435 FRAP を用いた力学刺激負荷平滑筋細胞のアクチンダイナミクスの観察

Actin dynamics in smooth muscle cells in response to mechanical stimulation using FRAP technique

○ 伊藤 一志 (東北大・工)
正 大橋 俊朗 (東北大・工)

正 坂元 尚哉 (東北大・工)
正 佐藤 正明 (東北大・工)

Kazushi Ito, Tohoku University, Aoba-yama 6-6-01, Sendai 980-8579
Naoya SAKAMOTO, Tohoku University
Toshiro OHASHI, Tohoku University
Masaaki SATO, Tohoku University

Key Words: FRAP, actin, α -actinin, anomalous diffusion

1. 緒言

生体内において細胞はせん断応力や伸展刺激などの様々な力学刺激に曝されている。力学刺激を負荷された細胞において、内部の張力が変化し細胞内小器官であるストレスファイバーが発達および消失することが報告されている^[1]。このことから細胞が周囲の力学刺激に適応する上でストレスファイバーの構築は重要であると考えられる。

ストレスファイバーはアクチンフィラメントや架橋タンパク質であるミオシンフィラメント、 α -アクチニンなどから構成されている束状の構造物である。ストレスファイバーを主に構成しているアクチンフィラメントは単量体アクチンが繊維状に連なって形成されている。細胞内でアクチンフィラメントが再構成される場合、アクチンフィラメントは脱重合し、単量体アクチンとなる。その後、単量体アクチンは拡散によって、アクチンフィラメント形成部位へ移動する。この過程において、単量体アクチンおよびアクチンフィラメントは架橋タンパク質をはじめとした複数のタンパク質の影響を受ける。例えば、アクチンフィラメントへの α -アクチニンの結合はアクチンフィラメントの長さを調節していることが報告されている^[2]。このことから、アクチンだけでなく架橋タンパク質の挙動もストレスファイバーの構築に重要な役割を担っている可能性がある。しかしながら、力学刺激によって引き起こされる細胞内張力の変化がアクチンおよび架橋タンパク質の拡散現象に与える影響についてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) を用いて、細胞内張力が変化した細胞でのアクチンおよび α -アクチニンの挙動を調べた。

1. 実験方法

2. 1 細胞培養および遺伝子導入

試料として、ウシ大動脈由来培養平滑筋細胞を用いた。継代培養には DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) に 10% ウシ胎児血清および抗生物質を添加した培養液を用いた。培養フラスコ上でコンフルエントになった細胞を継代の際、内径 35mm のガラスベースディッシュ上に播種した。実験には継代数 3~9 代目の細胞を使用した。

アクチンおよび α -アクチニンを蛍光標識するため、リポフェクション法により EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)-アクチンおよび EGFP- α -アクチニンプラスミドベクターを細胞に遺伝子導入した。ガラスベースディッシュ上

に播種した細胞が 50%コンフルエントの状態 で遺伝子導入を行った。遺伝子導入後 48~72 時間静置培養した細胞を実験に用いた。

2. 2 基質接着部の解除

本研究では、細胞内張力を変化させる手法として出口らの方法^[3]を参考にした。細胞への刺激方法を Fig.1 に示す。マイクロフォーシにより先端形状を加工したガラス製マイクロニードルを用いて、細胞の基質接着部の一部を剥離させた。剥離後、基質接着部は細胞中心部へ収縮した。実験を行う際、ガラスベースディッシュを共焦点レーザー走査型顕微鏡のステージに固定した。また、実験中ステージインキュベータを用いて培地の温度を 37℃ に保った。

2. 3 FRAP 実験

細胞収縮後、収縮部付近を通過して細胞を横断するようにブリーチングを行った。使用したレーザー光の波長は 488nm, ブリーチング幅は 5 μm であった。Fig.1 に示すようにブリーチングした領域を等間隔で三分割し、細胞収縮部に最も近い領域から ROI1~ROI3 と定義した。5 秒毎に取得した画像から画像閲覧ソフト Fluoview の解析機能を用いて各領域において蛍光強度変化を計測し、輝度回復曲線を得た。その後、回復曲線から時定数を算出した。

