

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：12608

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2007～2011

課題番号：19GS0418

研究課題名（和文）生体情報伝達連鎖機構の単分子力学解析と計算機モデリング

研究課題名（英文）Single Molecule Mechanics and Computer Modeling of Cascading System of Biological Information Transfer

研究代表者 猪飼 篤 (IKAI ATSUSHI)

東京工業大学・イノベーション研究推進体特任教授

研究者番号：50011713

研究成果の概要（和文）：

本研究課題の目的は、生細胞が持つ細胞骨格、と称される生体情報伝達用細胞内ネットワーク構造の力学および損傷修復過程の特性を明らかにし、細胞操作、細胞手術への貢献を図るものである。研究成果として、赤血球および繊維芽細胞中の細胞骨格（特にストレスファイバー）の非常に異なる力学特性をナノ力学手法により測定し、これまでにない定量的な構造モデルを構築した。その結果、ストレスファイバーを中心とする細胞骨格がアクチン層との結合を通じて細胞膜に連結されており、細胞運動、情報伝達において両者が密接な連携をもって動作する力学的基盤が明確となった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this project is to perform mechanically quantitative experiments to clarify the mechanical and wound healing characteristics of the cytoskeletal and contribute to the single cell manipulations and surgery. We used a newly developed nano-mechanical methods to measure the different mechanical properties of the red blood cell and fibroblast (especially those of actin stress fibers) and constructed mechanical models to simulate the results. We obtained solid mechanical evidence that showed strong association of stress fibers with cortical actomyosin layer. This association forms the basis for the cytoskeleton and cell membrane cooperation during cell locomotion and information transfer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	103,800,000	31,140,000	134,940,000
2008年度	81,000,000	24,300,000	105,300,000
2009年度	61,800,000	18,540,000	80,340,000
2010年度	56,400,000	16,920,000	73,320,000
2011年度	57,300,000	17,190,000	74,490,000
総計	360,300,000	108,090,000	468,390,000

研究分野：生体ナノ力学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：原子間力顕微鏡、細胞骨格、ネットワーク力学、分子間相互作用力、ストレスファイバー、アクチン、

1. 研究開始当初の背景

力学的刺激に対する細胞応答の主要部分は細胞骨格によることは知られ始めていたが、細胞骨格ネットワーク内での要素間の結合

状態やその強さが細胞骨格を通しての情報伝達に果たす機構についての知見は乏しかった。我々は直接的な力学計測を細胞内にて行うことによりこの分野の定量的発展に貢

献することを期した。

2. 研究の目的

本研究課題の主要な目的は、従来我々が開発してきた生体ナノ力学手法を駆使して細胞骨格の力学的構成原理を解明をする点にある。その手法は原子間力顕微鏡（AFM）の分子操作機能の多機能展開と材料力学理論の応用である。以下に具体的な研究目的を記す。

(1) 細胞力学研究で広く用いられている赤血球の細胞骨格の外力に対する力学応答を脂質膜を除去した状態で測定し、ネットワークモデルを用いて構成タンパク質のどのような物性が赤血球の柔軟な性質に寄与しているかを明らかにする。このような実験は世界的に初めての研究である。

(2) 細胞の力学的シグナル伝達系の構造維持と機能発現において主要な役割を担うアクチン細胞骨格、特にアクチンストレスファイバー（図1参照）について生細胞内直接ナノ力学測定を世界に先駆けて行い、その結果から予想される力学構造について力学解析と計算機シミュレーションを行ってさらに高度の理解に到達する。細胞の構造についての実験と理論解析から得る構造情報を単一細胞レベルの人工操作、細胞手術などの応用に役立つ技術とする。

