

# ひとつの細胞がみせる「かたちの記憶」

— 細胞はどのように変形を検出し、かたちを調節するか? —

小畑秀一

## ■ 研究のねらい

地球上に生きる生物にとって水は必要不可欠である。細胞の内外を隔てる細胞膜は水に対して高い透過性を示す半透膜である。この性質は細胞内での水の利用を容易にする一方で、細胞の生存にとって誠に危険な性質でもある。細胞内外に浸透圧差が生じた場合を考えてみよう。細胞外液の浸透圧変化、細胞における物質の盛んな合成や吸収による細胞内浸透圧の変化により、このような状況は生体内で容易に起こりうる。このような状況に置かれた細胞はどのように振舞うのであろうか? たとえば、細胞を低張液に晒すと一時的に膨張するものの、速やかに(約 10 分)元の大きさに復帰する。低張液に晒され続けているにもかかわらず、膨張したままにはならない。これは「細胞の容積調節現象」として知られている。卵細胞、グリア細胞、上皮細胞をはじめとするほとんどの細胞がこの現象を示すことから、地球上生物が普遍的に持つ重要な防禦反応と捉えることが出来、一定のかたち・大きさを維持することが重要であることを示唆している。いったい、この現象はどのような細胞内メカニズムにより保障されているのであろうか? 私は、「脂質二重膜、膜タンパク質および膜裏打ち骨格の相互作用により規定される、細胞膜の物理的特性の変化がこの現象の引き金になっている」との仮説を立て、この現象を引き起こす細胞内シグナル伝達経路(とりわけ、表面近傍におけるシグナル伝達)および細胞の表面構造の解明を通して、本仮説の検証を試みた。

## ■ 研究成果

### 1. 「容積調節現象」を引き起こす細胞内シグナル伝達経路

イヌ腎由来の上皮細胞である MDCK 細胞を低張液に晒すと、膨張は刺激開始後 2 分でピークに達し、その後は容積復帰の過程に転じる(図1)。膨張過程において、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が見られた。低浸透圧刺激前にあらかじめ細胞外液のカルシウムイオンを除去しておくことで、容積復帰は完全に阻害され、細胞は膨張したままの状態を保った。この条件下では膨張に伴う一過性の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇も見られなかった。すなわち、「容積調節現象」を引き起こすには細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が必須であることを示している。さらにカルモジュリンのアンタゴニストである W-7、Cl<sup>-</sup>チャンネルブロッカーである DIDS、NPPB が「容積調節現象」を阻害した(図2)ことから、細胞内カルシウムイオン濃度上昇に引き続き、カルモジュリンの活性化、Cl<sup>-</sup>チャンネルの活性化が起こると考えられる。

細胞の膨張に伴う細胞内カルシウムイオン濃度上昇はどのようにして起きるのであろうか? フォスホリパーゼ C(PLC)の特異的阻害剤である U-73122 によりこの上昇が阻害されたことから、PLC の活性化が重要な役割を担っていることが示唆された。これまでに遺伝子が同定されている PLC のうち、PLC $\delta$ 1 の pleckstrin homology (PH) 領域 (PLC $\delta$ 1-PH) は phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)と最も特異的に結合することが知られている。さらに、PLC $\delta$ 1-PH はイノシトール3リン酸(IP<sub>3</sub>)とも結合し、その結合力は PIP<sub>2</sub> に対する結合力

