3N0900

349kD 接着タンパク質 (Gli349) のガラス結合は、マイコプラズマ運動メカニカルサイクルの1ステップである

○上野山 敦子、楠本 晃子、宮田 真人（大阪市大院・理・生物地球）

寄生性の原核生物（＝バクテリア）であるマイコプラズマ (*Mycoplasma mobile*) は、ガラスなどの固形物の表面に接着し、はりついたまま滑るように移動する（滑走運動）。細胞には極性があり、細く突きだした頭の方に向かって毎秒2.5マイクロメートル（毎秒細胞長の4倍）で止まることなく動く。しかし、細胞表面にはべん毛や線毛などは見られず、またゲノム中にバクテリアの運動に関する遺伝子も、モータータンパク質も存在しない。滑走運動の機構は全く未知である。我々は以前、滑走変異株を解析することにより、細胞の首部分に局在する349kDの巨大タンパク質 (Gli349) が、*M. mobile* のガラスへの接着を担っていることを明らかにした。本研究では、Gli349のさらなる解析を行った。Gli349 特異的なモノクローナル抗体の細胞表面への結合を解析すると、Gli349は細胞あたり200-500分子、細胞の首周囲に均一に分布していた。次に、抗体の滑走に与える影響を調べた。滑走速度とガラス結合の両方が抗体の添加により、ほぼ同じ速度で指数的に阻害された。このことは、Gli349のガラスへの結合ステップが、滑走運動のサイクルに含まれていることを意味する。Gli349はN末端に膜貫通領域をもつ、酸性タンパク質 (pI 4.9) で、全域にわたって高いアスパラギン含量 (12%) を持っている。これらのことから、Gli349分子が膜から突きだした柔らかいフィラメント状構造物で、主に電荷を介してガラスに結合すること、またこのフィラメントがガラスを掴んだり離したりすることによって、滑走が起こっていることが考えられる。

A. Uenoyama, A. Kusumoto and M. Miyata : Glass binding step of a 349 kilodalton protein (Gli349) is involved in mechanical cycle of *Mycoplasma mobile* gliding.

3N0930

乳腺上皮細胞における機械刺激によるATP放出の機序

○古家 喜四夫¹、川口 久美¹、曾我部 正博²（¹ 科技団・細胞力覚、² 名大・医・生理）

細胞外ATPは多種多様な細胞、組織において情報伝達物質として働いていることがわかってきた。その受容体としては代謝型のP2Yとチャネル型のP2Xがあり、それぞれ10種近くのサブタイプがすでに明らかにされ、各種生体組織における分布、役割も明らかになりつつある。このようなATP情報伝達系の普遍性、重要性にも関わらず、情報の発信元にあたるATP放出の機構に関してはその経路を含め、まだほとんどわかっていない。培養乳腺上皮細胞は細いガラス棒でタッチしたり、シリコンゴム薄膜上に培養し細胞全体をストレッチするといった機械的刺激に応答し、ATP、UTP、UDPなどのヌクレオチドを放出する。これらヌクレオチドは拡散し、まわりの分泌細胞上のP2Y₂や筋上皮細胞上のP2Y₁型ATP受容体を活性化することにより細胞間Ca²⁺波を伝える。このATP情報伝達系は乳腺においてはミルク分泌の増強や腺胞収縮の制御に寄与していると考えられる。この培養乳腺上皮細胞を用い、主としてLuciferin-Luciferase発光法を用いたATP放出量の定量により以下の点を明らかにした。ATP放出は機械刺激による一過性の放出以外に細胞外Ca²⁺-free溶液(CFS)灌流によって持続的な放出がみられた。また刺激を加えなくとも自発性に放出していた。これらの放出量は少なく見積もって、自発性放出0.18 amole / cell・minute、CFSによる放出1.9 amole / cell・minute、そして一回のストレッチ刺激によるATP放出量は9.0 amole / cell・stretchであった。NPPB(ある種のCl⁻チャネルブロッカー)は自発性およびCFSによる放出は抑制したが機械的刺激による放出は抑制しないなどの薬理学的相違から、乳腺細胞におけるATP放出の経路としては2種以上の異なった経路が関与していることが示唆された。

K.Furuya, K.Kawaguchi and M.Sokabe : Mechanically induced ATP release in mammary epithelial cells