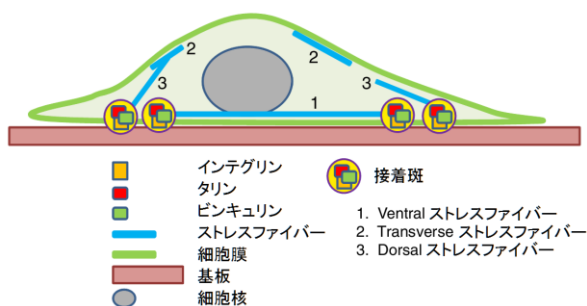


図1. 繊維芽細胞の細胞骨格と接着斑モデル. このような細胞に上方からAFM探針を差し込んでストレスファイバー等を人為操作する。

(3) 人工的に発生させた接着斑と呼ばれる構造が細胞内のアクチンネットワークと結合を生じてゆく過程をマイクロロロジー手法で追跡する。

(4) 細胞内のストレスファイバーと呼ばれる細胞骨格繊維の生じる損傷の修復過程を生化学的に追跡してその時間経過を測定する。

(5) 上記のような細胞骨格構造を形成し、それぞれの細胞骨格に特有の力学特性を与

えるタンパク質因子間の非共有結合相互作用力を一分子力学スペクトロスコピー法で解明する。

3. 研究の方法

主な研究の方法として我々が用いる分子・細胞レベルのナノ力学手法は主としてAFMの分子操作機能を活用する。我々は従来の研究において、AFMを利用した細胞膜タンパク質の選択的採取、リガンド：受容体結合力測定、細胞表面および細胞内の人工操作などにAFMを用いてきた。本研究課題ではこの方法をさらに発展させて細胞骨格研究に活用する。また細胞骨格の力学的構成原理を解明するために、ナノ力学測定結果を理論材料力学および計算機シミュレーションによって定量的に評価する方法を開発する。具体的には：

① 赤血球細胞骨格に特異的なリガンドタンパク質をAFM探針に結合して、細胞骨格の延伸時の大規模変形に伴う力学的応答を記録する。

② AFM探針を細胞内に挿入し、蛍光顕微鏡で可視化した単一ストレスファイバーに側方力を印加する。その応答から、in vivoでのストレスファイバーの強さ、プレストレス状態等を解明する。

③ これらの測定結果を材料力学理論やネットワークモデルで解析する。

④ AFM探針に固定したビーズをフィブロネクチンでコートして、繊維芽細胞表面に接触させ、接着斑生成時細胞内タンパク質の集積動態を確認する。

⑤ 細胞骨格を形成するタンパク質間の非共有結合的相互作用力を測定した。

4. 研究成果

本研究課題による成果は以下のようにまとめられる。引用論文は特に関連の深いものに限ったが、実際には複数の論文が関与している場合が多い。

(1) 脂質膜を除去した赤血球細胞骨格の力学的柔軟性を直接測定により初めて明らかにした。赤血球の細胞骨格ネットワークは極めて小さい張力により数 μm まで引き伸ばされた（次ページ図2）。延伸力学曲線はピコニュートンレベルの解像度でスムーズであり、スペクトリンアンフォールディングに特有な数十pNレベルのフォースピークは観測されない。このことからスペクトリン分子の屈曲状態（ないしは超屈曲状態）から、伸張状態への転移のみで細胞骨格の、ひいて

は赤血球自体の変形が説明できることが示された。従来唱えられていたスペクトリン分子の3次構造アンフォールディングや細胞骨格形成分子間の解離現象は必ずしも必要ない。赤血球の細胞骨格構造をネットワークモデルにより近似し、報告されているスペクトリン分子の構造を用いて実験結果を再現することができた(論文2)。

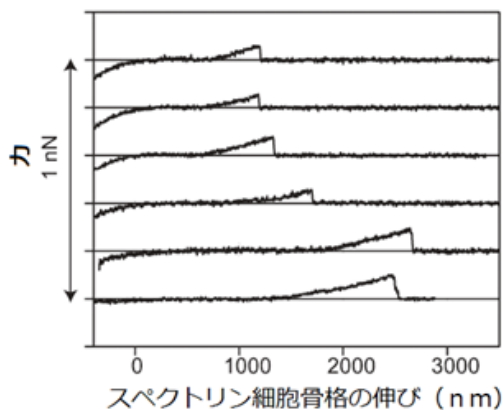


図2. 赤血球細胞骨格の伸長曲線の例(6本)。縦軸は張力、横軸は細胞骨格の伸び(nm)。縦軸は各カーブについて0.2 nN ずつずらした。細胞骨格は張力が約70 pN まで上昇する時点まで引き延ばされてカンチレバーから離れる。

