

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05907

研究課題名（和文）細胞内因性収縮力を時空間的に可視化するバイオセンサーの創成

研究課題名（英文）Development of intracellular force sensors and analysis of the relationship between cell dynamics and its contractile forces

研究代表者

松井 翼（Matsui, Tsubasa）

大阪大学・基礎工学研究科・講師

研究者番号：50638707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,800,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内因性収縮力を調節しているミオシン調節軽鎖のリン酸化と、細胞形態、収縮力発生、運動との関係を明らかにした。ミオシン調節軽鎖を擬似的に高いリン酸化状態にしておくと、細胞は円形状の形態で力を発生し、ほとんど運動しないこと、逆に擬似的に低いリン酸化状態にしておくと、細胞形態は複雑になり、活発に運動することがあきらかとなった。また野生型のミオシン調節軽鎖では、上記2つの状態を行き来することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞収縮力との細胞動態との関係を明らかにすることで、力によって駆動される生命現象の理解につながる。また、異常な収縮力の発生や力発生機構の変容という観点で、これまで原因が分かっていた疾患の原因解明につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to clarify the relationship between phosphorylation of the myosin regulatory light chain that regulates the endogenous contractile force and cell morphology, contractile force generation, and motility. When the myosin regulatory light chain is put in a pseudo high phosphorylation state, the cells generate a force in a circular form and hardly move. Conversely, when the myosin regulatory light chain is put in a pseudo low phosphorylation state, the cell morphology became complicated and cell movement became active. In addition, it was revealed that the wild-type myosin regulatory light chain goes back and forth between the above two states.

研究分野：生体力学

キーワード：ストレスファイバー メカノバイオロジー 細胞収縮 バイオメカニクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一見じっとしているように見える細胞も、隣り合う細胞や接着している基板に対して絶えず力を発生し引っ張っている。この内因性の力は、細胞内では力発生を担う収縮構造が等尺性収縮状態(長さが一定のまま力を発生している状態)にあり、力が釣り合っているため目に見える変形を伴わず、常に力を発生していながらも無視されてきた物理的因子であった。近年、この内因性収縮力は運動、増殖、分化、形態形成、疾病など生命現象のあらゆる場面で普遍的に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた (Vicente-Manzanares et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 10, 778-790, 2009)。その最たる例が、米国・フィラデルフィア大学の Discher 博士のグループの研究である (Engler et al., Cell, 126, 677-689, 2006)。彼らは間葉系幹細胞(骨髄などに存在し、様々な細胞へと分化する能力を保持していることから、組織の恒常性維持を担っている)を様々な硬さの基板上で培養すると、1)柔らかい基板では神経細胞へ、2)中間の硬さの基板では筋肉細胞へ、3)硬い基板では骨細胞へ分化することを発見した。驚くべきことに、間葉系幹細胞は自身が接着する基板の硬さを感じ取り、周囲の空気を読むかのように自身を取り巻く物理的環境に適応し分化していた、つまり運命決定を行っていたのである。この現象には内因性収縮力が中心的な役割を果たしている。薬剤により収縮力の発生を抑制すると、基板硬さに応じた分化は見られなかったと報告されている。また間葉系幹細胞は基板が硬くなると、発生する収縮力の上昇が見出されている。つまり、細胞は物理的環境へ自身を適応させるべく、内因性収縮力を調節していることを示唆するものである。以上のことより、内因性収縮力の大きさとその細胞内分布を知ることは、生命現象の機能調節機序を知る上で非常に重要な課題であると考えられる。特に、上記の報告が示唆するように、幹細胞の分化誘導や未分化能の維持にも内因性収縮力が関与しており、再生医療での応用時にも重要な因子となることから、世界中で内因性収縮力に着目した研究が活発に進められている。

細胞が発生している内因性収縮力の発生源として、アクチンストレスファイバーが挙げられる。アクチンストレスファイバーは細胞骨格分子であるアクチン、ミオシン、アクチン結合タンパク質などが重合した太さおよそ 100 - 500 nm の線維状構造物である。前述のように内因性収縮力への注目度・重要度が急激に増しているにも関わらず、アクチンストレスファイバーの動態調節機構には不明な点が多い (Murrell et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 16, 486-498, 2015)。アクチンストレスファイバーを構成する分子は、様々な生化学的シグナルにより時空間的な制御を受けて、動態調節がなされていると考えられている。ここで重要な役割を担うタンパク質が存在する。ミオシン調節軽鎖と呼ばれる約 20 kDa のタンパク質である。ミオシン調節軽鎖はミオシン重鎖に結合しており、特定のアミノ酸がリン酸化されるとミオシン重鎖のフィラメント形成や力発生の分子機構である ATP 加水分解反応を正に調節することが知られている。しかしながら、ミオシン調節軽鎖のリン酸化と細胞収縮力との関係や、アクチンストレスファイバーの動態調節、ひいては細胞の動態調節機構との関係は依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

