2SD03

アクチン細胞骨格の構造再構築を調整する力学因子の評価

○佐藤 克也¹、安達 泰治² (¹ 山口大・工学部・機械工、² 京大院・工学研究科・機械理工学)

アクチンフィラメントを主な構成要素とするストレスファイバーは、細胞内の張力が作用している場所に形成されると言われており、力学環境の変化によってその構造が動的に再構築されることが知られている。この構造再構築を調節する力学因子の一つとして、アクチンフィラメントに作用する張力が挙げられている。著者らは、ストレスファイバーに作用する張力が、同構造の再構築機構において果たす役割について検討した。まず、GFP-Actin を発現させた培養骨芽細胞を用いて、ストレスファイバーの動的挙動を観察した。マイクロピペットにて Trypsin/EDTA 液を局所的に吹きかけることで、細胞の焦点接着の一部を剥離させ、細胞に局所収縮を生じさせた。この局所収縮によって、単一細胞内において、張力が解放されるファイバーと、張力が保持されるファイバーが共存する状況をつくり、その後のストレスファイバーの構造変化を観察した。その結果、張力が解放されたファイバーのみが選択的に消滅することが示された。さらに、このストレスファイバーの消滅を引き起こす力学量を定量的に評価した。シリコンシート上に細胞を培養し、シリコンシートを変形させることで細胞に圧縮ひずみを与え、ストレスファイバーに作用する張力を解放した。そして、張力解放後のストレスファイバー構造の量を観察し、ストレスファイバーの消失を引き起こす力学量としてひずみの大きさを検討した。その結果、細胞全体に生じるひずみ量ではなく、ストレスファイバー自体に生じるひずみ量が重要であることが示され、ストレスファイバーの消失を引き起こすひずみ量は-20%であると見積もられた。

K. Sato, T. Adachi : Evaluation of mechanical factor that modulates the reorganization of actin cytoskeletal structure

2SD05

張力ホメオスタシス: 伸縮刺激に対する細胞内張力の安定化機構

○水谷 武臣¹、芳賀 永¹、高橋 正行²、小山 芳一³、川端 和重¹ (¹ 北大院・理・生物科学、² 北大院・理・化学、³ 北大院・医・生体機能学)

これまでに我々は、細胞内のアクチンストレスファイバーに働く張力に安定化機構が存在することを報告してきた。繊維芽細胞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、張力の変化を力学走査型プローブ顕微鏡 (M-SPM) で測定した。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、数十分後に一定値に落ち着いてきた。本研究の目的は、細胞内張力の安定化機構を解明することである。

ストレスファイバーにかかる張力はミオシン調節軽鎖 (MRLC) のリン酸化によって制御されている。さらに、MRLC のリン酸化は結合したリン酸の数によって、0、1 もしくは 2 リン酸化の 3 つの状態をとり、1 よりも 2 リン酸化の方がミオシンの ATPase 活性が高いことが知られている。そこで我々は、細胞内張力の安定化機構が MRLC に結合したリン酸の数によって調節されるとの仮説を立てた。

1 リン酸化はできるが 2 リン酸化は出来ない MRLC を発現させた細胞を伸張し、M-SPM で細胞内張力の時間変化を測定した。その結果、野生型の細胞で見られた細胞内張力の変化は見られなかった。次に、野生型の細胞を伸長もしくは収縮し、数分もしくは数十分経ったのち、細胞を固定し、リン酸化 MRLC に対する抗体を用いて細胞内の空間分布を観察した。伸長直後、ストレスファイバー上に 2 リン酸化した MRLC が増大し、その後脱リン酸化が進み、数十分後には伸長前の状態に戻っていた。また、収縮直後に 1 リン酸化した MRLC が減少し、その後リン酸化が進み、数十分後には収縮前の状態に戻っていた。

これらのことから、細胞内張力の安定化機構は MRLC に結合したリン酸の数によって制御されると言える。

T.Mizutani, H.Haga, M.Takahashi, Y.Koyama and K.Kawabata¹ : Tensional Homeostasis: Stabilization of Intracellular Tension Responding to External Stress

