

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：45506

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25103008

研究課題名(和文)小さな反応拡散系における秩序形成から生物の機能へ

研究課題名(英文)From Order to Functions in Small Reaction Diffusion System as a Biological Motif

研究代表者

櫻井 建成(Sakurai, Tatsunari)

山口芸術短期大学・芸術表現学科・准教授

研究者番号：60353322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 80,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、反応拡散波と界面変形を伴ったアクティブマターの相互依存性から生み出される動的秩序とそれに由来する機能の普遍的性質の解明を目的とした。特に生物の多様な運動形態の理解へ向け、生物と非生物の両方から迫る試みを行った。そこでは反応拡散系とアクティブマターの結合系という新しい枠組みを提案し、細胞ダイナミクスの背後にある物理的な対応を常に意識しつつ理論を発展させた。具体的には、(1)細胞の動きと外場の揺らぎとの関係性、(2)大腸菌の集団的秩序形成の理解、(3)界面張力により駆動する物体の提案、(4)活性タンパク質存在下での拡散現象と凝集現象の理解等を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, our aim is for the elucidation of the universal property of the biofunction from dynamic order by interdependency between reaction diffusion waves and active-matter with the interface transformation. It is suitable for a variety of understanding to carry out a trial to approach from both living and non-living things. We suggested a new frame called the combination system of reaction diffusion system and active-matter and developed the theory having both the physical nature and the living cell dynamics. Specifically, we revealed (1) the relationship between the movement of living cell and the fluctuation from outsides, (2) understanding of the collective order of Escherichia coli, (3) new features of the object driven by surface tension, (4) a diffusive and the condensed phenomena under the activity protein existence and its model.

研究分野：非線形非平衡開放系

キーワード：非平衡系物理学 数理物理学 生物物理学 非線形科学

1. 研究開始当初の背景

Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応は、非平衡開放系秩序形成という普遍的視点から、生物の振動現象の理解に中心的な役割を果たした。BZ反応と分子拡散の結合に起因する進行波（反応拡散波）は、神経のインパルス伝搬（Hodgkin & Huxley, 1963年ノーベル賞）や心臓でのカルシウム波（Lutherら, *Nature*, 2011）などの理解に貢献し、定在波であるチューリングパターンの実現（Vanagら, *Nature*, 2000）は、魚の縞模様とその分子的背景の理解（Kondoら, *Science*, 2010）に深く寄与した。

一方で、生物機能には運動を伴う秩序形成過程が必須であり、新たな実験系の開発と物理的アプローチが望まれていた。代表者は、光フィードバックによるBZ反応のゆらぎの制御を行い（Sakuraiら, *Science*, 2002）、更に、反応拡散波による界面変形を報告し（Maharaら, *PRE*, 2009）、新たな秩序形成創成へ向けたデザインを示した。また分担者（北畑）は、微小BZ液滴内での反応拡散波に起因した力学的運動を報告し（Kitahataら, *PRE*, 2011）、光感受性BZ反応を用いた制御を試みた（Kitawakiら, *JPC*, 2012）。これらは、操作性の自由度が高いものの、一方でどのような生物現象に関連しているかなど、具体的な枠組みを構築できずにいた。こうしたなか、研究分担者（澤井・石原）は、アメーバ細胞運動のモデル系である細胞性粘菌において、基底膜上のリン脂質シグナルとアクチンがラセン状反応拡散波となって伝播することにより、細胞の膜変形を誘導し、運動形態を決定していることを明らかにした。これまでのBZ反応からは説明困難な非自明動態が発見されつつあり、微小な反応拡散場と膜の運動が相互にカップルした系の理解の進展が希求されていた。

2. 研究の目的

代表者および分担者が独自に展開してきた研究対象は、反応拡散場と運動が結合した系が生み出す生物機能に直結する新奇な現象

であり、これらには明らかな類似点と共通性がある。その共通原理の理解、つまり反応拡散波と界面変形を伴ったアクティブマターの相互依存性から生み出される動的秩序の理解を通し、それらに由来する生物機能の普遍的性質の解明を目指すことを目的した。

3. 研究の方法

本研究では、非生物系担当班と生物系担当班に分かれ研究を行うが、非平衡開放系において発生する反応拡散波に起因した微小物体（液滴やアメーバ細胞）の運動という共通の課題と研究の方向性を共有し、それぞれが密接に連携して研究目的の達成を目指した。

