

論文の内容の要旨

論文題目 α B-クリスタリン発現制御細胞の様態

氏名 田中幹人

α B-クリスタリン (α B-crystallin) は、遅筋の萎縮で特異的に減少し、筋線維組成依存的に発現しており、遅筋の緊張性持続的収縮との関連が示唆される。一方、脳のグリオーマ細胞や心筋・腎臓でも発現が報告されている。 α B-クリスタリンはその配列特異性から small heat shock protein (sHSP)ファミリーに分類され、シャペロン機能を持つものと目されており、最近の知見からは α B-クリスタリンが力学的負荷を受ける骨格系に局在し、この機能維持・発揮に際して関与している可能性が示唆されている。本研究に於いては、*in vivo*での α B-クリスタリンの作用機序の一端を明らかにすることを目標とし、遺伝子工学的に α B-クリスタリン発現量を増大/抑制した培養細胞の特性の解析、ひいてはその特性発現の機作の解明に取り組んだ。

実験の第一段階としては、個々の細胞から細胞集団に至る過程での細胞発達課程における力学的負荷モデルとして、さらにタイムラプス画像からの解析手法確立のために *Xenopus laevis* A6細胞を用いた実験をおこなった。A6細胞は *Xenopus* 腎臓遠位ネフロン由来の上皮細胞であり、増殖して過密状態になると単層上皮膜を形成し、さらに Na^+ 運搬能を持つドーム状構造を分化形成する。力学的刺激として、過重力環境下で培養・分化させた際に、この A6細胞がどのような応答を示すかを観察した。1~100 xg の各種過重力条件における細

胞の挙動、及び分化マーカーとして Na^+/K^+ -ATPase 発現量を指標とし、縦断的実験を行った。実験手法としては分子生物学的手法に加え、経時撮影（タイムラプス）画像から細胞動態をキネマティック解析する系を確立し、これを用いて細胞動態を定量的に解析した。実験の結果、A6細胞は、5 xg 条件で特異的に増殖能が有意に高まることを見いだした。実験の次段階としては α B-クリスタリン発現がこれらの力学的感受性に影響を及ぼすことを期待した。しかし、各種の方法で試行を繰り返したものの本来 α B-クリスタリンを持たない A6細胞には、種間障壁の問題もあって α B-クリスタリンの導入が困難であり、安定した発現量を持つ細胞をクローニングすることが出来なかった。

従って、実験の第二段階においては上記の手法を踏襲しつつ、解析対象を自然型から α B-クリスタリン発現能を持つ C6（ラットグリオーマ細胞）、L6（ラット筋芽細胞）、C2C12（マウス筋芽細胞）へと変更し、これらに対して α B-クリスタリンの sense/anti-sense ベクターを導入した系（SE/AS）を用いた。いずれの株も α B-クリスタリン発現量が有意に増減していることを確認した。SE/AS 細胞はそれぞれ顕著な形態特性を持っていた。すなわち、 α B-クリスタリン量が増加している SE 細胞は葉状仮足が大きく広がった構造を持ち、一方 α B-クリスタリン量の減少している AS 細胞は糸状仮足が顕著で細長く、細胞両端の二点で基質に接着している針状構造を取り、接触阻止効果が極めて弱い傾向にあった（図1）。これらの細胞のキネマティクス解析の結果、AS 細胞の移動速度は α B-クリスタリン-WT（自然型）の 2-3 倍で、尺取り虫様の独特の移動様式を持ち、SE は移動度こそ低いもののラッフル膜の盛んな運動が観察された（図2）。この傾向は、FBS を誘導因子に用いた細胞移動アッセイによっても確認された。チューブリンとアクチンに対する二重抗体染色の結果、SE ではラッフル膜の顕著に発達した傾向が、また AS では細胞体の多くを微小管が占め、

