

令和元年6月18日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07352

研究課題名(和文)細胞が怪我をした時の修復メカニズム

研究課題名(英文)A study of cellular wound repair mechanism

研究代表者

祐村 恵彦(Yumura, Shigehiko)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：70183986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は常に外界の物理的・化学的ストレスにさらされており、細胞膜の損傷がしばしば起こるが、細胞には損傷を修復する機構が存在する。また、細胞外の物質を人為的に細胞内に導入するエレクトロポレーションなどの方法は、この修復機構に依存している。本研究では、細胞膜だけにピンポイントで穴をあけるレーザーポレーション法を新規開発し、この方法を用いて細胞膜に穿孔損傷を与え、形成された穴の開閉の過程を初めて可視化した。さらに修復過程に形成される修復装置とシグナル制御機構の一部を明らかにした。これらの研究成果は、基礎研究だけでなく、膜修復に関連する疾病の治療に役立つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜の修復の欠損は、筋ジストロフィー、炎症生筋疾患、糖尿病などの疾患の原因にもなっており、本研究のような基礎的な知識の積み上げが将来これらの疾病の治療に役立つと考えられる。また、今回開発したレーザーポレーション法をさらに発展させ、今後多くの研究者が利用できるような細胞導入装置の市販化を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Cells are consistently subjected to wounding by physical or chemical damages from the external environment. However, the cells have an ability to repair the wounded cell membrane. In addition, methods for introducing extracellular substances into cells such as electroporation rely on cellular wound repair. In the present study, we newly invented a laserporation method to make a pore in the cell membrane. By using this method, we examined the mechanism of cell membrane repair. We characterized the dynamics of wound pores opening and closing by live imaging of fluorescent cell membrane proteins, influx of fluorescent dye, and calcium ion imaging. We also found that annexin C1 immediately accumulated at the wound site depending on the external calcium ion. These results will contribute not only to basic researches but also to the therapy for membrane repair-related diseases.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞膜 損傷治療 レーザー Ca イオン annexin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は常に外界の物理的・化学的ストレスにさらされており、細胞膜の損傷がしばしば起こるが、細胞にはそのような細胞膜の損傷を修復する機構が存在する。また、広く基礎・応用に用いられている細胞外の物質を人為的に細胞内に導入するエレクトロポレーションなどの方法は、この修復機構に依存している。修復機構が異常になるとことで生じる遺伝病も知られている。細胞膜損傷の修復の機構について、修復装置の分子構成、修復メカニズム、制御シグナルなど未解明の点が多く残されていた。また、細胞膜の損傷に従来強力な UV レーザーが使われてきたが、細胞膜だけでなく、細胞質にも損傷を与える問題があり、細胞膜だけに損傷を与える技術が必要とされていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、独自に開発したレーザーポレーション法をさらに改良し、基礎的だが従来調べて来られなかった損傷の穴の開口から閉じるまでの動態を明らかにする。さらに、細胞内シグナル、修復に関与するたんぱく質の検索を遺伝子変異細胞のライブラリーを用いて調べる。さらに、候補となった分子の動態を可視化し、時系列に並べ、修復装置の構築から修復の完了までの全体像を明らかにする。