非生物系研究では、微小領域でのBZ反応系、樟脳の自発的運動系など、シンプルでありながら多様な実験系が構築できる実験系の提案とその物理的背景の理解を目指した。

生物系では、ゆらぎによって対称性の破れに起因するアメーバ運動の非自明動態（新奇な時空間秩序）の理解を目指し、細胞境界での波の反射や膜変形が及ぼす波への相互作用依存性を実験から解析した。反射性を変える条件を明らかにし（因子の同定）、リン脂質系における分子的機構に即したモデル解析を行った。粘菌細胞膜から抽出した脂質、PIP3、アクチンなどを用い、膜変形の自己組織化を *in vitro* で解析する系の構築を目指した。

4. 研究成果

非生物系の代表的な研究成果として、下記2つを挙げる

(1) 反応拡散波によって駆動されているアメーバ細胞を模した化学反応系

化学振動反応であるBZ反応溶液の液滴が、内部でのパターン形成と結合して運動する現象は、BZ反応において酸化状態と還元状態で界面張力が異なることにより、化学波の進行に伴って液滴表面の界面張力勾配が発生することが原因となって起こることを明らかにしてきた。そこで、実際にBZ反応溶液の

表面や、BZ反応溶液と油の界面において、化学波が伝播するときの界面張力の変化をレーザー準弾性散乱により測定した（図1）。その結果、気液界面ではほぼ化学波の進行に伴う色の変化と一致して、界面張力が変化することがわかった。一方、油水界面における測定においては、化学波の進行よりも遅れて界面張力が変化することが明らかとなった。この現象について、界面活性をもつ鉄触媒の界面への吸着脱離の時定数を考えることにより議論した。

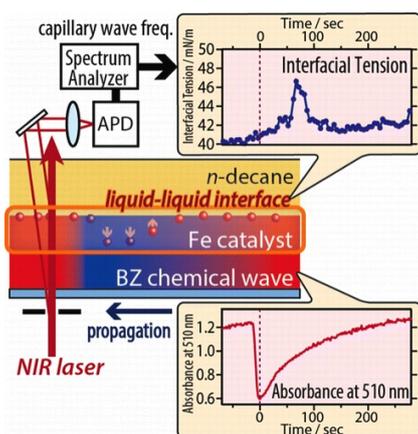


図1：レーザー準弾性散乱によるBZ溶液と油相の界面の界面張力測定の様式図。

(2) 界面張力により駆動される粒子にかかる力の実験的測定と粒子間相互作用

界面活性剤を周囲の水面に放出することにより周囲の水面に界面張力勾配を形成し動く系が自己駆動粒子のモデル系としてよく用いられる。その中でも特に典型的な水・樟脳系は、近年、集団運動についての研究対象になったり、形状や周囲の環境と運動の関係が議論されたりと、広く研究に用いられている。また、そのモデルとして反応拡散方程式と樟脳粒の運動方程式を組み合わせたモデルが広く用いられている。しかし、そのモデルに含まれているパラメータ、すなわち、樟脳分子の溶けだし速度や実効的拡散係数、昇華率などを測定から求められることはされていなかった。そこで、その物性値を測定から求めることを試みた。実際に樟脳粒が運動するときどの程度の力が発生している

のかを、表面張力系と力の伝導系をデザインすることにより測定し、それらの理論から求められる値と比較した。その結果、測定結果は矛盾なく理解され、樟脳粒子の運動の駆動力は数十 mN程度であることがわかった。

さて、表面張力の差により樟脳粒自体が駆動されるため、自己駆動粒子の実験系として多くの研究がなされている。我々は円対称ではない形状の樟脳粒の運動に関して、数理モデルから中心多様体縮約によって位置と特徴的な角度の時間発展に関する常微分方程式を導いた。また、そのような樟脳粒2つが相互作用する系の時間発展に関する式も導いた。濾紙に樟脳をしみこませた系を中心に穴があいた楕円形に成型し、軸に通して水面に浮かべることにより重心が動かない実験系を構築し、単独では静止する条件の楕円形の樟脳粒子2つを相互作用させたときに長軸が2つの楕円形の中心を結ぶ直線に直交する向きに配向することを明らかにした。この実験結果は中心多様体縮約で得られる常微分方程式の解析結果および元の数理モデルの数値計算結果と一致することも明らかにした。このような円対称ではない系をよりシンプルにした系として円形の樟脳粒を2つ剛体棒でつなぎその重心を固定した系を考えた。この系は回転方向に運動の自由度を持つがカイラルな対称性があるため、静止した解からパラメータの変化により回転運動に分岐すること理論的、数値的及び実験的に示した（図2）。

