

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657051

研究課題名（和文）3次元力学計測顕微鏡を利用した、紡錘体の形態を制御するメカノセンシング機構の解明

研究課題名（英文）Study of mechanosensing in the spindle using a 3D force microscope

研究代表者

矢島 潤一郎 (YAJIMA JUNICHIRO)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00453499

研究成果の概要（和文）：細胞分裂など、細胞の形態が変化するとき、細胞骨格である微小管に対して機械的ストレスが生じ、その応答として様々な生化学・力学反応が制御される。そのような制御機構を調べるためには、実際に微小管に機械刺激を与え、機械的刺激がかかった微小管に相互作用する分子モーター蛋白質(キネシン分子やダイニン分子)への影響を調べる必要がある。本研究では、生体分子を3次元空間で力学計測可能な実験系を構築し、微小管（モーター複合体）がメカノセンサーであること検証を試みた。

研究成果の概要（英文）：As a cell changes its shape such as cell division, one of the cytoskeletons, a microtubule, is subject to mechanical stress and responds to mechanical stimulation. These responses may regulate biochemical and mechanical reactions in cell. One way to understand its regulated system is to apply mechanical stress to a microtubule in an *in vitro* assay and then to quantify motility of molecular motors (kinesins and dyneins) interacted with the microtubule. We constructed microscope systems, which are able to apply mechanical force into the microtubule in 3D dimensions. Using this system, we are examining if a microtubule is mechano-sensor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2400000	0	2400000
2011年度	700000	210000	910000
年度			
年度			
年度			
総計	3100000	210000	3310000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：微小管・分裂期分子モータータンパク質・メカノセンサー

1. 研究開始当初の背景
細胞外からのメカニカルストレスに応答す

るメカノセンサーとして、細胞膜内部のイオンチャンネルや細胞膜と接触する細胞骨格で

あるアクチンフィラメント等が近年同定されてきた。細胞分裂時は、細胞内部の微小管依存性分子モーター(細胞分裂特異的キネシン分子や細胞質ダイニン分子)により、細胞分裂装置(紡錘体)を構成する細胞骨格微小管がダイナミックにその形態をかえ、複製されたDNAを正確に分配するが、その力を伝達するネットワーク機構は謎であった。その最大の理由は、紡錘体の形態変化を感知するメカノセンサーとしての実体分子が、それらの分子が実在するかも含め、不明な点であった。本申請者はこれまでに微小管依存性分子モータータンパク質の外部の負荷に依存して起こる化学・力学反応の特性を、光ピンセット技術(Yajima *et al.* *EMBO*, 2003, Uemura *et al.* *PNAS*, 2003)・1分子観察技術(Yajima *et al.* *Curr. Biol.*, 2002)などの手法を用いて明らかにすることを試みてきた。さらに、*in vitro*再構成系で、*xy*平面ばかりか、*z*方向にもナノメートル・ミリ秒の空間時間分解能で計測できる顕微鏡システムを用いて、分裂期キネシン(Eg5)が微小管を長軸方向にスライドさせるだけでなく、微小管を回転させるといった新たな特性を報告した(Yajima *et al.* *Nat Struct Mol Biol*, 2008)。従来の生細胞を対象とするエバネッセント照明観察では、細胞表層の2次元平面のみの観察に限定され、また、近年の細胞観察の主流となっている共焦点顕微鏡による3次元観察法では、観察が蛍光だけに限定されることや、*z*方向の空間分解能が低く、位置の定量的な解析が困難である。このような状況を打開するためには、本申請者が過去に報告したように、3次元空間でナノメートル(生体分子のサイズ)の空間分解能、ミリ秒(酵素サイクル時間)での時間分解能で生体分子を観察することが必要で、これらの3次元計測方法を生細胞内部の分子の観察に適用することで、従来の生細胞の観察方法の限界を超えることが十分に期待できた。加えて、生体タンパク質を取り扱う技術やタンパク質のダイナミックな挙動を、高時間分解能、かつ、立体的に計測できる3次元位置計測技術を基に、*z*方向(光軸方向)にも力学測定ができる3次元光ピンセット顕微鏡を開発することも可能な状況であった。生体内の細胞環境は本来3次元であるため、刺激する機械的ストレス及び応答シグナルの検出は3次元で行うべきである。精製した微小管やキネシン分子、細胞骨格ネットワークへの3次元力学応答の計測といった切り口は、分子・細胞生物学において新しい研究手法であり、その結果として、新たなメカノセンサー同定方法の一つとなり得、微小管結合タンパク質複合体がメカノセンサーであるか否かを光学顕微鏡による定量によ

