

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14497

研究課題名(和文) In vitro再構成による運動性細胞の極性獲得機構の解明

研究課題名(英文) In vitro reconstitution of the spontaneous establishment of the polarity of motile cells

研究代表者

宮崎 牧人 (Miyazaki, Makito)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：40609236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞はアクチン線維の重合力で膜を押し広げることで移動する。アクチン線維が膜を押し広げる力の反作用とミオシンの牽引力で、細胞の前から後に向かってアクチンの流れが維持されるために一方方向に動けると考えられている。しかし移動する前の細胞は円盤状で、アクチン流動も細胞膜から中央に向かう点対称性を示すため、細胞には前後がない。そこで本研究では、無極性の細胞が一方方向に動き出せる仕組みの解明を目的として、カエル卵抽出液を油中液滴に封入した人工細胞系を構築し、アクチン流動の再現に成功した。さらに液滴の直径が小さくなると、アクチン流動が空間非対称化する現象を発見し、転移点がアクチン重合活性に依存することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Actin polymerization can push the cell membrane, which is a driving force of cell migration. It has been generally thought that the retrograde F-actin flow maintained from the leading edge to the trailing edge allows cells to migrate uni-directionally. However, resting cells exhibit a disk-like shape and the actin flow shows point symmetrical pattern. To understand the mechanism of the spontaneous establishment of retrograde actin flow, we developed an artificial cell system by encapsulating *Xenopus* egg extracts into water-in-oil droplets and we have succeeded in reconstituting the actin flow in vitro. By using this system, we found that the actin flow became asymmetric in small droplets, and biochemical perturbations revealed that the transition point was dependent of the actin polymerization activities.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞運動 細胞骨格 アクトミオシン 分子モーター 自発的対称性の破れ

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の多くはアクチン重合の力で膜を押し広げ、平板状突起 (lamellipodia) を“前”に出すことで移動する (図 1)。細胞膜に局在している PIP₂ が Arp2/3 複合体を活性化し、膜直下でアクチン線維の重合と枝分かれが促進される。アクチン線維の伸張が細胞膜を前方に押し出す。その反作用とミオシンによる牽引力でアクチン線維は細胞の後方へと流れていく。このアクチン線維の流動 (retrograde flow) が細胞の前から後に維持されることで、細胞は一方方向に運動できる。では、細胞の前後はどのようにして決まるのか？初めは形もアクチン流動も無極性の細胞が、アクチンの流動や細胞の形を自発的に非対称にして一方方向に動き出すのであるが、その仕組みは良くわかっていない。

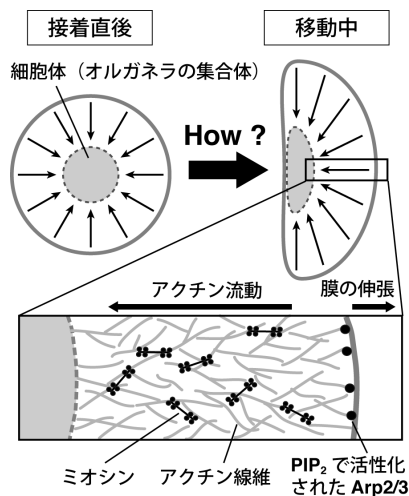


図 1 : 細胞が動く仕組み

2. 研究の目的

本研究の目的は、無極性の細胞が如何にして前後を決めて一方方向に動き出せるのか、自発的にアクチン細胞骨格の対称性が破れる仕組みの物理的理解を目的とした。

3. 研究の方法

我々はこれまでに油中液滴及びリポソームを用いた人工細胞システムを構築し、その有用性を示してきた (*Biophys. J.* 2014, *Nat. Cell Biol.* 2015, *Protoc. Exch.* 2015)。人工細胞系を用いれば、内包した各種タンパク質の活性、システムサイズ、界面の形状を自在かつ独立に制御することが可能となる。運動性細胞はアクチンミオシン活性に応じて変形してしまうため、そのような独立制御は人工系でなければ不可能である。そこで本研究では、アフリカツメガエルの卵抽出液を封入した

