2P201

パターンニング培養基質による細胞骨格形成制御とその力学特性解析

○小国 晶子、原田 伊知郎、赤池 敏宏（東工大院・生命理工）

近年、細胞が周囲の基質の固さの違いや、自ら発生させた力などの力学的情報を認識し、応答していることが分かっている。細胞移動、増殖、分化、細胞骨格の形成など、多くの生体内の現象が力学的情報への応答と関わっている。しかし、どのような機構で力学的刺激が細胞機能発現につながるのかはほとんど明らかになっていない。細胞は極性を持ち、細胞骨格を通じて局所的に力が分布するため、個々の接着斑にかかる負荷の大小に依存して細胞内に伝達されるシグナルも異なることが示唆される。このような細胞内の空間的に様でない局所的な力学的刺激の解析は、現存する生化学的手法では非常に困難である。このことから、細胞全体の平均としてではなく、細胞の中の局所的な力学的情報を知ることを目的に、これまで光ピンセットなどのマニピュレーション等を用いて微小領域での力学的情報伝達を調べることが積極的に行われてきた。しかし、培養細胞は時々刻々と遊走し、それに伴う形態変化が起こるため、力の局所的な解析は、どの状態の細胞の、どの位置で行った結果であるかを常に注意する必要がある。

以上のような背景から、本研究では接着斑と同じサイズとみなすことができる数マイクロオーダーの接着基質パターンニングをすることを試みた。この手法により接着斑と細胞骨格の配置を制御することが可能である。さらに原子間力顕微鏡 (AFM) 観察と組み合わせることにより、接着斑部位 1 つ 1 つが発生させる力と、細胞骨格の物性に関する知見が得られることが期待できる。

今回は、基質として平面上にフィブロネクチンをパターンニングしたものの、3次元的に細胞が弾性を感知することができるゲルをパターンニングしたものの等作製と、それらの基質上での細胞のふるまい、特に細胞が基質に対して発生させる力について解析を行っているものでそれらを報告する。

A Oguni, I Harada and T Akaike : Analysis of mechanical characteristics of cytoskeleton using micropatterned substrate.

2P203

ミオシン調節軽鎖のリン酸化に基づいた細胞の張力ホメオスタシス機構

○水谷 武臣¹、芳賀 永¹、高橋 正行²、川端 和重¹（¹ 北大院・理・生物科学、² 北大院・理・化学）

生命体には、外界からの影響を抑え、ある最適な状態に保つ、ホメオスタシスと呼ばれる機構が存在する。例えば、恒温動物における体温調節機構では、外界の気温上昇によって体温が上昇すると、自律神経から体温をさげる命令が下り、その結果、適切な体温が保たれる。ホメオスタシス機構を明らかにすることは、生物の成り立ちを理解する上で非常に重要である。

昨年の年会で我々は細胞内のアクチンストレスファイバーに働く張力にホメオスタシス機構が存在することを示した(張力ホメオスタシス)。繊維芽細胞 (NIH-3T3) を弾性基板上に培養し、その基板を伸長もしくは収縮させることで細胞内の張力を変化させ、張力の時間変化を力学走査型プローブ顕微鏡 (SPM) で測定した。その結果、細胞内張力を反映した硬さは、伸長と同時に増加し、収縮と同時に減少した。その後、硬さは変形前の値へと徐々に回復し、120 分程度で一定値に落ち着いた。しかしながら、張力ホメオスタシスがどのような機構で起こるのかは明らかでない。本研究の目的は、張力ホメオスタシス機構を解明することである。

生きた細胞内において、ストレスファイバーにかかる張力はミオシン調節軽鎖のリン酸化によって制御されている。そこで我々は、弾性基板上の繊維芽細胞を伸長し、10 秒、1、30、120 分経ったのち、細胞を固定し、リン酸化されたミオシン軽鎖に対する抗体を用いて細胞内の空間分布を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、伸長直後にストレスファイバー上のリン酸化ミオシンが増大し、その後脱リン酸化が進み、120 分後には伸長前の状態に戻っていた。これらの結果から、張力ホメオスタシスはミオシン調節軽鎖のリン酸化によって制御されていると考えられる。

T. Mizutani, H. Haga, M. Takahashi, K. Kawabata : Tensional Homeostasis of a Single Cell Regulated by Phosphorylation of the Myosin Regulatory Light Chain

