

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17451

研究課題名(和文) 微小管の秩序的ネットワーク化による運動界面構築

研究課題名(英文) Assembly of active substrate of kinesin and networked-microtubule with ordering

研究代表者

川村 隆三 (KAWAMURA, Ryuzo)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：50534591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：架橋した微小管のネットワークとキネシンで構築する「運動界面」について、協同性の高い運動を発現する原理の探求と、細胞の動的力学環境としての応用に取り組んだ。モーター分子であるキネシンを基板に2次元パターン修飾することで、微小管の進行方向の制御と運動界面領域のパターン作成を実現した。接着した細胞に隣接して運動界面を配置して駆動し、力学刺激を付与することにも成功している。運動界面上に一度剥離した細胞を播種すると、再接着後の細胞形態に力学刺激への応答が観察される現象を発見した。

研究成果の概要(英文)：Using an active network of microtubules driven by kinesins on a solid surface, we explored mechanism for coordinative behavior of these motor proteins and applied the constructed system to cells as an active substrate for better understanding of cellular dynamic characters. By patterning the kinesin-coated areas at micrometer and millimeter scale on surfaces, the moving direction of microtubules and the area pattern of active network region were successfully controlled, respectively. With use of the 2D-patterning technique, areas of the active network and the adhered-cells were prepared on the same surface and mechanical stimuli of the fluctuating microtubule network was successfully applied to the neighboring cells. When cells were seeded on this active substrate, unusual deformation of cancer cells after the adhesion was observed as a response to the mechanical stimuli.

研究分野：生物物理化学

キーワード：モータータンパク質 微小管 キネシン 界面 力学刺激 細胞

1. 研究開始当初の背景

モータータンパク質は数ナノメートルの微小ステップで運動できる。代表例のキネシン/微小管系では、キネシンを基板に固定しておく、直径25ナノメートルの微小管を、アデノシン三リン酸 (ATP) の化学エネルギーで駆動して運動を再現できる。近年になって、モータータンパク質の密度によって渦状のパターンが現れることが報告され、複数分子としての振る舞いが明らかにされ始めている。しかし、生物の運動器官を見る限り、分子機械としてはサイズや出力、運動方向について多様な運動を実現できてしかるべきである。

これまで、キネシンのレールである微小管に着目し、これらの分子を集積化して駆動する研究に取り組んできた。動的自己組織化を利用した集積化法では、微小管のマイクロな構造を反映して運動方向や形状を制御した集合体を形成することに成功している (Kawamura *et al.*, *Biomacromol.* 2008, **9**, 2277; Kawamura *et al.*, *Langmuir* 2010, **26**, 533)。また、微小管をランダムに化学架橋してネットワーク構造にした場合では、キネシンを修飾した基板上で微小管が長軸方向だけではなく横方向にも移動する揺らぎ運動が発生することを見出している (Kawamura *et al.*, *RSC Advances* 2014, **4**, 32953)。この微小管ネットワークとキネシンの運動界面では、微粒子をランダムな揺らぎ運動で輸送することもできる。その速度は、瞬間最大で1200nm/sを記録しており、キネシン本来の速度 (約400nm/s) よりも速い。微小管を化学架橋することでネットワーク弾性を利用した加算的な運動機能を発見した一方で、分子機械としては運動方向とタイミングが無秩序という問題が残っている。微小管ネットワークの運動界面はランダムな化学架橋で得たものであり、秩序構造を導入することでより協同性の高い運動を発現する可能性がある。

微小管の運動界面は、大きさで言うと細胞に匹敵するスケールの揺らぎ運動を発揮する。他方、細胞もまたモータータンパク質の力で運動する。培養環境の物性を生体内環境と同

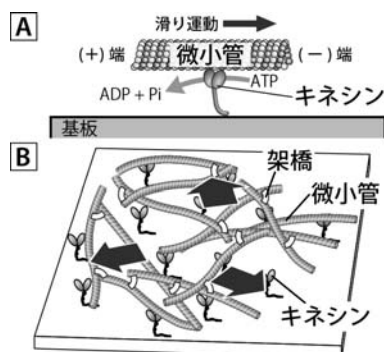


図1 キネシン・微小管の *in vitro* 運動再現系 (A)、キネシンで駆動する微小管ネットワークの運動界面(B)

等の弾性率に変化させると、細胞の運動挙動だけでなく、細胞分化の運命までも変化させる (Engler *et al.*, *Cell* 2006, **126**, 677) ことが報告されている。細胞は、天然のモータータンパク質の多分子体であり、環境に応じてその構造を動的に変化できる。生体内では、静的な物性だけでなく、細胞の様々な生理的活動に付随する運動が発生して、動的な力学環境にある。しかし、培養細胞に力学刺激を与える従来の方法では、細胞スケールでランダムな揺らぎ運動を付与することは困難で、その影響はほとんど未解明であった。微小管の運動界面は、これを細胞培養基板として応用できれば、再現系で生体内の揺らぎの動的環境を模倣した未知の細胞挙動探索が可能になる。

