

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20974

研究課題名(和文)細胞実験と数値流体力学の統合的手法による細胞質分裂における細胞の力学状態の解明

研究課題名(英文)An integrated analysis of biomechanics of cytokinesis: in vitro experiment and computer simulation

研究代表者

今井 陽介 (Imai, Yohsuke)

神戸大学・工学研究科・教授

研究者番号：60431524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：タリンGFPを発現させたMDA-MB-231細胞の細胞質分裂過程の三次元ライブイメージングを実施し、「タリン二量体の構造変化が細胞質分裂の力学的な特性を変化させるのではないか」という仮説を検証した。タリンGFPを発現したMDA-MB-231細胞は底面に対して斜め方向に分裂する傾向があり、これは、生体分子、細胞、細胞環境の力学的なバランスが変化したためではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常の蛍光顕微鏡では二次元像しか得ることができないため、細胞質分裂を三次元的に時系列でとらえた例はほとんどない。細胞質分裂の過程では、細胞骨格タンパクが発生する収縮力を細胞膜に伝えるために、細胞骨格タンパクと細胞膜を繋ぐリンカータンパクが必要であるが、その実体は明らかになっていない。本研究は、タリンがリンカータンパクの一つであることを示唆し、またタリンの構造変化によって細胞質分裂を制御できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In cells, two talins form a homodimer, connecting to each other at the C-terminus dimerization domain. We hypothesized that an alteration in the talin dimer structure changes the dynamics of cytokinesis. To test the hypothesis, we performed a three-dimensional time-lapse imaging of MDA-MB-231 cells, expressing talin-GFP which forms heterodimers with endogenous talin. We show that the cytokinesis orientation was changed to more oblique rather than horizontal by expressing talin-GFP.

研究分野：計算バイオメカニクス

キーワード：計算生体流体力学 数値流体力学 細胞実験 計算バイオメカニクス 細胞質分裂

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、細胞小器官を含むとはいえ、ほとんど液体の細胞質が、ほとんど液体の細胞膜に包まれている。極めてやわらかく、細胞は自身に作用する力に応じて、時々刻々とかたちを変える。細胞骨格分子が重合あるいは脱重合して力学平衡が局部的に破れ、細胞膜と細胞環境の間で細胞接着分子が結合あるいは解離する。細胞の周囲環境もまた液体で満たされており、低レイノルズ数の流れの中でゆっくりと、新たな力学平衡を満たすように細胞はかたちを変える。これが絶えず繰り返され、その結果として、細胞は運動したり、分裂したりする。このような細胞挙動は、これまで人類が開発してきた機械や材料にはない特徴を多く有しており、そのメカニズムの理解は、生命科学のみならず、人工細胞の設計原理やマイクロロボットの動作原理など、工学技術革新のための基礎学理となる。しかしながら、生体分子、細胞、および細胞環境がマルチスケールで複雑に相互作用する力学の問題であり、分子の同定を中心とする従来の生物学的手法だけでは本質的な理解に至らない。

計算バイオメカニクスは、生命現象を力学法則によって数理モデル化し、大規模シミュレーションによって力学状態を定量化する。我々は、マラリアを題材にこれを血球細胞と微小循環系へと応用し (Kondo et al., *Ann. Biomed. Eng.*, 2009), セレクチンを介したがん細胞の接着挙動に力学的な解釈を与えるなど (Takeishi et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2016), 細胞の計算バイオメカニクスの研究を推進してきた。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、我々が開発してきた細胞の流体構造生化学連成計算を基盤に、細胞実験と数値流体力学の統合的な手法によって、細胞質分裂における生体分子、細胞、細胞環境の力学状態を明らかにする。細胞質分裂の過程では、細胞の赤道上に収縮環が発生し、細胞骨格タンパクであるアクチンとモータータンパクであるミオシンが収縮力を発生する。収縮力を細胞膜に伝えるためには、細胞骨格と細胞膜を繋ぐリンカータンパクが必要であるが、その実体は未だ明らかでない。予備実験において、細胞質分裂直前、細胞の底面に平行な赤道上に、タリンと呼ばれる分子がリング状に局在する様子が観察された。ここでは、タリンが収縮環のリンカータンパクであると仮定し、タリンの局在と細胞質分裂の挙動の関係に着目する。

