

過重力負荷による骨芽細胞株 MC3T3-E1 でのアクチンストレスファイバー再構成誘導

お茶の水女子大学・人間文化創成科学研究科 宮本泰則、石川祐希、最上善広
Hypergravity Induces Reorganization of Actin Stress Fiber Assembly in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells

Yasunori Miyamoto, Yuki Ishikawa, and Yoshihiro Mogami

Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University, Tokyo 112-8610

E-mail: miyamoto.yasunori@ocha.ac.jp

Abstract: It is reported that a change of gravity environment affects the growth and function of some cultured cells. But the gravity response mechanism is not well characterized. We hypothesize that a gravity change is sensed through a cytoskeleton (tensegrity model) and transduced into biochemical signals by major extracellular matrix receptor, integrin. In this paper, we examined the effect of hypergravity (60G) on the formation of actin stress fibers in mouse osteoblast cell line MC3T3-E1. The hypergravity induced a reorganization of the stress fibers. The reorganization was reversible by a removal of the hypergravity loading. Partial destruction of stress fiber formation with cytochalasin B and GRGDS peptide was recovered by hypergravity loading. The reorganization of stress fibers by hypergravity was inhibited with a Rho kinase inhibitor, Y-27632, indicating that Rho kinase plays a critical role in the reorganization of actin stress fiber formation by hypergravity loading. This study is part of activities of the working group of Science Steering Committee for Space Utilization, JAXA-ISAS.

Key words; hypergravity, tensegrity, actin stress fiber, integrin

重力の作用は、サイズ依存的であり、サイズの小さなものに対する影響は小さいと一般的に捕らえられている。我々は、個々の構成要素のレベルでは極微弱な応答が、要素間の共同作用と、その産物である動的不安定性を通じて、集団としての「思いもよらない特性」が発現されるという、新しい概念を確立しようとしている。そのためにWG「生体要素

間の共同作用に基づく重力効果の増幅発現機構解明への研究展開」(宇宙環境利用科学委員会研究班)を構築し、研究を進めている。

今回の研究は、上記WGの一環として細胞レベルにおける様々な構成要素からなるテンセグリティ構造に着目した。テンセグリティ (tensegrity) とは、tensile(張力)と integrity(統合)からなる造語で、構成する要素の圧縮性の構造と張力とのそう反する力のつりあいにより安定化する構造のことをさしている。細胞内では、細胞骨格がこのテンセグリティ構造を担っていると推察される。テンセグリティ構造である細胞骨格に重力が負荷された際に、その構造により重力効果が増幅され、連結部にあるインテグリンに顕著な影響が出るというIngber博士の仮説に基づいている(1,2)。インテグリンは、主要な細胞外マトリックスに対するレセプターであり、細胞骨格のひとつであるアクチン繊維と連結し、テンセグリティ構造の保持に寄与している。Fig.1に示している細胞骨格、インテグリン、種々の連結分子、シグナル分子の構成要素間の共同作用が過重力応答に重要と考え

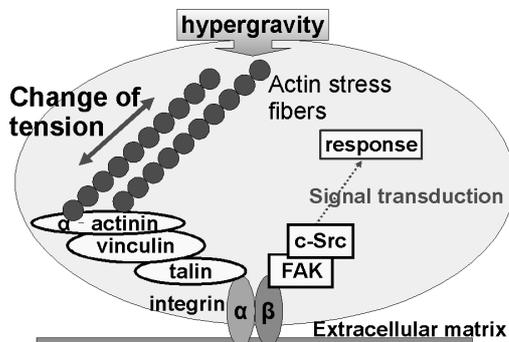


Fig. 1 Hypothesis of hypergravity response through cytoskeleton and integrin (tensegrity model)

ている。

本研究では、骨芽細胞株MC3T3-E1細胞を用い、過重力負荷による細胞骨格のひとつであり、インテグリンと連結しているアクチン繊維（ストレスファイバー）の形成への影響を調べた。