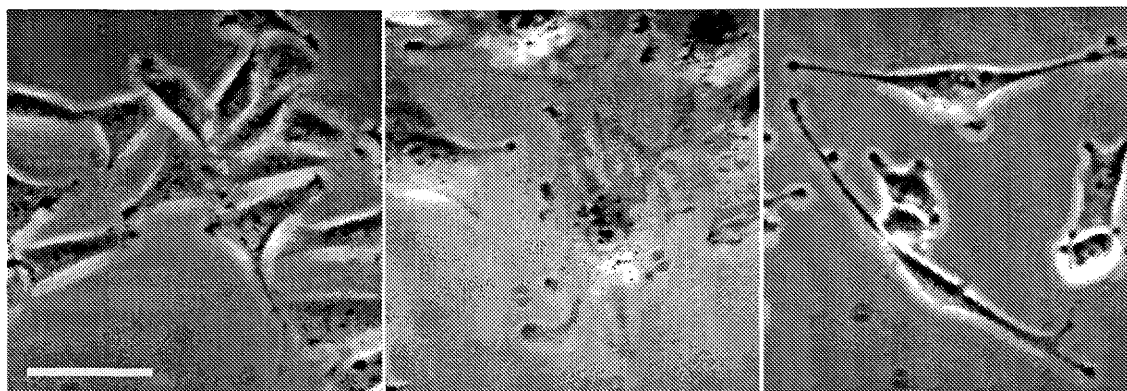


図1： α B-クリスタリン発現制御細胞の形態。左から C6WT, C6SE, C6AS。C6SE はより仮足を伸ばして広がった構造を取り、C6AS では二極性の形態を取っていることが見て取れる。移動速度は C6AS>C6WT>C6SE の順となる。 Bar=50 μ m

その二極性両端の末梢部にアクチンが集合している様子が確認された。

これらの α B-クリスタリン発現量多寡による細胞変化が可逆的なものであるかどうかを解析するため、SE細胞に対して α B-クリスタリン抗体を、AS細胞に対してはウシ眼球レンズより精製した α B-クリスタリンをマイクロインジェクションにより導入した。結果は、統計的にも有意に、SE細胞のAS化（ α B-クリスタリン減少にともなう様態化）と、AS細胞におけるラッフル膜形成という変化が確認されたことから、これらの様態変化の可逆性が立証された。

この形態差異が、形質転換に伴う細胞外基質との接着性変化や接着因子の産生量変化によるものであるかを検証するため、5種類の基質をコートしたディッシュ上で培養した。結果は基質種により全体的な形態傾向は変化したものの、 α B-クリスタリン-WT/SE/AS間の相対的な形態特性は一定であった。従って、これらの差異は能動的な接着能の変化によるものであると推察された。

WTの細胞集団はSE/AS様の形態をとる細胞を均質に含んでいたため、SE/ASの動的・形態的特性が細胞周期に因るものである可能性を検証した。細胞を長時間撮影し、適宜経時的にフローサイトメータで細胞周期を解析することで動画像とDNA性状から解析した。結果、WT/SE/AS細胞の細胞周期分布に差異は認められず、細胞密度の上昇に伴って移動速度は変化したものの、各パラメータの相対的な関係は変わらなかった。

運動性の差異をもたらす要因を検証するため、各種の細胞骨格系に影響を及ぼす薬剤を添加し、薬剤添加後の細胞動態を画像に基づいて解析した。この結果、C6/L6細胞では異なった反応様式を示したものの、AS細胞の極端な移動度が細胞骨格系の収縮力を阻害する薬剤種によって顕著に抑えられる点では一致した。

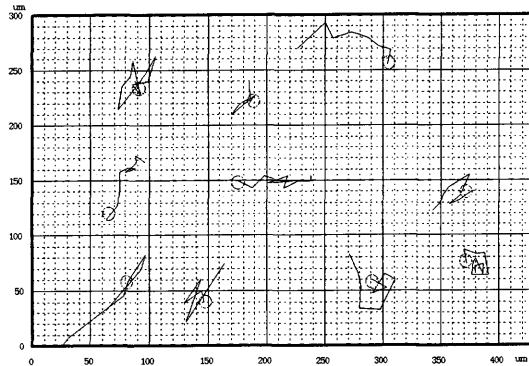
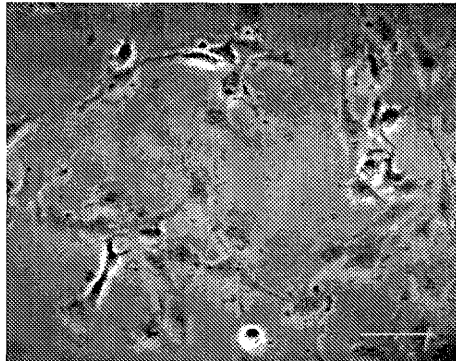
細胞骨格の動態変化を生化学的に比較するためには、 ^{35}S -MetラベルしたC6細胞のチューブリン代謝半減速度を比較した。結果、SEでは代謝遅延、ASでは代謝亢進傾向が見られた。また、この際にWT/SE/AS間でのタンパク代謝回転率の差異が認められた。