2SD04

心筋細胞の拍動同期とその制御

○金子 智行、小島 健介、安田 賢二 (東大・院総合文化)

我々は細胞が集団を作ることによって、新しい機能や非線形な現象が生じる集団化効果 (コミュニティ・エフェクト) の解明を目指している。コミュニティ・エフェクトの解明にとって、新生児の心筋細胞は自動能を有しており、その拍動の様子を観察するだけで細胞内部の状態変化をモニターすることが可能なため、長期にわたる連続観察によって変化を計測するには非常に適したモデルである。心筋細胞間の拍動同期は主に細胞間接着によりギャップジャンクションが形成され電気的に結合することによると考えられている。そこで、細胞間の接着をアガロースマイクロチャンバー (AMC) を用いて制御することにより、任意の細胞とのみ結合させることを試みた。アガロースは無毒性で細胞非接着性であり、温度を上げるとゾル化し、下げるとゲル化する性質を持っている。この特性を利用し、基板上に細胞接着のための細胞外基質を塗布し、その上からゾル上のアガロースを滴下し、スピンコートすることにより平らで薄いアガロースゲルを作成し、波長 1064nm と 1480nm のレーザを用いて任意の部位を融解させることにより AMC を作成した。

この AMC を用いて新生ラット心筋細胞の拍動リズムの同期過程の観察や繊維芽細胞等を介した心筋細胞の拍動同期の制御を試みた。心筋細胞同士の拍動の同期は心筋細胞同士が物理的に接触してから数十分後に突然拍動が同期する現象が観察された。さらに、接触する心筋細胞数を徐々に増加させていくと、心筋細胞の拍動リズムが安定していくことがわかった。しかし、心筋細胞間に心臓由来の繊維芽細胞を配置し、繊維芽細胞を介して心筋細胞の拍動を同期させると、拍動が同期したり同期しなかったりを数十分繰り返した後に心筋細胞の拍動が安定して同期する現象が観察された。これらのことから心筋細胞に関するコミュニティ・エフェクトの知見をはじめて得ることに成功した。

T. Kaneko, K. Kojima and K. Yasuda : Control and measurement of the beating synchronization in cardiomyocytes

2SD06

弾性体としての細胞外マトリクスと細胞との力学的相互作用

○原田 伊知郎、赤池 敏宏 (東工大・生命理工)

生体組織において細胞は様々な細胞外マトリクス (ECM) を識別し、それらに接着して従来持つ機能を制御していることが多く明らかにされている。しかし、単純に ECM をコートした接着基質を細胞に提供するだけでは細胞の機能を十分に引き出すことができないことも示されつつある。生体中にある細胞は細胞外マトリクスの個々の分子を認識しているだけではなく、それら分子の物理的な状態を認識している可能性が報告されている。特に、細胞が柔らかい基質から堅い基質へと移動する "durotaxis" と呼ばれる現象は、細胞が基質の力学的な強度を認識する分子機構が存在することを意味する。我々は、細胞がどのようなメカニズムによって接着している基質の力学的な強度を認識しているかを明らかにすることを目的に様々な力学的強度を有する基質に細胞を培養し、細胞の振る舞い、特に細胞の運動性を中心に解析を行ってきた。その結果、1. 柔らかいゲル上において、細胞は互いの基質に及ぼす牽引力を検知して遊走するが、走化性はシャーレ上の細胞と同等であること、2. ゲル上に培養された細胞のアクチンフィラメントも固いシャーレ上にある細胞と同等にストレスファイバー状の構造が形成されていること、3. 接着基質の力学的強度が小さくなるとともに細胞の接着斑構造が細かいものになり Fibrillar Adhesion, Focal Contact, Focal Adhesion の区別が顕著でなくなってくる等が明らかになってきた。現在接着基質の力学的強度に依存した接着斑形成の動的な性質の違いと、そこに局在各種タンパクの成分比や、各種阻害剤を添加したときに観察される接着斑構造変化について新しい知見が得られつつあるので、それらの結果について報告する。

I.Harada and T.Akaike : Mechanical Interaction between Cell and Extracellular Matrices as Elastic Substrate