

## カドヘリンのはたらきとカルシウムイオン

兵庫県立須磨東高等学校 薄井 芳奈

現行の学習指導要領では、4単位の生物で「細胞接着」「細胞骨格」について、かなり詳しく学習するようになっています。新たに詳しくなった内容ということもあって、現場の先生方の、どこまで学習すればよいのか、羅列的になって授業がしづらい、といった声も耳にします。

ここで紹介する実験は、2013・2014年に理研 CDB で実施された「高校生物教員のための発生生物学リカレント講座」ならびに、「高校生のための発生生物学実習講座」で実施された実習内容を、高等学校の授業で取り組めるようにアレンジして行ったものです。

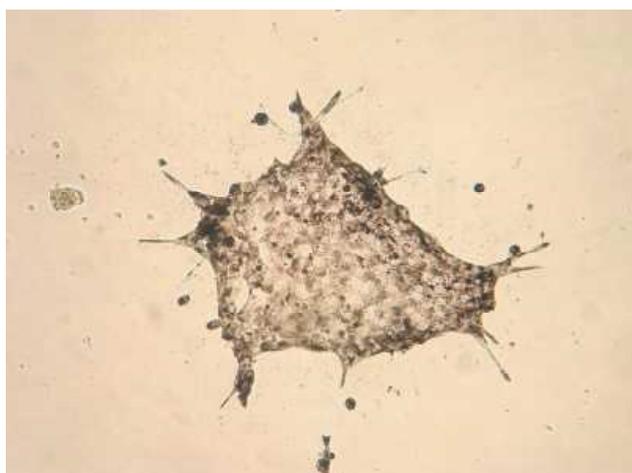
### 授業実践報告

実施日・対象： 2014年12月12日（金）1限 2-5 18名 いずれも理系生物選択者  
3限 2-6 17名

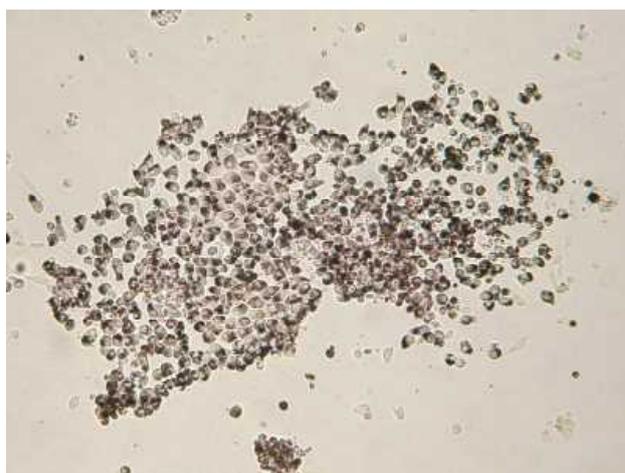
カドヘリンを介した細胞どうしの接着にはカルシウムイオンが必要です。

EDTA（エチレンジアミン四酢酸）や EGTA（エチレングリコールビス四酢酸）は、カルシウムイオンやマグネシウムイオンを捕まえて、細胞どうしや、細胞と基質との接着を弱める働きをします。

培地を取り除き、PBS でいったん洗ったのち、EGTA を含む PBS を加えると、カドヘリンによる細胞接着がはがれて、細胞と細胞の間に隙間が現れるようすが数分以内の短時間で観察できます。さらに、カドヘリンが細胞内の細胞骨格と連結していることによって、細胞どうしが接着によって引っ張り合い、敷石状の形を維持していたものが、接着が外れることによって、丸くなっていくようすが観察することができます。この実験では、EDTA よりもカルシウムイオンに対する選択性が高いため、EGTA を用いていますが、EDTA でも可能です。



↑ ディッシュの底に敷石状に細胞どうしが密着した網膜色素上皮の初代培養細胞のコロニー



↑ EGTAを加えて細胞どうしの接着がはがれ、丸くなった細胞（左の写真とは別のコロニー）

なお、変化のようすの動画を本校HP・You Tubeに公開していますので、ご覧ください。

<https://www.youtube.com/watch?v=HRnxiLuzHGU>

### ① 観察用の初代培養細胞の準備

ニワトリまたはウズラ 8～9 日目胚から網膜色素上皮を取り出し、トリブシン処理をした上で、細胞培養用ディッシュに播き、液体培地で 1～2 日間培養します。この作業は、特別時間割などを設定し、生徒にさせることも可能ですが、今回はあらかじめ教員が行いました。

詳しい方法や使用器具薬品については、本校HP「須磨東 理科 実験教材の広場」に「学校でできる初代培養」として紹介していますので、そちらをご参照下さい。

<http://www.hyogo-c.ed.jp/~sumahigashi-hs/rika/rika-pdf/1uzurahi/uzura/syodaibaiyo2013.pdf>

### ② 実験器具・試薬の準備

初代培養細胞（網膜色素上皮）

パストゥールピペット 3 本

シリコン乳豆 1 個

PBS 10ml

dPBS（1mM EGTA 1mM MgCl<sub>2</sub> in PBS） 10ml

生物顕微鏡（生徒用）

顕微鏡デジタルカメラシステム・ノート PC など



- ・ 班に生物顕微鏡を 1 台用意し、P C のモニターに顕微鏡像が出るようにセットしておく。

※本校では（株）佐藤商事「USB 顕微鏡デジタルカメラシステム 1000」とサポート終了で使用しなくなったノートパソコンを利用している。

- ・ 生物顕微鏡は機種によってはステージの穴が大きくディッシュが安定しないこと、また、メカニカルステージを使う方がコロニーを逃さず観察できることから、スライドガラスをステージにセットし、その上にディッシュを乗せて観察するようにしている。