2. 研究の目的

本研究は、モータータンパク質をネットワーク化することで、多分子体特有の振る舞いを明らかにすることを目的としている。生物は、階層構造で無数のモータータンパク質分子を協同的に作用させている。人工系でも、微小管をランダムな架橋でネットワーク化するだけで、キネシン修飾基板上で加算的な運動を発現できることが明らかになった。微小管自体の特徴 (構造上の極性やらせん、剛直性の変調など) や界面の2次元パターンなどのパラメータを変化させて分子機械としての運動特性 (方向やタイミングなど) を評価し、秩序構造導入によって協同性の高い運動発現の原理を探求する。

また、これまで *in vitro* 実験系では再現されていなかった、細胞スケールの揺らぎ力学刺激を培養細胞に与えることで、未知の力学挙動探索実現を目的として、微小管ネットワークとキネシンで構築する運動界面を細胞培養環境に応用する。細胞スケールの揺らぎ力学刺激が細胞の力学挙動に影響するという仮説を検証する。

3. 研究の方法

キネシンを固定した基板上で、架橋した微小管ネットワークを駆動する系 (図1B) について (1) 「秩序構造導入による運動機能の向上」と (2) 「動的細胞培養環境構築への応用」に取り組んだ。

(1) 「秩序構造の導入による運動機能向上」には、モータータンパク質であるキネシンの2次元パターン配置による微小管ネットワーク運動の空間的な制御性を検証した。レーザーアブレーションによるマイクロメートルパターンとシリコンゴムスタンプによるミリメートルパターンの2通りの手法で行った。また、キネシン駆動の化学エネルギー分子に着目して、光活性化型 ATP (caged-ATP) の使用による運動の時間的制御にも取り組んだ。

(2)「動的細胞培養環境構築への応用」では、まず微小管の運動界面(図1B)と細胞培養が両立する溶液環境について、キネシンの駆動と細胞の生存を指標にして条件を同定した。同定した溶液条件中の運動界面に、酵素処理で剥離した細胞を播種することで、接着過程の細胞への力学刺激付与を実現した。細胞形態の観察によって応答挙動を評価した(図2)。

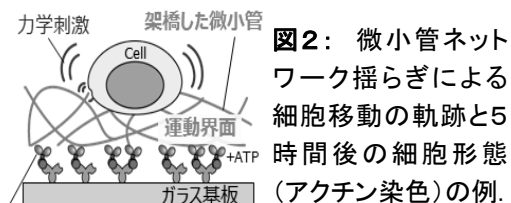


図2: 微小管ネットワーク揺らぎによる細胞移動の軌跡と5時間後の細胞形態(アクチン染色)の例。

4. 研究成果

最初の原理検証実験で、運動界面と培養細胞の共存に成功したことから、細胞への力学刺激付与と応答観察に向けた運動界面の構築へと重点を移して実際の研究を遂行した。

(1) 秩序構造導入による運動機能向上

マイクロメートルスケールの2次元パターンについては、キネシンを基板一面に修飾した駆動領域内に、レーザーアブレーションによる局所剥離で非駆動領域を作成することで実現した。レーザーアブレーションによる剥離は、原子間力顕微鏡による表面立体観察から確認できた。また、剥離した領域にはキネシンの再修飾も可能であることがわかった。基板上に縞状の駆動/非駆動領域パターンを作成して、未架橋の微小管の動態を追跡すると、微小管の進行方向は一部パターンに依存することが分かった。縞幅の狭さに応じて進行方向はパターンに平行に近づく傾向を示した。最小1マイクロメートル幅で作成したパターン上では、微小管の進行角度は縞に対して平均で 22° の角度で滑り運動を示した。この時、同時に速度が約25%低下することが分かった。

ミリメートルスケールの2次元パターン形成では、ポリジメチルシロキサン(PDMS)のマスクを用いることで、細胞接着領域を周囲にして 5×5 ミリメートルの運動界面領域を構築できることを確認した。(2)の結果で述べる培養細胞と共存する溶液条件で動作することが確認できた。

caged-ATPへの照射による運動界面の時間的運動制御では、運動界面の作製から最大9時間後まで遅延して運動を開始できることを確認した。しかし、空間的な制御性について、活性化したuncaged-ATPの拡散により局所的な運動発現が困難であることが判明した。

(2) 力学刺激を付与できる細胞用基板としての応用

キネシンの駆動を再現する条件に、細胞培

養用のビタミン類とアミノ酸類を添加、血清は非添加とすることで、5時間の観察時間中に培養細胞が生存可能な条件を見つけ出した。

細胞スケールの揺らぎを発現する運動界面に細胞を播種することで、接着の過程で生細胞に力学刺激を印加した。その結果、高転移性のがん細胞(マウスメラノーマ、B16-F10)を播種した場合、力学刺激存在下では長い突起をもつ細胞の形態が観測されることが分かった(図3、Kawamura *et al.*, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2**, 2333-2338 (2016))。がんの転移プロセスでは、がん細胞が細胞間をすり抜けるという現象が必須になることから、本研究で観察された細胞の変形性は、**転移性**の本質を反映している可能性が高い。当初の手法では、細胞の接着性が低く、被検細胞数の確保が困難であったが、細胞接着タンパク質を基板に共修飾することで接着率を確保することに成功している。今後は、がん細胞の転移性と相関の高い細胞の形態的特徴を特定することで細胞診断技術としての応用が期待される。