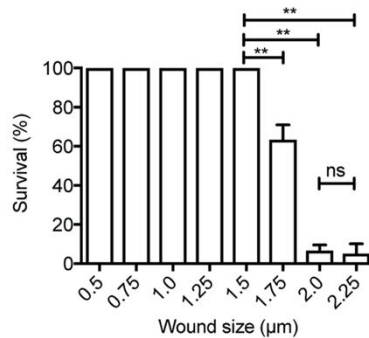
### 3. 研究の方法

細胞性粘菌の細胞の細胞膜に穴を開ける損傷実験のために、独自に開発したレーザーポレーション法を用いた。この方法により、細胞膜だけに正確な大きさの穴を開けることができた。開口した穴の動態を調べるため、全反射蛍光顕微鏡下で、同方法により細胞膜に穴を開け、GFP-CAR1 (膜タンパク質) を発現した細胞を用いて、画像取得した。また、外液に蛍光色素を入れ、穴から流入する色素の量を計時的に蛍光定量した。これらのデータを ImageJ で解析し、カーブフィットを行なって、開口のパラメーターを比較した。修復に関連する分子を同定するために、遺伝子変異細胞のライブラリーで、上記の実験を行い関連タンパク質の同定を行なった。その結果、annexin C1 が候補が上がったので、annexin C1 の動態を観察するために、GFP-annexin C1 発現コンストラクトを作成し、細胞に形質導入した。また、annexin 欠損細胞も作成し、修復の異常を調べた。

### 4. 研究成果

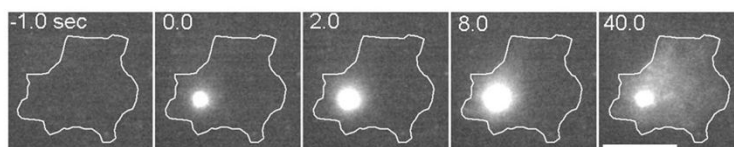
#### 1) Laserporation を用いての細胞膜損傷実験

独自に新規開発したレーザーポレーション法を用いて、穴のサイズを変えて損傷実験を行った。穿孔は再現よく起こり、正確な大きさの穴が開けられた。2.0 以上のサイズでは細胞は、修復されることなく破砕された。



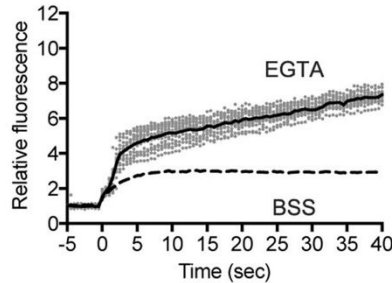
#### 2) 穴の動態解析

GFP-CAR1 (膜タンパク質) を発現した細胞で穴を開けると、穴の部分が黒く見え、そのサイズは一度広がったのち小さくなって最終的には閉じていった。外液に蛍光色素を入れて、穴からの流入を可視化し、その蛍光値から継時的流入変化を調べた。損傷直後は、蛍光は細胞内に流入するが、数秒以内に停止した。大きなサイズの穴になる程流入量は多くなった。この流入から穴が閉じるまでの half time を求めると、直径 0.5 μm サイズの穴 (円形) では、1.2 秒、1.0 μm サイズでは 1.8 秒となっており、細胞膜は速やかに修復により閉じることが分かった。



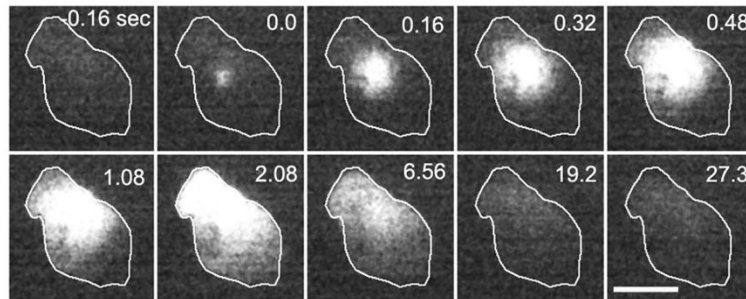
3) 外液 Ca イオンが修復に必要である。

カエルなどでの研究から，外液 Ca イオンが修復に必要であるとの知見から，細胞性粘菌についても Ca イオンの必要性を検証した。外液に Ca イオンのキレーターである EGTA を入れて，Ca イオンを除いて，上記蛍光色素流入実験を行うと，蛍光色素の流入は止まらず，穴は塞がっていないことがわかり，Ca イオンが怪我の修復に必須であることが分かった。



4) 外液からの Ca イオンの流入の可視化

次に，実際に細胞内に Ca イオンが流入しているかを調べるため，細胞に蛍光 Ca イオンセンサーである GCamP6s を発現させて，細胞膜損傷実験を行ない可視化した。損傷後直ちに穴からの Ca イオンの流入が起き，細胞質全体に広がっていった。



