

caged 細胞内シグナル伝達物質を用いた gap 結合の機能解析

杉山 未来 (筑波大学 生物学類 4年) 指導教官: 斎藤 建彦 (筑波大学 生物科学系)

[導入・目的]

gap 結合は細胞間コミュニケーション経路の1つであり、隣接する細胞同士はその二枚の細胞膜を貫くチャンネルを介してイオンや化学物質の細胞間移動をする事ができる。当研究室では、イモリ網膜の発生・再生系、及びニワトリ網膜発生過程における gap 結合について研究が行われており、gap 結合を構成するサブユニットであるコネキシンの発現が、発生・再生過程において変化することがわかっている。このことは、gap 結合が網膜の再生・発生過程において何らかの機能をもつことを示唆している。私はこの gap 結合をどのようなシグナル伝達物質が通り、またそれらがどのように制御されているのかについて興味を持ち、caged 化合物を用いて実験を行った。

caged 化合物は生理活性物質を化学修飾して活性をなくした物質で、紫外光を照射することでその保護基をはずし、これにより必要な物質を局所的に遊離させること (uncage) ができる。そこで、私は caged 化合物を用いて細胞内にシグナル伝達物質を遊離させ、その gap 結合を介した動態をカルシウム測光により解析するという実験系の確立を目的とした。

[材料・方法]

1. 標本

先行研究において、イモリやニワトリの色素上皮細胞ならびに発生初期網膜では多くの gap 結合の存在が確認されていることから、以下の標本を用いた。

- ・発生 5 日胚のニワトリ網膜細胞の単離培養標本
- ・発生 4.5 日胚のニワトリ色素上皮細胞の単離培養標本
- ・ニワトリ発生網膜のスライス標本
- ・ニワトリ発生網膜のホールマウント標本
- ・イモリ正常網膜のスライス標本
- ・イモリ正常網膜のホールマウント標本

2. 試薬

caged 化合物は、caged カルシウムとして o-nitrophenyl EGTA, AM, caged IP3 として D-myo-inositol 1, 4, 5-triphosphate, P4(5)-(1-(2-nitrophenyl)ethyl) ester, tris(triethylammonium salt) を用いた。また、蛍光カルシウム指示薬として fluo-3, AM を用いた。

3. caged 化合物と蛍光指示薬の細胞内への導入

① caged カルシウム

試料を o-nitrophenyl EGTA, AM 10 μ M, fluo-3, AM 10 μ M, Pluronic F127 0.04% を生理食塩水に溶かした溶液に入れ、室温または 37 度 \cdot 60 ~ 80 分間ロードした後、生理食塩水で洗い 30 分おいた。

② caged IP3

caged IP3 の細胞透過体は市販されていないので、細胞内電極による圧、あるいは電流による注入を行った。

4. レーザーフォトリシスによる caged 化合物の uncage およびカルシウム測光

レーザーフォトリシスシステムおよびレシオシステム

(浜松ホトニクス) を用い、選択した位置に YAG レーザーで 355nm 波長を 4 ~ 6ns 照射し、励起波長 400 ~ 490nm、蛍光波長 535nm で fluo-3 の蛍光を測定しカルシウムイオン量の変化をリアルタイムで解析した。

5. gap 結合阻害剤の投与

gap 結合の阻害剤であるオクタノール 100 μ M を、約 1 分間還流投与した。

[結果・考察]

caged カルシウムを種々の標本に取り込ませ、細胞内へのカルシウムの放出と広がり測定した。その結果、使用した全ての標本で caged カルシウムのレーザー照射による uncage に成功し、細胞内カルシウムイオンの上昇が観察された。最もよく uncage されたのはニワトリの色素上皮細胞の培養標本だったので、これを用いさらに遊離カルシウムイオンが周囲の細胞に広がるかどうか調べた。その結果、カルシウムイオンはゆっくりと周囲の細胞へ拡散し、この広がり gap 結合の阻害剤によって抑えられることがわかった。この時、最高で 257.6 ミクロン、およそ細胞 3, 4 個分の距離までカルシウムの広がりが見られた。またレーザーを照射した細胞からの距離を、カルシウムイオンの濃度変化を表す値であるレシオ値のピークの時間差で割ったものをイオンの広がる速度とした時、レーザー照射した細胞からの距離がおおよそ細胞 1, 2 個分であった 5 つの細胞における平均速度は 4.5 ミクロン/秒であった。以上の結果から、培養色素上皮細胞間の gap 結合はカルシウムイオンを通すことがわかり、カルシウムイオンが gap 結合を介した細胞間のシグナル伝達物質として働いていることが判明した。

今回スライス標本やホールマウント標本では、レーザー光を連続して照射しないと uncage が起こらず、またカルシウムイオン量の上昇も低かった。これはおそらく、試料とチャンバーの底面の間に隙間が出来てしまうため、試料に照射されるレーザー光の強度が uncage を行うのに十分でなかったためと考えられる。

caged IP3 については、現在細胞内への安定した注入法を模索している。

[展望]

今後はカルシウム以外の caged シグナル伝達物質を利用することで、gap 結合を介した細胞間伝達の解析をすすめたい。また、今回 uncage のあまりうまくいかなかったスライスやホールマウント標本において、ロード後培養を接着させるなどにより uncage の効率をあげ、発生・再生網膜における gap 結合がどのようなシグナル伝達物質を通し、また制御しているのかについて調べていきたいと考えている。さらに、この caged シグナル伝達物質を用いた実験系をパッチクランプ法などと組み合わせれば、伝達物質による電気的応答を調べることが可能であり gap 結合の解析が進むと思う。