

2P325

マクロファージ1細胞の抗原刺激応答解析 (I) 抗原刺激解析系の開発

○進藤 浩史¹、折田 一樹²、松村 和典²、若本 祐一²、石本 裕士³、柳原 克紀³、河野 茂³、安田 賢二² (¹東大・教養・基礎科、²東大院・総合文化・広域科学、³長崎大院・医歯薬総合・感染分子病態学)

[目的] 免疫系は様々な細胞の多様な相互作用で成立し、内部の細胞は病原侵入に伴い細胞間で情報を受渡し、免疫系全体の活性化や抗原除去後の沈静化を引起す。情報伝達の起点は抗原提示細胞であり、免疫系の情報伝達を理解するにはまず、抗原取込みを行う個々の樹状細胞やマクロファージへの抗原刺激のタイミング、刺激位置、抗原量と食食応答及び抗原提示量との定量的な関係を明らかにする必要がある。そこで我々は、抗原提示細胞1細胞を連続観察しながらその細胞に対し厳密な抗原刺激が可能な刺激系を開発し、抗原提示細胞1細胞の食食応答を計測した。

[方法] 細胞は、BALB/c マウスから取出した肺マクロファージを用いた。この細胞をガラスボトムディッシュに低密度 (10~20 cells/dish) で撒き、温度、湿度、CO₂濃度を一定に保った小型培養槽を顕微鏡ステージに配置し、その中にディッシュを入れ、1細胞を1秒間隔でタイムラプス観察した。抗原刺激は zymozan (酵母細胞壁断片) を用いて行った。部位特異的に抗原刺激を行う為、薄い濃度でシャーレ周辺部に撒いた zymozan を光ピンセットで目的細胞周辺まで運び、任意の時間、部位に抗原刺激を与えた。細胞の食食応答は、抗原刺激部位画像を切出し、細胞体部分の面積変化を追うことで計測した。

[結果] 上記方法で、マウス肺マクロファージに対して部位特異的に zymozan の抗原刺激を与えたところ、それに伴う食食応答が起き、更に刺激部位の画像解析により食食開始時間を同定できた。1細胞の同一部位への連続抗原刺激、複数位置への同時刺激もでき、これら条件下での1細胞の食食応答を計測できた。結果の詳細は「マクロファージ1細胞の抗原刺激応答解析 (II)」にて議論する。

H. Shindou, K. Orita, K. Matsumura, Y. Wakamoto, H. Ishimoto, K. Yanagihara, S. Kohno, and K. Yasuda : Analyzing the single cell response of macrophage to the antigen stimulation (I) Development of antigen-stimulation and analysis system

2P327

単一細胞における遺伝子発現時間変動のデコンボリューション法による解析

○一ノ瀬 純也¹、柏木 明子²、四方 哲也^{1,2}、金子 邦彦^{1,3} (¹JST, ERATO 金子複雑系生命プロジェクト、²阪大院・情報科学、³東大院・総合文化・広域科学)

細胞集団に対して、ある遺伝子の発現活性に注目したとする。集団平均が一定で時間変化しない場合でも、個々の細胞について注目すれば、細胞毎に異なる値をもってバラついている。これは、その遺伝子発現活性が、個々の細胞毎に異なる時間変動をしているためである。この時間変動の原因は、遺伝子発現に関わる細胞内分子反応系に含まれるノイズ (時空間的な分子濃度のゆらぎや、1分子レベルでの分子構造のゆらぎ) であると考えられる。したがって、1細胞レベルで遺伝子発現変動を定量的に解析することには、このノイズの影響を抑制して安定な細胞状態を維持したり、逆にノイズを積極的に利用して細胞状態をダイナミックに変化させることによって環境の変化に柔軟に適応することができるようにしたりしている生物現象のメカニズムを解明する意義がある。そのためには1個の細胞について、ある遺伝子の発現活性を生きた状態のまま連続観察することが必要である。一般に生きた細胞における遺伝子発現を検出するために、目的の遺伝子に GFP 等を連結し、その蛍光を検出する手法がとられている。しかし発現活性の時間変動の定量的解析までは行われていない。ある時刻における蛍光タンパクの量は、その時刻に新規に合成されたものと、過去に合成されて残っているものとの重ね合わせ (コンボリューション) になっている。このことが、定量的な時間変動解析をやりにくくしている原因である。そこで我々は、蛍光顕微鏡と、人為的に発現を制御できる遺伝子ネットワークを組み込んだ大腸菌を用い、一旦合成された GFP が細胞内で減少していく挙動関数を決定し、細胞の蛍光強度時系列データに対してデコンボリューションをかけることによって、細胞内での遺伝子発現活性の時間変化を定量的に解析することを試みた。その結果について報告する。

