3P201

原子間力顕微鏡を用いた細胞接着力の細胞レベルでの定量的評価

○金 賢徹、荒川 秀雄、長田 俊哉、猪飼 篤（東工大院・生命理工）

原子間力顕微鏡（AFM）は溶液中で凹凸像を高解像度で得られるのみでなく、分子レベルでの相互作用力を定量的に測定する有力な測定手段のひとつとしても盛んに用いられている。細胞-細胞外マトリックス間や細胞-細胞間の接着は、発生や分化などの基本的な過程に深く関わっているばかりでなく、癌転移や血栓の生成といった深刻な病気のメカニズムを解明するためにも特に重要である。

発表では細胞接着の諸過程を、AFMを用いて細胞レベルで定量的に解析する試みについて紹介する。はじめに細胞レベルで測定を行うように、直径約 10 μ m のポリスチレン製ビーズを AFM カンチレバー先端に取り付けてプローブとして用いることにより、接触面積を通常の探針より 50 倍以上大きくした。また本研究では、代表的な細胞接着分子のひとつであるフィブロネクチン（FN）をモデル分子として利用し、これをビーズに共有結合で固定した。本研究の手法では一度に多数の分子同士が反応するため、得られた結果の解析は、force-extension カーブのヒステリシス部分が接触領域全体の接着力を反映すると考え、このエネルギーの次元を持つ量を「剥離仕事」と名付け、解析のパラメータとして用いた。以上のような準備の後、FN とマウス繊維芽細胞間の接着力を測定したところ、剥離仕事の平均値は $3.5 \pm 2.3 \times 10^{-18}$ J/ μ m² であった。またマッピングの手法を用いることにより、生きた細胞に対する測定の再現性や、細胞上の広い領域にわたった FN 接着部位が調べられた。これらの結果は、細胞接着力を分子レベルのみでなく細胞レベルで定量的に解析することの重要性を示唆しており、われわれが構築した実験系が細胞レベルでの解析にふさわしいことを示している。発表ではさらに、本研究での手法を用いた測定の応用と種々の試みについても紹介する予定である。

Kim, H., Arakawa, H., Osada, T. and Ikai, A. : Semi-quantitative Cell Adhesion Measurement by AFM on Cellular Level

3P203

脊髄由来細胞増殖抑制因子の作用機構：G 1 / S 期で同調させた場合

○前田 梨恵、江本 由美子、太和田 勝久（九大院・理・生物）

当研究室で発見、精製された豚脊髄由来細胞増殖抑制因子は、分子量約 350、中性 pH で正の電荷を帯びた、耐熱性で水溶性の物質である。この因子の添加により、MDCK 細胞は遊走運動、増殖を止め、その後細胞外基質への接着を弱めて丸くなる¹⁾。本研究では、因子の作用機構を解明することを目的として、細胞周期を G 1 / S 期にそろえた MDCK 細胞に、その G 2 期のいろいろな時期に因子を添加し、M 期通過への影響を解析した。MDCK 細胞の G 1 / S 期同調には double thymidine block 法を用いた。因子作用の解析は、顕微鏡に接続した微速度撮影装置 (Time-Lapse Cinematography) でビデオ録画した細胞の形態変化²⁾と個数変化を調べることによって行った。Double thymidine block 法によって G 1 / S 期に同調させた MDCK 細胞は、チミジン処理終了から約 8 時間で M 期に入ることがわかった。チミジン処理終了から 8 時間後に因子を添加すると、因子存在下でも細胞は有糸分裂を完了し、細胞数が増加した。しかし、チミジン処理終了から 6 時間後（つまり、M 期開始より 2 時間前）に添加すると、細胞数は全く増加しなかった。これらの結果から、M 期に入る 2 時間前に因子を添加すると細胞は M 期を完了できなくなることが分かる。因子は有糸分裂の進行に必要な制御機構に阻害効果をもたらしている。

1) 江本, 藤井, 太和田. 生物物理学会第 39 回年会 (2001)

2) 前田, 江本, 今福, 太和田. 生物物理学会第 39 回年会 (2001) ビデオセッション

R.Maeta, Y.Emoto, and K.Tawada : Effects of spinal cord-derived growth inhibitor on MDCK cells synchronized to G1/S phase

