

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06165

研究課題名(和文)細胞膜皮層のアクトミオシンネットワークが駆動する多様な細胞プロセスの統合的理解

研究課題名(英文)Mechanics of actomyosin networks beneath the cell membrane

研究代表者

宮崎 牧人(Miyazaki, Makito)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：40609236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜表層のアクトミオシンネットワークは細胞運動や細胞内構造のポジショニングなど様々な機能を制御している。それらの仕組みを解明するため、我々は精製タンパク質及び細胞質抽出液を細胞サイズの油中水滴に封入した人工系を用いて実験を行った。その結果、アクチンコルテックスの収縮によって液滴が動くこと、液滴界面から発生したアクトミオシン波とバルク中のアクトミオシンネットワークの綱引きによって、細胞内構造の配置の対称性が制御されることを発見した。これらの発見は、アクチン細胞骨格が駆動する様々な細胞機能の制御機構の物理的理解に繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクチン細胞骨格は細胞運動や細胞内構造の配置制御など、様々な細胞機能を制御している。アクチン細胞骨格を制御する上流のシグナル系はかなり明らかになりつつあるが、その一方で、最下流のアクチン細胞骨格がどのような物理的機構で細胞機能を制御しているのか、その仕組みはほとんど未解明である。そこで上流のシグナル系を排除するために、精製した細胞骨格タンパク質及び細胞質抽出液を封入した人工細胞を用いて実験を行った。本研究で得られた結果は、アクチン細胞骨格自身が、その力学的相互作用のみで様々な細胞機能を制御する能力を備えていることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Actomyosin networks beneath the cell membrane regulate various cellular functions including cell motility and intracellular positioning. To elucidate the regulatory mechanisms, we have employed in vitro models composed of purified proteins or cytoplasmic extracts encapsulated in cell-sized water-in-oil droplets. Here we found that the spontaneous rupture of the actin cortex by myosin induced directed motion of droplets. Tug-of-war between actomyosin waves generated from the droplet boundary and stochastically formed actomyosin networks in the bulk space regulates the positioning symmetry of intracellular objects. These findings will help us understand the regulatory mechanisms of various cellular functions orchestrated by the active actin cytoskeleton.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞骨格 アクトミオシン 分子モーター 人工細胞 再構成 細胞運動 対称性の破れ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

コルテックス (cortex) とは、細胞膜直下に形成されるアクチオシンの網目構造であり、動物細胞に普遍的に見られる細胞骨格である。アクチン繊維が α -アクチニンなどの架橋タンパク質とミオシンフィラメントで架橋され、そのネットワーク構造が ERM タンパク質 (ezrin/radixin/moesin) などを介して細胞膜に固定されている。

コルテックスは細胞の形態維持機能の他に、細胞運動や、核や紡錘体などの細胞内構造物の配置制御など、多種多様な能動的機能を有していることが最近の研究によって明らかになりつつある。しかし、細胞には様々なシグナルネットワーク系が内在し、アクチン細胞骨格は上流のシグナル因子によって複雑な制御を受けていると考えられている。従って、様々な細胞機能発現におけるコルテックスの重要性は認知されているが、「アクトミオシンネットワークだけで、どこまで高次な細胞機能が実現・制御できるのか？」という根本的な問いには未だに答えられていない。

2. 研究の目的

本研究では細胞膜皮層に形成されたアクトミオシンネットワークがどのようにして多様な機能を生み出しているのか、その仕組みを包括的に理解することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は細胞骨格を内包した人工細胞の作製技術を確立し (*Biophys. J.* 2014, *Protoc. Exch.* 2015)、人工細胞で細胞機能が再現される条件を探ることで、細胞質分裂 (*Nat. Cell Biol.* 2015) や細胞質流動 (*PNAS* 2017) の仕組みを解明してきた。これまでの研究成果を基盤として、本研究では精製アクトミオシン及び細胞質抽出液を封入した油中液滴を細胞の最小構成要素モデルとして用い、細胞運動や細胞内構造の配置制御などの機能が再構成される条件を探ることで、細胞膜皮層のアクトミオシンネットワークが関与する様々な細胞機能の発現プロセスにおける共通原理と制御機構を解明することを目指す。