(2) 培養ラット繊維芽細胞における人工接着斑形成初期過程のマイクロロロジー解析を行い、接着斑とアクチン細胞骨格の連結形成の時間依存性を解明した。図3は同一部位から5回連続してビーズを引き上げては戻すサイクルを繰り返した際にビーズにかかる力の時間変化である。0-30秒までの張力緩和にサイクル依存性がある。それ以降の張力回復の時間変化は3回までの時間変化はほぼ同となる機構を解析した(論文4)。

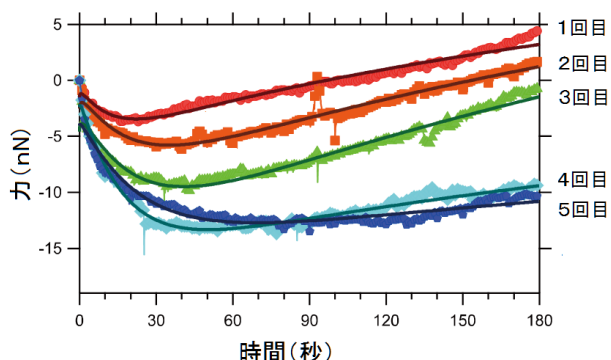


図3. フィブネクチンコートしたビーズの下に生成した接着斑から定位置にあるビーズに印加される力の時間変化。ビーズ引き上げ直後は張力の緩和があり、その後ゆっくりした張力上昇が続く。

さらに、新規に開発したスコープ機能を持つAFM探針を用いて、人工接着斑形成部位に集積するタンパク質を解析した(論文5)。

(3) 上記細胞内を縦断するアクチンストレスファイバーに、原子間力顕微鏡AFM探針による側方力を印加し、その変位映像からストレスファイバーと細胞膜に直結するアクトミオシン層の結合を力学的に証明した(図4)。その結果、繊維芽細胞のアクチン細胞骨格におけるストレスファイバー(特にventral stress fiberと呼ばれるグループ)は個々に独立したものではなく、アクトミオシン層および細胞膜との結合を通じて、ストレスファイバー同士も間接的に連結しており、結果としてストレスファイバー:アクトミオシン層が2次元複合構造をなしていることが明らかとなった(論文1)。

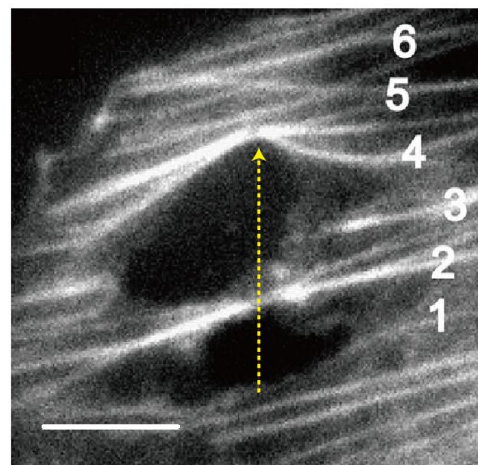


図4. アクチンを緑色蛍光タンパク質でラベルした生細胞で、図の上方に向け黄点線矢印で示した線に沿う側方力印加により変形したストレスファイバー4. 右側ではファイバー4と3の間に弱い蛍光を発する膜状構造が残っており、ファイバーは非線形変位を示し、左側では膜状構造が壊れているため線形変位を示している。ファイバー3は中央付近で切断された後、プレストレスが原因で左右に収縮している。スケールバーは20 μm。