3. 結果及び考察

フォトブリーチングを行った細胞の蛍光画像を Fig.2 に示す。ブリーチング後、時間経過に伴いアクチンおよび α -アクチンともに蛍光強度の回復が確認された。アクチンおよび α -アクチンにおける回復曲線の時定数を Fig.3 に示す。静置培養下では、ROI1 と ROI3 でのアクチンおよび

Fig.1. Schematic diagram of mechanical dislodging and photobleaching.

α -アクチニンの時定数に有意な差は見られなかった。基質接着部を剥離させた細胞では、ROI3 に比べて ROI1 においてアクチンの時定数が有意に低かった。一方、 α -アクチニンの時定数は ROI3 に比べて ROI1 において有意に高かった。このことから基質接着部の剥離を伴わない箇所と比べて基質剥離部付近でアクチンの拡散速度が大きく、 α -アクチニンの拡散速度は小さくなることが示唆された。これには基質接着部剥離により生じた細胞内張力の変化がアクチンおよび α -アクチニンの異常拡散を促している可能性が考えられる。

細胞内張力を減少させた場合、細胞はストレスファイバーを一時的に分解させることが報告されており^[4]、本研究でも基質接着部剥離の際、ストレスファイバーがアクチンフィラメントと α -アクチニンに分解していると考えられる。よって、本研究での拡散現象は分解したアクチンフィラメントと α -アクチニンの挙動によるものであると考えられる。また、従来の報告で、細胞内張力を局所的に変化させた細胞は張力変化部位でストレスファイバーを再構成させることが報告されている^[5]。さらに、ストレスファイバーの構築は、G-アクチンの重合ではなく、アクチンフィラメントの結合によって生じていることが示唆されている^[6]。このことから、細胞内張力が変化した場合、ストレスファイバーから分解されたアクチンフィラメントが集結し、ストレスファイバーが再構成されていると考えられる。したがって、剥離部でのアクチンの異常拡散はストレスファイバーの局所的な再構成におけるアクチンの挙動を示している可能性がある。

本研究において α -アクチニンの拡散傾向はアクチンと異なっていた。現在のところ、この詳細なメカニズムは不明である。今後、アクチンおよび α -アクチニンの構造変化を調べることににより、今回観察された異常拡散メカニズムを明らかにする予定である。

4. 結言

本研究ではFRAPによって細胞内張力が変化した場合でのアクチンおよび α -アクチニンの挙動を調べた。その結果、細胞の局所的な収縮がアクチンおよび α -アクチニンの蛍光回復に影響を与えた。このことから細胞内張力の一時的な減少によるアクチンおよび α -アクチニンの異常拡散はストレスファイバーの局所的な再構成に関わっている可能性が考えられた。

参考文献

- [1] Hirata H et al., JSME Intl J Series C 47, 926-969, 2004.
- [2] Biron D and Moses E, Biophys J 86, 3284-3290, 2004.
- [3] Deguchi S et al., Mol Cell Biomech 2, 205-216, 2005.
- [4] Costa et al., Cell Motil Cytoskeleton 52, 266-274, 2002.
- [5] Wang N et al., An J physiol cell physiol 287, 440-448, 2004.
- [6] Machesky LM and Hall A, J Cell Biol 138, 913-926, 1997.

Fig.2. Representative fluorescence images of (a) EGFP-actin and (b) α -actinin obtained by fluorescence recovery after photobleaching experiments on individual BASMC. The arrows indicate photobleached bands. The circles show retracted regions. Bars = 30 μ m.

Fig.3. Time constants of fluorescence recovery of (a) actin and (b) α -actinin in ROI 1 and ROI 3.