なるこれらの脱リン酸化酵素がMAPKの細胞内動態にどのような影響を及ぼすかについて検討中である。

Y.Ota, S.Onizawa, T.Furuno, N.Hirashima and M.Nakanishi : Nuclear shuttling and dephosphorylation of MAP kinase

B560

PC12細胞におけるPI(4,5)P₂が局在した小胞の動態

○秋山 信治¹、Jeromin Andreas²、Roder John²、宮田 英威¹（¹東北大・院理・物理、²Dept. of Mol. Immunol., Mt. Sinai Hosp.）

ホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸（PIP₂）は、イノシトール三リン酸やジアシルグリセロールなどのシグナル伝達物質の先駆物質としての役割に加え、近年、アクチン細胞骨格の再構築や膜トラフィック、ラフト形成など、様々な細胞内プロセスの制御に直接的に関与することが明らかになってきた。しかし、このような多様なプロセスが同時進行している細胞内において、PIP₂の分布が時間的、空間的にどのように変化し、また、それがどのような機構で制御されているのかについては、ほとんど明らかにされていない。我々は、生細胞内のPIP₂を可視化するために、ホスホリパーゼCδのPHドメインとGFPとの融合タンパク質を定常的に発現させたPC12細胞を用い、PIP₂の分布変化の観察を試みていた。その結果、エバネッセント波励起蛍光顕微鏡により、細胞底膜近傍でPIP₂が局在した複数の運動する小胞が存在することが明らかになった。これらの小胞の運動を解析した結果、一方向的に運動するもの、ほぼ停滞しているもの、一方向的な運動の後に停滞するものなど、多様な運動パターンが確認された。また、運動の速さは最大で1 μm/sに達するものがあり、各小胞の速さの最大値の平均は約0.4 μm/sであった。次に、サイトカラシンDの処理によりアクチン重合を阻害した条件下で同様の観察を行ったところ、処理しない場合と同様な小胞運動が観察された。一方、コルヒチンにより微小管の重合を阻害した場合は小胞自体がほとんど観察されなかった。以上のことから、観察された小胞運動は微小管に依存したものであると考えられる。過去の報告では、PIP₂によって制御される小胞輸送過程は皆アクチンに依存している。それゆえ、本研究で観察された小胞運動は、小胞輸送過程におけるPIP₂の新たな役割の可能性を示唆するものと考えられる。

S.Akiyama, A.Jeromin, J.Roder, H.Miyata : Dynamics of PI(4,5)P₂-rich vesicles in PC12 cells.