フェムト秒レーザー誘起衝撃力に誘導される細胞内 Ca^{2+}濃度上昇の経路探索

Pathway of Intracellular Ca^{2+} Increasing Stimulated by Femtosecond Laser Impulse

奈良先端大物質　○杉田 龍紀，山田 壮平，岡野和宣，安國 良平，細川 陽一郎
Div. Mat. Sci. NAIST ○Ryuki Sugita, Sohei Yamada, Kazunori Okano, Ryohei Yasukuni Yoichiroh Hosokawa
E-mail: sugita.ryuki.sr3@ms.naist.jp

生体内外から細胞への機械刺激は、発生や分化などの細胞機能の調整に重要な役割を担っている。機械刺激のインパルス入力に対する細胞のシグナル伝達経路を知ることができれば、より一般的な機械刺激に対する生理応答を理解する一助になると考えられるが、既存の手法では顕微鏡下の培養細胞にインパルス入力として機械刺激を作用させることは困難であった。我々は水中に集光された近赤外のフェムト秒レーザーパルスが誘起する衝撃力をインパルス刺激として細胞に作用させることを提案しており、これまでにこの衝撃力に対する細胞の生理応答として細胞膜の機械刺激受容チャネル(MSC)を介した細胞質への Ca^{2+}の流入が生じることを報告している。本研究では、細胞外からの Ca^{2+}流入に続くシグナル伝達過程の一つとして、Ca^{2+}貯蔵庫である小胞体から細胞質への Ca^{2+}放出の有無を評価した。

試料としてガラスボトムディッシュに培養したマウスの筋芽細胞(C2C12)を用い、細胞内 Ca^{2+}の蛍光観測用に蛍光性 Ca^{2+}指示薬である Fluo-8 AM (λex = 490 nm, λem = 520 nm)を導入した。細胞近傍の培養液中にフェムト秒チタンサファイア再生増幅器(130 fs, 800 nm, 150 nJ/pulse)の単パルスを、20 倍対物レンズ(N.A. =0.46)を用いて、細胞から 20 μm の位置に集光し、機械刺激を細胞に作用させた。機械刺激の作用による細胞内の Ca^{2+}濃度の変化を、共焦点顕微蛍光イメージングによる Fluo-8 の蛍光強度の変化から評価した。蛍光励起には波長 473 nm の CW レーザーを用いた。

細胞質から小胞体に Ca^{2+}を運ぶイオンポンプをタプシガルギン(1 μM)で阻害し、小胞体に貯蔵される Ca^{2+}を減少させた状態でレーザー誘起衝撃力による機械刺激を作用させたところ、Control に比べて細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇量が抑制される傾向が観測された（Fig. 1)。この結果は、衝撃力の作用によって細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇する経路として、小胞体からの Ca^{2+}放出が寄与していることを示している。細胞質の Ca^{2+}濃度増加により小胞体上のリアノジンが活性化して小胞体からさらに Ca^{2+}を放出するカルシウム誘発性カルシウム放出 (CICR)という過程が知られている。本実験においては、衝撃力が MSC を介した細胞質への Ca^{2+}流入を誘導し、その後、CICR が引き起こされると考えられる。発表では、リアノジンを阻害した結果も含め、この Ca^{2+}上昇経路の詳細について議論する。

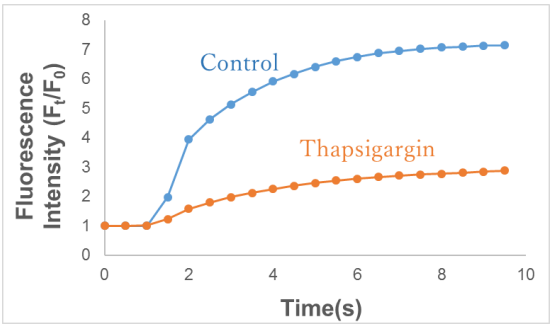

Fig. 1 Temporal changes of the fluorescence intensity in the cytosol after femtosecond laser irradiation at 20 μm distance from cells.

© 2020年 応用物理学会