4. 研究成果

①細胞運動機能の発現メカニズム

精製タンパク質を封入した油中液滴内でコルテックスを再構成し、コルテックスの収縮が一方方向性の運動を生み出せるか否かを検証した。まず、精製したアクチンモノマーとアクチニンを油中液滴に封入し、アクチンの重合反応を開始させたところ、液滴内壁にコルテックス様の構造が自発的に形成された。この系にミオシンを加えたところ、収縮力の増大によってコルテックスの一部が破け、収縮する現象を再現することに成功し、さらにコルテックスの収縮に伴い液滴が移動する現象を発見した。

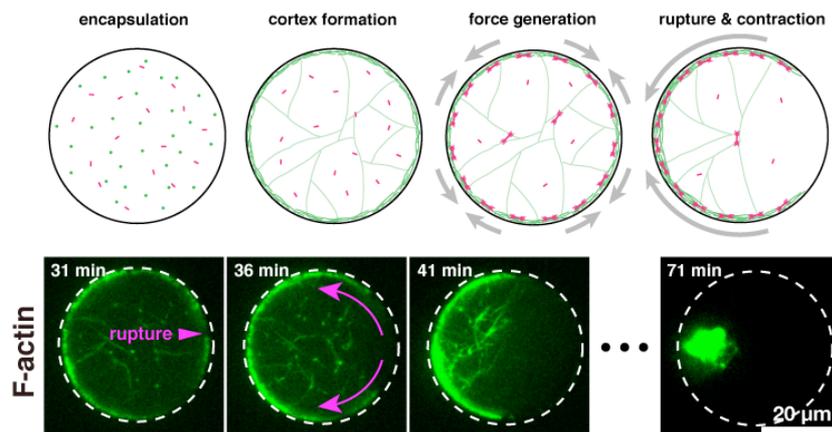


図1：実験系の模式図とコルテックスの収縮プロセス

液滴が動く仕組みを調べるため、コルテックスが破けた位置と液滴の運動方向の関係を調べた。その結果、コルテックスが破けて収縮していく方向と逆向きに液滴が動くことがわかった。また、液滴の移動距離は液滴のサイズにほぼ比例することがわかった。続いて、コルテックスと脂質膜の相互作用の強さをリン脂質の組成を変えることで制御し、相互作用の強さとコルテックス動態及び液滴の運動の関係を調べた。相互作用が強い場合は、コルテックスの複数箇所が同時に破け、収縮してはコルテックスが再び形成されるというプロセスが繰り返された。この状況では液滴はわずかにランダムに動くだけで、一方方向性の運動は生じなかった。相互作用が中間の領域では、コルテックスが1箇所破れて収縮を始めると、破けた箇所に薄いコルテックスが再形成され、薄いコルテックスが破けるというプロセスが連続的に生じるようになり、2時間以上に渡って液滴が連続的かつ直線的に動いた。

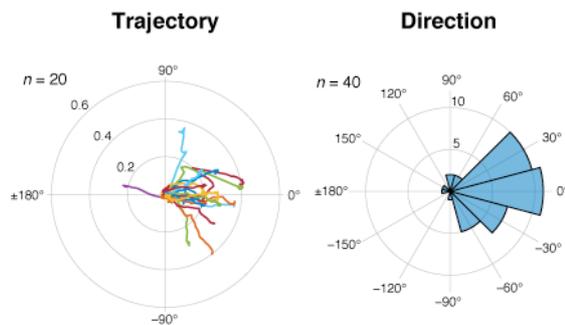


図2：移動した液滴の軌跡と移動方向の一例(コルテックスと脂質膜との相互作用が弱い場合。 0° はコルテックスが破けた方向を示す。)