油中液滴を運動性細胞のモデル系として用いることにした (図 2 A)。

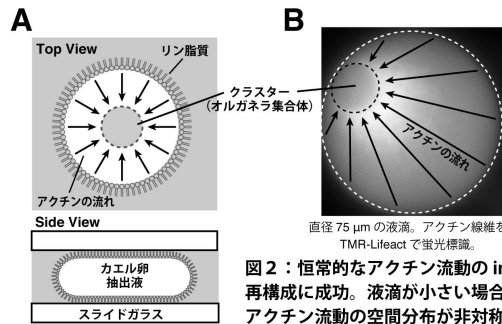


図 2 : 恒常的なアクチン流動の in vitro 再構成に成功。液滴が小さい場合はアクチン流動の空間分布が非対称化。

4. 研究成果

アクチン流動の再構成

アフリカツメガエルの卵から安定した品質の細胞質抽出液を調整する技術を習得し、リン脂質膜で包まれた油中液滴に封入する手法を確立した。この細胞質抽出液を封入すると、その直後より液滴辺縁から中心に向かって 1 時間以上つづく持続的なアクチン流動が発生、その流れで細胞質中のオルガネラが集められ、液滴中心にクラスターが形成された (図 2 B)。ファロイジン及びのノコダゾールの添加によって、アクチン流動が阻害されたことから、持続的なアクチン流動の発生にはアクチンの重合反応、脱重合反応が共に必要であることがわかった。

アクチン流動の自発的対称性の破れ

液滴中心に形成されるクラスターの大きさは液滴の体積に比例することがわかった。また、大きな液滴をスライドガラスで押し潰し過ぎてしまうと、クラスターが 2 枚のスライドガラスの間に引っかかってしまい、細胞質中での自由な移動が阻害されてしまうことがわかった。そこで円板状に押し潰した液滴の直径と高さのアスペクト比を、クラスターが引っかからない程度に固定し、様々な大きさの円板状液滴を用意して、それぞれでのアクチン流動の収束点 (クラスターの位置) と液滴のサイズ依存性を調べた。その結果、液滴が小さくなると、アクチン流動が空間的に非対称になることを発見。システムサイズ依存的にアクチン流動の対称-非対称転移が生じることを明らかにした。

アクチン重合活性の変調効果

システムサイズ依存的にアクチン流動が非対称化する仕組みを明らかにするために、アクチン線維の重合活性を変調させる実験を行なった。具体的には、1) Arp2/3 複合体の活性化因子である PIP₂ を油中液滴の脂質膜に少量添加し、アクチン重合を活性化させた場合、及び 2) Arp2/3 複合体の阻害剤である CK666 を細胞質抽出液に添加した場合の変

化を観察した。なお、アクチン重合反応に摂動を与えることを目的としたので CK666 の濃度は完全阻害にならない濃度とした。実験の結果、PIP₂ を加えた場合には、対称-非対称転移の転移点が、液滴の直径がより大きい方にシフトし、その一方で CK666 を加えた場合には、対称-非対称転移の転移点が、液滴の直径がより小さい方向にシフトした。これらの結果から、Arp2/3 複合体を介したアクチン重合反応は、アクチン流動の非対称性を促進することが明らかになった。

