B549

伸縮刺激に対する繊維芽細胞の張力回復現象

○水谷 武臣¹、芳賀 永²、川端 和重² (¹ 北大・院理・物理、² 北大・院理・生物科学)

重力・流れなどの外力は細胞の運動・増殖・形態などに強い影響を与えることが知られている。これまで生化学シグナルの伝達に着目した研究が進められている。しかし、生化学シグナルの伝達だけでこれらの現象を説明するには到っていない。我々はこれまで、力学量測定用走査型プローブ顕微鏡(力学SPM)を用いて生きた細胞のかたさ測定を行ってきた。細胞のかたさが運動に伴って急激に変化することから、かたさはストレスファイバーの張力を主に反映していること、及び、この張力によって細胞運動時における細胞前部の伸長と後部の収縮の同期が計られるというモデルを提案している。本研究の目的は、細胞を伸縮させることによって細胞内の張力を変化させ、細胞がどのように張力変化に対して応答するのかを明らかにすることである。弾性基盤を用いて繊維芽細胞(NIH-3T3)を伸張・収縮させた場合のかたさの時間変化を力学SPMにより測定した。その結果、8%収縮させると細胞のかたさは急激に減少し、その後緩やかに増加しながら一定値になった。一方、8%伸張させるとかたさは急激に増加し、その後緩やかに減少しながら一定値になった。伸縮直後のアクチンフィラメントを固定染色し、その構造を観察したところ、フィラメントのたるみや顕著な破壊等は確認されなかった。よって、基盤収縮後でもフィラメントは伸張状態にあるといえる。単純な粘弾性体であれば、収縮後の張力残存下で自らさらに張力を増加させることはない。これらの結果から、伸張・収縮に対する細胞のかたさ応答は、アクチン繊維の弾性的変化に起因する **瞬間的応答** と、細胞内で一定の張力状態を保つ為の **長時間的応答** が存在するといえる。本年会では、GFP-アクチンを用いることで、伸縮前後のアクチンネットワーク構造の変化をリアルタイムで観察した結果も合わせて報告する予定である。

T.Mizutani, H.Haga and K.Kawabata : Recovery of Tension from Stretching or Shortening Stress in Fibroblasts

B551

細胞内アクチンファイバーの再構築を引き起こすひずみ量の検討

松尾 守¹、佐藤 克也²、○安達 泰治³、富田 佳宏³ (¹ 神戸大院・自然科学・機械工学、² 神戸大院・自然科学・システム機能科学、³ 神戸大・工学部・機械)

細胞内のアクチンファイバー構造は、周囲の力学環境の変化に伴い、その構造が再構築されることが知られている。例えば、細胞外基質のひずみ解放に伴い、アクチンファイバー構造が消失することが報告されている(1)。しかしながら、これまでの報告では、細胞を固定、染色したアクチンファイバー構造を観察しているため、その構造変化過程の詳細は未だ明らかでない。

本研究では、骨芽細胞様細胞を単軸方向に伸張させた状態のシリコーン膜上に培養した。その後、シリコーン膜の引張りひずみを解放し、細胞に対して圧縮ひずみを与え、それに伴うアクチンファイバー構造の変化を観察した。実験には、GFP-Actin DNAを導入した細胞を用い、アクチンファイバー構造を可視化した。

実験の結果、シリコーン膜の引張りひずみ解放前は連続していたアクチンファイバー構造が、シリコーン膜のひずみ解放から約15分後には、断続的な構造に変化していることが観察された。これは、シリコーン膜のひずみ解放によって、アクチンファイバー構造が圧縮された結果、その構造が再構築される途中過程として、脱重合している様子を捉えたものであると考えられる。細胞に対して24%の圧縮ひずみを与えた場合には、前述のアクチンファイバー構造の変化が観察されたが、一方、16%の圧縮ひずみを与えた場合には、アクチンファイバー構造に変化は観察されなかった。この結果は、細胞内のアクチンファイバー構造の再構築を開始させるひずみの大きさに閾値が存在する可能性を示唆するものである。

(参考文献)

(1) Costa, K. D. et al., Cell Mobility and the Cytoskeleton, 52, (2002), 266-274.