図4のファイバー4右側の非線形変形は材料力学でFlamant問題と呼ばれる薄板面内印加問題の応用で解析した。また、このような構造の動的変化を、有限要素法を用いて計算機シミュレーションした結果、ストレスファイバー部分と膜状構造部分のヤング率の値を得ることができた。赤血球の場合も含めて、生体構造のナノ力学物性測定によって想定される構造を、計算機モデルとして再現してさらに高度の測定につながることを目指している。また、材料力学における複合材料の力学的解析の適用を進めている。

(4) 新規に開発した鉤状 AFM 探針を使って、個々のストレスファイバーを細胞内から引き上げ、ファイバーがおかれた力学状態の違いを検出した (図 5)。

その結果、アクチンを主成分とする、ストレスファイバーは極めて強い構造を持ち、数十ないし数百 nN の張力に耐える。しかし、細胞内では ATP 存在下で自発的に張力のかかった様々な程度のプレストレス状態にある。ストレスファイバーが置かれたさまざまなプレストレス状態を力学的に検出することが可能となった (論文 3)。

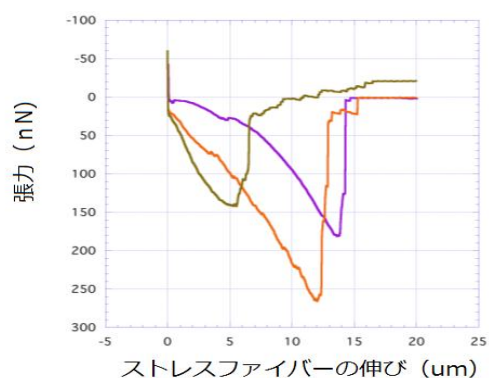


図 5. 細胞内におけるプレストレスレベルや細胞膜への結合状態で変わるアクチンストレスファイバーの引き出し力学曲線の多様性。縦軸は力 (nN)、横軸は引き出し距離 (μm)。

ストレスファイバーのように細胞内で 2 点を固定されたファイバーのプレストレスレベルを見積もる方法を開発した。その方法は、ファイバーに側方力を印加する際のファイバーの変位と側方力の関係を測定することにより可能となる。細胞膜を除去して ATP を排除した状態のストレスファイバーにこの方法を適用すると、数 nN 程度のプレストレスが観測された。生細胞内のストレスファイバーにこの方法を適用すると異常に大きいプレストレスが算出されるが、これは前述したようにファイバーが細胞膜に連結して全体として 2 次元複合体をなしているためと考えた。

(5) 細胞内ストレスファイバーに機械的損傷を与えた後、その回復過程に接着斑タンパク質、paxillin が関与していることを示し、損傷部位への paxillin 集積過程を詳細に解析した。その集積時期はすでに集積が確認されていたタンパク質、zyxin より早いほぼ同時であり、一定の時間後に修復が終わるとストレスファイバーから離脱してゆくこと

が示された (論文準備中)。

(6) 細胞骨格を形成するタンパク質間の非共有結合の強さを比較するため、スペクトリン: アンキリン、タリン: ビンキュリン、ビンキュリン: アクチンのそれぞれのペアを引き離すに要する力を AFM を利用した単一分子力学スペクトロスコピー法により解析した (論文準備中)。また一部の場合、分子動力学計算を行った。これらの結果から、細胞骨格を構成するタンパク質間の相互作用力は 10 pN から 70 pN 程度と比較的小さいが、赤血球においても培養繊維芽細胞においても細胞あるいは細胞骨格構造の比較的大きい変形においても切断されることなく構造を維持している可能性が高い事を示した。

(7) 細胞膜脂質を局所的に分解除去する方法を開発し、その操作の結果、細胞表面の離れた場所に多くの泡状構造 (blebs) が生じることを見た。情報伝達にアクチン細胞骨格が関与している可能性を示唆する結果を得た (論文準備中)。

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 40 件)

1. Hakari T, Sekiguchi H, Osada T, Kishimoto K, Afrin R, Ikai A. Nonlinear displacement of ventral stress fibers under externally applied lateral force by an atomic force microscope, Cytoskeleton、査読有 68 巻 2011 628-638
doi: 10.1002/cm.20537.