本研究では、コルテックスの収縮が液滴の運動に変換されること、そしてコルテックスと膜との相互作用の強さによって液滴の運動モードが変化することを発見した。これらの発見はコルテックスによって細胞運動が駆動されるメカニズム、細胞極性が維持されるメカニズムの物理的理解に繋がると期待される。

論文：[Makito Miyazaki, Yuto Sano, Kozue Hamao, Masatoshi Ichikawa, Shin'ichi Ishiwata, Manuscript in Preparation](#)

②細胞内構造の配置制御メカニズム

カエル卵の細胞質抽出液を油中液滴に封入した人工細胞を用いて、コルテックスが細胞内構造の配置を制御しうるかどうかを検証した。まずカエル (*Xenopus laevis*) の卵を遠心分離によって細胞質成分だけを分離し、微小管の影響を排除するために微小管の重合阻害剤であるノコダゾールを添加した後、油中液滴に封入した。封入後、サンプルの温度を氷温から 20°C に上げてアクチンの重合を開始させたところ、液滴内部全域で急速な重合が生じてアクチンネットワークが形成されたのち、ネットワーク全体が収縮した。この収縮に伴って細胞質中のオルガネラが集められ、クラスターが形成された。続いて、液滴内膜直下でアクチン重合が生じ、コルテックスが形成された後、コルテックスが膜から剥がれて液滴中央に向かって収縮した。コルテックス形成と収縮は周期的に生じ、液滴界面から中央に向かうアクチン波は90分以上続いた。各種阻害剤を用いた実験によって、脂質膜表面で生じるアクチン重合には Arp2/3 複合体が関与していること、コルテックスが膜から剥がれて中央部に向かって収縮する過程ではミオシンが関与していること、そして長時間に渡るアクチン波の発生にはアクチンの重合反応と脱重合反応の両方が必要であることが明らかになった。

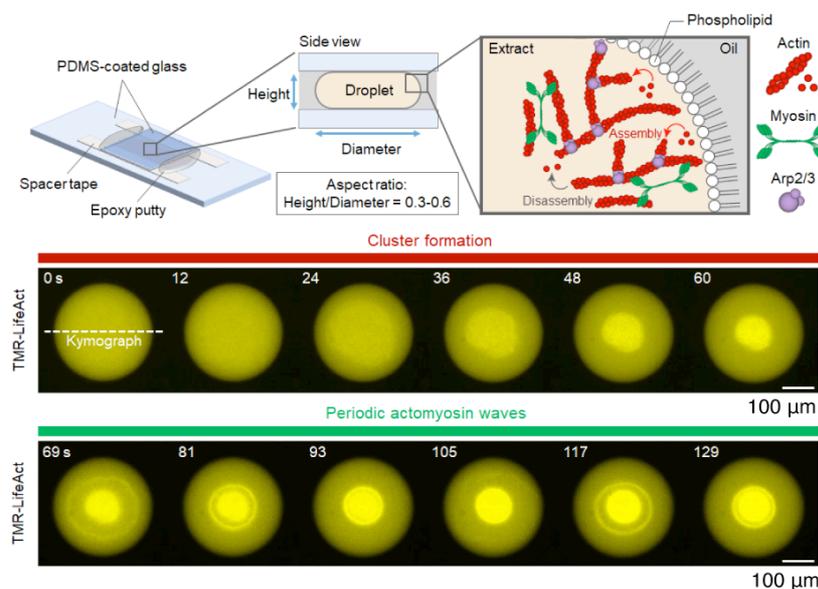


図3：実験系の模式図とクラスター形成およびアクチン波の発生プロセス

続いて液滴の直径を変えて実験を行ったところ、大きな液滴ではクラスターが液滴中央に配置されるのに対して、小さな液滴ではクラスターが液滴の端に配置されることを発見した。本実験系では細胞核や紡錘体は含まれていないため、核や紡錘体に固有のシグナル系は存在しないと期待される。すなわち、クラスターの対称／非対称配置の制御機構を調べることで、細胞内構造の配置制御におけるアクチオシンの直接的な作用を明らかにすることが出来ると考えた。

