3P225

生細胞を用いた7回膜貫通型レセプターを介した3量体Gタンパク質活性化様態のリアルタイム測定

○桑山 秀一、高橋 正裕、上田 昌宏、柳田 敏雄（阪大院・生命機能）

生きた細胞で細胞表面のレセプターに結合した1分子のリガンドが、いったいいくつかの3量体型GTP結合タンパク質の活性化されるのか？我々は蛍光タンパク質間（CFP-YFP）のFRETを利用した定量的解析系の開発を目的とした。定量化で問題となるのは、内在するGタンパク質が存在するとFRET強度の変化を正味のG α とG β の活性化（解離）として定量化できないことである。このため、モデルとして細胞性粘菌の走化性誘引物質（cAMP）刺激によるG α -G β の活性化解析を選んだ。その理由は、細胞性粘菌は半数体であるためG α とG β の同時欠損株を簡単に作製でき、内在性3量体型GTP結合タンパク質を排除できるからである。

まず、改良型eCFPであるCerulean遺伝子を、走化性情報伝達に必須な粘菌G α 2遺伝子のN末端helical domain 1st loop直後に挿入した。また、改良型eYFPであるVenus遺伝子を、走化性情報伝達に必須なG β 遺伝子のN末端に付加した。作製した遺伝子の*in vivo*での機能性を確認したところ、2つの遺伝子を共発現したG α 2/G β 同時欠損株は走化性不能を相補しなかったが、VenusとG β の間に12Xglycineをスペーサーとして挿入したところ走化性不能を相補した。

この細胞株を用いて実際にcAMPリガンド濃度依存的なFRETシグナルの変化を観察した。10⁻¹⁰Mから10⁻⁴Mにおける6桁の濃度レンジでのcAMP刺激でのFRET効率の変化を調べた結果、EC50sは約10⁻⁸Mという結果を得た。これはcAMPのレセプターへのKd値や走化応答性のhalf max値（約10⁻⁷M）に比べて約1桁低い値であった。本大会ではこれらの結果を基に3量体型GTP結合タンパク質の活性化機構、特性を議論する。

H. Kuwayama, M. Takahashi, M. Ueda and T. Yanagida. : Real-time measurement of 7TM-type receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells.

3P227

大腸菌全ヒスチジンキナーゼの細胞内局在

○吉本 誠之¹、塩見 大輔²、本間 道夫¹、川岸 郁朗^{1,3}（¹名大院・理・生命理学、²テキサス大・医、³名大・高等研究院）

大腸菌走化性レセプターは、細胞内のヒスチジンキナーゼ（HK）CheA、アダプターCheWと複合体を形成し、外界からの刺激に応じてCheA活性を制御する。レセプターは細胞膜中に均一に存在するのではなく、細胞の極にクラスターを形成して局在する。このクラスター形成はシグナルの増幅や適応に重要と提唱されており、それを支持する実験結果も報告されている。しかし、レセプターの極局在やクラスター形成のメカニズムについてはほとんどわかっていない。一方、大腸菌にはCheA以外にも29種のHKが存在する。このうち浸透圧センサーEnvZや嫌気応答のセンサーArcBなど多くは、レセプターと同様に二回膜貫通型で、ホモダイマーを形成する。これらの局在を比較解析することによって、膜貫通型レセプターの極局在メカニズムについての手掛かりが得られるのではないかと期待される。そこで私たちは、30種のHK全てについてGFP融合タンパク質を構築し、野生株に発現させて蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、多くのHKは特徴的な局在を示さなかったが、数種のHKがレセプターと同様な極局在を示した。このうち、嫌気応答のセンサーであるTorSは特にレセプターと局在の様子がよく似ていた。また、亜鉛や鉛のセンサーであるHydHは極と隔壁に局在した。極局在を示したHKには、キナーゼ・ドメインのほかに、レシーバー・ドメイン、HPtドメインをもつという共通点があった。そこで、TorSについて系統的な欠失変異体を作製したところ、実際に極局在に関与しているのはこれらのドメインではなく、ペリプラズムドメインもしくは膜貫通領域であることが示された。また、TorSは膜上でmultimerを形成すると言われているので、multimer形成によるクラスタリングの可能性と極局在との関連性を現在検討している。