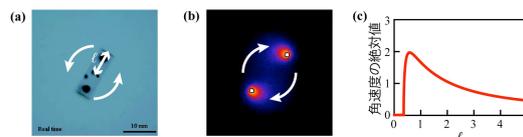


図2 円形の樟脳粒2個を剛体で結びつけた回転子の運動。(a)実験のスナップショット、(b)数値計算のスナップショット。樟脳分子の濃度場も表示した。(c)理論的に得られた回転角速度の回転子半径依存性。

次に、生物系の代表的な研究成果として、下記3つを挙げる。

(3) 個々のアメーバ細胞のリン脂質シグナリングと数理モデルの提案

細胞性粘菌におけるアクチンフィラメントの形成やイノシトールリン脂質 (PIP3) の局在が、基質面の膜の近傍で興奮波として伝播することがわかってきた。分担者である澤井のこれまでの研究から、アクチン重合の障害が進行波の起点生成頻度を減少させることが見出されている。そこで基質面の形状や物性によって膜の伸展を制限し、進行波を観察した。その結果、特に基質面に疎水性素材である PDMS を用いた場合、PIP3 の局在を起こす細胞がほとんど存在しないこと、また、PDMS 表面の親水化によって、進行波を起こしている細胞の率が増加することが明らかになった。このことから、基質面への接着のしやすさが、PIP3 のゆらぎの増幅と波の生成に強く関わっている可能性が示唆された。

反応拡散系は、連続無限自由度の系であるが、しばしば実際のダイナミクスは低次元的な運動をおこない、縮約された方程式で記述される。小さな反応拡散系を理論的に記述する試みとして、反応波の位置やその強度を変数としてとり、系がもつ対称性からそれらが満たすべき縮約された方程式系をしぼりこみ、低次の展開を行った。特に、新しい面として、自由度が潜在的には無限大でありうる方程式系を構成した。細胞内の反応波だと見なせば、円形領域の拡散波の位置に応じて細胞の形や運動方向を決めることで、細胞運動のモデルと考えることができる。実際に得られた運動は、パラメータに応じて、極性化した運動、ケラトサイト様運動、ジクザグ様運動、複数の仮足を交互に出すアメーバ様運動など、実際の細胞運動に似た物が得られた。

さて、人工脂質リポソーム上においてホスファチジルイノシトールの主要な調節機構であるリン酸化-脱リン酸化反応を操作、または自律的に進行させ、その時間発展を測定

できる実験系の開発も進めた。多環芳香族炭化水素の一種である蛍光物質ペリレンを用いてリポソームを可視化し、ビオチン-ストレプトアビジン結合によって、リポソームをガラス表面に捕捉し、顕微鏡測定の焦点面に維持した。反応基質および生成物である $PI(4,5)P_2$ 、 $PI(3,4,5)P_3$ それぞれに選択的に結合するラット Phospholipase C タンパク質 PH ドメイン (PHp1c)、粘菌 CRAC タンパク質 PH ドメイン (PHcrac) の GFP ないし RFP タグを精製し、これらがガラス基板上に捕捉された $PI(4,5)P_2$ または $PI(3,4,5)P_3$ を含むリポソームに対し選択的に結合することを確認し、測定プローブとしての性能を評価した。同時に、この系に、リン酸化を付加するため、リン酸化酵素の精製が可能となった。

(4) 細胞集団中での力と個々の細胞の変形と細胞集団の変形の依存性

細胞集団中ではどのような力が働くだろうか？ 培養細胞が基質を引っばる力 (Traction force, T) は、ゲル基質にビーズを入れてその変位をみるなど、Traction Force Microscopy (TFM) として確立している。一方で、細胞内の応力 (Stress σ) については、釣り合い方程式 $\text{div } \sigma = T$ から、細胞を弾性体と仮定して応力 σ を見積もる Monolayer Stress Microscopy (MSM) が提案されている (Tambe ら, Nat. Mat. 2011)。しかしながら、MSM では細胞を弾性体と置くという妥当性の定かではない仮定が置かれている。この問題の困難さは、問題自体が ill-posed であることにあり、一般に逆問題と呼ばれる。逆問題をベイズ推定の枠組みで定式化し、手法を培養細胞の応力分布 σ の推定問題に適用した。この際、MSM とは異なり細胞の力学的な性質を仮定せず、単純な $L2$ 正則化を入れた。真値のわかる数値データで試した所、MSM では細胞を弾性体と仮定したデータでのみ妥当な結果を出したが、他の場