5) 損傷時の細胞質の Ca イオンの制御

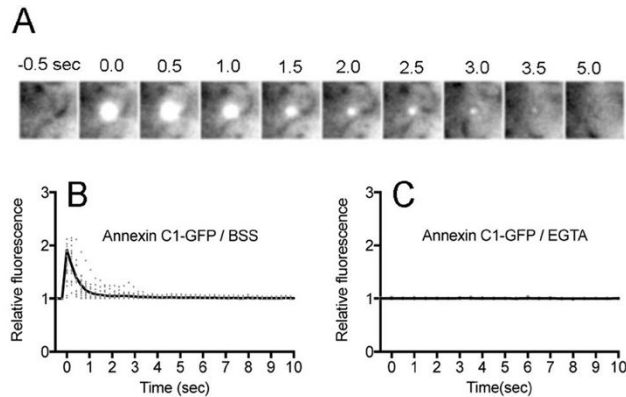
上記実験で，外液に EGTA を入れた場合には，蛍光値の増大は起きなかったため，細胞内ストアーから Ca イオンが関与していないと考えられる。しかし，穴から流入した Ca イオンが Ca-induced Ca-release 機構によって細胞内ストアーからの Ca イオンの放出を起こしている可能性が考えられる。そこで，小胞体の inositol 1,4,5 triphosphate receptor 相同遺伝子 (ip1A) 欠損細胞で Ca イオンの動態を調べた。その結果，ip1A 欠損細胞では Ca イオンの細胞内の増大が低くなったので，小胞体からの Ca イオンも観察された Ca イオンの上昇に寄与していることがわかった。

6) 小胞体からの Ca イオンは修復には必要ない。

上記，ip1A 欠損細胞の結果を受け，この変異体の損傷時の修復を調べたが，野生型細胞と変わらないことがわかり，小胞体からの Ca イオンは修復には必要ないと結論づけた。

7) 修復に annexin C1 が関与する。

遺伝子変異細胞のライブラリーを用いて，損傷に問題のある遺伝子として annexin C1 を同定した。GFP-annexin C1 発現細胞を作成し，損傷時の細胞内局在を蛍光観察したところ，損傷直後に損傷部に GFP-annexin C1 は集合することが分かった(A, B)。相同遺伝子の annexin C2 は集合することはなかった(C)。



8) annexin C1 の局在は Ca イオン依存的

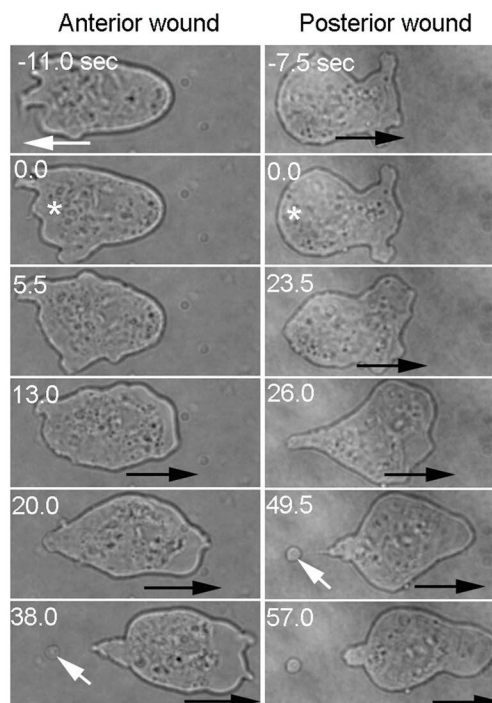
外液に EGTA を入れて、Ca イオンを除くと GFP-annexin C1 は集合することはなかった  
ので、GFP-annexin C1 は Ca イオン依存的に細胞膜に結合すると考えられる。

9) 繰り返しの損傷に対する反応

繰り返しの損傷に対して GFP-annexin C1, Ca イオンの流入の反応は同じ経過反応を示した。以前の線維芽細胞の報告で、1 回目の損傷に比べて 2 回目以降は修復が速やかになる  
ということだったが、細胞性粘菌では観察されなかった。