M.Yoshimoto, D.Shiomi, M.Homma and I.Kawagishi : Subcellular localization of histidine kinases in *Escherichia coli*

3P226

マイクロ温度計を用いてHeLa細胞の熱発生を検出する試み

○鈴木 団¹、Zeeb Vadim^{2,3}、石渡 信一^{1,3}（¹早大・科健機構、²ロシア科学アカデミー生物学研究センター、³早大・理工・物理）

我々はマイクロピペットに閉じ込めた蛍光色素、Europium-TTA/DMSO（Eu-TTA/DMSO）の蛍光強度変化を利用して、顕微鏡下で μ mサイズの微小領域を対象に温度を計測できる、新しい技術を開発してきた。このマイクロ温度計を利用し最終的には単一細胞レベルで細胞の熱発生を検出しようとする試みについて、報告する。

ヒスタミンの刺激を受けたHeLa細胞の細胞内[Ca²⁺]は、刺激直後に大きなピークを生じた後、スパイク状に繰り返して変動する。前者は細胞内小胞（ERやゴルジ体）からのCa²⁺放出により生じ、後者は、細胞膜直下のERを介した細胞外部からのCa²⁺流入によることが示唆されている。現在、前者の過程でCaポンプによるCa²⁺汲み上げ時に、ATPの加水分解に伴って生じると予想される熱発生に着目してその検出を試みている。

まずシータガラスの一方の空洞のみをEu-TTA/DMSOで満たすことで、熱を吸収するマイクロ温度計の体積を従来の半分にした。またピペットの押し付けによる細胞への影響を抑えるため、球状に盛り上がった分裂中の細胞にピペットを側面からそっとあてがった。蛍光Ca²⁺指示薬にはfluo-4を用い、防振台の外に置いたフィルターホイールで繰り返し切り替える励起光をリキッドライトガイドで顕微鏡へと導入して、fluo-4とEu-TTAの蛍光を一台のCCDカメラにより観察した。このようにして、細胞内[Ca²⁺]変動とEu-TTAの蛍光をほぼ同時に捉え、その強度変化の相関を解析している。

現在、計測中のピペットのわずかな位置ズレ、溶液の温度揺らぎなどが誤差の原因となっている。以上の実験誤差を無くし精度を上げるべく、実験装置・手順を最適化中である。

M. Suzuki, V. Zeeb and S. Ishiwata : Application of newly developed microthermometer for the detection of heat generation developed by HeLa cell

3P228

Cell Cycleの分析によるNADPH oxidase依存性細胞分化メカニズムの解明

○安藤 佳大、鈴木 友子、平岡 和佳子（明治大・理工・物理）

白血球やグリア細胞の増殖・分化に関わるシグナル因子として、活性酸素の関与が報告されている。本研究の目的は、そのファミリーがNOXとして多くの組織に分布することが明らかになりつつある、NADPH oxidase依存性の活性酸素の発生が細胞分化にどのように寄与しているのかを明らかにすることにある。実験では、B細胞由来のPLB-985をphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)でマクロファージへ分化誘導するときの、活性酸素の生成と細胞増殖および細胞分化との関係を明確にするためにCell Cycleの動きについて検討を試みた。比較のために、NADPH oxidaseの膜タンパク質成分であるgp91^{phox}を不活化したX-CGD細胞を使用した。Cell Cycleの解析には、Propidium Iodideを用いて染色した細胞のDNA量をフローサイトメーターで定量し、各周期の割合を算出した。PMA処理から24時間の間に一部の細胞は接着性を獲得する様子が観察されている。このときの、附着性細胞と浮遊性細胞のCell Cycleを解析したところ、どちらともCell Cycleの割合はG1期が約80%であった。附着性細胞は、その後3日間ほぼG1期にとどまり続けたが、活性酸素の生成が無いX-CGD細胞では、細胞はG1期にとどまり続けることができないことが明らかになった。この結果はNADPH oxidaseの活性化により引き起こされるMac-1 α (CD11b)の発現経過（第42回日本生物物理学会年回）によっても説明される。さらにこれらの細胞周期の変化と、PMAによる活性酸素生成の時間経過についての関連性、PKCとの関連性についても検討したので報告する。

Y.Ando, T.Suzuki, W.Hiraoka : NADPH oxidase-induced differentiation in B-cells elucidated with cell cycle analysis