このWT/SE/ASにおける顕著な形態と運動性の変化から、 α B-クリスタリンが低分子量Gタンパク質を介したシグナル伝達系に作用している可能性が示唆されたため、Rac1のWild-Type(WT)及びConstitutively-Active(CA), Dominant-Negative(DN)変異体のEGFP融合タンパク質を α B-クリスタリン-WT/SE/ASに導入し、これを上記画像撮影解析系を用いて経時撮影、解析した。結果、WT/CA/DNは、それぞれのシグナル伝達系変異体によって予想されるとおりの結果をもたらしたものの、その発現様式には α B-クリスタリン-WT/SE/ASの種類により明確な差があった。

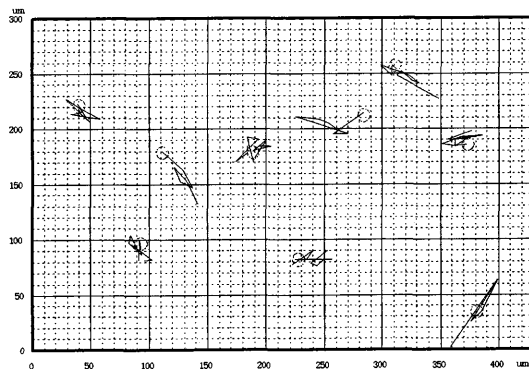
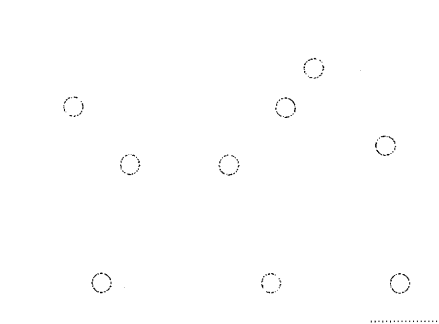
本研究の成果から、 α B-クリスタリンは細胞内で細胞骨格系に関与し、細胞形態と運動特

性に影響を与えている可能性が示唆された。この変化は α B-クリスタリンの本質的機能に因るものであることが想像される。またこの変化の多くは細胞骨格の動的不安定性の増大あるいは偏向という点に集約されるものと推察される。

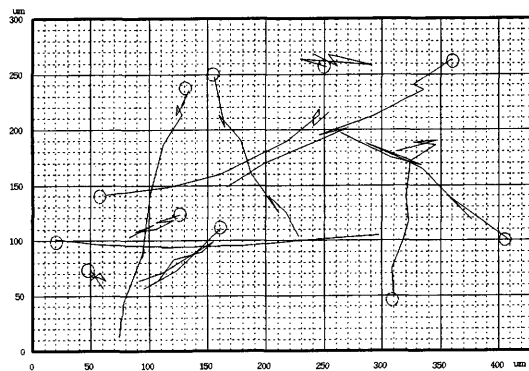
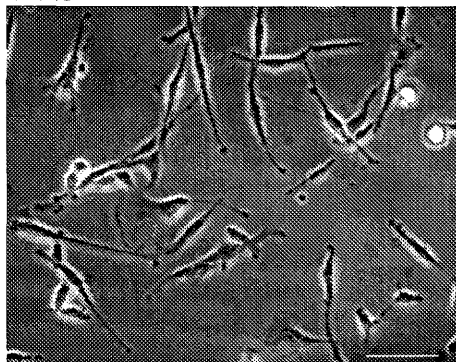
C6WT



C6SE



C6AS



×200, Bin Size=2, Bar=50 μ m (写真3枚とも)

図2 C6-WT/SE/AS細胞の移動傾向. 2時間撮影したタイムラプス画像を元に、左列の画像(撮影開始時)から(画面外へ出てしまう傾向のつよいものは省く、という条件付きで)無作為に抽出した10個の細胞の10分ごとの座標位置を右のグラフにプロットし、線で繋いだもの。○は細胞の撮影開始時の大まかな位置を示す(画像中の○は対象とした細胞を表している。画像とグラフの縮尺比は同一では無い。)C6WT細胞のランダムウォーク様の運動、C6SEの振動、C6ASの方向性を持った運動が伺える。また、細胞形態が運動様式を決定している様子が幾つかの細胞から伺える。