1J1030

脊髄由来の細胞活動抑制因子がMDCK細胞に与える作用の経時的顕微鏡観測

○江本 由美子、乙顔 歩、今福 泰浩、太和田 勝久（九大院・理学・生物科学）

【材料と方法】豚脊髄から精製した細胞活動抑制因子をMDCK細胞培養上清に添加し、細胞の還元活性と細胞形態の変化を経時的に調べた。細胞形態の経時観測のために、細胞を顕微鏡のステージ上に固定した小型恒温CO₂インキュベーターに入れ、顕微鏡をビデオに接続した。そのビデオの作動をパソコンで制御して、11分毎に1分録画する過程を繰り返し、24時間、あるいはそれ以上の時間にわたってタイムラプス録画した。

【結果】(1) 因子の作用を細胞の還元活性で定量化すると、作用はdose-dependentであり、また作用時間にも依存することがわかった。(2) 因子を添加してから24時間までは、細胞の還元活性が低下した。それ以上長時間因子を作用させても、さらなる還元活性の変化は見られなかった。そこで、短時間で還元活性が低下するような濃い濃度および、24時間で還元活性が低下するような薄い濃度の2通りの条件で、タイムラプスビデオ録画により細胞の形態や運動の変化を調べた。(3) 6時間の因子作用で還元活性が20%以下になるような濃い濃度では、6時間以内に細胞がほとんど剥がれてしまった。(4) 6時間の因子作用では還元活性が殆ど低下しないが24時間の因子作用では還元活性が20%以下になるような薄い濃度の因子を作用させた場合、細胞に因子を添加してすぐに細胞運動が止まった。その後、ほとんどの細胞は増殖を止めた。個々の細胞は盛り上がり過ぎて、いくつかの細胞は完全に丸くなった。24時間後に培養上清を除いて因子を含まない新しい培地を入れると、細胞運動が始まり、因子を添加していない細胞と同じように、活発に増殖した。以上のことから、この細胞活動抑制因子の作用が可逆的であることがわかった。

Y. Emoto, A. Otogao, Y. Imafuku and K. Tawada : Reversible effects of a cell growth inhibitor on the activity of MDCK cells

1J1100

上皮成長因子受容体の情報伝達反応は前会合体の形成によって加速されている

○佐甲 靖志¹、兪 暁春²、目加田 英輔²、柳田 敏雄¹（¹ 阪大・院医、² 阪大・微研）

多くの細胞内情報伝達系において、細胞膜における受容体の2量体化が不可欠であるとされているが、2量体化反応の詳細は必ずしも明らかではない。我々は、蛍光1分子可視化法によって、細胞膜受容体の2量体化と情報伝達反応の分子機構を研究している。今回、上皮成長因子受容体(EGFR)と、その細胞質部分をエリスロポイエチン受容体の細胞質部分の1部と取り替えたキメラ受容体を比較することによって、EGFRの2量体化反応の解析をおこなった。

本来EGFRを発現していない細胞(CHO)にEGFRまたはキメラを安定に強制発現させ、蛍光色素Cy3で標識したEGFの結合を1分子観察すると、ほとんどのキメラ分子がEGF結合10分後まで単量体であるのに対し、EGFRは添加直後から2量体以上の会合体を形成していることがわかった。EGFRの2量体化の80%以上は既に膜上に存在するEGF-EGFR複合体の近傍に溶液中のEGFが結合することによって起こった。キメラの2量体化の進行は遅く、その多くは膜上の2つのEGF-キメラ複合体の衝突によって起こった。以上の結果から、EGFRがEGFの結合以前に、細胞質部分の作用によって何らかの会合体（前会合体）を形成していると思われる。

Cy3-EGFとCy5-EGFを混合して結合させると、添加から10分後までに蛍光共鳴エネルギー移動を起こす会合体の数が増加した。前会合体内の分子配置はEGFの結合によって変化するようである。

EGFRまたはキメラによって起こる細胞内のリン酸化は、EGFRを発現する細胞ではEGF添加の1分後にはかなり進行していたが、キメラを発現する細胞では10分後にはまだ検出されなかった。

以上の結果は、EGFRの2量体化はEGFの結合による前会合体の構造変化であること、EGFRの情報伝達反応が前会合により加速されていることを示唆している。

Y. Sako, X. Yu, E. Mekada and T. Yanagida : Signal transduction of epidermal growth factor (EGF) is accelerated by pre-clustering of EGF receptor