細胞収縮力の発生源であるアクチンストレスファイバーの動態調節機構の解明を目的とした。上記目的を達成するために、時空間的に細胞内因性の力を評価可能なバイオセンサーの構築を試みる。並行して、細胞動態とミオシン調節軽鎖のリン酸化との関係、また収縮力との関係の評価する。さらには、アクチンストレスファイバーの微細構造についても各種顕微鏡を駆使して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アクチンストレスファイバーを構成・結合しているタンパク質の探索

細胞内には 10 数万種類のタンパク質が発現しており、細胞全体を溶解してしまうと、アクチンストレスファイバーを構成しているタンパク質を絞り込むのは非常に困難となる。そこで、細胞からアクチンストレスファイバーだけを抽出、単離する独自の化学的手法を用いて、アクチンストレスファイバーだけを取り出す。そのあと、生化学的手法、質量分析法によりアクチンストレスファイバーを構成・結合しているタンパク質の同定を行った。また、老化に着目し、細胞老化刺激群とコントロール群との間で、上記の方法を用いて老化依存的にアクチンストレスファイバーの構成成分の変化を調べた。

(2) アクチンストレスファイバーの微細構造イメージング

これまでに、アクチンストレスファイバーは筋原線維のサルコメア構造と同等と扱われてきたが、実際には分子構成や単位構造内に存在する II 型ミオシンの分子数が少数であることなど、相違点が明らかとなっている。さらにアクチンストレスファイバーの微細構造はほとんど明らかにされていないのが現状である。そこで本研究では、独自の化学的手法を用いて、細胞内からアクチンストレスファイバーを抽出し、原子間力顕微鏡を用いた高分解能イメージングを行った。また透過電子顕微鏡観察、単離アクチンストレスファイバーの引張試験、ATP 投与による収縮力計測を通じて、アクチンストレスファイバーが有する高次構造と力学特性の関係について調べた。

(3) ミオシン調節軽鎖の疑似リン酸化変異体を用いた細胞動態解析

ミオシン調節軽鎖のリン酸化と細胞動態との関連を明らかにするために、ミオシン調節系差の疑似リン酸化変異体を用いた。ヒト骨肉腫細胞株 U2OS 細胞に上記変異体を遺伝子導入し、安

定発現株を樹立した。ミオシン調節軽鎖変異体として、擬似的に非リン酸化状態を示す AA 変異体、擬似的にリン酸化状態を示す DD 変異体、野生型を示す WT の 3 種類を用いた。それぞれ蛍光タンパク質が融合されており、蛍光顕微鏡でライブイメージング可能である。上記変異体発現細胞を、細胞収縮性を位相差顕微鏡で可視化できる特殊基板上に播種し、5 分おきに細胞形態、収縮性、運動速度などのパラメータの計測を行った。

4. 研究成果

(1) アクチンストレスファイバー構成タンパク質解析

生化学的手法により、アクチンストレスファイバーを構成するタンパク質の解析を行った。アクチンストレスファイバーに存在しないことが分かっているチューブリン、ファシンのバンドは単離アクチンストレスファイバーの画分には見られなかったことから、抽出・単離方法がうまくいっていることが分かった。さらに、ヒト線維芽細胞を用いて、老化刺激群とコントロール群の細胞からアクチンストレスファイバーの構成成分の違いを比較したところ、老化刺激群にのみ存在するタンパク質を同定することができた。また、老化細胞群ではアクチンストレスファイバーの本数は減少するものの直径は増加するなど、特徴的な変化を示すことが分かった。今後、老化細胞内のアクチンストレスファイバーの構成成分についてより詳細な解析を実施していく。