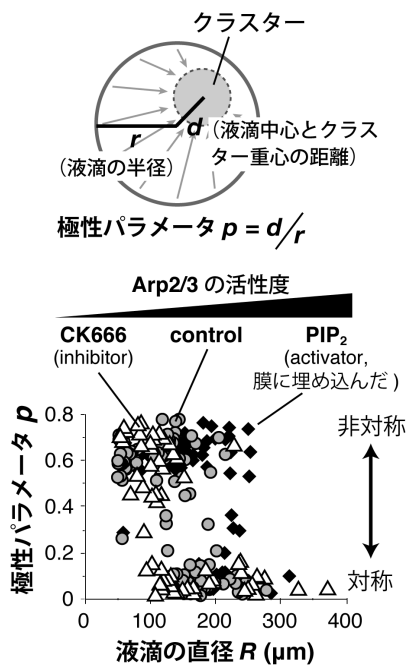


図3：アクチン流動の非対称化とアクチン重合活性の変調効果

ミオシンモーター活性の変調効果

続いて、ミオシンがアクチン流動の非対称性に及ぼす影響を調べた。ミオシン II のモーター活性の各種阻害剤 (Blebbistatin など) 及び活性化因子 (リン酸化酵素) を用いて、それらの影響を調べたが、どの場合もコントロール実験と比べて優位な差が見られなかった。しかし、細胞質中のミオシン II のリン酸化状態が変化していることを確認できなかったため、加えた各種阻害剤・活性化因子が効いていない可能性も考えられるため、さらなる検証が必要である。

微小管細胞骨格が駆動する細胞質流動の再構成

ここまでの研究ではアクチン細胞骨格が自発的に生み出す流動に焦点を当てて研究を進めてきたが、その一方で、微小管細胞骨格も細胞質流動を駆動することが知られており、発生の段階で重要であると考えられるようになり、近年注目されている現象である。そこで我々は、本研究課題で構築したカエル

卵抽出液 + 油中液滴の人工細胞システムを応用し、微小管駆動の細胞質流動の仕組みの研究も行った。

アクチンの重合を阻害した細胞質抽出液を準備し、アクチン流動の系と同様の油中液滴に封入すると、微小管のネットワークが形成され、後にネットワーク全体が収縮した。この収縮に伴い、細胞質中のオルガネラがかき集められ、微小管とオルガネラのクラスターが形成された。アクチンの系と同様に、液滴の直径が大きい場合は、クラスターは液滴の中央に、液滴の直径が小さい場合は、クラスターは液滴の端に形成されることを発見した。

続いて、ダイニン分子モーターのモーター機能を p150-CC1 を用いて阻害したところ、微小管ネットワークの収縮は生じなくなったが、微小管バンドルが渦状に配向し、微小管バンドルの渦構造が回転することによって細胞質の回転流動が発生することを発見 (図4)。個々の微小管バンドルの動態、人工細胞の大きさと流速の関係、キネシン分子モーターの阻害効果などを定量的に調べ、渦構造の形成と回転流動のメカニズムを明らかにした (PNAS 2017; 図5)。

微小管が渦構造をつくる様子 (蛍光顕微鏡写真)

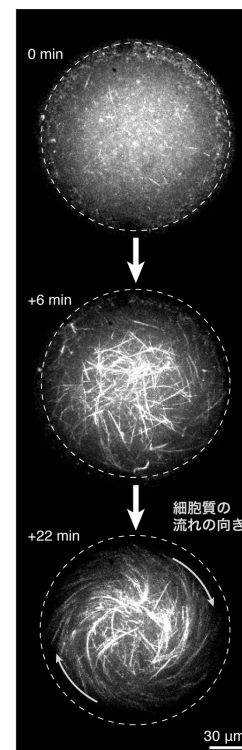


図4：微小管駆動の細胞質流動の再現に成功

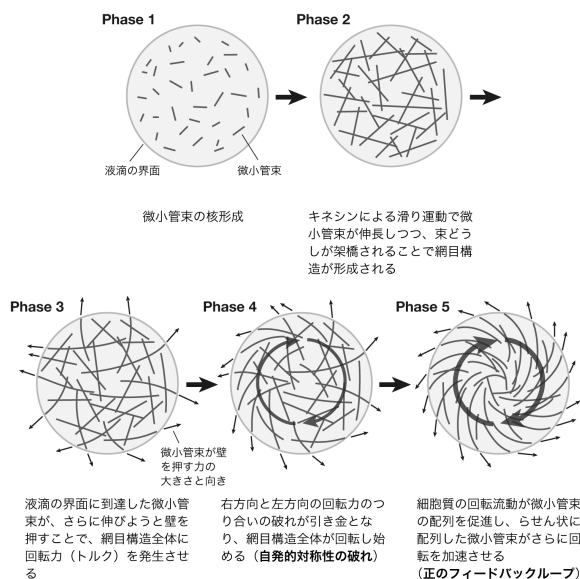


図5：微小管駆動の細胞質流動の発生メカニズム

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)

Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, and Shin'ichi Ishiwata, "Spatial confinement of active microtubule networks induces large-scale rotational cytoplasmic flow" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 2922–2927 (2017) doi: 10.1073/pnas.1616001114. [査読有]

[学会発表](計 9件)

宮崎牧人

「細胞骨格構造の in vitro 再構成: システムサイズ依存性から見てきた細胞骨格の自己組織化原理(仮)」
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 「サイズ」で斬る分子細胞生物学, 2017.12.6-9, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市) [招待講演, 確定済]

宮崎牧人

「細胞骨格構造の in vitro 再構成(仮)」
液晶交流会, 2017.9.12, 弘前大学 (青森県・弘前市) [招待講演, 確定済]

Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, and Shin'ichi Ishiwata, "Spatial confinement of active microtubule networks induces large-scale rotational cytoplasmic flow"
The joint 19th International Union of Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and 11th European Biophysical Societies' Association (EBSA) Congress, July 16-20, 2017, Edinburgh, UK [selected for oral presentation, 確定済]

宮崎牧人

「細胞分裂装置の in vitro 再構成」
アクティブマター研究会, 2017.1.20-21, 九州大学 (福岡県・福岡市) [招待講演]

宮崎牧人

「細胞サイズ閉鎖空間でのアクチン細胞骨格の in vitro 再構成」
定量生物学の会第8回年会, 2017.1.8-9, 岡崎カンファレンスセンター (愛知県・岡崎市) [招待講演]

宮崎牧人

「細胞骨格の in vitro 再構成: 細胞骨格が司る細胞機能発現機構の解明を目指して」
『細胞を創る』研究会 9.0, 「細胞を作って・測って・利用するテクノロジーの最前線」
2016.11.21-22, 早稲田大学 (東京都・新宿区) [招待講演, セッションオーガナイザー]

宮崎牧人

「細胞骨格構造の in vitro 再構成」
第6回ソフトマター研究会, 2016.10.24-26, 北海道大学 (北海道・札幌市) [招待講演]

Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Masataka Chiba, and Kazuya Suzuki
"Self-organization of active cytoskeletal networks in a cell-sized confined space"
Biophysical Society 2016 Thematic Meetings "Engineering Approaches to Biomolecular Motors: From in vitro to in vivo", June 14-17, 2016, Vancouver, Canada [基調講演]

Makito Miyazaki, Kazuya Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata
"In vitro reconstitution of active cytoskeletal networks in cell-sized droplets"
EMN (Energy Materials Nanotechnology) Meeting on Droplets 2016, May 9-13, 2016, San Sebastian, Spain [招待講演]

[その他]

新聞・雑誌報道

2017/4/6

Academist Journal 「細胞質流動」の再現に成功! -人工細胞を作って、細胞の仕組みを解明する」
<https://academist-cf.com/journal/?p=4063>

2017/3/8

日経産業新聞「細胞内の流れ再現 早大、栄養の輸送解明期待」(8面)

2017/3/7

マイナビニュース「早大、大きさを自在に制御できる人工細胞システムで細胞質流動を再現」

(<http://news.mynavi.jp/news/2017/03/07/230/>)
(livedoor ニュース、biglobe ニュースなどに
転載)

2017/03/7

早稲田大学プレスリリース「世界初・人工細胞で「細胞質流動」の再現に成功 機械よりも高効率で働く生体機能を模倣した輸送システム構築の可能性」

(<https://www.waseda.jp/top/news/49174>)

ホームページ

<http://www.ishiwata.phys.waseda.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 牧人 (MIYAZAKI, Makito)

早稲田大学・先進理工学部物理学科・助教

研究者番号：4 0 6 0 9 2 3 6

(4)研究協力者

田邊 正敏 (TANABE, Masatoshi)

鈴木 和也 (SUZUKI, Kazuya)