### 3. 研究の方法

高転移性乳がん細胞株 (MDA-

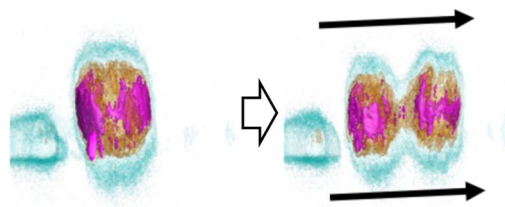


図1. EGFP-Fを発現したMDA-MB-231細胞の細胞質分裂. 二光子顕微鏡で撮影した水平面の断層画像から三次元再構築している。細胞質分裂の直前に球形状になり、その後、底面に対しほとんど平行な方向に分裂した。

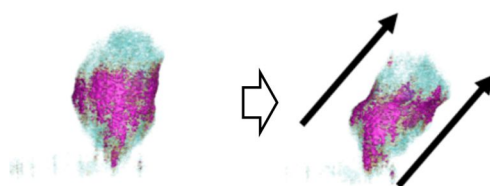


図2. タリンGFPを発現したMDA-MB-231細胞の細胞質分裂. 細胞質分裂の直前に球形状になり、赤道面に近い位置に分裂溝が形成され、底面に対し斜め上向きに分裂した。

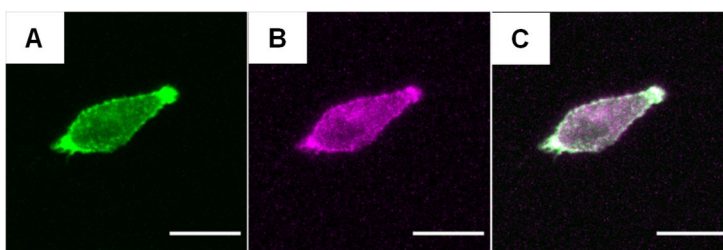


図3. 底面に接着し伸長した形状のMDA-MB-231細胞の内在性タリンとタリンGFPの分布. (A) タリンGFP. (B) 内在性タリン. (C) AとBを重ねたもの. 内在性タリンとタリンは焦点接着斑に共局在している。内在性タリンは焦点接着斑以外の領域にも分布している。

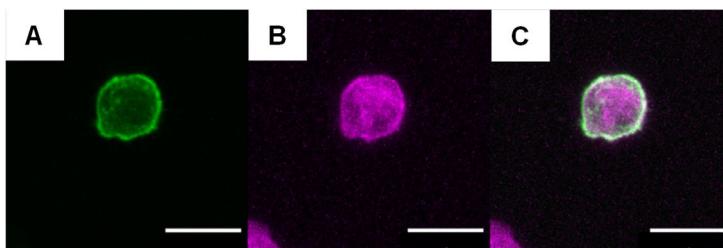


図4. 球形状のMDA-MB-231細胞の内在性タリンとタリンGFPの分布. (A) タリンGFP. (B) 内在性タリン. (C) AとBを重ねたもの. 内在性タリンとタリンは赤道上に共局在している。内在性タリンは赤道上以外の領域にも分布している。

MB-231) に GFP を発現させ、二光子顕微鏡を用いて、細胞質分裂過程の三次元ライブイメージングを実施する。細胞内では 2 つのタリンが C 末端の二量体化ドメインで結合し、ホモ二量体を形成する。我々はタリンの二量体の構造変化が細胞質分裂の力学的な特性を変化させるのではないかと仮説を立てた。これを検証するため、内在性タリンと二量体を形成するタリン GFP を発現させた MDA-MB-231 細胞と EGFP-F (細胞膜 GFP) を発現させた MDA-MB-231 細胞の細胞質分裂の過程を比較した。

また、細胞を超弾性体としてモデル化し、細胞骨格タンパクが発生する力、細胞と底面の間に作用する接着力を連成させる計算モデルを開発し、実験結果と比較した。

#### 4. 研究成果

まず、EGFP-F を発現した MDA-MB-231 細胞の細胞質分裂の三次元ライブイメージングを実施した。図 1 のように、EGFP-F を発現した MDA-MB-231 細胞は細胞質分裂直前に球形状に変化した。水平方向に次第に伸長し、分裂溝を形成し、底面に対してほとんど平行な方向に分裂した。EGFP-F を発現した MDA-MB-231 細胞 10 体の細胞質分裂の角度は、水平面に対して  $0.01\pi$  から  $0.16\pi$  であった。