クラスターの配置の対象-非対称転移の詳細を明らかにするために、沢山のサンプルを用意して定量的な解析を進めていたところ、クラスターの位置が周期的に振動しているサンプルを偶然発見した。この観察結果から、クラスターには液滴中央部へ動かす力と、液滴辺縁部に動かす力の2つが働いており、それらの2つの力の大小関係によってクラスターの最終的な配置が決定するという仮説を立てた。また、振動の周期がアクチン波の周期とおおよそ一致したことから、アクチン波はクラスターを液滴中央に押す力を生み出していると考えた。また、振動しているクラスターと液滴界面との間には数本のアクチンバンドルが形成されていたことから、クラスターと液滴界面との間に確率的に形成されたアクチンブリッジが、クラスターを液滴界面に引き寄せる力を生み出していると考えた。

この綱引きモデルを検証するために、アクチンの制御タンパク質を液滴に添加してアクチンネットワークの架橋度、アクチン線維の平均長を変化させたところ、クラスターの配置の対象-非対称転移の転移点がモデルから期待された方向にシフトした。さらにアクチオシンの分子ダイナミクスに立脚した物理モデルを構築し、解析解及び数値シミュレーションで現象を定量的に再現することに成功した。

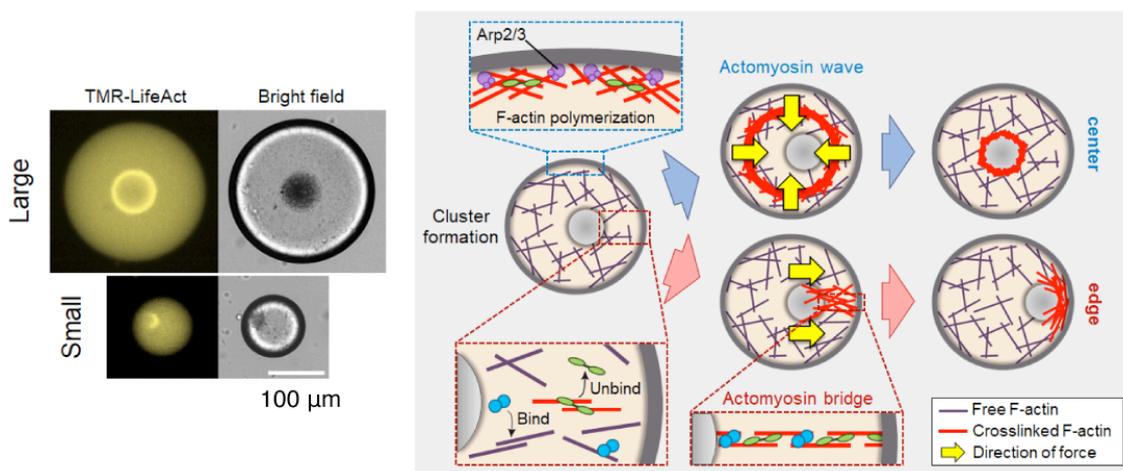


図4：クラスター配置の対称-非対称転移の顕微鏡画像と現象を説明するモデル

本研究では、膜直下に形成されたコレテックスと細胞質中のアクチオシネットワークがクラスターに対して拮抗する力を発生し、それらの力の大小関係（正確にはアクチン波の周期と、細胞質中のアクチオシンが大域的なネットワークを形成するのにかかる特徴的な時間の大小関係）でクラスターの配置が決まるという制御機構を提案した。この新規制御機構は、核や紡錘体のポジショニングなど、動物細胞における細胞内構造の配置制御メカニズムの理解に繋がると期待される。