2. Afrin R, Nakaji M, Sekiguchi H, Lee D, Kishimoto K, Ikai A. Forced Extension of delipidated red blood cell cytoskeleton with little indication of spectrin unfolding, Cytoskeleton、査読有、69 巻、2012、101-112、doi: 10.1002/cm.21001.

3. Shinichi Machida, Takahiro Watanabe-Nakayama, Masakazu Saito, Rehana Afrin, and Atsushi Ikai Fabricated cantilever for AFM measurements and manipulations: Pre-stress analysis of stress fibers、Micron、査読有、(印刷中)、2012

4. Watanabe-Nakayama T, Machida S, Harada I, Sekiguchi H, Afrin R, Ikai A. Direct detection of cellular adaptation to local cyclic stretching at the single cell level by atomic force microscopy、Biophysical

Journal、査読有、100 卷、2011、564-572.

5. Takahiro Watanabe-Nakayama, Shinichi Machida, Rehana Afrin, and Atsushi Ikai, Micro-scoop for Manipulation of Micro Objects: Use of Fabricated Cantilever with Atomic Force Microscope、Small、査読有、6 卷、2010、2853-2857.

6. Shinichi Machida, Takahiro Watanabe-Nakayama, Ichiro Harada, Rehana Afrin, Tomonobu Nakayama and Atsushi Ikai, Direct manipulation of intracellular stress fibres using a hook-shaped AFM probe、Nanotechnology、査読有、21 卷、2010、385102 (1-6).

7. Rehana Afrin, Kazuki Shiga, Ichiro Takahashi and Atsushi Ikai, Tensile Mechanics of Alanine Based Helical Polypeptide: Force Spectroscopy vs. Computer Simulations、Biophys. J.、査読有、96 卷、2009、1105-1114.

8. Alexandre Yersin、Toshiya Osada, Atsushi Ikai, Exploring Transferrin-Receptor Interactions at the Single-Molecule Level、Biophys. J.、査読有、94 卷、2008、230-240.

[学会発表] (計 8 5 件)

1. Takahiro Watanabe-Nakayama, Masakazu Saito, Shin-ichi Machida, Rehana Afrin, and Atsushi Ikai, Paxillin accumulation to a damaged site on a stress fiber、Biophysical Society 56th Annual Meeting、February 25-29、2012、San Diego, CA, USA.

2. Rehana Afrin, Takahiro Watanabe-Nakayama, Shinichi Machida, Masakazu Saito and Atsushi Ikai, Exploring Atomic Force Microscopy for Nano-medical Applications、ACMM22/ICONN2012/APMC10 Combined Conference、February 05 - 09、2012 Perth, Australia.

3. Kikuo Kishimoto, David Lee, Yotaro Shinosawa, Kazuaki Inaba, Rehana Afrin and Atsushi Ikai, Mechanical Analysis of the Bio Cell Subjected to AFM Loading International Workshop on Biomedical Engineering & Biomechanics(invited)、2011.8.13、西安、中国

4. Atsushi Ikai, Rehana Afrin, Shinichi Machida, Takahiro Watanabe-Nakayama,

Masakazu, Saito and Kikuo Kishimoto, Linkage structures between ventral stress fibers revealed by atomic force and fluorescence microscopy、Seeing is Believing: Imaging the Processes of Life、July 20-22、2011、Santa Barbara, USA.

5. Atsushi Ikai, Rehana Afrin, Shinichi Machida, Takahiro Watanabe-Nakayama, Masakazu, Saito and Kikuo Kishimoto, Manipulation of Individual Stress Fibers and Focal Adhesions with AFM to Understand the Basic Mechanics of the Cellular Construction、AFM for BioMed、Paris、2011 23-27 August、Paris, France.

6. Atsushi Ikai, Rehana Afrin, Shinichi Machida, Takahiro Watanabe-Nakayama, Masakazu, Saito and Kikuo Kishimoto, AFM for Cytoskeletal Mechanics、Linz Winter Workshop 2012、4-7 February 2012、Linz, Austria.

