

平成23年 5月25日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20700390

研究課題名(和文)

力学的、分子的両観点からの細胞分裂の解析

研究課題名(英文)

Analysis of the cytokinesis in terms of mechanics and bio-molecules.

研究代表者

三好 洋美 (MIYOSHI HIROMI)

独立行政法人理化学研究所・細胞シミュレーションチーム・研究員

研究者番号： 50455367

研究成果の概要(和文)：

細胞外縁部の運動性と形状の時空間パターン、および、これらの相関関係を解析し、分子レベルから細胞レベルまで、マルチスケールに広がるメカノケミカルなフィードバックによる細胞外縁の運動状態と形状の決定メカニズムを見出した。さらに、マイクロ構造化表面を利用して細胞に力学的な摂動を加えたときの細胞のふるまいを解析し、運動状態と形状の決定に、仮足と細胞体の力学的性質が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

I have analyzed the spatiotemporal patterns of the cell peripheral activity and the shape, and the relation between the patterns of them. The analysis revealed the mechanism determining the cell peripheral activity and the shape through the mechanochemical feedback ranging from the molecular to the cellular scale. Moreover, the effect of the mechanical perturbation on cells was analyzed by using microstructured surface, which revealed the critical contribution of the mechanical properties of the lamella and cell body for determination of the cell motility and the cell shape.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞変形、細胞運動、細胞バイオメカニクス、アクチン細胞骨格、細胞-マイクロ構造相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂を駆動する分子とこれらの細胞内分布が盛んに同定され、その結果から、細胞のくびれの細胞膜直下に形成される収縮環と呼ばれる環状構造体におけるアクチン-ミオシン相互作用が細胞をくびり切ると考えられていた。一方、研究開発当初、機能

の(力学的)観点を取り入れた細胞分裂研究がいくつかのグループにより開始されており、分裂を駆動する力測定・推定、および、時空間変化を意識したアクチン-ミオシン相互作用摂動実験などにより、収縮環だけでなく、くびれの外側表面のアクチン-ミオシン相互作用の重要性を指摘する報告がでてくるようになってきていた(Miyoshi

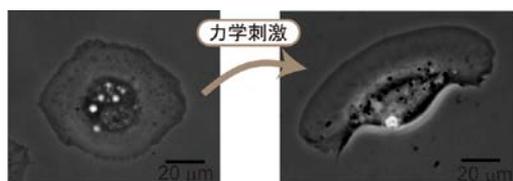
ら Cell Motil. Cytoskeleton 2006, Guha ら Curr. Biol. 2005, O' Connel ら Curr. Biol. 2001). 細胞分裂すなわち, 細胞の変形は, 細胞極性の確立, 表層の変形能の変化, 表層の伸び縮みを含む, 細胞全体が時間空間的に調節された現象であることから, 細胞分裂の根本原理を理解するために, 機能の(物理的)観点, ものの(分子生物学的)観点の両方からのアプローチが重要であると考え, 本研究を開始した.

## 2. 研究の目的

力学因子, 生化学因子の両方に着目し, 細胞分裂, さらに一般的に, 細胞の変形メカニズムを理解することを目的とした. 力学因子に着目したアプローチとして, 実験と数理的解析とを組み合わせ細胞変形を駆動する力のモデリングを行う. 生化学因子として, アクチン細胞骨格構造に着目し, 細胞内分布を同定する. 細胞の変形メカニズムの解明に, 力のモデリング, およびバイオイメージングを融合してアプローチし, 細胞変形のメカニズムの統合的な理解を目指す.

## 3. 研究の方法

モデル細胞として魚上皮ケラトサイトを選択した. ケラトサイトは, 非極性-満月形, 極性-三日月形の形状をとる. いずれもシンプルな形状であることから, 定量解析に適している. また, 力学刺激により非極性-満月形から極性-三日月形への遷移を誘導することができる(図1). よって, 細胞の変形および極性形成に対する力学因子の影響を化学因子とのクロストークなしに評価可能である. このようにケラトサイトは, 力学的・分子的両観点からの細胞形状変形の研究に非常に適したシンプルなモデル細胞として有用である.



非極性-満月形ケラトサイト 極性-三日月形ケラトサイト

図1 ケラトサイトでは力学刺激により非極性-満月形(左)から極性-三日月形(右)への遷移を誘導することができる.

