

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07366

研究課題名(和文)細胞膜張力シグナルによる遊走細胞のミオシンII集積

研究課題名(英文)Myosin II accumulation of migrating cells by cell tension

研究代表者

岩橋 好昭 (Iwadate, Yoshiaki)

山口大学・大学院創成科学研究科 准教授

研究者番号：40298170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：GFP ミオシン II を発現した細胞性粘菌アメーバを硬さの異なる基質上に這わせ、アメーバ運動とミオシン II の動態を計測した。ヤング率 0.1 kPa 柔らかい基質上では、細胞は糸状突起様の細かい突起をほとんど出さなかった一方、ヤング率 1 kPa の硬い基質上で、細胞は糸状突起様の仮足を多く出した。仮足の振る舞いを詳しく解析すると、最大の仮足の長さは硬い基質上の細胞のほうが短かった。ミオシン II の最大蛍光強度は硬い基質上の細胞のほうが強かった。これらの結果はミオシン II の集積が細胞の伸展に依存することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が誘引物質の方向に移動する性質は走化性と呼ばれ、血球細胞の免疫応答や神経細胞の組織形成など様々な生命現象で重要な働きを担っている。基質に接着した細胞の移動は、一般的にアクチン重合による前端的伸長とアクチン重合による後端的退縮によってなされている。細胞前端的細胞膜上のレセプターが誘引物質を感知してから、前端的のアクチン重合にいたる細胞内シグナル伝達経路は詳しく研究されてきた。一方、細胞後端にミオシン II が集積するメカニズムはこれまで明らかにされていなかった。本研究によってミオシン II が走化性運動時、機械的なシグナルを介して集積する可能性が提案された。

研究成果の概要(英文)：Dictyostelium amoebas expressing GFP myosin II were dispersed on substrates of different stiffness. Cell migration and myosin II dynamics of them were measured in detail. On a soft substrate, the cells produced few filopodia-like pseudopodia, while on a stiff substrate, the cells produced many filopodia-like pseudopodia. A detailed analysis of pseudopodia behavior revealed that the maximum pseudopodia length was shorter for cells on a hard substrate. The maximum fluorescence intensity of myosin II was stronger in cells on a stiff substrate. These results suggest that the accumulation of myosin II and pseudopodia-dynamics depends on the degree of cell cortex extension.

研究分野：生物物理学

キーワード：アメーバ運動

1. 研究開始当初の背景

細胞が特定の化学物質（誘引物質）の方向に移動する性質は走化性と呼ばれ、血球細胞の免疫応答や神経細胞の組織形成など様々な生命現象で重要な働きを担っている。基質に接着した細胞の移動は、一般的にアクチン重合による前端的伸長とアクトミオシンの収縮による後端の基質からの脱着・収縮によってなされている。細胞前端的細胞膜上のレセプターが誘引物質を感知してから、前後端でのアクチン重合・アクトミオシン収縮にいたる細胞内シグナル伝達経路は詳しく研究されてきた。細胞内シグナル伝達経路上で前後を分ける分子は、誘引物質側に集まる PI3K と PI3K に排除される PTEN といわれている。PI3K がその後何段階かのシグナル伝達を経てアクチンを重合させることは証明されているが、PTEN の集積からミオシン II の集積に至るシグナル伝達経路は不明である。また、PTEN の分布は細胞の側部と後部で変わらないが、ミオシン II は側部よりも後部に多く集積し、PTEN とミオシン II は必ずしも共局在するとはいえない。すなわち、前方の誘引物質を細胞が感知してミオシン II を後ろに集積させるメカニズムは不明なままである。一方、近年、機械的なシグナルを介して、細胞性粘菌アメーバや好中球が運動方向を決めることが報告されてきている^{1,2}。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ミオシン II が後端に集積する細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることである。我々は、細胞先端でのアクチン重合による細胞膜の伸長は(1) ミオシン II を細胞先端に集積させる、同時に(2) 細胞膜張力の上昇として後端に伝わり後端でもミオシン II を集積させるという、力学的シグナルによる独自のアイデアを着想し、細胞が進展するとミオシン II が集積するという新たな走化性メカノシグナル伝達仮説を提案し、この仮説の証明を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 誘引物質 cAMP の安定な濃度勾配下での細胞性粘菌アメーバの運動を観察するために図 1 に示すトンネルチャンバを作成し、トンネル内で走化性運動する粘菌アメーバのミオシン II の動態を計測する。トンネルは型枠で PDMS を固めて製作する。

