1PA033

PC12細胞におけるATP合成過程の研究:細胞内Ca²⁺濃度上昇の影響○吉永 恵美子¹⁾、小濱 とも子²⁾、井上 和秀²⁾、太田 善浩¹⁾

1)東京農工大学大学院 工学研究科 生命工学専攻

2)国立医薬品食品衛生研究所 薬理

【目的】 PC12細胞は、ラット副腎髄質褐色細胞腫よりクローン化されたカテコールアミン分泌細胞であり、開口放出の際には、カテコールアミンだけでなくATPも同時に放出されることが知られている。また、開口放出は、細胞内Ca²⁺濃度の上昇を引き金となって起こる。そこで本研究では、PC12細胞において、細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起こる時、ATP合成機構を持つミトコンドリア内にはどのような影響を与えているかに焦点を置き、これを調べる目的として実験を行った。

【実験方法】 本研究では、継代62~70回で、3~4日間培養のPC12細胞を試料として用いた。PC12細胞に、終濃度12mM KClを添加すると、細胞膜が脱分極し、細胞膜上の電位依存性Ca²⁺チャンネルが開き、細胞内へCa²⁺が流入する。これによって起こる、細胞内Ca²⁺濃度、ミトコンドリア内でのNADHの合成、フラビンタンパク質の酸化・還元の変化を、蛍光顕微鏡およびCCDカメラを用いて時間分解測定を行なった。また、ミトコンドリア内でのCa²⁺の輸送を阻害するRuthenium Red (RuR)を併用し、NADH合成での同様な実験を行ない、NADH合成におけるミトコンドリア内Ca²⁺の影響を調べた。

細胞内Ca²⁺は、Ca²⁺感受性蛍光色素であるCalcium Green-1で染色し、NADH、フラビンタンパク質はそれぞれの自家蛍光を測定に用いた。また、それぞれの測定データは、全て横軸を時間(秒)、縦軸を測定開始0秒の蛍光強度を100%とした時の変化率(%)として数値化し、グラフを作成、解析を行った。

【実験結果・考察】 PC12細胞にKClを添加すると、添加直後に細胞内Ca²⁺濃度の急激な上昇が確認できた。NADH合成に関しては、KCl添加後緩やかな合成の促進が確認され、フラビンタンパク質は、酸化状態から還元状態へと移行した。また、RuRを併用した場合、NADHの合成が抑制される傾向となる結果が得られた。これらのことから、細胞内Ca²⁺濃度の上昇が、ミトコンドリア内におけるATPの合成を促進するような影響を与えているであろうと推測される。

さらに、ミトコンドリア内膜の膜電位に対するCa²⁺の影響についても検討を行なう予定である。

E. Yoshinaga, T. Obama, K. Inoue, Y. Ohta

Study on procedures of ATP synthesis in PC12 cells

: Influence of elevation of intracellular Ca²⁺ concentration

1PA035

細胞間接着と解離におけるE-カドヘリンと

 α -カテニンの局在変化○小山 郁子¹⁾、永淵 昭良²⁾、月田 承一郎²⁾、楠見 明弘^{1,3)}

(1名大院理、2京大院医、3ERATO, JST)

E-カドヘリンは上皮細胞などにおいて、カルシウムイオン依存的な細胞間接着を担う膜タンパク質である。2細胞間の接着を保持するのに十分な力の生成は、カドヘリン分子の凝集、及びカテニン複合体を介したアクチン線維への結合の両方に依存すると考えられている。したがって、細胞間接着構造が形成される際にこれらが生起する過程を知ること、細胞間接着の制御機構の理解に不可欠である。

そこで、本研究においては、E-カドヘリンと α -カテニンの細胞間接着領域への集合と分散の機構を検討した。そのために、これらのタンパク質にGFPを結合させたものを、上皮細胞MDCKに安定発現させた。接着構造が形成されない低カルシウムイオン濃度(50 μ M)の培養液中では、E-カドヘリン-GFPは細胞膜表面に一様に存在したほか、細胞内の一部に局在した。 α -カテニン-GFPは細胞質全体に広がっている成分に加えて、局在する成分が存在した。細胞質内においては両者の局在部位は一致しなかったが、細胞膜表面では、一部の α -カテニン-GFPはE-カドヘリンと結合していた。したがって、細胞間接着構造外に存在するE-カドヘリンについては、細胞膜表面では、一部が α -カテニンを介してアクチン線維と結合していることが示唆される。これは、我々の以前の結果と一致する(Sako et al. 1998. J. Cell Biol. 140:1227-1240)。カルシウムスイッチ([Ca²⁺]=50 μ M $\rightarrow$ 1.8mM)後、細胞表面のE-カドヘリン分子は細胞膜上を移動して接着領域に集合した。また、逆カルシウムスイッチ後、E-カドヘリン-GFPのエンドサイトーシスは観察されなかった。以上は、E-カドヘリンは細胞膜上を移動して細胞間接着部位へ集合すること、大規模な集合にはアクチン線維が関与することを示唆する。

I. Koyama, A. Nagafuchi, S. Tsukita and A. Kusumi: Assembly Mechanism of E-cadherin and α -catenin during Development of Cell-Cell Adhesion.