1J1045

副腎皮質細胞をATPとプレインキュベーションするとACTHに対する反応性は高まる

○青鹿 謙司、太田 善浩（東京農工大・工・生命工）

【目的】 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) は、副腎皮質細胞におけるステロイドホルモン合成の生理的な刺激物質であり、細胞内にカルシウム信号（カルシウムイオン濃度の経時変化）とステロイドホルモン合成を引き起こす。一方、ATPはカルシウム信号とステロイドホルモン合成を促進するが、生理的役割についてはよく解っていない。そこで本研究ではATPがACTHのカルシウム信号と、その結果生じるステロイドホルモン合成に対する効果を高めているという仮説をたて、細胞外ATP存在下においてACTHで刺激した時の細胞内カルシウムイオン動員の観察、ステロイドホルモン合成量を比較検討することからATPのACTHに対する効果を研究する。

【方法】 細胞はウシ副腎皮質束状層の初代培養細胞を使用した。細胞はカルシウムイオン感受性色素 Calcium Green-1 で染色し、蛍光強度変化をCCDカメラを用いて単一細胞レベルで解析した。

【結果・考察】 初めにATPを添加し、30分後にACTHを添加した。予め加えておくATP濃度を高くすると、カルシウム信号を生じた細胞の割合は、12.6% (0nM ATP) から40.8% (100nM ATP) まで増加した。次に、ACTH存在下においてACTHで刺激したところACTH単独刺激よりも反応率が増加した。そこで30分前にACTHを添加しておいた細胞の上清を、ACTHを添加していない細胞の上清と置き換え、ACTHで刺激したところ、ACTH単独刺激よりも反応率が増加した。このことはACTHが存在することにより細胞外に分泌された物質が、新たに加わるACTH刺激に対する反応性を高めることを示唆するものである。一方ATPに関して同様の実験を行ったところ、反応率は変化しなかった。ステロイドホルモン合成量と上述の結果との関係については現在検討中である。

K. Aoshika, Y. Ohta : Enhancement of ACTH-induced Steroidogenesis by ATP

1J1115

EGFによって起こる細胞内Ca²⁺応答の入出力定量

○上村 武¹、佐甲 靖志²、柳田 敏雄^{1,2,3}（¹ 阪大・基礎工、² 阪大・医、³ 科技振・1分子過程Pj）

細胞に存在する多様なシグナル伝達経路は、現在も次々と明らかにされている。しかし、その入力と出力の定量的な関係は、まだほとんど明らかにされていない。細胞に上皮成長因子(EGF)を加えると、(EGF) → EGF受容体 → PLC- γ → (IP₃) → 小胞体上のIP₃受容体 → 細胞質Ca²⁺濃度の上昇 というシグナル伝達が起こる。我々はこのシグナル伝達経路について、細胞膜に結合するEGFの数を入力、それによって起きるCa²⁺応答を出力として、その入力と出力の関係を定量した。

細胞外溶液を灌流し、様々な濃度のRhodamine標識EGF溶液を約20秒間のパルス状に加えることで、細胞(HeLa)にEGF刺激を与えた。それぞれの濃度において細胞膜に結合したEGFの数は、1分子蛍光顕微鏡を用いて測定した。また、これらの刺激に対するCa²⁺応答はCa²⁺蛍光指示薬を用いて測定した。この二つの測定系の結果を比較することで、このシグナル伝達経路の入力と出力の定量的な関係を調べた。その結果、Ca²⁺応答を引き起こすために必要なEGFの結合数は細胞あたり数百個であることが分かった。また、EGFの結合曲線とCa²⁺応答曲線それぞれの50%値を与える細胞外液のEGF濃度で二つの曲線を比較すると、Ca²⁺応答曲線はEGFの結合曲線よりも高濃度側にシフトしていた。これは、2量体化するまでEGF受容体が信号を出さないことを反映しているものと考えられる。

今後、細胞膜に結合するEGFの数とCa²⁺応答を同時に測定できる実験系を構築し、個々の細胞で起きるシグナル伝達の入出力を定量したいと考えている。これにより、シグナルにどのような増幅や変調が起きているのかを明らかにしていきたい。

T. Uyemura, Y. Sako, T. Yanagida : Analysis of correlation between EGF-binding and intracellular Ca²⁺ response.