### (1) 細胞外縁の運動性と形状のマルチスケール解析

満月形ケラトサイトの位相差顕微鏡像を高時空間分解能で(200 ms, 80 nm pixel resolution)取得した. 画像処理により細胞外縁を抽出し, 運動性と形状を計測・解析した. 運動性の指標として細胞外縁の突出率( $v$ , 図2a)を, 形状の指標として外縁の曲率( $\kappa$ ,

図2b)を用いた.  $v$ の計算において $\Delta t$ を変化させることにより, また $\kappa$ の計算において $\Delta i$ を変化させることにより, マルチスケールの特徴を抽出した. 得られた $v$ および $\kappa$ を基に, 時空間マップの作成および $v$ と $\kappa$ の相関の解析を行った.

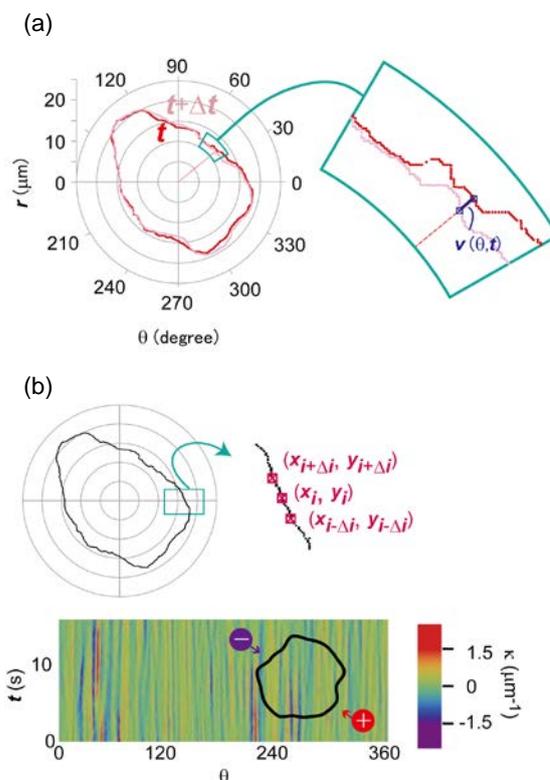


図2 細胞外縁の (a) 突出率, (b) 曲率の計算.

### (2) アクチン細胞骨格構造の観察

固定した細胞において, アクチン細胞骨格, および細胞接着斑の代表的な構成要素であるビンキュリンを観察した.

### (3) メカノケミカルフィードバックの推定

(1)(2)の解析, 観察結果を基に, 細胞形状の変化におけるメカノケミカルフィードバック経路の推定を試みた.

### (4) マイクロ構造化表面による細胞運動の力学的振動

フォトリソグラフィーによりシリコン上に保護膜パターンを形成し, 深堀り反応性イオンエッチング(DRIE)により単線マイクロ溝から成る基質, および, 平面と格子状マイクロ溝表面から成る基質を作製した. 基質上を移動運動する三日月形ケラトサイトがマイクロ構造に遭遇し, これにより運動に力学的に振動が加えられた場合の運動性, 細胞形状の変化を解析した.

## 4. 研究成果

### (1) 細胞外縁の運動性と形状のマルチスケール解析

細胞外縁の突出率( $v$ )を位置と時間に対してプロットし,  $v$ の時空間マップを作成し, サブ細胞

スケールで突出領域が細胞外縁に沿って伝播していることを明らかにした (図 3 a, 破線楕円). さらに, 細かな時空間スケールで  $v$  の時空間マップを作成した結果, サブ細胞スケール突出領域内部において, 突出活性が揺らいでおり突出活性の極大部が時空間的に伝播していることも分かった (図 3 b, 破線).

突出率 ( $v$ ) (図 3 b, 破線) と曲率 ( $\kappa$ ) (図 2 b) の時空間パターンを比較した結果, 特定のスケールにおいてパターンに類似性が認められた. そこで, これらの関連の詳細を解析した結果, 高突出領域において, 突出活性と曲率との間に負の相関があることを見出した (図 4).

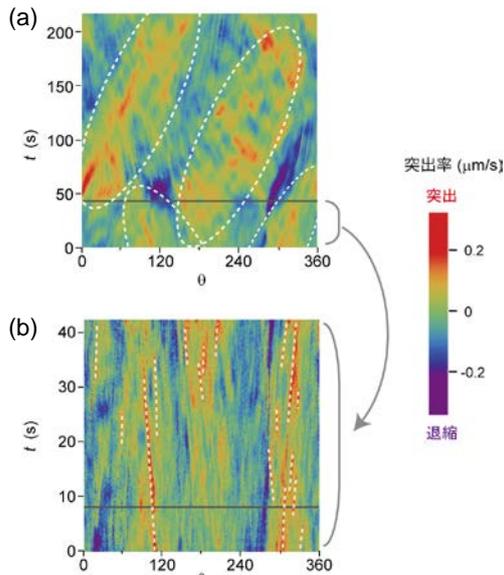


図 3 細胞外縁の突出率 ( $v$ ) の時空間マップ.