J. Ichinose, A. Kashiwagi, T. Yomo, K. Kaneko : Analysis method for temporal fluctuation of gene expression activity by deconvolution of amount of the product

2P326

マクロファージ1細胞の抗原刺激応答解析 (II) 1細胞内における情報処理メカニズムの解析

○折田 一樹¹、進藤 浩史²、松村 和典¹、若本 祐一¹、石本 裕士³、柳原 克紀³、河野 茂³、安田 賢二¹ (¹東大院・総合文化・広域科学、²東大・教養・基礎科、³長崎大院・医歯薬総合・感染分子病態学)

[背景・目的] マクロファージ・樹状細胞に代表される抗原提示細胞は免疫反応の最初の防壁として働き、さらに下流の細胞に情報を伝える重要な役割を持つ。特に、マクロファージは異物などの刺激に対して、食食反応、液性因子の放出、抗原提示など様々な応答を示す。これらがどうコントロールされ、細胞内の情報として処理されているかを知るためには、1細胞に着目し、細胞がどのような情報を保持しているか、そのダイナミクスを計測しつつ、細胞への入力を制御し、それに対する応答を定量的に意味付けする必要がある。しかし、細胞内の状態を経時的に観察することは標識の必要性和その侵襲性により難しい。そこで我々は、周囲の環境からの想定外の刺激を一切排除するために1細胞を孤立化させ、細胞に刺激物質の投与などの摂動に対する応答 (運動) を、特別な処理無しに観察できる細胞の形状 (の変化) に着目して評価することとした。

[方法] マウス肺マクロファージを対象とし、観察を行った。細胞をアガロース、SU-8、PDMS などのマイクロチャンパー、低細胞密度培養などで孤立化し、光ピンセットにより時間・細胞体における位置を制御して刺激物質を与えた。これを経時的に観察し細胞形状の変化を数値化しこれを評価した。

[結果・考察] 上記のような培養・刺激・観察系を用いることによりマウス肺マクロファージの運動を70時間連続して追跡することに成功した。また時間を置いて複数の刺激を与えるとその応答間においてを一方が他方を束縛するといった現象を観察した。これらの詳細については本年会にて報告する。

K. Orita, H. Shindou, K. Matsumura, Y. Wakamoto, H. Ishimoto, K. Yanagihara, S. Kohno, and K. Yasuda : Analyzing the single cell response of macrophage to the antigen stimulation (II) Processing of acquired information in the single cell

2P328

スイッチングによる蛍光相互相関分光法のクロストーク解消

○西村 淳一¹、杉山 崇¹、高橋 保夫^{1,2}、金城 政孝²、宮脇 敏史³ (¹オリンパス・基礎技術部、²北大・電子研・超分子分子光、³理研・脳センター)

蛍光相互相関分光法 (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) は溶液内および細胞内において、2色の異なる蛍光分子が微小領域内を通過する際の同時性 (相互相関) から両者の結合状態を計測する方法である。FCCS は均一系の溶液中で生理的条件を保持した状態で蛍光標識蛋白質の細胞内動態をリアルタイムで高感度に測定できることから、近年この方法を用いた研究が進展している。しかしながら従来の方では2種類の蛍光色素の蛍光スペクトルが重なり合う場合にクロストークが発生して偽の相互相関が観測されることから、FCCS 測定の精度が低下するという問題点があった。我々はこの欠点を補うために、2つの励起光を音響光学的に互い違いに On-Off (スイッチング) してそれに同期させた検出と信号処理を行うことによりクロストークを完全に解消することに成功した。本報告では上記スイッチングによる FCCS 測定システム (スイッチング FCCS) を検証する目的で、カスパーゼ3酵素の切断部位を含むリンカーによってつながれた2色の蛍光蛋白質を溶液中にて活性化型カスパーゼ3と反応させ、酵素反応の時間変化を計測した。蛍光蛋白質はカスパーゼ3の活性によって切断され、FCCS 測定による相互相関の値は時間とともに減少した。非スイッチング測定ではクロストークによると思われる偽の相互相関が最後まで残ったのに対して、スイッチング FCCS 測定では5時間後に相互相関が全く見られなくなった。この結果から、蛍光波長の重なりによるクロストークがスイッチング FCCS によって解消され、真の酵素反応が定量的に測定できることが示された。今後、このスイッチング FCCS の最適化を目指すとともに、細胞機能解析への応用を検討していきたい。

J. Nishimura, T. Sugiyama, Y. Takahashi, M. Knjo, A. Miyawaki : Cross talk free Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy using switching method