2P202

温度応答性培養基質を用いた細胞形態制御による骨格形成変化の解析

○八巻 和正、原田 伊知郎、赤池 敏宏（東工大院・生命理工）

細胞が外部から機械刺激を受容すると細胞骨格の再編成が起き、発現タンパク質の変動など細胞機能が変化することが知られている。機械刺激は細胞接着部を介して細胞骨格に伝わることから、細胞外マトリックス (ECM) の生理的差異だけでなく、硬さ等の物理的要因も細胞にとって重要な刺激になると考えられる。細胞がより硬い接着基質を好む "durotaxis" という現象から、細胞は外部からの機械刺激を積極的に受容して機能を制御していることが示唆される。だが細胞がどのように機械刺激を受容しているのか等の詳細な機構はわかっていない。この機構を探るために、シリコンゴムを接着基質としたストレッチ実験等が精力的に行われてきた。シリコンゴムを用いたストレッチ実験では多くの細胞に同時に機械刺激を与えることができるため、未知のタンパク質の挙動を生化学的手法をあわせて追従することが可能な点で優れている。しかし一軸方向に足場に負荷を加える場合、その方向に垂直な方向ではシリコンゴムが収縮するため細胞に働く力が緩和してしまう。そのために生化学的手法を併用する場合、両者の効果によって足場からの負荷の効果が打ち消されてしまう可能性が考えられる。

本研究では温度応答性高分子ゲルを培養基質とした新規培養系を確立し、細胞に等方的な張力を加えた時の細胞応答を解析することを目指す。培養基質には、温度応答性高分子ゲルである *N*-イソプロピルアクリルアミドをベースとしたものを用いた。これまでにこの培養基質を用いることで、NIH3T3 等の繊維芽細胞に等方的な負荷を加えることが可能であることを確認してきた。今回の報告では、この培養基質により等方的な負荷を加えた場合とシリコンゴムにより一軸方向に負荷を加えた場合で、細胞骨格の変化にどのような差が見られるのかを検討した。

K Yamaki, I Harada and T Akaike : Analysis of reorganization of cytoskeleton by controlling cellular morphology using the temperature-sensitive culture substrate

2P204

フェムト秒パルスレーザー誘起による A253 細胞内カルシウム濃度上昇

○谷村 暢子¹、中林 誠一郎¹、山下 俊一²（¹ 埼玉・理・化学、² 日大・医・生理）

カルシウムは細胞内外で、情報伝達物質としての重要な役割を担っている。HeLa セルにフェムト秒パルスレーザー (fs-レーザー) 照射を照射すると細胞内カルシウム濃度上昇が起こることが報告されていた。本稿では、ヒト顎下腺管上皮由来の A253 細胞に fs-レーザー照射を照射すると細胞内のカルシウム濃度上昇のみならず、カルシウム濃度上昇の細胞間の伝播が観測された。各細胞でのカルシウム濃度上昇の時間変化を図 1 に示す。ギャップジャンクションの阻害剤であるヘプタノール存在下で実験を行ったところ、ヘプタノール (300 μ M) の有無にかかわらずカルシウム濃度上昇の周辺細胞への伝播は常に確認された ($n=3$)。この結果は、細胞間のカルシウム濃度上昇の伝播にギャップジャンクションが寄与しないことを示唆する。平均出力 80mW のレーザーのロングパルス光 (CW) と、fs-レーザー光をそれぞれ同一条件下で照射したところ、CW ではほとんどの細胞でカルシウム濃度上昇が起こらず、fs-レーザー照射したときのみ、蛍光強度比は有意な変化を示した。また、照射パルスレーザー尖頭値が 100mW 以下の時には、カルシウム濃度上昇は誘起されず、120mW 以上で顕著に観測された。

図1. フェムト秒パルスレーザーによる細胞内カルシウム濃度上昇の細胞間伝播。フェムト秒パルスレーザー照射により細胞内カルシウム濃度が上昇し、その信号が細胞間伝播した。

N. Tanimura, S. Nakabayashi, T. Yamashita : Femtosecond Pulsed Laser Induces an Intracellular Ca^{2+} Transient and Its Intercellular Propagation in the A253 cell line