より強いことが報告されている。PIP<sub>2</sub> のほとんどは細胞膜に存在すること、IP<sub>3</sub> は可溶性で細胞質に存在することを考えると、PLCδ1-PH に蛍光マーカーである green fluorescent protein (GFP)を付加すれば、蛍光の局在変化から IP<sub>3</sub> の産生を明らかにすることが出来る。図3に示すように、GFP と PLCδ1-PH の融合タンパク(GFP/PLCδ1-PH)を発現している細胞において、融合タンパク由来の蛍光の局在が膨張に伴い変化することが明らかになった。すなわち、膨張により細胞質の蛍光強度が増加した。また、あらかじめ細胞を U-73122 で処理すると、この蛍光の局在変化は見られなくなった。以上の結果は、膨張により PLC の活性化、PIP<sub>2</sub> の分解を経て IP<sub>3</sub> が産生されること、および IP<sub>3</sub>により小胞体から貯蔵カルシウムが放出されていることを示している。しかしながら、U-73122 で処理された細胞でも「容積調節現象」を示すことから、細胞外からのカルシウムイオンの流入も存在すると考えざるを得ない。「容積調節現象」において発動される細胞内シグナル伝達経路をまとめると図4のようになる。

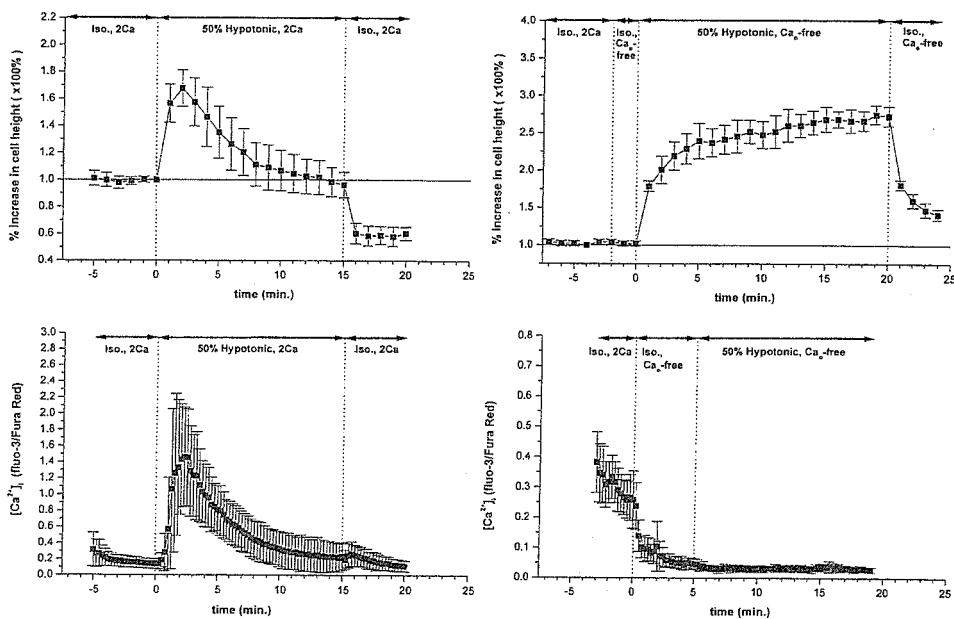


図1. 「容積調節現象」には細胞内カルシウムイオンが必須である。

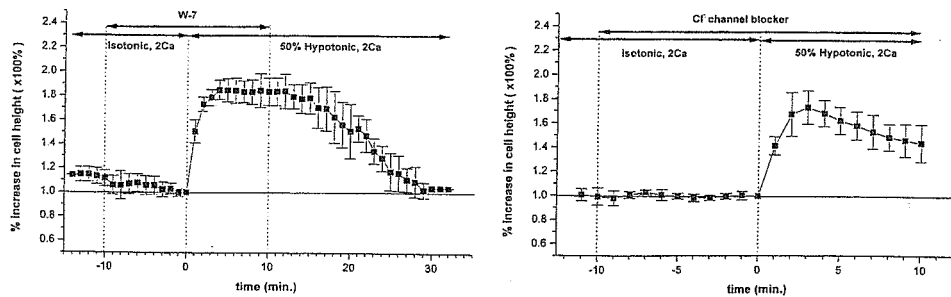


図2. 細胞内カルシウムイオンに引き続き、カルモジュリンと Cl<sup>-</sup>チャネルが活性化される。



図3. 膨張に伴うGFP/PLCδ1-PHの細胞内局在変化。膨張前には細胞膜近傍に存在した蛍光が、低浸透圧刺激2分後には細胞質へ移行している。

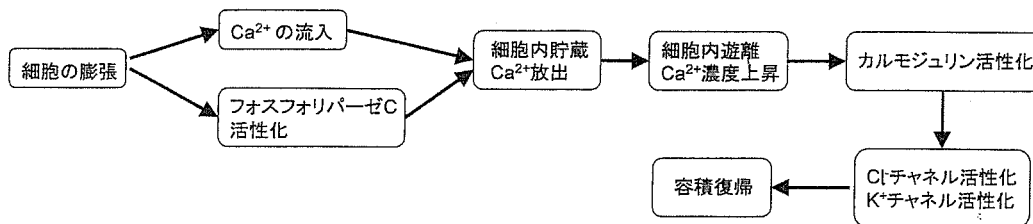


図4. 「容積調節現象」を引き起こす細胞内シグナル伝達経路。