3N0915

軟らかいコラーゲンゲル上で特異的にみられる上皮細胞の極性形成と集団運動

○芳賀 永¹、平川 直¹、伊良原 史子²、林 雅名子²、高橋 正行³、川端 和重²（¹ 北大・院理・物理、² 北大・院理・生物科学、³ 北大・院理・化学）

胚の発生段階や傷の修復過程において、上皮系細胞は運動・増殖を繰り返しながら細胞間接着を形成することでシート状の組織を形成する。しかし、個々の細胞がどのような外的要因で運動・増殖し上皮シートを形成するのかなど、その組織形成のメカニズムには未だ不明な点が多い。

一般に、細胞はサイトカインのような生化学的な刺激を検知しながら分化・増殖・運動を行うことが知られている。最近の研究では、基質の伸展刺激や流れずり応力など物理的な刺激も細胞の形態形成・分化・増殖率などに顕著な影響を与えることが明らかとなってきた。本研究では、上皮培養細胞であるMDCK細胞を軟らかいコラーゲンゲル上に培養し、基質の弾性が上皮シート形成過程に与える影響について調べた。位相差顕微鏡を用いて生理的培養条件下におかれたコラーゲンゲル上のMDCK細胞を長期間にわたって観察した結果、ガラス基盤上では観察されなかった幾つかの特異的な性質が明らかとなった。コラーゲンゲル上の上皮細胞は、1) 隣接細胞との接触面積が大きい（つまり強固な細胞間接着構造を形成する）こと、2) コロニーを形成している細胞のみならず単一の細胞も培養シャーレ内で一軸方向に極性を形成すること、3) その一軸方向に協調的な集団運動を示すこと等が明らかとなった。さらに、これら極性形成や集団運動の方向が培養液の熱対流によって生じる流れの方向に沿う傾向があることも分かってきた。現在、軟らかいゲル上における上皮細胞の極性形成と集団運動の外的要因とそのメカニズムを調べている。年会では、コラーゲンゲル上の細胞とガラス基盤上における細胞の発現タンパクの違いなどもあわせて報告する予定である。

H. Haga, N. Hirakawa, T. Irahara, K. Hayashi, M. Takahashi and K. Kawabata : Cooperative Movement and Polarity Formation of Epithelial Cells on Soft Collagen Gel

3N0945

力学刺激により血管内皮細胞の接着斑のintegrinのendocytosisが活性化する

○河上 敬介^{1,2}、辰巳 仁史^{1,3}、早川 公英⁴、清島 大資^{1,2}、曾我部 正博^{1,4}（¹ 名古屋大院・医学系・細胞情報医学、² 名古屋大・医・保健、³ CREST・JST、⁴ ICORP・「細胞力覚」・JST）

血管内皮細胞に力学刺激を加えると細胞底面の接着斑はある部分では消失し、また別の部分では新たに作られる。本研究の目的は細胞底面接着斑の力学刺激に対する応答の分子機構を明らかにすることである。そのために細胞への局所的な力学刺激法を開発し、これに対する接着斑の応答機構をintegrinのライブ観察を通して解析した。培養血管内皮細胞の上面に、fibronectinをコートしたガラスビーズを接着させると、ビーズ周辺に接着分子integrinとactinの集積が起こり、そこから細胞底面の接着斑に連結するstress fiberが形成される。このビーズを数μm移動すると、stress fiberを介して細胞底面の接着斑へ力学刺激が伝わった。力学刺激の範囲と方向を調べるために、蛍光粒子入りpolyacrylamide gelの上に細胞を培養し、上記と同じ力学刺激を与えて、蛍光粒子の移動から細胞底面へ伝わった力を調べたところ、刺激点から約20 μmの範囲において細胞底面がビーズに向かって牽引されていた。蛍光標識したβ1 integrin抗体で内皮細胞を処理すると、integrinの動態をライブ観察ができる。この抗体標識した細胞にビーズを介して局所的力学刺激を与えると、牽引刺激が負荷された細胞底面領域に分布する接着斑の消失が起こることがライブ観察された。接着斑の消滅の原因としてintegrinのendocytosisが考えられる。そこで、細胞膜を色素(FM4-64)で染色してライブ観察すると、まさに力学刺激が負荷された細胞底面の領域において、endocytosisの指標となるFM4-64の陽性スポットが多数出現することが分かった。またこれらのスポットはclathrin抗体による染色でも陽性であった。以上のことから、細胞底面の接着斑に力学刺激が伝わると、integrinのclathrin依存的なendocytosisが活性化されて接着斑の消失が起こることが強く示唆された。

K. Kawakami, H. Tatsumi, K. Hayakawa, D. Kiyoshima and M. Sokabe : Endocytosis of Integrins is Facilitated by Mechanical stimulus Applied on the Focal Contact in Endothelial Cells