り検証を行うことが可能な状況であった。微小管がメカノトランスダクション上流の実体分子と証明できれば、微小管と相互作用して化学反応や力学反応を起こす生体分子の同定にも繋がる。さらに、微小管はすでにメカノセンサーとして同定されている別の細胞骨格であるアクチンフィラメントとも生体分子を介して架橋されており、細胞の広範囲なメカノトランスダクション機構の解明に繋がり、生体分子間の‘力伝達ネットワーク’の理解、すなわち、メカニカルストレス(物理的信号)による細胞内の‘メカノトランスダクション’の理解にまで繋がることを十分に期待できた。これらの動作機構が解明されれば、生命を支える根幹的な機能の一つである、細胞の力学刺激応答機構は、これまでに完全に解明されていなかった細胞分裂や分化を始め、多くの生命現象の理解が進むばかりか、無重力条件化での骨や筋組織の反応の解明を含む(宇宙)医学等の発展にも繋がることを考えた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞分裂時でのメカノセンサーの同定が目標であった。分裂装置・紡錘体の分子機構の解明を目指した研究手法は、現状では出尽くした感もあり、例えば、機能する生体分子の個々の分子活性は、変異体分子やRNAiによる機能阻害と免疫染色を組合した観察などにより明らかになってきたが、複数のタンパク質分子の機能発現が細胞内でどのように制御されているか、紡錘体の形態が如何に制御されているかの全容は不明である。これは現状研究手法の主流である生体分子の局在の観察からだけでは機能の全容を理解できないことが理由として挙げられる。紡錘体内では時々刻々と構成要素の生体分子が入れ替わり機能する非平衡な開放された系でありながらも、その形態や骨格などを巧みな内部の力のバランスで保っているため、紡錘体内に存在する力学特性を明らかにする必要がある。本研究では、紡錘体の機能を完全に理解するために、紡錘体に働く‘力伝達ネットワーク機構’の解明に不可欠なメカノセンサーの同定に挑むものであった。この新しいメカノセンサーとして微小管もしくは、微小管・分子モーター複合体をその候補として考えていた。これまでに、微小管に加えられたメカニカルな刺激に応答するキネシン分子の特性が調べられたことは、発想が斬新なため皆無であった。本申請者は、これまでに精製した微小管を使用して、*In vitro*運動アッセイにおける予備的実験により、微小管の先端がガラス面に固定されて(バックリングして)ねじれた微小管には、溶液中にあるキネシン-1の結合頻度が減少することを確かめ

ており、これは微小管がねじれ刺激に対するメカノセンサーとなっている可能性を示唆している。これを定量するために、3次元での力学計測が必要であった。z方向での力学計測は技術的に難しいことから報告は皆無であるが、本申請者が報告した3次元位置検出顕微鏡に(Yajima *et al. Nat Struct Mol Biol*, 2008)、光ピンセットシステムを組み込むことを目指した。さらに、再構成して自律的に構築した紡錘体様構造で力学的刺激を与えてその応答を、ネットワークを構成している微小管及びキネシン分子の動態を観察することで、構造体の力学特性を調べるとともに、再構成紡錘体中でも微小管(微小管・キネシン複合体)がメカノトランスダクションの上流に位置する、メカノセンサーであることを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微小管に対する伸張・曲げ・ねじれ刺激に応答するキネシンの3次元空間での応答の定量:

微小管に対する伸張・曲げ刺激は、微小管の両端付近に結合したビーズを赤外レーザーで集光させた光ピンセットで捕捉して溶液中で操作することで行った(Yajima *et al.* 2003 *EMBO*)。ねじれ刺激は微小管の先端をガラス面に固定して、ガラス面に結合した分子モーターにより微小管を滑り回転運動させ、微小管がねじられた超らせん構造により実現した(Yajima & Cross. *Nat. Chem. Biol.* 2005)。より定量的にねじれ刺激を加えるためには、磁石を選定して使用し、微小管に結合した磁気ビーズを回転させることでも可能した。上述の物理刺激を与えた微小管に対するキネシンの結合頻度、結合寿命、微小管上での運動連続性、運動速度はキネシンに結合した量子ドットの3次元空間での輝点を、破断力はキネシンを結合させビーズを別の光ピンセットにより3次元的に操作して、微小管から無理やり乖離させたときの3次元での力を計測(後述)することで定量する。

(2) 光ピンセット及び3次元位置検出機構を統合した顕微鏡システムの構築:

