

ワークショップ3

W3-1

イメージングによる細胞内情報伝達ネットワークの解析

斎藤 尚亮

神戸大学 バイオシグナル研究センター

神経などの細胞機能は、細胞内情報伝達における多種類のシグナル分子から構成される複数のシグナル経路がお互いにクロストークすることによって、巧妙に調節されている。これまでに多くのシグナル経路の存在が報告されてきたが、それぞれのシグナルが「何時」、「何処で」伝達されるか、あるいはクロストークするかといった時間的・空間的な解析は十分には行われていない。我々は、情報伝達分子の中で特にリン酸化酵素に焦点をあて、情報伝達ネットワークのイメージング解析を行ってきた。その結果、類似した酵素学的特性をもつ分子であっても、刺激に対する応答は、時間経過、局在の点において、明らかに異なることが示された。たとえば、プロテインキナーゼC (PKC) の構造上類似したサブタイプは、サブタイプにより刺激に応じて移動する細胞内部位・時間経過は異なっており、さらに同一の分子であっても、刺激に応じて異なる部位へ移動することが示された。これらの結果から、PKCをはじめとする情報伝達因子は、同一の分子であっても、上流からの刺激に応じて、時間的・空間的に異なる応答を示し、異なるシグナルを下流に伝達し、異なる細胞応答を導く機能（ターゲティング機能）を持つと推測される。

本ワークショップでは、培養細胞におけるPKCターゲティングが、サブタイプ特異的、刺激特異的であり、かつターゲティングの違いにより異なる細胞応答を引き起こすことを報告する。さらに、脳部位特異的にPKC-GFPを発現するトランスジェニックマウスを用いた組織レベルのイメージングによって明らかになったPKCターゲティングについても最近の成果を紹介する。また、PKCの活性制御を行うと考えられているジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)との分子相関について、時間的・空間的な観点から得られた結果を報告する予定である。

W3-2

マクロファージ貪食過程におけるアクチン細胞骨格機能と脂質シグナルのイメージング

荒木 伸一

香川大学 医学部 組織細胞生物学

粒子状異物の細胞内への貪食 (phagocytosis) は、細胞表層での膜とアクチン細胞骨格の動きによって引き起こされる局所的細胞運動である。この過程には、アクチン線維の重合、脱重合、架橋、再配列、収縮運動に働く多くのアクチン結合蛋白質およびミオシンが関与しており、これらは複雑なシグナリング経路により時間空間的制御を受けていると考えられる。このワークショップでは、蛍光バイオイメージングによるマクロファージ貪食過程のアクチン細胞骨格機能と脂質シグナリングについての所見を紹介する。

1. GFP-actinで見たphagocytic cup squeezing

IgGオプソニン化赤血球 (IgG-E) を貪食中のマクロファージを走査電顕で観察すると、正常ないしPI3kinase阻害マクロファージではphagocytic cupはIgG-E表面に密着しておりIgG-Eを締め付けているように見える。しかし、MLCK阻害剤 (ML-7) によりmyosin IIを阻害したときのphagocytic cupはIgG-E表面に沿っておらず、開いた状態になっていた。GFP-actin発現細胞のvideo microscopyにおいても、正常の貪食過程では、phagocytic cupを取り巻くF-actinの帯がIgG-Eを締め上げる動きが観察された。この締め上げはML-7で阻害され、PI3kinase阻害剤では影響を受けないことから、PI3kinase非依存性のmyosin IIによるphagocytic cup squeezingと考えられた。

2. 脂質シグナリングの可視化と時間空間的解析

膜脂質性のphosphoinositideシグナル分子であるPIP2、PIP3は、膜輸送、アクチン細胞骨格の制御をおこなうことが知られている。我々は、PIP2、PIP3にそれぞれ選択的に結合するphospholipase CとBruton's tyrosine kinaseのpleckstrin homology (PH) domain - yellow fluorescein protein (YFP)融合キメラをマクロファージに発現させ、貪食過程でのPIP2、PIP3シグナル動態解析をおこなった。PIP2はphagocytic cup形成時に偽足の細胞膜で局所的に高濃度になり、phagosomeとして細胞内に取り込まれるとたちまち減少、消失する。PIP3は、PIP2より少し遅れてphagocytic cupに増加し、phagosomeに取り込まれた後しばらくして減少していった。このことから、PIP2がアクチン結合蛋白質を制御することにより偽足の伸展、phagocytic cup形成をもたらし、PIP2がPI3kinaseによりリン酸化されて生じたPIP3がその後の過程を制御していることが推測される。