

## 力学刺激による細胞間情報伝達と隣接細胞内 PKC $\alpha$ 局在の関係

荒井雅貴\*, 中嶋和弘\*\*, 世良俊博\*\*, 工藤奨\*\*

九州大学大学院 工学府 機械工学専攻 [〒819-0396 福岡県福岡市西区元岡 744 番地]

\*\*九州大学大学院 工学研究院 機械工学部門

### 1. 緒言

血管内皮細胞に負荷された機械刺激は、生化学シグナルに変換され細胞内・細胞間に伝達される。マイクロピペットによる機械刺激により細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し周囲の細胞に伝播する Ca<sup>2+</sup> wave は、細胞間情報伝達の 1 つと考えられている<sup>(1)</sup>。

プロテインキナーゼ C  $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) は細胞内に存在する情報伝達物質であり、増殖や遊走等に関与している<sup>(2)</sup>。PKC $\alpha$  は Ca<sup>2+</sup> によって活性化し、細胞質から細胞膜へと移動し細胞膜に局在することが薬剤刺激による実験によって確認されている<sup>(3)</sup>。しかし、力学刺激による Ca<sup>2+</sup> wave と PKC $\alpha$  の局在化をリアルタイムで同時観察した実験はなく、PKC $\alpha$  の局在メカニズムは分かっていない。

そこで本研究では、マイクロピペットを用いて細胞に力学刺激を加え、刺激を加えた細胞の隣接細胞内 PKC $\alpha$  の局在変化を Ca<sup>2+</sup> wave と同時に観察し、さらに阻害剤を用い PKC $\alpha$  局在化のメカニズムも検討した。

### 2. 実験方法

実験にはウシ大動脈由来血管内皮細胞 (東洋紡) を用い、 $\phi 27\text{mm}$  のガラスベースディッシュ (IWAKI) に播種した。内皮細胞内 PKC $\alpha$  を観察するために、PKC $\alpha$  と蛍光タンパク質 Dronpa-Green (DG, Amalgam) を融合させた PKC $\alpha$ -DG を作製し、Hily Max (Dojindo) を使用して遺伝子導入を行った。Ca<sup>2+</sup> は Fura2-AM (Invitrogen) を用いた。

蛍光観察には倒立型蛍光顕微鏡 (ECLIPSETE2000-S, NIKON) を使用した。蛍光の同時観察には AQUACOSMOS (浜松フォトニクス) を用いた。画像取得間隔は 256 msec に設定した。

細胞への力学刺激は硼珪酸ガラス電極をピペットプレーで先端が 3 $\mu\text{m}$  程度になるように処理し、マニピレーターを用いて操作した。

PKC $\alpha$  の局在変化と Ca<sup>2+</sup> の関係を調べるために、PKC $\alpha$  の Ca<sup>2+</sup> 結合ドメイン阻害剤である Go6976 を負荷した。また、Suramin で P2Y 受容体を、18 $\alpha$ -GA でギャップ結合をそれぞれ阻害することで

隣接細胞への情報伝達方法を限定し、PKC $\alpha$  の局在変化を観察した。

### 3. 実験結果

Control 時における力学負荷に対する PKC $\alpha$  と Ca<sup>2+</sup> の蛍光変化を Fig.1 に示す。力学刺激後 Ca<sup>2+</sup> は刺激部位から Ca<sup>2+</sup> wave が起こった。PKC $\alpha$  は Control と Suramin 負荷時では隣接細胞で刺激を加えた側の蛍光輝度が増加した (白矢印)。18 $\alpha$ -GA・Go6976 負荷時では蛍光輝度の増加が見られなかった。各条件で PKC $\alpha$  の蛍光ピークを比較したところ、18 $\alpha$ -GA・Go6976 負荷時では Control に比べ優位に蛍光輝度が減少した。

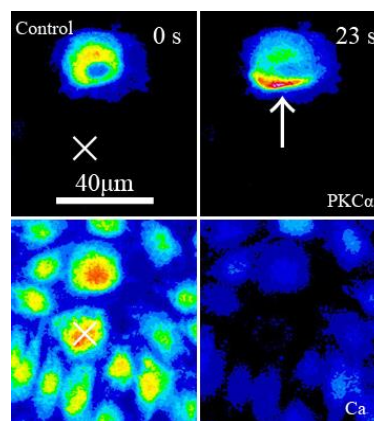


Fig. 1 Control 時の PKC $\alpha$  (上段) と Ca<sup>2+</sup> (下段) の蛍光変化, × : 刺激位置

### 4. 考察

今回の実験から力学刺激時の PKC $\alpha$  の局在変化には Ca<sup>2+</sup> が必要だと考えられる。また、Suramin 負荷時にも局在が見られたことから、P2Y 受容体よりもギャップ結合の存在が重要だと考えられる。

### 文 献

- 1) Demer L.L et al., Mechanical stimulation induces intercellular calcium signaling in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 264, 2094-2102, 1993.
- 2) Olga K. et al., Protein kinase Ca: disease regulator and therapeutic target. *Trends Pharmacol Sci.*, 31, 8-14, 2010.
- 3) Wagner S., et al., Analysis of the subcellular distribution of protein kinase C $\alpha$  using PKC-GFP fusion proteins. *Exp Cell Res*, 258, 204-214, 2000