### ③ 実験操作

1. 初代培養細胞を顕微鏡で観察し、細胞どうしが接着してコロニーを作っているところを選ぶ。顕微鏡の倍率を 150 倍にしておく。パストゥールピペットの操作役、コロニーが視野から離れないように追いかける役を決めておく。
2. 培地をパストゥールピペットで吸って捨てる。
3. パストゥールピペットを替えて約 1.5ml（シャーレの 1/3 程度）の PBS をシャーレの壁に沿わせるように加える。
4. PBS をパストゥールピペットで吸って捨てる。
5. パストゥールピペットを替えて、約 1.5ml の dPBS（EGTA を含む）をシャーレの壁に沿わせるように加え、細胞の変化を観察する。数秒以内に変化が現れることもあるので見逃さないように注意。



変化は EGTA 溶液を加えた直後から数分間で起こり、10 分も経てば明確に分かる状態になるので、授業時間内に十分観察ができてい

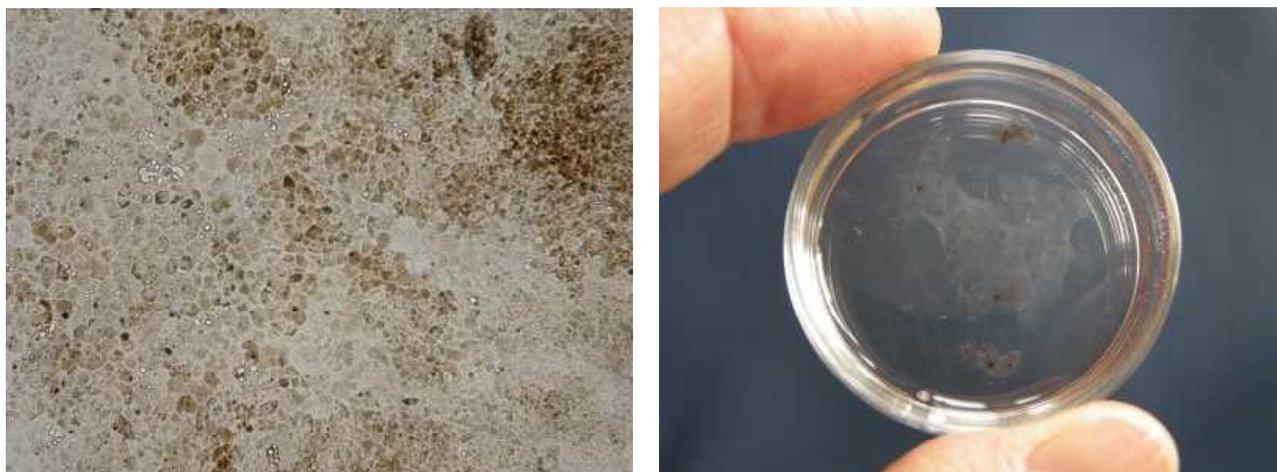
ました。ただし、ディッシュ上に観察に適したコロニーが少ないと、操作時にディッシュを動かしてしまうことで見失い、そのあと見つけるのに時間がかかってしまいます。全部の班によい状態のディッシュを提供するためには、各ディッシュに多めに細胞を播いておくことが必要でした。

## 使用する細胞について

網膜色素上皮は簡単にはがすことができ、初代培養で比較的容易にコロニーを得ることが可能です。細胞がメラニンの顆粒を作っていて黒いので、位相差顕微鏡がなくても、学校にある生物顕微鏡で容易に観察できること、上皮系の組織で、密着したシートを作り、細胞接着がはがれるようすがはっきりと分かること、が、この組織を用いる理由です。

いったん、EGTA で細胞接着をはがしても、EDTA 溶液を PBS で洗ったのち、ディッシュに再び培地を加えて、引き続き 37℃ で培養し続けると、翌日には接着を取り戻しています。

さらに、培養を続けると、細胞が増えて、ディッシュの底にシート状に広がっていくことも、観察することができます。理研 CDB と先端医療センターで臨床研究されている、iPS 細胞由来の網膜色素上皮シートによる加齢黄斑変性の治療など、先端研究の理解にもつながります。



EGTA添加実験後、PBSで洗い、再度培地を与えて培養を続けた網膜色素上皮の初代培養細胞。

培養開始から9日目。細胞が増え、ディッシュの底のかなり広い範囲にシート状に広がっている。

## 生徒の感想より

- ・密着していた細胞がだんだんと離れていったのはよく観察できた。やはり、パソコンとカメラを使って観察するのは、みんなと話ができるので楽しかった。
- ・カルシウムイオンを取り除いただけで、目に見えるほどの変化になることに驚きました。
- ・最初は今いち分からなかったけど、帰る頃にはスカスカになるくらいバラバラになっていた。四角だった細胞が丸くなったのが、カドヘリンは普段きちんと細胞どうしをひっばっているんだな、と思った。
- ・培養液を除いて、PBS で洗って、dPBS を入れる作業は少し緊張したけど、上手くできてよかったです。真っ黒いシートも細胞からできていて、これも体の一部であると思うと、すごいな、と思いました。
- ・細胞を何回か見失ってしまって探すのが大変だったけど、dPBS を入れると縮んで丸くなっていくのがよく観察できてよかったです。
- ・今まで、細胞どうしが結合している状態の細胞の形のまま、バラバラになると考えていました。細胞骨格が伸び縮みして、さまざまな形に対応できるということが分かりました。
- ・EGTA を加える前はみんな形を維持していて、でも、すべて形は違っていました。引っぱられているんだな、ということがはっきりと分かりました。私たちの体を維持することができるのは、細胞レベルから行われていることだと知れて、よかったです。