論文：Ryota Sakamoto, Yusuke T. Maeda, Tetsuya Hiraiwa, Masatoshi Tanabe, Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, "Tug-of-war between actomyosin-driven antagonistic forces determines the positioning symmetry in cell-sized confinement", *Under Review*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

① 宮崎 牧人, 石渡 信一, In vitro 再構成による収縮環の形成機構の解明, 日本生物物理学会学会誌「生物物理」、査読有、56巻、2016、174-176

DOI: 10.2142/biophys.56.174

〔学会発表〕（計24件）

① Makito Miyazaki, Kazuya Suzuki, Shin'ichi Ishiwata, In vitro reconstitution of active cytoskeletal networks in cell-sized droplets, EMN (Energy Materials Nanotechnology) Meeting on Droplets 2016, May 9-13, 2016, San Sebastian, Spain (招待講演)

- ② Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Masataka Chiba, and Kazuya Suzuki, Self-organization of active cytoskeletal networks in a cell-sized confined space, Biophysical Society 2016 Thematic Meetings "Engineering Approaches to Biomolecular Motors: From in vitro to in vivo", June 14-17, 2016, Simon Fraser University, Vancouver, Canada (招待講演)
- ③ Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Katsuhiko Sato, Koutaro Nakagome, Kazuya Suzuki, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, and Takeshi Itabashi, Dynamic properties of bio-motile systems as a liquid-crystalline structure, 26th International Liquid Crystal Conference (ILCC 2016), July 31-August 5, 2016, Kent State University, OH, USA (基調講演)
- ④ 宮崎 牧人、細胞骨格構造の in vitro 再構成、第 6 回ソフトマター研究会、2016.10.24-26、北海道大学、北海道 (招待講演)
- ⑤ 宮崎 牧人、細胞骨格の in vitro 再構成:細胞骨格が司る細胞機能発現機構の解明を目指して、『細胞を創る』研究会 9.0、2016.11.21-22、早稲田大学、東京 (招待講演)
- ⑥ Makito Miyazaki and Shin'ichi Ishiwata, In vitro reconstitution of contractile actomyosin cytoskeleton, The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, November 25-27, 2016, Tsukuba, Japan (招待講演)
- ⑦ Yuto Sano, Makito Miyazaki, Kozue Hamao, and Shin'ichi Ishiwata, Directed motion of cell-sized droplets driven by actomyosin network contraction, The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, November 25-27, 2016, Tsukuba, Japan
- ⑧ Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Hiroki Eguchi, Takashi Ohki, and Shin'ichi Ishiwata, Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings in vitro, IGER International Symposium on "Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage, December 12-13, 2016, Nagoya, Japan
- ⑨ 宮崎 牧人、細胞サイズ閉鎖空間でのアクチン細胞骨格の in vitro 再構成、定量生物学の会第 8 回年会、2017.1.8-9、岡崎カンファレンスセンター、愛知 (招待講演)
- ⑩ 宮崎 牧人、細胞分裂装置の in vitro 再構成、アクティブマター研究会、2017.1.20-21、九州大学、福岡 (招待講演)
- ⑪ Makito Miyazaki, Shin'ichi Ishiwata, In vitro reconstitution of contractile actomyosin rings, The 69th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, June 13-15, 2017, Sendai, Japan (招待講演)
- ⑫ 宮崎 牧人、構成的アプローチによる細胞骨格の自己組織化メカニズムの解明、日本液晶学会討論会・液晶交流会、2017.9.12-15、弘前大学 (招待講演)
- ⑬ Makito Miyazaki, Toward a physical understanding of the cell division machinery from the combination of single-molecule and in vitro reconstitution experiments, The 3rd Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC2017), September 12-16, 2017, Nairobi, Kenya
- ⑭ 宮崎 牧人、細胞骨格の in vitro 再構成:システムサイズ依存性から見えてきた自己組織化機構、2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017: 第 40 回日本分子生物学会年会& 第 90 回日本生化学会大会)、2017.12.6-9、神戸ポートアイランド (招待講演)
- ⑮ Ryota Sakamoto, Yusuke T. Maeda, Tetsuya Hiraiwa, Masatoshi Tanabe, Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Boundary induced actomyosin wave and symmetry breaking of active gels, Designer Soft Matter (DSM2018), June 9, 2018, Singapore
- ⑯ Ryota Sakamoto, Masatoshi Tanabe, Tetsuya Hiraiwa, Shin'ichi Ishiwata, Yusuke T. Maeda, Makito Miyazaki, Symmetry breaking of actomyosin and actin-waves in confined artificial cells, 第 79 回岡崎カンファレンス、2018.8.31, 岡崎、愛知
- ⑰ Makito Miyazaki, In vitro reconstitution of actin cytoskeleton: Toward a unified understanding of the mechanics of cell motility and division, The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Symposium "Geometric cell biology: Uncovering self-organization mechanisms of ordered dynamics and cellular functions by spatio-temporal perturbation"), September 15-17, 2018, Okayama, Japan (招待講演)
- ⑱ 宮崎 牧人、タンパク質から見た細胞の世界〜タンパク質分子は如何にして"巨大"な細胞を制御しているのか?〜、第 56 回日本生物物理学会年会、第 5 回会員総会シンポジウム 生物物理学の根本問題 # 1 : 生物の物理的境界、2018.9.15-17, 岡山 (招待講演)
- ⑲ Ryota Sakamoto, Yusuke T. Maeda, Tetsuya Hiraiwa, Masatoshi Tanabe, Shin'ichi Ishiwata, and Makito Miyazaki, Periodic contraction of actomyosin gel and nucleus-like cluster positioning in a confined geometry, 第 56 回日本生物物理学会年会、2018.9.15, 岡山大学、岡山
- ⑳ 宮崎 牧人、アクチン系細胞骨格の in vitro 再構成:細胞運動と細胞分裂の仕組みの包括的理解を目指して、第 91 回日本生化学会大会、シンポジウム「細胞構造と細胞質流動がつくるバイオロジー」、2018.9.24-26, 京都 (招待講演)
- 21 Ryota Sakamoto, Yusuke T. Maeda, Tetsuya Hiraiwa, Masatoshi Tanabe, Shin'ichi