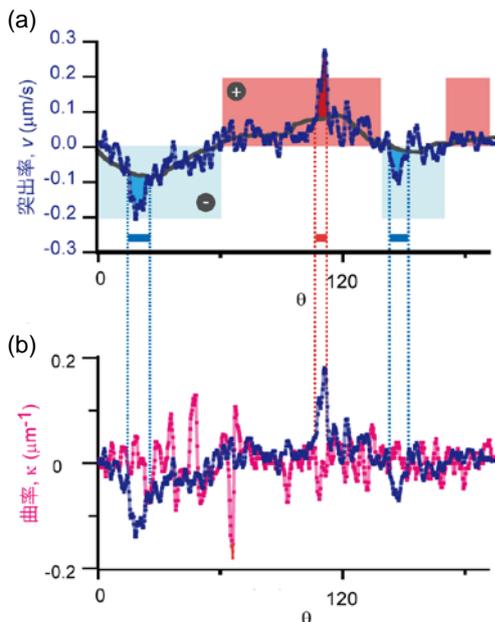


図 4 細胞外縁の突出率 ( $v$ ) と曲率 ( $\kappa$ ) の相関. (a) 高突出領域を赤で示す. (b) 高突出領域において  $v$  と  $\kappa$  の間に負の相関が見られる.

## (2) アクチン細胞骨格構造の観察

非極性一満月形のケラトサイトにおけるアクチン細胞骨格構造は, 放射対称な分布を示した. ビンキュリンは葉状仮足に均一な点状の分布を示した (図 5).

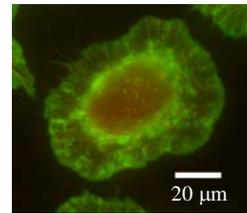


図 5 非極性一満月形ケラトサイトにおけるアクチン細胞骨格 (緑), ビンキュリン (赤) の細胞内分布

## (3) メカノケミカルフィードバックの推定

(1), (2) の解析結果および, ケラトサイトに関する先行研究結果を参照して, 細胞の運動状態および形状を決するメカニズムを推定した (図 6). その結果, 分子レベルからサブ細胞レベルまで, マルチスケールに広がるメカノケミカルなフィードバックによる細胞外縁の運動状態と形状の決定メカニズムが示唆された. 実験データを基にした膜曲率のアクチン伸長阻害効果の同定は, 本研究の重要な成果である.

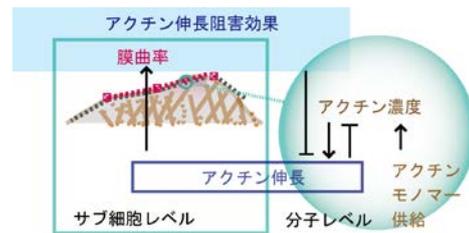


図 6 本研究により推定された細胞外縁の運動状態と形状を決するメカノケミカルなフィードバック

## (4) マイクロ構造化表面による細胞運動の力学摂動

極性一三日月形ケラトサイトが, 移動中の細胞が単線マイクロ溝に遭遇した場合, ①溝を下って登り横切る (図 7 a), ②溝の内部を溝の長軸に沿って移動する, ③溝において方向転換する (図 7 b), の 3 通りの反応が観察された. 溝の幅を狭くするにつれて方向転換する細胞の占める割合が増し, 幅を  $1.5 \mu\text{m}$  以下にすると, 90%以上の細胞が方向転換した.

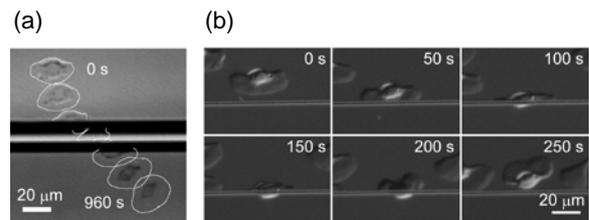


図 7 (a) 溝を横切る細胞 (溝幅:  $20 \mu\text{m}$ ). (b) 溝において方向転換する細胞 (溝幅:  $1.5 \mu\text{m}$ ).