(2) アクチンストレスファイバーのねじれ構造と細胞接着斑構造内の張力分布

独自手法により、培養血管平滑筋細胞からアクチンストレスファイバーを抽出・単離を行い、細胞からむき出しの状態にした。この状態にすることで、原子間力顕微鏡によるナノメートルオーダーの微細構造イメージングを行った。その結果、アクチンストレスファイバーには、主たる構成成分であるアクチンフィラメントが持つ約 37 nm ピッチの微細なねじれだけでなく、より高次なねじれ構造を持つことが明らかとなった。さらに、透過電子顕微鏡でもねじれ構造が観察された。上記 2 種類の顕微鏡では、アクチンストレスファイバーを化学固定して観察していたため、より動的なねじれ構造の計測を試みた。微細ガラス針を用いて、光学顕微鏡下で単離アクチンストレスファイバーの引張試験を行ったところ、ひずみ負荷にともないアクチンストレスファイバーに結合させたマーカーが回転することを確認した。また ATP を投与すると、マーカーが回転しながら収縮力を発生していることも明らかとなった。ねじれ構造をモデル化し、細胞内でひずみを負荷されたときのアクチンストレスファイバーの振る舞いを考えた。細胞内のアクチンストレスファイバーは周囲の力学環境に適応するように、形成、崩壊を繰り返している。中でも、細胞が一軸繰り返し伸展ひずみを負荷されると、ひずみ負荷方向に配向しているアクチンストレスファイバーが選択的に崩壊し、ひずみとは直交する方向に再形成、再配置されることが知られている。このとき、ひずみが除荷されるときにアクチンストレスファイバーは速やかに崩壊することが分かっている。この現象に対して、アクチンストレスファイバーのねじれ構造の持つ寄与は以下のことが考えられた。ねじれモデルにより、ひずみ除荷により座屈する前にねじれ構造がほどけることが分かった。これによりアクチンストレスファイバーに結合できる表面積が増えることで、構成分子の脱重合を促す化学反応を促進することが予想された。

原子間力顕微鏡によるアクチンストレスファイバーのイメージングとともに、細胞接着斑が層構造を有していること、さらに蛍光顕微鏡を組み合わせることで細胞接着斑のタンパク質分子局在の関係を明らかにした。この構造モデルから、細胞接着斑は細胞中心側で高い応力を支持していることが示唆された。この細胞接着斑内部の特徴的な応力の分布は、 σ -アクチニン張力センサーを用いても確認することができた。

(3) ミオシン調節軽鎖疑似リン酸化変異体を用いた細胞動態の関係

3 分おきに 5 時間の時系列データを取得し、面積、真円度、形態複雑性、移動量、収縮力の 5 つのパラメータを算出した。この中から、各変異体が持つ特徴情報を抽出するために主成分分析を行った。その結果、第一主成分と第二主成分で上記変異体の特徴を捉えることが可能であり、散布図上で変異体ごとに分布していることが明らかとなった。AA 変異体の特徴として、移動量や形態複雑性が高くなるが、収縮性は低い値を示した。DD 変異体では円形に近い形状をしており、収縮性は高い値を取ることが分かった。WT ではリン酸化状態が動的に調節されていることから、散布図上でも全体的に分布しているものの、収縮性が高い位置に多く分布しており、面積や形態複雑性も高い傾向が見られた。次に、細胞内の MRLC の局在を解析したところ、収縮性の高い細胞は細胞辺縁に MRLC が局在しており、細胞形態は円形に近く恒常的に収縮力を発生していた。上記の特徴を有する細胞について、MRLC と収縮性の局在について相互相関分析を行ったところ、MRLC が局在してからおよそ 30 分後に収縮力の極大値を取ることが分かった。以上より、本研究で行った解析により、MRLC のリン酸化状態および局在は、細胞形態、移動、収縮力の発生に寄与していることが明らかとなり、MRLC の各変異体の特徴を捉えることが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nehwa Foncham Jeremia, Matsui Tsubasa S., Honghan Li, Matsunaga Daiki, Sakaguchi Yoshiyuki, Deguchi Shinji	4. 巻 521
2. 論文標題 Multi-well plate cell contraction assay detects negatively correlated cellular responses to pharmacological inhibitors in contractility and migration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 527 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto Tatsuki, Matsui Tsubasa S., Ohishi Taiki, Deguchi Shinji	4. 巻 19
2. 論文標題 Helical structure of actin stress fibers and its possible contribution to inducing their direction-selective disassembly upon cell shortening	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomechanics and Modeling in Mechanobiology	6. 最初と最後の頁 543 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10237-019-01228-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Tsubasa S., Deguchi Shinji	4. 巻 316
2. 論文標題 Spatially selective myosin regulatory light chain regulation is absent in dedifferentiated vascular smooth muscle cells but is partially induced by fibronectin and Klf4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C509 ~ C521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00251.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Tsubasa S., Ishikawa Akihiro, Deguchi Shinji	4. 巻 505
2. 論文標題 Transgelin-1 (SM22) interacts with actin stress fibers and podosomes in smooth muscle cells without using its actin binding site	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 879 ~ 884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Tsubasa S., Wu Hujegile, Deguchi Shinji	4. 巻 13
2. 論文標題 Deformable 96-well cell culture plate compatible with high-throughput screening platforms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0203448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0203448	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Deguchi S., Saito, A.C., Matsui, T.S., Huang, W.J., Sato, M.	4. 巻 12
2. 論文標題 The opposite mechano-response of paxillin phosphorylation between subcellular and whole-cell levels is explained by a minimal model of cell-substrate adhesions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 16-00670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/jbse.16-00670	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda, S.P., Matsui, T.S., Ichikawa, T., Furukawa, T., Kioka, N., Fukushima, S., Deguchi, S.	4. 巻 59
2. 論文標題 Cellular force assay detects altered contractility caused by a nephritis-associated mutation in nonmuscle myosin IIA.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 423-433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S.	4. 巻 482
2. 論文標題 New wrinkling substrate assay reveals traction force fields of leader and follower cells undergoing collective migration	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 975-979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.11.142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計103件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 16件）