次に、タリン GFP を発現した MDA-MB-231 細胞の細胞質分裂を三次元ライブイメージングした。図 2 のように、タリン GFP を発現した MDA-MB-231 細胞も細胞質分裂の直前に球形状に変化した。しかしながら、分裂溝は細胞の赤道面に近い位置に形成され、斜め方向に分裂した。タリン GFP を発現した MDA-MB-231 細胞 20 体の細胞質分裂の角度は、 $0.01\pi$  から  $0.44\pi$  に広く分布しており、中央値は  $0.58\pi$  であった。

内在性のタリンとタリン GFP の分布の違いを調べるため、蛍光免疫染色を実施した。図 3 のように、底面に接着し伸長した形状の MDA-MB-231 細胞について、内在性タリンとタリン GFP は焦点接着斑に共同在していたが、内在性タリンは細胞接着斑以外の領域にも分布していた。また、図 4 のように、細胞質分裂直前と考えられる球形状の MDA-MB-231 細胞については、タリン GFP は赤道上にタリンと共同在し、一方で、内在性タリンは細胞全体にも分布がみられた。

底面に接着している細胞は、細胞質分裂の直前に球形になる必要がある。細胞接着斑に局在していたタリン GFP が、赤道上に局在するタリン GFP と関係があるかどうかを調べるため、タリン GFP を発現している MDA-MB-231 細胞が底面に接着している状態から球形状になる過程の三次元ライブイメージングを実施した。図 5 のように、細胞接着斑に局在していたタリン GFP が赤道上に移動している様子が観察された。さらに、この過程をコンピュータシミュレーションによって再現を試みた。図 6 のように、底面近傍に分布していた赤い粒子が球形状に変化する過程で赤道上に移動した。

これらの結果を総合すると、細胞質分裂の方向が変化したのは、タリン GFP の発現によってタリンの構造が変化し、生体分子、細胞、細胞環境の力学的なバランスが変化したためであると考えられる。タリンとタリン GFP のヘテロ二量体のピンキュリン結合部位がタリンホモ二量体よりも小さな力で露出しているのではないかと考えている。

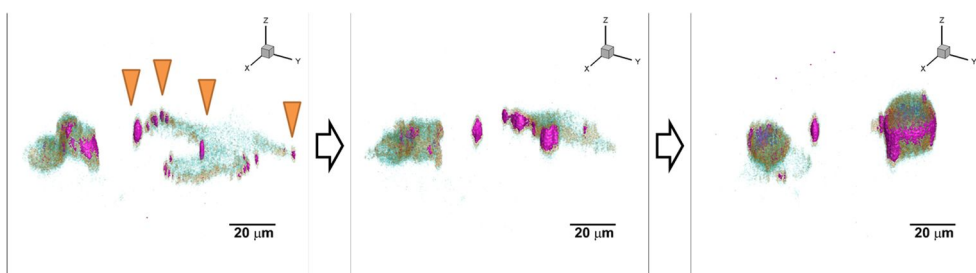


図5. 底面に接着していたMDA-MB-231細胞（タリンGFPを発現している）が球形状になる過程。細胞接着斑に局在していたタリンGFPが赤道上に移動しているように見える。

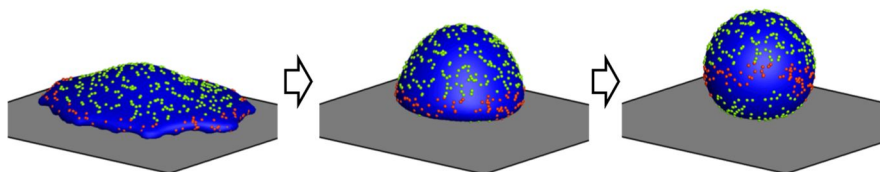


図6. 底面に接着していた細胞が球形状になる過程のコンピュータシミュレーション。底面近傍（焦点接着斑）に分布していた赤い粒子が赤道近傍に移動している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kido, S., Ishida, S., Imai, Y.
2. 発表標題 A computational model of cell adhesion and migration under fluid shear stress
3. 学会等名 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	沼山 恵子  (Numayama-Tsuruta Keiko)  (30400287)	東北大学・医工学研究科・准教授    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------