PDMSによる2次元パターン化では、ヒト臍帯静脈細胞(HUVEC)を接着培養した同一基板上で、運動界面を構築・駆動して力学刺激を付与できることを確認した。今後は、創傷治癒のモデル系として更に開発することで、揺らぎ力学刺激の影響検証を通じた創傷治癒機構解明への貢献が期待できる。

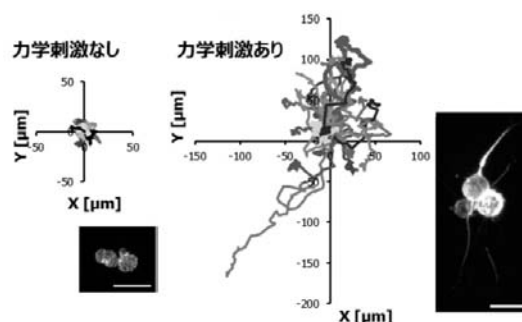


図3: 微小管ネットワーク揺らぎによる細胞移動の軌跡と5時間後の細胞形態(アクチン染色)の例。(スケールバー: $20\mu\text{m}$)

(Kawamura *et al.*, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2**, 2333-2338 (2016))

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① **Ryuzo Kawamura**, Daiki Uehara, Naritaka Kobayashi, Seiichiro Nakabayashi, Hiroshi Yoshikawa “Kinesin-Driven Active Substrate Giving Stochastic Mechanical Stimuli to Cells for Characterization.” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2**, 2333-2338 (2016). 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 日本化学会第97春季年会(2017) 2017年3月16日 慶応大学(日吉キャンパス) Ryuzo Kawamura, Daiki Uehara, Naritaka Kobayashi, Seiichiro Nakabayashi, Hiroshi Y Yoshikawa "Kinesin-driven active substrate for cells giving mechanical noise stimuli" ポスター
- ② 第67回コロイドおよび界面化学討論会 2016年9月24日 北海道教育大学旭川校(北海道・旭川市) Ryuzo Kawamura, Daiki Uehara, Naritaka Kobayashi, Seiichiro Nakabayashi, Hiroshi Y Yoshikawa "Cross-linked microtubule network driven by kinesin as bio-active matter" ポスター
- ③ 11th International Conference and Workshop on Biological Barriers 2016年3月7日 Saarland University (ドイツ・ザールブリュッケン) Ryuzo Kawamura, Daiki Uehara, Naritaka Kobayashi, Seiichiro Nakabayashi, Hiroshi Y Yoshikawa "Motor protein-driven active substrate for detection of cellular mechanical response" ポスターとショートトーク
- ④ 「第5回次世代の物質科学・ナノサイエンスを探る」「知の協奏を目指すソフトおよびナノマテリアル研究会 2016」共同開催 2016年1月8日 ニセコ国際会議施設(北海道・虻田郡ニセコ町) 川村隆三、上原大樹、小林成貴、中林誠一郎、吉川洋史 「キネシン・微小管を用いた運動界面構築と細胞培養基板としての応用」招待講演
- ⑤ 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「ナノメディシン分子科学」+「超高速バイオアセンブラ」合同若手の会 2015年10月31日 不死王閣(大阪府・池田市) 川村隆三、上原大樹、小林成貴、中林誠一郎、吉川洋史 「細胞の力学刺激を目的としたキネシン駆動型運動界面の構築」ポスター
- ⑥ iCeMS International Symposium Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter 2015年9月25日 京都大学吉田北部キャンパス(京都府・京都市) Ryuzo Kawamura, Daiki Uehara, Naritaka Kobayashi, Seiichiro Nakabayashi, Hiroshi Y

Yoshikawa "Kinesin-driven microtubule network for mechanical cellular stimuli" ポスターとショートトーク

- ⑦ 第53回日本生物物理学会年会 2015年9月15日 金沢大学角間キャンパス(石川県・金沢市) Ryuzo Kawamura, Daiki Uehara, Naritaka Kobayashi, Seiichiro Nakabayashi, Hiroshi Y Yoshikawa "Dynamic substrate driven by motor proteins for mechanical cellular stimuli" ポスター

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

[その他]

研究室ホームページへの業績掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村 隆三 (KAWAMURA, Ryuzo)
埼玉大学・理工学研究科・助教
研究者番号: 50534591

(2) 研究協力者

中林 誠一郎 (NAKABAYASHI, Seiichiro)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号: 70180346

(3) 研究協力者

吉川 洋史 (YOSHIKAWAW, Hiroshi)
埼玉大学・理工学研究科・准教授
研究者番号: 50551173

(4) 研究協力者

小林 成貴 (KOBAYASHI, Naritaka)
埼玉大学・理工学研究科・助教
研究者番号: 40595998

(5) 研究協力者

菅沼 雅美 (SUGANUMA, Masami)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号: 20196695