3P202

サポニン処理培養心筋細胞ネットワークにおける SPOC の顕微解析

○井手 純一²、新原 岳雄¹、石渡 信一^{1,2}（¹早大・理工・物理、²生命理工）

培養心筋細胞は細胞ごとに異なる周期で拍動するが、ネットワークを形成すると互いに同調して拍動する。ネットワークを形成した心筋細胞内の筋収縮系がこの同調拍動にどのように寄与しているかを明らかにするためには、細胞膜を介して起こる電気的拍動の影響を取り除いた筋原線維の動きを調べ、ネットワーク中での収縮系の動的特性を明らかにする必要がある。

そこで我々はサポニンを使って細胞膜を穿孔し、細胞内を SPOC（自励振動）条件下におき、細胞内筋原線維の SPOC を観察、解析した。実験には、50 μ g/ml サポニンで穿孔し、その後 50mM カフェインで細胞内 SR から Ca²⁺ を放出した 9 日目のニワトリ胚培養心筋細胞を使用した。その細胞を Alexa 488 phalloidin で染色後 SPOC 溶液 (2.2mM ATP, 16.4mM ADP, 10mM MOPS, 14.2mM MgCl₂, 10mM Pi, 41mM KCl ; pH7.0) を加え、コンフォーカル顕微鏡で観察した。その結果、SPOC 特有の速い伸長相と遅い収縮相を持つ鋸歯状の波形が得られた。周期に関しては 13.7 秒から 3.1 秒の間に広く分布していた (n=20)。このばらつきは、細胞によって筋原線維の太さ、長さ、細胞内の状態が違うことに依っているものと考えられる。

また、この SPOC 溶液には Ca²⁺ キレート剤が入っていない為、細胞内に残った Ca²⁺ の影響も考えられる。そこで 2mM EGTA を加えた SPOC 溶液で同様の実験を行ったところ、SPOC は観察されなかった。これにより、上で述べた SPOC は Ca²⁺ の影響を受けていたことが示唆された。このことから Ca²⁺ 非存在下では SPOC 領域が Pi の少ない方へシフトすると考えられる。これらの性質を含めて、細胞ネットワークにおける SPOC 生成の溶液条件を探っている。

J.Ide, T.Shinbara and S.Ishiwata : Microscopic analysis of SPOC in a saponin-treated cardiac myocyte network

3P204

脊髄由来細胞増殖抑制因子は接着阻害誘導型アポトーシスを抑える

○江本 由美子、藤井 智子、太和田 勝久（九大院・理・生物）

われわれは、これまでに、豚脊髄の塩抽出物から細胞の活動を抑制する因子（脊髄由来増殖抑制因子）を発見し、この因子の細胞増殖抑制作用が因子濃度と作用時間に依存し、また細胞特異的であることを示した。この因子を MDCK 細胞の培養上清に添加すると、細胞増殖が停止する^が、薄い因子濃度の場合は、細胞は基質に接着したままで、培養上清を取り除いて新しい増殖培地を入ると増殖を再開する。添加する因子濃度を濃くするにつれて、細胞接着が弱まり、細胞が丸くなり、ついには基質からはがれて培地中に浮く。浮いた細胞を集めて因子を含む培地を除いて新しい増殖培地に入れ換えても、細胞は基質への接着や増殖を再開しない。

MDCK 細胞は基質に接着していないとアポトーシスを起こす（接着阻害誘導型アポトーシス）性質がある。この性質は in vitro では、細胞が接着できないようにあらかじめ表面処理したシャーレで MDCK 細胞を培養するとアポトーシスの指標であるラダー状 DNA 断片が生じることで示される。

目的と結果：高濃度の脊髄由来増殖抑制因子存在下で基質からはがれた MDCK 細胞は、因子作用による接着阻害が原因でアポトーシスを起こしている可能性がある。そこで我々は、高濃度の因子存在下で基質からはがれた MDCK 細胞の DNA 断片化を調べたが、ラダー状 DNA 断片は検出されなかった。さらに、細胞が接着できないようにあらかじめ表面処理したシャーレに本抑制因子存在下で MDCK 細胞をまき、その後のアポトーシスの発生を調べると、ラダー状 DNA 断片は検出されなかった。以上の結果から、本細胞増殖抑制因子は接着阻害誘導型アポトーシスを抑え、他のタイプの細胞死（ネクロシスではない）を起こすことがわかった。

Y.Emoto, T.Fujii and K.Tawada : Spinal cord derived growth inhibitor abrogates the anoikis of MDCK cells