方法

骨芽細胞株の培養と過重力負荷

骨芽細胞株MC3T3-E1細胞をMEM、10%ウシ胎児血清中で培養を行った。細胞は、35mmディッシュに播種し、過重力(60G, 1時間負荷, 2分間休止, 60G, 1時間負荷)を遠心機(LIX-130, トミー精工社)で行った。各種阻害剤は、過重力負荷直前に添加した。またEGFP-アクチン発現プラスミドは、リポフェクタミン2000(インビトロジェン)を用いて導入後、一晚培養した後、過重力を負荷した。

細胞の蛍光抗体染色

カバーガラス上に細胞を播種した後、1番培養後、過重力負荷を行い、固定を行った。細胞内のアクチン繊維を観察するために、蛍光染色を行った。アクチン染色には、ローダミン標識ファロイジンを用いた。染色した細胞は、共焦点蛍光顕微鏡を用い観察を行った。

結果

アクチン重合阻害剤サイトカラシンBのストレスファイバーの過重力応答への効果

過重力負荷によりストレスファイバー形成の促進が観察された。次に、サイカラシンBにより形成を部分的に壊して、その影響を調べた。その結果、部分的な阻害(1.25及び2.5 $\mu\text{g/ml}$)では、過重力負荷(60G)にて回復が見られたが、ほぼ完全にストレスファイバー形成を阻害したとき(5 $\mu\text{g/ml}$)では回復が見られなかった。またこの過重力負荷後、1G下で2時間静置することにより元の状態に、可逆的にもどることをEGFP-アクチン発現プラスミドを用いた非固定細胞を用いた連続的な観察により確認した。

RGD 依存的インテグリン阻害のストレスファイバーの過重力応答の効果

インテグリンと細胞外マトリックスの結合を阻害ペプチドGRGDSP(RGD)ペプチドにより阻害した際、Fig.2に見られるようにストレスファイバー形成がコントロールペプチド(RGE)と比較して阻害されたが、過重力負荷(60G)により顕著な回復が見られた。さらにこの過重力負荷による回復は、Rhoキナー

ゼ阻害剤Y-27632により阻害された。この結果から、過重力負荷によるストレスファイバー再構成にRhoキナーゼが重要な役割を果たしていることが示された。

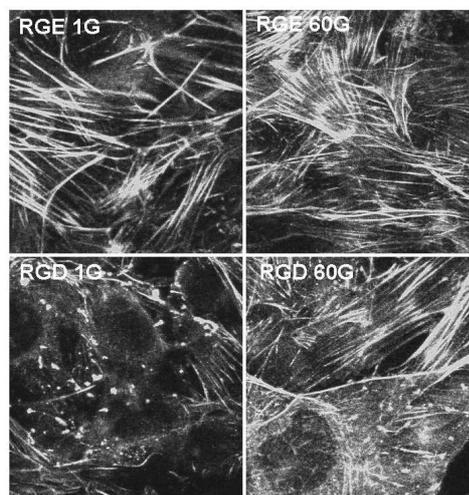


Fig.2 Effect of adhesive inhibition and hypergravity on reorganization of actin stress fibers

考察

アクチンは、アクチン単量体、アクチン線維、ストレスファイバーの3種の状態の動的平衡状態にある。今回の結果から、過重力負荷応答が、平衡状態をアクチン単量体のほうに、かく乱を与えるような阻害剤存在下でも顕著にストレスファイバー形成の回復を促進させた。つまりストレスファイバーの再構成へと動的平衡状態を遷移させる作用を過重力負荷が有していることを明らかにした。

今後、テンセグリティ構造がどのように過重力応答に関わっているのかを、細胞骨格、インテグリンなどの構成要素レベルの解析の中から明らかにしていきたい。

参考文献

- 1) Donald Ingber
“How cells (might) sense microgravity.”
The FASEB Journal, 13, S3-S15 (1999).
- 2) Donald Ingber
“Integrin as mechanochemical transducers.”
Current Opinion in Cell Biology, 3, 841-848 (1991).