7. Kikuo Kishimoto, Evaluation of the Interfacial Strength of Mutilyaered Materials by Peeling & Indentation Method、AUN/SEED-Net 3rd Regional Conference in Mechanical and Aerospace Technology、March 4-5、2011、Manila, Phillipines.

8. Shinichi Machida, Takahiro W. Nakayama, Ichiro Harada, Rehana Afrin, Tomonobu Nakayama, Atsushi Ikai, Direct Manipulation of Stress Fibers in the Cell Using Fabricated Atomic Force Microscopy Cantilevers、American Biophysical Society Symposium, "Actin, the Cytoskeleton and the Nucleus"、2010 年 11 月 9 日、Singapore.

9. S. Machida, T. W. Nakayama; I. Harada; R. Afrin; T. Nakayama; A. Ikai, Force Measurement and Intracellular Operation Using Customized AFM Cantilever、American Biophysical Society 54th Annual Meeting、2010 年 2 月 20-24 日、San Francisco USA.

10. Atsushi Ikai, Rehana Afrin, Shin-ichi Machida and Takahiro Nakayama, David Lee and Kikuo Kishimoto, Force Spectroscopy of Helical Polypeptides and Cytoskeleton Related Proteins Studied by Atomic Force Microscopy、The 17th International Microscopy Congress (IMC17)、2010 年 9 月 19-24 日、Rio de Janeiro Brazil.

[図書] (計 7 件)

1. Ikai, A., Afrin, R., Watanabe-Nakayama,

T. and Machida, S., CRC Press, Molecular Manipulation with Atomic Force Microscopy (Eds. Anne-Sophie Duwez, Nicolas Willet), 2012, 287.

2. Ikai, A., Afrin, R., Watanabe-Nakayama, T. and Machida, S., Pan Stanford Publishing, Life at the Nanoscale: Atomic Force Microscopy of Live Cells (Ed. Yves Dufrene), 2012, 460.

3. Ikai, A., Afrin, R., Watanabe-Nakayama, T., Machida, S. and Saito, M., Wiley-VCH Atomic Force Microscopy in Liquid (Eds. Arturo M. Baro, Ronald G. Reifenger), 2012, 402.

4. Atsushi Ikai, Rehana Afrin, Hiroshi Sekiguchi, Force to Unbind Ligand: Receptor Complexes and the Internal Rigidity of Globular Proteins Probed by Single-Molecule Force Spectroscopy, Advances in Chemical Physics: Single Molecule Biophysics: Experiments and Theory (Eds: T. Komatsuzaki et al.), Wiley, 2011 512p

5. Atsushi Ikai, The World of Nano-Biomechanics: Mechanical Imaging and Measurement by Atomic Force Microscopy, Elsevier (2008) ドイツ語版: Einfuhrung in Die Nanobiomechanik: Bildgebung Und Messung Durch Rasterkraftmikroskopie (German Edition) by Atsushi Ikai and Carsten Heinisch (Wiley-VCH Verlag GmbH).

6. Atsushi Ikai, A Review on: Atomic Force Microscopy Applied to Nano-mechanics of the Cell. Advances in biochemical engineering/biotechnology : Nano/Micro Biotechnology (Eds. I. Endo et al.) 2009 Springer 270p.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ikai.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 猪飼 篤

(Ikai Atsushi)

東京工業大学・イノベーション研究推進体・特任教授

研究者番号: 50011713

(2) 研究分担者

○岸本喜久雄

(Kishimoto Kikuo)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 30111652

○長田俊哉

(Osada Toshiya)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号: 00201997

○大谷弘之

(Ohtani Hiroyuki)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・准教授

研究者番号: 80203826.

21年度まで。

○レバナ・アフリン

(Afrin Rehana)

東京工業大学・バイオフィロンティアセンター・特任准教授

研究者番号: 70447556

22年度より連携研究者

○田上勝規

(Tagami Katsunori)

早稲田大学・特任講師

研究者番号: 40361571

20年度より研究協力者

○関口博史

(Sekiguchi Hiroshi)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号: 00401563

21年度より研究協力者