

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14511

研究課題名(和文)機能性小分子プローブによるアクチン繊維の光操作

研究課題名(英文) Manipulation of Actin Cytoskeleton with Small-Molecular Probes

研究代表者

上野 匡 (Ueno, Tasuku)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：60462660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンは細胞骨格の一種であり、様々な外的な刺激や発生のコンテキストによって応答して、ネットワークが速やかに、また動的に再編成される。これにより細胞極性形成や神経突起の伸長、細胞運動などの細胞のダイナミクスが支えられている。本研究課題では、運動や細胞内物質輸送、細胞間の力の発生のといったさまざまな現象で多種多様な機能を果たす光によりアクチンを、時空間的に操作可能な技術を確立することを目的に、独自の発見に基づき光機能性プローブの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクチンは力の発生などを介して、細胞生存の根幹に関わる重要な役割を担う。近年、アクチンにより形成される多細胞間の力の動的なネットワークが、細胞の集団としての振る舞いに決定的に重要であることがわかってきた。本研究で開発したツールにより、細胞間の力のネットワークを、自由度高く光操作可能となったことで、多細胞集団における力のネットワークの重要性の理解が進み、関連する基礎生命科学分野の発展が期待できる。また、多細胞間の力のネットワークは、創傷治癒や胚発生における細胞の再配置、転移性腫瘍細胞の浸潤や転移においても重要であることから、最新の知見が医療や健康への貢献へと繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Actin is ubiquitous cytoskeletal protein, forming a dynamic network that generates mechanical force in the cells. In order to dissect the complex mechanism of actin-related cellular functions, we have succeeded in developing tools for actin manipulation in living cells by utilizing a newly discovered actin-binding small molecule. The manipulation tools enables highly specific green-light-controlled fragmentation of actin filament, affording unprecedented control of the actin cytoskeleton and its force network in living cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：機能性小分子 アクチン骨格 光操作

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格は、中間径フィラメント、微小管、そしてアクチンフィラメントという繊維状のタンパク質でできた網目状の構造物で、アクチンはその中でも最も細い。顆粒の単量体アクチンタンパク質が重合し糸状に連なった繊維は細胞の形態を決定しており、細胞質・細胞膜の流動と、接着や細胞遊走、細胞分裂での収縮等の運動性に密接に関わっている。細胞が多数になると、細胞はお互いがただ隣り合っているのではなく、選択的な接着によって積極的に寄り集まっている。更に、隣接する細胞によって押されたり引っ張られたり力の力でコミュニケーションしていることも古くから知られており、このような細胞間の力が多細胞動物の形態形成に重要であることについては近年になっても重要な報告が相次いでなされる。このような細胞間に働く力のコミュニケーションが必要なやく割をはたす細胞集団の振る舞いを理解するために、力のネットワークに対する自由度の高い摂動法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

細胞間の力のコミュニケーションの役割の理解するために、細胞間にかかる力の源となるアクチンを光操作するツールを開発することを本研究の目的とした。任意の細胞を任意のタイミングで操作し空間的に力の均衡を破った場合に、その摂動がどのように伝播していくのか、また伝播が力の感知を担う分子群の挙動に対して、どのような時空間的な変化を与えるか、細胞の集団の振る舞いがどのように変わるのか、といった疑問に対して理解を深められる。

3. 研究の方法

薬剤処理によるアクチンの阻害実験は、遺伝工学的な手法と比較して与える摂動の時間解像度や簡便性に優れ、アクチン系の実験においても、現在に至るまで広く汎用されている。現在汎用されているアクチン阻害薬は、受動拡散により細胞膜を透過できるために、細胞の外液に加えるだけで簡便に用いることができる。一方で、薬剤はサンプル全体に分布するために、特定の細胞のみにおいてアクチンを阻害するという事は原理上できず、薬剤が拡散分布していくすべての細胞でアクチンが阻害されてしまう。そこで本研究では、一部の細胞のみで限局的なアクチン骨格摂動を達成するために、光照射依存的なアクチン繊維の操作を可能とする光機能性小分子の開発を行うこととした。分子の開発には、我々の先行研究により偶発的に見いだされたアクチン結合性の蛍光色素 HMLRef を用いた。HMLRef は、既報の天然物構造を構造基盤としたアクチン結合性分子とは異なり、非常に単純な構造ながらアクチン繊維への高い選択性と結合性が達成されている。構造展開の自由度も高いことから、構造改変により分子への機能付与を行い、アクチン骨格を光操作可能な光機能性小分子の開発を行った。

4. 研究成果

HMLRef の構造にヨウ素原始を導入した Small molecule-based Chromophore-assisted light inactivation (smCALI) 用のプローブ分子を設計し、有機化学的に合成した。CALI とは、光照射依存的に活性酸素を産生する光昨日性分子＝光増感物質を用いた、分子不活化法である。HMLRef はアクチン繊維結合性を有する蛍光色素であり、活性酸素を産生する増感能に乏しいため、ヨウ素による重原子効果を付与することで、アクチン繊維に結合する光増感物質へと変換を行うこととした。有機化学的に合成したヨウ素化 HMLRef を細胞系へと応用することで、膜透過性を有し、アクチン繊維への結合性が保たれていることが確かめた。また、一重項酸素由来の発光を元に光励起による増感能の決定を行い、ヨウ素の付与による効果が実験的に確かめられた。