M. Matsuo, K. Sato, T. Adachi, Y. Tomita : Effect of strain magnitude on reorganization of cytoskeletal actin fiber

B550

周期伸張刺激によるストレスファイバーの消失にはADF/cofilinが関与する

○早川 公英¹、辰巳 仁史^{2,3}、曾我部 正博^{1,2} (¹ 科技団・ICORP・細胞力覚、² 名大・医・第2生理、³ CREST)

細胞に20%、1Hzの一軸周期伸張刺激を負荷すると、不定形であった細胞が1-2時間程度で伸張軸の直交方向に伸張した紡錘形に変化して配向する。これに先立って、刺激開始後1-3分以内にストレスファイバー(SF)が消失し、15分程度で伸張軸に直交する新しいSFが形成される。今回我々は、機械刺激によるSF消失の分子機構を探る目的で、digitonin処理により細胞膜の透過性を上昇させたセミインタクト細胞を調整した。この細胞にmouse brain extractの存在化で周期伸張刺激を負荷すると、SFが消失することが分かった。一方extract非存在下ではSFの消失は起こらなかった。この結果は周期伸張刺激負荷によるSF消失にextract中の因子が関与していることを示している。アクチンフィラメントの切断活性を持つアクチン結合タンパク質であるgelsolinとADF/cofilinがその因子の候補として考えられた。そこでgelsolinとcofilinを通常の細胞外液に添加し、伸張刺激によるSFの変化を観察した。gelsolinの添加では伸張の有無に関わらずSFはほとんど影響を受けなかったが、cofilin存在化では伸張刺激によってSFの消失が観察された。同濃度のcofilin処理のみ(伸張刺激なし)ではSFは消失しなかった。以上の結果から、周期伸張刺激がcofilinによるアクチン切断/脱重合を促進することが示唆された。MLCK阻害剤ML9或いは、actomyosin-ATPase阻害剤BDMで処理した細胞ではcofilin添加により伸張刺激なしにSFが消失した。したがって周期的伸張刺激下では、伸張状態から自由長に復帰する際の一時的張力消失がcofilinによるSF崩壊を促進することが示唆された。

K.Hayakawa, H.Tatsumi and M.Sokabe : ADF/cofilin is involved in stress fiber disassembly by periodic stretching

B552

血管内皮細胞における力学刺激による接着斑崩壊の分子機構

○清島 大資^{1,2}、河上 敬介^{1,2}、辰巳 仁史^{1,3}、早川 公英⁴、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)

培養血管内皮細胞の上面にfibronectinでコートしたガラスビーズを接着させると、ビーズ周辺にintegrinとactinの集積が起り、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。このビーズを移動すると、stress fiberを介して細胞底面の接着斑へ局所的な力学刺激が伝わる。 β 1 integrinの細胞外ドメインを認識する抗体(Alexa488結合)で血管内皮細胞を染色し、ビーズを数 μ m移動したときの一つ一つのintegrinのclusterの動態を近接場光顕微鏡によりライブ観察を行った。力学刺激が負荷された細胞底面領域に分布するintegrin-clusterは1分以内に消失(崩壊)した。endocytosisの指標となる色素(FM4-64)で細胞膜を染色し、力学刺激下でライブ観察すると、integrin-clusterの崩壊がおこる細胞部位でFM4-64の細胞内への取り込みが増加していた。また、細胞内に取り込まれたintegrin-clusterの多くはendocytosisのマーカーであるclathrinと共局在していた。このことから、力学刺激によるintegrin-clusterの崩壊はclathrin依存的なendocytosisによるものと考えられた。このintegrinのendocytosisの約半数は、tyrosine phosphataseの阻害剤であるPAO(100 nM)により抑制されたので、接着斑構成蛋白の脱リン酸化が関与していることが示唆された。以上のことから、stress fiberを介して接着斑に力が加わると、接着斑構成蛋白の脱リン酸化が起り、clathrin依存的なendocytosisによってintegrinが細胞内に取り込まれると考えられた。実際にはstress fiberの消失が先行するので、むしろ接着斑への力学負荷の消失が力学刺激依存的なendocytosisの原因と思われる。この過程は内皮細胞における伸張依存性の形態変化の初期機構と考えられる。

D.Kiyoshima, K.Kawakami, H.Tatsumi, K.Hayakawa and M.Sokabe : Molecular mechanism of the breakdown of focal contacts by mechanical stimulus in endothelial cells.