格子状マイクロ溝の場合、溝幅が 1.5  $\mu\text{m}$  以下のときには、単線溝の場合と同様、ほとんどの細胞が方向転換した。一方、溝幅 4  $\mu\text{m}$  の場合には、細胞は 4 本の溝から構成される柱状の構造に沿うように変形し、その結果、細胞の移動効率が大幅に低下した (図 8)。

マイクロ溝に対する細胞の応答において、仮足と細胞体の変形特性が重要と考えられる。細い溝においては、格子溝、直線溝に関わらず、細胞体が溝上まで移動後、方向転換した。原因は、①高い変形能を持つ仮足のマイクロ溝への突出、②変形能の低い細胞体の溝内部への進入の阻害、③マイクロ溝から細胞体への反力により引き起こされる細胞核の変位、④結果として起こる細胞極性の変化、であることが推定された。

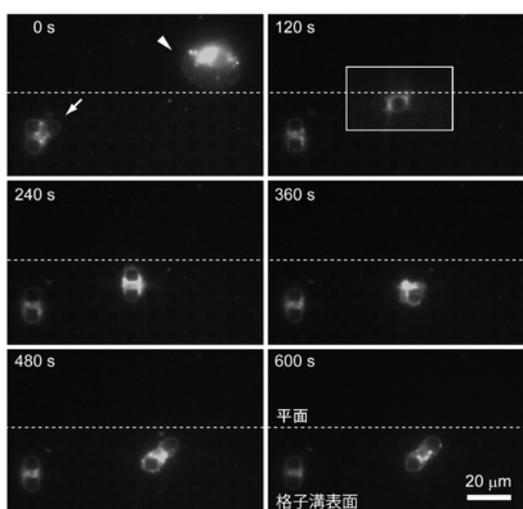


図 8 格子状マイクロ溝において変形し、移動効率が低下した細胞 (溝幅: 4  $\mu\text{m}$ )。

### (5) まとめ

葉状仮足突出活性におけるマルチスケールの入れ子状の時空間パターン (図 3)、および、サブ細胞スケールの突出領域における突出活性と曲率との負の相関関係 (図 4) はこれまでに報告のない新たな知見である。加えて、これらの特徴を呈する運動状態の細胞におけるアクチン細胞骨格構造を同定し (図 5)、これらの知見を基に、力学的・分子的両観点から、細胞外縁の運動状態および形状を決するメカニズムを推定することができた (図 6)。このように、本研究当初開始当時に期待された成果を得ることができた。

さらに、発展として、マイクロ構造化表面を利用して細胞に力学的な摂動を加えた場合の細胞の運動状態および形状を解析した。その結果、マイクロ構造における細胞の運動状態と形状の決定には、仮足のアクチン細胞骨格構造と細胞体の力学的性質が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これは、当初の研究計画以上の進展である。

本研究成果は、細胞の運動状態および形状

の適応的な変化とその結果として発現する細胞機能を与えるための、メカノケミカルなシステムの構造とダイナミクスの解明、および、システム制御に重要な貢献をすると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Hiromi Miyoshi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Yutaka Yamagata, and Taiji Adachi, "Control of highly migratory cells by microstructured surface based on transient change in cell behavior," *Biomaterials*, vol.31, pp. 8539-8545, 2010, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi, 「細胞外縁部の運動性と形状の空間スケール依存的な相関」第 48 回日本生物物理学会年会, 2010.9.20, 仙台
- ② Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi, "Quantitative analysis of cell edge dynamics and cell shape in non-polarized fish epidermal keratocytes," *Biophysical Society 54<sup>th</sup> Annual Meeting*, 2010.2.20 - 2.24, San Francisco, USA
- ③ 三好 洋美, 安達 泰治, 「非極性ケラトサイトにおける突出と退縮のダイナミクス」第 47 回日本生物物理学会年会, 2009.10.30 - 11.1, 徳島

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 基板、細胞培養装置、細胞チップおよび培養方法

発明者: 三好 洋美, 山形 豊, 安達 泰治, 朱正明, コ ジョンス, イ サンミン, チョ ドンジン

権利者: 独立行政法人理化学研究所, P u s a n N a t i o n a l U n i v e r s i t y

種類: 特許

番号: 特願 2010-018665

出願年月日: 2010.1.9

国内外の別: 国内

[その他]

RIKEN Research Highlights: 「微細凹凸で細胞の移動を操る」, 10 December 2010

<http://www.rikenresearch.riken.jp/jpn/research/6432>

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 洋美 (MIYOSHI HIROMI)

独立行政法人理化学研究所・細胞シミュレーションチーム・研究員

50455367