10) 損傷により細胞の極性を制御できる。

想定外の発見として、移動している細胞の前部膜に孔を開けると、細胞は反転して逃げる  
ことを見出した。細胞の尾部に孔を開けた場合には、細胞は方向転換せずにそのまま速度を  
速めて逃げていくことが分かった。この発見は、細胞運動の制御機構研究で重要な視点を与  
えるものであろう。また、研究結果は、抗がん剤などにより細胞を完全に死滅できない場合、  
損傷を受けたが生き残った細胞が移動しやすく転移しやすい可能性を示唆しており、応用的  
にも重要な知見が得られた。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

T. Kondo, and **S.Yumura** (2019). Translation enhancement by a *Dictyostelium* gene sequence in

*Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 130: 3501-3510. doi: 10.1007/s00253-019-09746-7. ( 査読有り )

M.S. Pervin, and S. Yumura (2019). Manipulation of cell migration by laserporation-induced local wounding. Scientific Reports, 9, 4291, doi: 10.1038/s41598-019-39678-1. ( 査読有り )

M.S. Pervin, G. Itoh, M. S. U. Talukder, K. Fujimoto, Y. V. Morimoto, M. Tanaka, M.Ueda, and S. Yumura (2018). A study of wound repair in *Dictyostelium* cells by using novel laserporation. Scientific Reports, 8: 7969, doi: 10.1038/s41598-018-26337-0. ( 査読有り )

Taira, R. and S. Yumura (2017). A novel mode of cytokinesis without cell-substratum adhesion. Scientific Reports, 7: 17694. doi: 10.1038/s41598-017-17477-w. ( 査読有り )

Tanaka, M., T. Kikuchi, H. Uno, K. Okita, T. Kitanishi-Yumura and S. Yumura (2017). Turnover and flow of the cell membrane for cell migration. Scientific Reports, 7:12970. doi:10.1038/s41598-017-13438-5. ( 査読有り )

Jahan, MD. G. S. and S. Yumura (2017). Traction force and its regulation during cytokinesis in *Dictyostelium* cells. Europ. J. Cell Biol., 96: 515-528. doi:10.1016/j.ejcb.2017.06.004. ( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

Md. Istiaq, Obaidi Tanvir, Shigehiko Yumura  
Robustness of cytokinesis in *Dictyostelium* cell after cell membrane wound  
日本分子生物学会, 2018.10.28 パシフィコ横浜 ( ポスター発表 )

Md. Istiaq Obaidi Tanvir, Shigehiko Yumura  
Wound repair during cytokinesis in *Dictyostelium* cells  
日本細胞性粘菌学会, 2018.10.20 山口大学 ( ポスター発表 )

Md. Shahabe Uddin, Pervin Mst. Shaela, Shigehiko Yumura  
Regulation of actin and actin-related proteins dynamics at wound site in *Dictyostelium* cells  
日本細胞性粘菌学会, 2018.10.20 山口大学 ( ポスター発表 )

Pervin Mst. Shaela, Md. Shahabe Uddin, Shigehiko Yumura  
Dynamics of actin and actin-binding proteins during wound repair in *Dictyostelium* cells  
日本細胞生物学会, 2018.6.5 タワーホール船橋 ( ポスター発表 )

Shaela Pervin, Shigehiko Yumura  
Calcium-dependent wound repair of cell membrane in *Dictyostelium* cells  
日本細胞生物学会, 2017.6.13 仙台国際センター ( ポスター発表 )

Risa Taira and Shigehiko Yumura  
Cytokinesis E: A novel mode of cytokinesis in multicellular aggregates  
日本細胞生物学会, 2017.6.13 仙台国際センター ( 口頭発表 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況（計 1 件）

名称：細胞内への外来物質の導入方法

発明者：祐村恵彦

権利者：国立大学法人山口大学

種類：特許

番号：特許第 6 3 7 4 1 8 7 号

取得年：平成 30 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。