1P213

細胞内カルシウムのばらつきと細胞周期

○大沼 清¹、浅島 誠^{1,2}、金子 邦彦^{1,3} (¹東大院 総文、²ICORP 器官再生、³ERATO 複雑系生命)

【背景】 Ca^{2+} は普遍的な細胞内メッセンジャーとして働いており、開口放出や可塑性、筋収縮、細胞膜の修復、細胞増殖など、数多くの機能が細胞内 Ca^{2+} に依存している。一方、 Ca^{2+} 結合タンパク質はアロステリックに活性化されるものが多い。従って、生細胞内の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の少しの違いが、機能的には大きな違いとなって現れる。ところが、生細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を実際に測定してみると、特別な刺激がなくて各細胞内で時間的空間的に一様な静止状態でも、細胞ごとに大きく違っている。

【疑問】 この様に細胞ごとにばらついており、更にそのばらつきが増幅されるような状態で、各細胞はどのようにその機能を維持しているのだろうか？

【実験】 本研究では、蛍光 Ca^{2+} 指示薬の Indo-1 AM を細胞に負荷し、フローサイトメーターを使い個々の細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を計測した。また別途に核染色色素 PI を使用して細胞周期を測定した。この様にして、細胞周期の時期により、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の集団分布がどのようにに変化するかを調べた。結果は本大会に於いて報告する。

K. Ohnuma, M. Asashima and K. Kaneko : Intracellular calcium dispersion and cell cycle

1P215

Domain formation in lipid bilayer probed in two-dimensional infrared ultrafast experiment

○ Volkov Victor¹、Chelli Riccardo^{1,2,3}、Nutti Francesca²、Papini Anna Maria²、Righini Roberto^{1,2,3} (¹European Laboratory for Nonlinear Spectroscopy (LENS), Università di Firenze, ²Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, ³Consorzio Interuniversitario Nazionale per la Scienza e Tecnologia dei Materiali (INSTM))

We use two-dimensional infrared spectroscopy (2D-IR) to probe structure and dynamics in phospholipid membrane fragments and in binary sphingomyelin/phospholipid liposomes. The membrane fragments are composed of dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC), the sn-2 chain of which contains ^{13}C labeled carbonyl. Hence, the sn-1 and the sn-2 carbonyls of DMPC give two diagonal resonances at 1740 and 1697 cm^{-1} in 2D-IR response. The liposomes consists of 1-palmitoyl-2-linoleyl phosphatidylcholine (PLPC) and Sphingomyelin (SPM) in the ratio 2:1. The diagonal part in the 2D-IR spectra demonstrates two spectral responses at 1645 and 1730 cm^{-1} due to the amide I of SPM and the frequency degenerated carbonyls of PLPC, respectively. 2D-IR spectra revile difference in homogeneous and inhomogeneous broadenings in diagonal resonances both in membrane fragments and liposomes. This indicates on structural and molecular segregation, which leads to different dynamics. The off-diagonal cross-peaks specify further molecular intra- and inter-domain molecular structural correlations. The cross-peaks anisotropy describes the relative orientations of the transition dipole moments of the coupled carbonyls. In result, we demonstrate that 2D-IR spectroscopy is a new powerful and unique methodology to probe molecular dynamics and structural correlations in liquid membrane environment.

V. Volkov, R. Chelli, F. Nutti, A. M. Papini and R. Righini : Domain formation in lipid bilayer probed in two-dimensional infrared ultrafast experiment

1P214

培養ラット心筋細胞の Ca^{2+} 振動に対するミオシン ATPase 抑制剤の作用

○青山 祥一郎¹、鈴木 団²、石渡 信一³ (¹早大院・生命理工、²早大・科健機構、³早大・物理)

N-benzyl-p-toluene sulphonamide (BTS) は、myosin II の ATPase 活性を特異的に阻害し、アクチン・ミオシン間の相互作用を抑制する有機低分子として知られている。また、心筋細胞では細胞内 Ca^{2+} の反復性濃度変化 (Ca^{2+} 振動) によりアクチン・ミオシン間相互作用が on-off 制御をうけ、拍動が起こる。そこで、我々は新生児ラット由来の培養心筋細胞に対して BTS を作用させ、アクトミオシン ATPase 活性 (すなわち、アクチン・ミオシン間相互作用) の抑制によって Ca^{2+} 振動や拍動がどのように影響を受けるかを、蛍光・位相差顕微鏡を用いて Ca^{2+} 振動と拍動を同時観察する事によって調べた。 Ca^{2+} 振動と拍動との結びつきを、BTS を用いて Uncouple させることにより、 Ca^{2+} 振動の機構を明らかにするという意味もある。 Ca^{2+} 振動の観測には蛍光 Ca^{2+} 指示薬である fluo-4 を使用し、拍動は位相差観測により解析した。まず、拍動している培養心筋細胞シートに対して BTS (50、100mM) を作用させると、拍動は減弱し、その後停止した。一方、拍動と相関していた Ca^{2+} 振動は拍動が弱まるにつれて振動波形の振幅も減少したが、拍動停止後も、振動は不安定ながらも継続しその後停止した。こうした結果は、心筋細胞拍動のシグナリング機構にアクトミオシン分子モーターによる力発生がフィードバック機構として関与している可能性を示している。今後は、さらに低濃度の BTS を作用させた時の Ca^{2+} 振動・拍動の相関や、BTS 作用前後における Ca^{2+} 振動波形の相違を解析することで、アクトミオシン収縮特性が心筋細胞拍動のシグナリング機構に果たす役割について、より深く検討していく予定である。

Shoichiro Aoyama, Madoka Suzuki and Shin'ichi Ishiwata : Effects of myosin-ATPase inhibitor on self-oscillatory properties of embryonic cardiac muscle cells

1P216

Two-dimensional Infrared Spectroscopy and Molecular Dynamics of Liquid Formamide

Lima M.¹、Volkov Victor¹、Foggi P.¹、Chelli Riccardo²、○ Righini Roberto¹ (¹LENS, University of Florence, ²Chemistry Department, University of Florence)

Two-dimensional infrared (2D-IR) spectroscopy makes possible to investigate the molecular vibrational transitions, to analyze static and dynamic broadening mechanisms and to obtain information concerning the structure and the dynamics of molecular systems.

We studied liquid formamide by means of 2D-IR spectroscopy in the C=O stretching region and by Molecular Dynamics (MD) computer simulation. Formamide is a simplest molecular model for peptide unit. It forms a hydrogen bond network between anharmonically coupled C=O...H₂-N oscillators.

In broadband ultrafast experiment, the spectral anisotropy shows a very fast decay due to the strong dipole-dipole coupling responsible for the extended delocalization of vibrational excitation. Time resolved narrowband experiment shows that spectral inhomogeneity is lost in 3 ps: after spectral diffusion is completed, there is a randomization of the structure probably due to the reconstruction of the hydrogen bond network. Through isotopic substitution, we were able to measure the dipole-dipole angle by means of the cross peak anisotropy.

From the MD simulation, a very extended hydrogen bond network liquid has been figured out. The excitonic model, applied to the liquid molecular configuration obtained from the simulations, reproduces very well the observed linear IR spectrum in the CO stretching region. Temperature dependent experiments and simulation were performed from the super cooled liquid (T = 265 K) to high temperature liquid (T = 353 K).

M. Lima, V. Volkov, P. Foggi, R. Chelli and R. Righini : Two-dimensional Infrared Spectroscopy and Molecular Dynamics of Liquid Formamide