合には精度は悪く、一方、我々の手法ではモデルで仮定した細胞の力学的な性質によらずに高い精度で推定と真値が一致した。また、実験的検証も行い、他の手法で見積もった値と整合性を得ている。

細胞集団の変形は、個々の細胞の変形と細胞の相対位置の変化(再配置)に加え、細胞分裂や細胞死が関わる。これらのプロセスに関してテンソルを用いて定式化することで、変形に際して各プロセスがどの程度寄与するのかを定量的に表し、実際に翅上皮に適用した細胞集団の挙動を表す連続体モデルの構築を行った。細胞集団では、細胞同士が互いに力を及ぼし合い、形態の変形が起こる(弾性的変形)。また、同時に、細胞の相互の位置が入れ替わる(塑性変形)ので、長い時間スケールで見ると流体的な挙動を示すことも多くの研究で分かっている。このことから、Maxwellモデル(もしくはJefferysモデル)に近いモデル化が可能と考えられるが、細胞の性質とどう関係するかは、マクロな現象論モデルからは分からない。上皮系でよく用いられる、細胞の挙動を表すCell Vertex Modelをミクロモデルとして、我々は細胞形態を内部自由度としてもつ連続体モデルを構築した。このモデルで単純な場合を考えると、期待どおりMaxwellモデル的な挙動を示す非線形方程式が得られた。さらに、そのパラメータは、細胞の力学的性質と関連づけられた。また、アクティブゲル理論と同様に、アクティビティをエントロピー生成率に加えることで、恒常的な細胞運動を引き起こすことも示せた。本モデルは高分子溶体と液晶流体に近い構造をもつことから、今後新しいソフト(アクティブ)マタークラスを記述するための本モデルの改良が今後の課題である。

(5)細胞の動きと外場の揺らぎとの関係やその数理モデル

生きた細胞では、絶え間ない不定形の大き

な変形を伴いながら、比較的速い這い回り運動を示したり、外物を取り込んだり、他の細胞と密着するなどする。こうした複雑な形のあり方の記述・理解は、生物学的意義からの興味のみならず、物理学的にも極めて挑戦的な課題である。本班では、細胞性粘菌アメーバに着目し、その極性が走化性誘引分子の時間変動成分によって誘起されることを実験的に示し、適応応答する反応拡散系の秩序形成として理解できることを数理的に示した。こうした細胞の形状変化について、アクチンとそれに付随する膜上のイノシトールリン脂質のリン酸化反応の伝播波の二変数興奮系とフェイズフィールドの結合系の振る舞いの詳細をしらべ、細胞端に局在する発火パターンで駆動される特徴的な変形ダイナミクスを明らかにした(図3)。更に、極性を表現する第三の変数を組み入れた拡張モデルにおいて、不定形の細胞運動で見られる基本的な運動モードが、極性の強さと、膜の硬さを表現するパラメータによって分類されることを示し、実験的にオプトジェネティクスを用いたRacの活性制御により裏付けた。モデルの発展系として、多細胞集団のダイナミクスにおける接触依存的な極性形成の役割をシミュレーションと実験による相互検証をおこない、細胞選別の新たな仕組みを明らかにした。

さて、細胞集団では、細胞同士が互いに力を及ぼし合い、形態の変形が起こる(弾性的変形)。同時に、細胞の相互の位置が入れ替わる(塑性変形)ので、長い時間スケールで見ると流体的な挙動を示す。更に、細胞分裂などによる変形もある。これらの変形を統合し、組織レベルの変形を記述する連続体モデルの構築と拡張を行った。特に上皮細胞組織の発生現象を念頭に、(a)細胞弾性を記述する自由エネルギーの導出、(b)アクティブ効果をいれることによる、コンバージェントエクステンションの新規メカニズムの発見、