- Ishiwata, Makito Miyazaki, Actomyosin waves and percolation control nucleus-like cluster positioning in a cell-sized space, *Advances in Physics of Emergent Orders in Fluctuations (APEF2018)*, November 14, 2018, Tokyo, Japan.
- 22 宮崎 牧人、アクトミオシンの収縮力によって動く液滴：細胞運動の構成的理解を目指して、第41回日本分子生物学会年会，ワークショップ「細胞が創る空間パターンニングの脱構築と再構築」，2018.11.28-30，横浜（招待講演）
 - 23 Ryota Sakamoto, Yusuke T. Maeda, Tetsuya Hiraiwa, Masatoshi Tanabe, Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Tug-of-war by active gel shapes positioning symmetry in cell-sized compartment, *American Physical Society March Meeting*, March 5, 2019, Boston, MA, USA
 - 24 坂本 遼太, 宮崎 牧人, 前多 裕介, 変形するアクトミオシン液滴の非接着運動と力学モデル、日本物理学会第74回年次大会、2019. 3.14、九州大学、福岡

〔図書〕（計1件）

- ① 宮崎 牧人、サイズ依存性から見えてきた細胞骨格の自己組織化原理～人工細胞を用いた細胞分裂装置の再構成研究を通して～、羊土社、実験医学、2018、36巻、2186–2192

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hakubi.kyoto-u.ac.jp/jpn/jpn.html>

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。