## 2. 「容積調節現象」を引き起こす構造的基盤

細胞の膨張(「容積調節現象」初期過程)により、PLCの活性化(および、おそらく $\text{Ca}^{2+}$ の流入も)という化学的変化が細胞表面で起きることが明らかになった。これ(ら)は細胞表面で起きる現象である。この変化を起こす原因は何であろうか? デオキシコール酸は細胞膜の張力を低下させる物質として知られている。実際、細胞をデオキシコール酸で処理すると「容積調節現象」は完全に阻害された。この結果は、張力をはじめとした細胞膜の物理的特性の変化が細胞表面で起こる化学変化の引き金になっていることを示唆する。細胞膜の物理的特性は脂質や膜タンパク質と膜裏打ち骨格構造との相互作用により規定されている。したがって、この問題を明らかにするためには、生きている細胞の表面構造と、それを支える分子基盤を明らかにする必要がある。そこで、ビデオ強化型高分解能微分干渉顕微鏡(VE-DIC)をベースに、落斜蛍光・全反射蛍光・反射干渉装置などを組み込んだ多機能光学顕微鏡を構築し、この問題に取り組んだ。

図5に示すように、細胞のapical表面には直径約 $0.3\mu\text{m}$ の粒状構造が多数存在することがVE-DIC下で観察された。この粒状構造の多くは細胞の膨張過程で消失し、容積復帰の過程で再び出現した。しかし、容積復帰過程での表面形状は膨張前と比べるといびつさが増していた。刺激開始から約15分経過すると、刺激前とほぼ同じ形状に戻った。原子間力顕微鏡観察により、apical表面にはVE-DICで見えたのとほぼ同一サイズの凹凸が存在することが確認された。つまり、VE-DICで観察された粒状構造は細胞表面の凹凸を示していると考えて良い。さらに、GFPとアクチンの融合タンパク質を発現する細胞を作成し、生きている細胞でのアクチンの存在様式を調べたところ、粒状構造に一致してアクチンの小さな塊が存在することがわかった。以上の結果は、細胞膜は微細だが褶曲構造をとることによりその膜表面積をかせいでおり、膨張による見かけ上の膜表面積の増加に対して、この褶曲構造を伸展させることで対応していることを示唆している。

このような細胞表面の褶曲構造は apical 表面に見られるだけではなく、basal 表面(ガラスやプラスチックシャーレなどの基質と細胞との接着面)においても見られる。あらかじめ細胞膜のみを蛍光ラベルした細胞を全反射型蛍光顕微鏡で観察すると、接着斑およびストレスファイバーに一致する部分のみが明るく見えた(図 6)。これは細胞底面でストレスファイバーが走る部分の細胞膜は、ストレスファイバーによってその周囲より基質面に押し下げられていることを意味している。