Nikon-Ti 顕微鏡のそれぞれの入射ポートから赤外レーザー及び青レーザーを入射する。赤外レーザーの一つは $1/4\lambda$ 板とプリズムを使用して独立に操作できる2つのレーザートラップとしてビーズをそれぞれ捕捉し、微小管の両端に結合させて、微小管に伸びや曲げの物理刺激を可逆的に加える。ビーズの位置とキネシンが結合し

た量子ドットの位置を同時に3次元で検出可能とした。このために、量子ドットとビーズが同等の光強度を持つように、ビーズの蛍光波長を選定する。蛍光微小管像は光を分割することで別のカメラで撮影する。実際に捕捉したビーズのブラウン運動の3次元の軌跡から、xyzそれぞれの方向の光ピンセットのパネ定数を得、生体分子に加わる力などを定量することを可能とした。

4. 研究成果

細胞分裂など、細胞の形態が変化するとき、細胞骨格である微小管に対して機械的ストレスが生じ、その応答として様々な生化学・力学反応が制御される。本研究では、3次元空間での力学計測系を構築し、機械的刺激がかかった微小管に相互作用する分子モーター蛋白質への影響を調べ、微小管(モーター複合体)がメカノセンサーであるか否かの検証を試みた。

(1) 生体分子を計測する装置の構築:

3次元空間で粒子の位置を計測できる光学系に、磁気力(磁石)、もしくは赤外レーザーによる光ピンセットにより生体分子を操作・定量ができる実験系の構築を試みた。微小管の長軸に対してねじれ方向の負荷を加えるため、適当な方法を検討した。適当な磁力をかけるためには、磁石の向きや位置を変えることや適当な磁力を持つ磁石を選択することも必要で、さらに、顕微システムへの取り付けを既存の光学部品を組み合わせることで行った。微小管のねじれの定量のために、微小管の複数箇所量子ドットを結合し、これらの相対位置より微小管のねじれ具合を見積もる方法を検討した。微小管に対して曲げや伸びを引き起こす操作は、微小管にラテックスビーズを結合させ、ビーズを光ピンセットで捕捉して操作する方法を検討し、微小管へのねじれの場合と同様の方法で見積もった。以上より、外部からの操作により微小管に力学的な負荷をかける方法の開発が進み、微小管に対して伸長・曲げ・ねじれ刺激を加え、相互作用する微小管依存性分子モータータンパク質の挙動への影響を定量化してゆく方法の最適化を試みた。

(2) 微小管に対する伸張・曲げ・ねじれ刺激に応答するキネシンの3次元空間での応答特性:

微小管をねじるためには、微小管の片端をガラス面やビーズなどの粒子に吸着させ、微小管の他の箇所に磁気ビーズ等を結合させる必要があり、その最適化を行ったが、外部から操作を加えて微小管に伸び・曲げ・ねじれ刺激を与える方法およびその定量方法の確

立に予想以上に時間を要したため、実際に微小管依存性分子モータータンパク質を用いた計測のための実験系の最適化に費やす時間が不十分であった。本研究課題は、これまでの成果に基づき、機械的刺激がかかった微小管に相互作用する分子モーター蛋白質への影響を定量し、微小管（モーター複合体）がメカノセンサーであるかを検証することが可能と考えているが、以下について更なる改良・検討が必要である。計測系については、微小管に対して強いねじれを引き起こすことのできる磁石の位置や向きを制御する機構をさらに開発していくことが必要であり、また、計測中に生じるドリフトを取り除く必要もある。生体資料の測定に関しては、微小管に結合したビーズが非特異的にガラス面に吸着しない条件、微小管依存性分子モータータンパク質が外部から操作されている微小管上を運動する実験条件を最適化する必要がある。

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)

[学会発表] (計3件)

①矢島 潤一郎、西坂 孝之、Characterising the corkscrew motion of a microtubule driven by single-headed kinesins. Actin, the Cytoskeleton and the Nucleus. Mechanobiology workshop. 平成22年11月9日-11月12日、シンガポール国立大学、シンガポール.

②矢島 潤一郎、西坂 孝之 Robert Cross、キネシンモーターによる微小管の並進回転運動メカニズム 2011年生体運動研究合同班会議、平成23年1月7日-1月9日、大阪市立大学、大阪市

③山口 真、豊島 陽子、矢島 潤一郎、テトラヒメナ外腕ダイニンによる微小管の滑り回転運動 2012年生体運動研究合同班会議、平成24年1月6日-1月8日、筑波大学、つくば市

[その他]

ホームページ等

<http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/laboratories/yajima.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢島 潤一郎 (YAJIMA JUNICHIRO)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号：00453499

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(その他)研究協力者

西坂 崇之 (NISHIZAKA TAKAYUKI)
学習院大学・理学部・教授

研究者番号：40359112