1PA034

走査型二重水膜電極法による *Chara* の電気的細胞間連絡の測定
緒方 惟昭 (産業医大、産業保健、第一生体情報)

【材料と方法】「走査型水膜電極法、Ogata1983-」を改変した「走査型二重水膜電極法」：緒方1998、本学会；緒方1999、日本植物生理学会；Ogata 1999 Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists (図1)により、*Chara* の二連節間細胞(節間細胞a/節間細胞n/節間細胞b)の細胞間(a/n間、およびn/b間)の見かけの電気的特性を得た。又、生体膜に関する電気的等価回路モデル(Philippson, 1921, 図2)を適用して、抵抗(並列抵抗R_m、直列抵抗R_s)および電気容量(並列容量C_m)の算出を試み、それぞれの時間的変化を求めた。

【結果と考察】節間細胞a&bの抵抗、R_s、R_sは8 $\times 10^{-3}\Omega m^2$ 細胞間電気抵抗、R_{m,a/n} およびR_{m,n/b}は40 $\times 10^{-3}\Omega m^2$ であった。細胞間電気容量、C_{m,a/n} およびC_{m,n/b}は3 $\times 10^{-2}F m^{-2}$ (at 30Hz)であった。節間細胞aに対する高張液(200mM, Mannitol)暴露は処理(膨圧低下)は、R_{m,a/n}にdumping-oscillationを伴った増加(周期約10分、最大80 $\times 10^{-3}\Omega m^2$ 、定常値50 $\times 10^{-3}\Omega m^2$)を引き起こした。一方、C_mは時間と共に減少(時定数5分)し、定常値2 $\times 10^{-2}F m^{-2}$ (at 30Hz)で安定した。R_s、R_sの揺動は数%以内であった(R_sは増加傾向、R_s減少傾向)。これらの結果は、電子顕微鏡などで観察されている plasmodesma (原形質連絡)の細胞接着面積(節間細胞断面積の約1/3)に占める有効密度(～10%)の減少だけでは説明出来ない事を示している。即ち、細胞接着全面積の減少に対応するような制御機構の関与が考えられる。

(図1)

(図2)

1PA036

ヘミデスモソーム膜タンパク質BP180の運動制御機構の研究

○村瀬 琴乃¹⁾、平子 善章¹⁾、尾張 部克志²⁾、楠見 明弘^{1,3)} (1名大院理、2名大院人間情報、3ERATO, JST)

BP180は、細胞-基質間接着構造であるヘミデスモソームの膜内在性タンパク質で、実際に接着を担っている重要な膜タンパク質である。BP180はヘミデスモソームに凝集することによって、細胞を接着させるのに必要な接着力を生成している。したがって、BP180のヘミデスモソームへの集合機構を知ることは細胞-基質間接着の制御機構の理解に必須である。本研究は、BP180の運動の制御機構を一分子レベルで一粒子追跡法を用いて研究し、ヘミデスモソームの形成機構を解明するための第一歩とすることを目的とした。また、対照としてリン脂質の運動制御機構についても調べた。

ビデオレートで単純拡散運動に見える粒子も時間分解能をあげれば、実は非常に小さなドメイン内部に制限されて、時々、隣接ドメインにホップすること、それを繰り返すことによってマクロスコピックな拡散と移動が起こることがわかってきた。時間分解能110マイクロ秒で観察するとドメインサイズは70 nm程度であるが、その時でもD_{micro}は2 $\times 10^{-6}cm^2/s$ 程度であり、予想される値の1/10程度である。したがって、さらに小さい領域で運動が抑制されていることがわかった。その結果、細胞膜の膜貫通タンパク質を含む脂質二重膜は流動性のあるタイル状のドメインをモザイク状にびっしりと敷きつめたような構造をとっていることがわかってきた。BP180とリン脂質は隣接する流動タイル間を30ミリ秒毎に飛び移ることによって膜上を移動している。膜をタイル状に仕切る機構は不明であるが、拡散を阻害するような膜ドメイン、或いは膜骨格に結合して動かなくなった膜タンパク質、凝集したタンパク質が込み合っていることなどによって自由拡散が著しく抑制されるパーコレーション効果による可能性が大きい。

K. Murase, Y. Hirako, K. Owaribe and A. Kusumi: Regulation Mechanism for the movement of BP180, A transmembrane protein of the hemidesmosome.