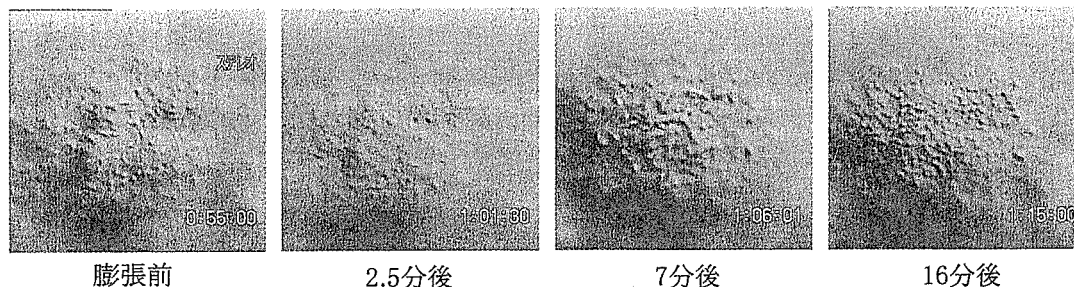


図5. 生きているMDCK細胞apical表面の微細構造(VE-DIC像)。膨張、収縮において、細胞膜(apical側)の微細な褶曲が伸縮する。

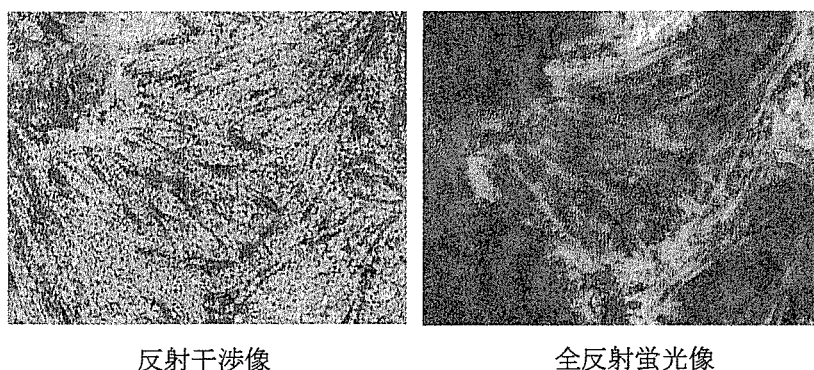


図6. 生きているMDCK細胞のbasal面(ガラスとの接着面)の微細構造。

#### ■ 今後の展開

これまでの 3 年間の研究において、「容積調節現象」を引き起こす細胞内シグナル伝達経路の概略と、この経路を発動させるのに重要な役割を果たしていると推定される細胞表面の構造的基盤の一部を明らかにしてきた。今後は以下の点に着目し、研究をさらに展開したい。

1. さきがけ研究の援助により開始した本研究はその緒についたばかりであり、まだまだ詰めの甘い部分が多い。まず初めに取り組むべきは、本日報告した内容に沿って、詰めの甘い部分を地道に埋めることである。
2. 細胞膨張による PLC の活性化はどのように制御されているか？  
(mechano-chemical coupling の具体例と成り得るか)

現在まで知られている PLC の活性化メカニズムは全て化学的なものである。例えば、アセチルコリンなどのシグナル分子が細胞膜上の受容体に結合すると、3量体 G タンパク質の活性化を経て PLC が活性化される。「容積調節現象」における PLC の活性化においてはこのような経路を経てはいないようである。つまり、膨張という細胞変形に伴う膜表面の構造変化が PLC の活性を制御している可能性が考えられる。この問題を明らかにするためには、膜裏打ち骨格も含めた細胞膜の物理的特性を調べる必要がある。例えば、蛍光褪色からの回復時

間測定を通して脂質や膜タンパク質の流動性の変化を、光ピンセットを用いて膜張力の変化を、さらには、一粒子追跡法により裏打ち骨格構造の変化を調べる予定である。また、急速凍結法と電子顕微鏡を用い、apical 表面裏打ち骨格の分子構築と「容積調節現象」に伴うその変化を直接観察することにも挑戦したい。これらの実験を通して、細胞膨張による細胞表面の物理的変化が PLC の活性化という化学的変化に変換されていることを示すことが出来れば、タンパク質活性化制御の新たな分野を開拓できると信じている。