1. 発表者名 茶木 大登, 松井 翼, 出口 真次
2. 発表標題 顕微ナノ力学特性計測装置の開発
3. 学会等名 日本機械学会関西学生会卒業研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本 達樹, 松井 翼, 出口 真次
2. 発表標題 ストレスファイバーのひずみ非一様性に関する力学的検討
3. 学会等名 日本機械学会関西支部第95期定時総会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本 達樹, 松井 翼, 出口 真次
2. 発表標題 ストレスファイバーのひずみ非一様性に関する構造力学的検討
3. 学会等名 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本告 楽, 松井 翼, 福島 修一郎, 野井 健太郎, 出口 真次
2. 発表標題 細胞骨格分子動態の局所性に関する考察
3. 学会等名 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Foncham Jermia Nehwa, Tsubasa S. Matsui, Li Honghan, Daiki Matsunaga, Shinji Deguchi
2. 発表標題 Drug screening assay for evaluating cellular contractility
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井 翼, 本告 楽, 吉本 昂平, 徳永 昌也, 福島 修一郎, 出口 真次
2. 発表標題 細胞接着斑はどのように異なる大きさの力を感知するか? (How do focal adhesions sense different levels of cellular tension?)
3. 学会等名 第19回日本蛋白質学会年会/第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井翼, 出口真次
2. 発表標題 ビジュアルフィードバック制御によるタンパク質複合体線維の顕微粘弾性評価
3. 学会等名 第63回システム制御情報学会研究発表講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井 翼
2. 発表標題 細胞が発生する力のアッセイ
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部哲也, 松井翼, 福島修一郎, 出口真次
2. 発表標題 非筋細胞から単離した線維状タンパク質複合体の力学特性計測
3. 学会等名 日本機械学会 関西学生会平成30年度 学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本告楽, 松井翼, 福島修一郎, 出口真次
2. 発表標題 細胞接着構造の分子動態計測
3. 学会等名 日本機械学会 関西学生会平成30年度 学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本達樹, 松井翼, 出口真次
2. 発表標題 らせん状ストレスファイバーの構造に起因する生物学的作用に関する考察
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井翼, 出口真次
2. 発表標題 細胞収縮と増殖シグナルの相関解析
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中亮輝, 松井翼, 福島修一郎, 出口真次
2. 発表標題 細胞収縮の時系列解析
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T.S. Matsui, S. Deguchi
2. 発表標題 A cellular contractility monitoring system allowing for high- throughput and long-term analysis
3. 学会等名 MHS 2018 (International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本達樹, 松井翼, 出口真次
2. 発表標題 らせん状ストレスファイバーの機械的性質に関する考察
3. 学会等名 第29回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井翼, 出口真次
2. 発表標題 細胞発生力を高効率に定量評価する方法の開発とその適用例
3. 学会等名 日本機械学会2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田 翔太, 松井 翼, 市川 尚文, 古川 太一, 木岡 紀幸, 福島 修一郎, 出口 真次,
2. 発表標題 細胞の「力比べ」アッセイ
3. 学会等名 第24回 HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井翼
2. 発表標題 非筋細胞内で力を支持するアクチンストレスファイバーの収縮動態
3. 学会等名 第9回分子骨格筋代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井翼
2. 発表標題 細胞内因性収縮力を計測/評価するシステムの開発
3. 学会等名 第34回代謝調節の分子生物学・独り占めセミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井翼, 三浦壮, 出口真次
2. 発表標題 細胞の物理的状態評価を目指した画像演算アルゴリズムの構築
3. 学会等名 第30回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井翼
2. 発表標題 Load-dependent contractile properties of actin stress fibers
3. 学会等名 第49回生物機械システム研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsubasa S. Matsui, Hige Jile, Shinji Deguchi
2. 発表標題 A New Engineering System for the Study of Cell Mechanobiology
3. 学会等名 MHS2016（国際学会）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室ホームページ http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	出口 真次 (Deguchi Shinji) (30379713)	大阪大学・基礎工学研究科・教授 (14401)	