(c)細胞分裂やアポトーシスが及ぼす組織変形の定式化を行った。(b)では、発生過程などでよく見られるこんばージェントエクステンションの新規メカニズムを発見した。(c)では、細胞分裂が生み出すフォースダイポールを、その変形や細胞分裂頻度、形態依存性などを考慮して導入している。

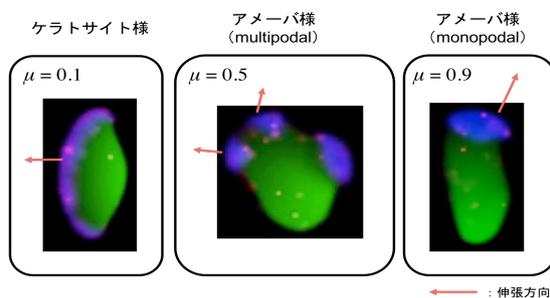


図 3 フェイズフィールドモデルにみられる変形動態。(赤)と(緑)の興奮性と(青)の双安定性により膜動態が決まる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 2 件)

- ① H. Kitahata, N. Yoshinaga, Effective diffusion coefficient including the Marangoni effect, *J. Chem. Phys.* 148, 査読有, 2018, 134906/1-8, DOI: 10.1063/1.5021502
- ② Y. Koyano, M. Gryciuk, P. Skrobanska, M. Malecki, Y. Sumino, H. Kitahata, and J. Gorecki, Relationship between the size of a camphor-driven rotor and its angular velocity, *Phys. Rev. E* 96, 査読有, 2017, 012609/1-8, DOI: 10.1103/PhysRevE.96.012609
- ③ S. Ishihara, P. Marcq, K. Sugimura, From cells to tissue: A continuum model of epithelial mechanics, *Phys. Rev. E* 96, 査読有, 2017, 022418, DOI: 10.1103/PhysRevE.96.022418
- ④ K. Kamino, Y. Kondo, A. Nakajima, M. H-Kitahara, K. Kaneko, S. Sawai, Fold-change detection and scale-invariance of cell-cell signaling in social amoeba, *PNAS* 114(21), 査読有, 2017, E4149-E4157, DOI: 10.1073/pnas.1702181114
- ⑤ A. Nakajima, S. Ishihara, D. Imoto and S. Sawai, Rectified directional sensing in long-range cell migration, *Nat. Commun.* 5, 査読有, 2014, 5367/1-14, DOI: 10.1038/ncomms6367

[学会発表] (計 5 2 件)

- ① Tatsunari Sakurai, Growth-diffusion-chemotaxis model for deposition pattern of Escherichia coli, *Equadiff 2017* (Jul. 24-28, 2017), Bratislava, Slovakia.
- ② Shuji Ishihara, A continuum model for epithelial tissue mechanics, *Structured Soft Interfaces: Caught Between Multi-Scale Simulation and Application* (Jan. 23-27, 2017), Leiden, Netherlands.
- ③ Satoshi Sawai, Microfluidic analysis of collective cell migration during contact-following in Dictyostelium, *STATPhys26, the 26th IUPAP International conference on Statistical Physics* (Jul. 18-22, 2016), Lyon, France.
- ④ Hiroyuki Kitahata, Motion of a Belousov-Zhabotinsky reaction droplet coupled with pattern formation, *Pacificchem 2015* (Dec. 15-20, 2015), Honolulu, USA.

[図書] (計 4 件)

- ① 「高校生のための東大授業ライブ 学問からの挑戦」東京大学教養学部編 (編) “いきいきとした状態の科学—細胞性粘菌でさぐる自己組織化のメカニズム”澤井 哲、東京大学出版会 (2015), 131-149, ISBN: 978-4-13-003346-6

[その他]

<http://nonlinear.s.chiba-u.jp/~kitahata>
<http://sawailab.c.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 建成 (SAKURAI Tatsunari)
 山口芸術短期大学・芸術表現学科・准教授
 研究者番号: 60353322

(2) 研究分担者

石原 秀至 (ISHIHARA Shuji)
 東京大学・大学院総合文化研究科・特任准教授
 研究者番号: 10401217

北畑 裕之 (KITAHATA Hiroyuki)
 千葉大学・大学院理学研究院 准教授
 研究者番号: 20378532

澤井 哲 (SAWAI Satoshi)
 東京大学・大学院総合文化研究科・教授
 研究者番号: 20500367