続いて開発した分子を培養生細胞へ付与し、光照射下でのアクチン繊維への影響の有無を確かめたところ、想定通り、プローブ分子を付与した細胞に緑色光を当てた場合には、アクチン繊維の断片化が確認された (図 1)。増感能がない HMRef やアクチン結合性がない光増感剤 (EosinY) では断片化が観測されないことから、結合と増感能、双方が重要であることがわかる。また、光非照射下、またはプローブ非存在下での光照射によってはアクチン繊維が断片化しないことから、開発したプローブが smCALI 法へと応用可能であることが確かめられた。また、アクチン繊維が断片化する条件においても細胞死は惹起されておらず、アクチン繊維に隣接することが知られている微小管への影響も見られないことから、開発した分子を用いることで、生細胞中のアクチン繊維を高選択的に操作できることが確かめられた。緑色光を利用してアクチン繊維を不活化できることから、開発した分子を GLIFin (Green Light-mediated Inactivator of F-actin) と命名した。GLIFin を生細胞に付与した後に、観察視野の一部にのみ光照射を行った場合には、光照射を受けた細胞でのみ、アクチン繊維の断片化が引き起こされることから、細胞 1 個レベルでの空間分解能によってアクチン繊維の不活化が達成できることが示された。

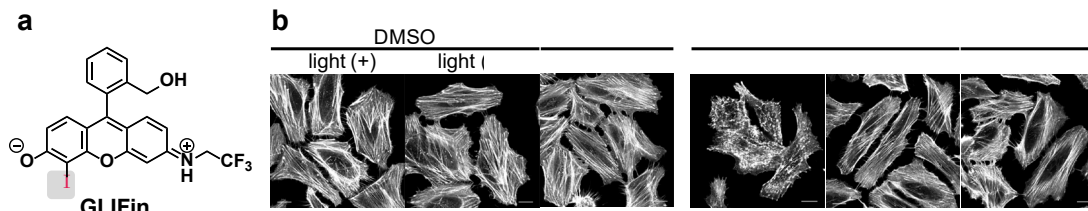


図 1. GLIFin の構造と培養細胞への応用。

続いて集団として細胞が運動する細胞集団運動 (collective cell migration) 系への応用を行った。Collective cell migration は、胚発生や創傷治癒、癌の浸潤といった組織の構築過程に見られる細胞運動様式の 1 つである。腎尿管上皮由来の株化細胞である Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞をシート状に培養した後に collective cell migration を惹起すると、光照射により細胞集団の運動が大幅に抑制されることが確かめられた。細胞形態やアクチン繊維の染色像から、光照射によるアクチン繊維への摂動効果が認められる一方で、光照射によっても、細胞死は引き起こされないことも確かめられた。細胞シートへの摂動は、光照射を行うパターンによって自在に設定

できることから、GLIFin を用いたアクチン繊維の操作の自由度の高さが確かめられた。

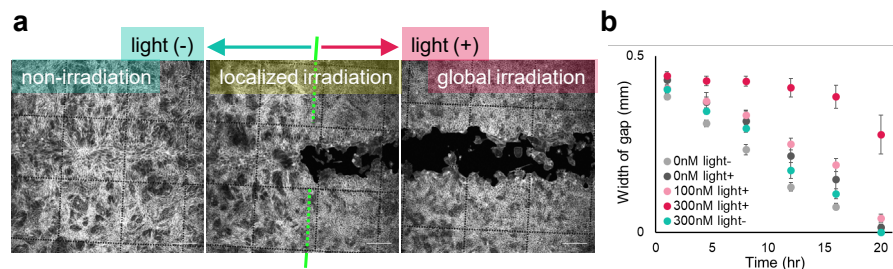


図 2. MDCK 細胞シートの集団運動への応用

細胞の集団が細胞間の力を介して連携しあい運動する仕組みを理解するために従来、scratch wound assay や Laser ablation による細胞の除去、Cell Exclusion Assay 法が用いられてきたが、いずれも細胞がない領域をつくり細胞の振る舞いを観察する技術である。光機能性分子 GLIFin による操作は、任意のタイミング、任意のパターンで集団細胞の中に力を伝達しない生きたままの細胞領域をデザインできるという、既存の手法にない特徴を有していることから、力のコミュニケーションがどのように細胞集団の運動に影響していくのかを解明する上で、非常に強力なツールとして役立つことが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高木 太尊 , 上野 匡, 野村 悠介, 浅沼 大祐, 浦野 泰照
2. 発表標題 新規Fアクチン結合性蛍光小分子の機能精査及びその応用
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木 太尊 , 上野 匡, 野村 悠介, 浅沼 大祐, 浦野 泰照
2. 発表標題 新規 F アクチン結合性蛍光小分子の機能精査及びその応用
3. 学会等名 第13日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野 匡
2. 発表標題 A small molecule based simple fluorescent probe for actin visualization
3. 学会等名 1st International Symposium on Interdisciplinary Approaches to Integrative Understanding of Biological Signaling Networks (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木 太尊, 上野 匡, 野村 悠介, 浅沼 大祐, 浦野 泰照
2. 発表標題 新規Fアクチン結合性蛍光小分子の機能精査及びその応用
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 孝平1, 高倉 栄男1, 志水 陽一, 浅沼 大祐, 上野 匡, 浦野 泰照, 小川 美香子
2. 発表標題 光線免疫療法によるがん細胞死誘発過程における細胞膜の変化に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野 匡
2. 発表標題 機能性小分子によるアクチン骨格の可視化と操作
3. 学会等名 数理シグナル 第2回公開シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木 太尊, 上野 匡, 野村 悠介, 浅沼 大祐, 浦野 泰照
2. 発表標題 小分子蛍光プローブによるアクチン繊維の可視化
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会 第29回サマースクール
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規光増感剤	発明者 浦野泰照, 上野匡, 高木大尊, 浅沼大祐	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-26324	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----