### 3. 「容積調節現象」における細胞膜のリサイクリングの可能性

生きている細胞は絶えず endocytosis と exocytosis を行っている。これにより細胞膜の張力が一定に保たれていると考えられている。図5に示したように、「容積調節現象」において細胞膜の褶曲の程度が大きく変化していることが明らかになった。膨張過程での膜表面積の増大、容積復帰過程での膜のだぶつきに対し、細胞膜の凹凸構造を伸縮させることだけで対応しきれないのであろうか？膨張過程では exocytosis により膜表面積の実質的増加を促し、容積復帰過程においては endocytosis によりだぶついた膜の回収を行っている可能性がある。これらの点を微細形態学的、細胞生物学的、生物物理学的方法を用いて明らかにする予定である。

### 4. 細胞骨格を介した引っ張りによる細胞間接着の制御

本日の報告では触れなかったが、3年間の研究過程で、細胞の膨張により細胞—細胞間接着部においてチロシンのリン酸化が亢進する事を発見した。「容積調節現象」においては水の流入が避けられないため、これによる細胞内のイオンあるいはタンパク質などの溶質の希釈が生じる。細胞間接着部でのチロシンのリン酸化が細胞骨格を介した引っ張りによるものかどうかをより直接的に証明するためには、細胞内での溶質の希釈を引き起こさずに細胞を変形させる方法を用いなければならない。この目的のために、細胞膜に結合させたポリスチレンビーズを細いガラス針で引っ張る実験を計画中である。その上で、チロシンのリン酸化がおきるタンパク質の同定を行い、細胞間接着の細胞内からの力学的制御機構という、従来の細胞間接着研究とは全く逆の視点から研究を展開したい。

新たに立ち上げた研究を如何に軌道に乗せるか、この3年間は試行錯誤の連続でしたが、大変に有意義な期間でした。「容積調節現象」には生物学領域において未解決の問題が幾つか密接に関連していることが分かった。「容積調節現象」の理解に留まることなく、これらの未解決問題の解明に向けて今後も挑戦し続けて行きたい。3年間支えて頂いた科学技術振興事業団の皆さんにお礼申し上げます。

## ■ 成果リスト

- Obata S. (1999) Dynamics of surface structure in living cell revealed by multi-purpose optical microscopy. 日本電子顕微鏡学会シンポジウム論文集 印刷中
- Obata S. Usukura J. Wakabayashi T. Sokabe M. (1999) Apical fine structure of living MDCK cell and its change during cell volume regulation. XV Congress of the International Federation of Associations of Anatomists
- 小畑秀一、梅村仁美、白倉治郎、若林 隆、曾我部正博 (1999) 培養細胞底面の表面形状と「容積調節現象」に伴う変化。日本電子顕微鏡学会第55回学術講演会

- ・ 小畑秀一、臼倉治郎、若林 隆 (1999) 細胞はどのようにして自分の形を知り、調節するか 第104回日本解剖学会総会 ミニシンポジウム「細胞骨格研究の最近の展開」
- ・ 小畑秀一、若林 隆、曾我部正博 (1998) 低浸透圧刺激に伴う培養細胞表面構造の変化 日本生物物理学会第36回年会
- ・ 小畑秀一、臼倉治郎、若林 隆 (1998) 細胞はどのようにして自分の形を知り、調節するか？ (2) 第103回日本解剖学会全国学術集会
- ・ 小畑秀一、若林 隆、曾我部正博 (1997) カバーガラス上に培養した MDCK 細胞の容積調節現象。 第36回日本生物物理学会
- ・ Obata S. Takemoto K. Wakabayashi T. Sokabe M. (1997) Intracellular  $Ca^{2+}$  increase during regulatory volume decrease in MDCK cells. XXXIII International Congress of Physiological Sciences
- ・ 小畑秀一、臼倉治郎、若林 隆 (1997) 細胞はどのようにして自分の形を知り、調節するか？ (1) 第102回日本解剖学会全国学術集会