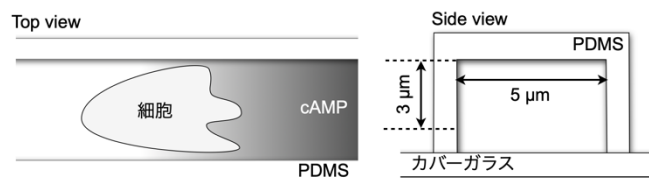


図1 走化性トンネルチャンバ

- (2) 細胞性粘菌アメーバを硬さの異なる基質上に這わせ、アメーバ運動の様子（仮足の伸長・縮の時間変化など）、ミオシン II の動態を計測する。
- (3) ミオシン II を欠損した細胞性粘菌アメーバを(2) 同様に硬さの異なる基質上に這わせ、アメーバ運動の様子を観察する。
- (4) 我々の仮説に基づいて運動するアメーバを模した機械モデルを試作し、仮説にしたがう運動を再現できるか検討する。

4. 研究成果

- (1) トンネルチャンバ内に cAMP の濃度勾配を形成させ、一方向に細胞性粘菌アメーバを進行させることができた。GFP ミオシン II の発現した細胞性粘菌アメーバをトンネルチャンバ内で走化性運動させ、GFP ミオシン II の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、過去に我々が観察した先行研究同様、ミオシン II は細胞後端だけではなく、仮足先端にも集積し、GFP の蛍光が先端で増大した後その仮足は収縮した。すなわち、仮足先端にミオシン II が集積しその仮足を退縮させながら細胞性粘菌アメーバは cAMP の濃度勾配に従って、トンネルチャンバ内を一方向に進行した。
- (2) 野生型の細胞性粘菌アメーバ、あるいはミオシン II を欠損した細胞性粘菌アメーバに GFP ミオシン II を発現させたものを硬さの異なる基質上に這わせ、アメーバ運動の様子（仮足の伸長退縮の時間変化など）、ミオシン II の動態を計測した。ヤング率 0.1 kPa の柔らかい基質上では、細胞は糸状突起様の細かい突起をほとんど出さなかった（図 2A）。一方、ヤング率 1 kPa の硬い基質上で、細胞は糸状突起様の細かい突起を多く出した（図 2B）。細胞をスケルトナイズさせその分岐数を計測すると、硬い基質上の細胞のほうが有意に多かった（図 2C）。また、それぞれの仮足の振る舞いを詳しく解析すると、最大の仮足の長さは硬い基質上の細胞のほうが短かった（図 2D）。ところが、集積したミオシン II の最大蛍光強度は硬い基質上の細胞のほうが強かった（図 2E）。

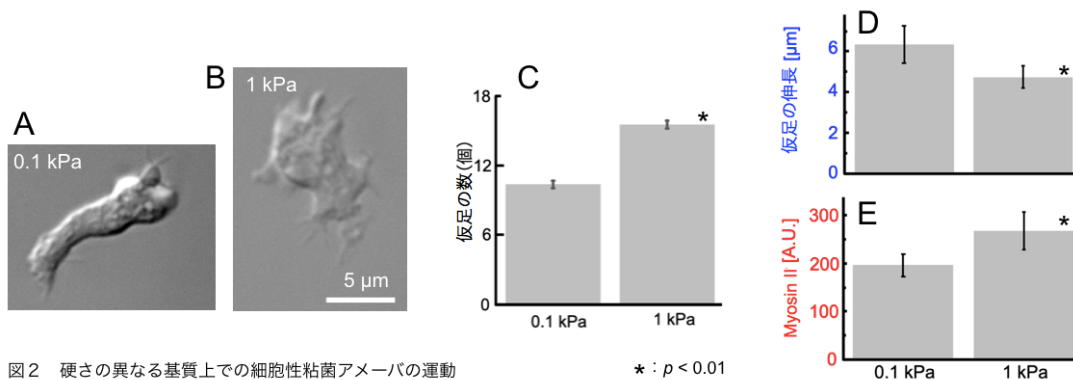
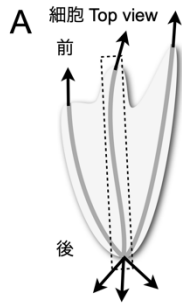


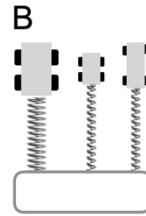
図2 硬さの異なる基質上での細胞性粘菌アメーバの運動

* : $p < 0.01$

- (3) (2) で見られたヤング率 0.1 kPa の柔らかい基質上と、ヤング率 1 kPa の硬い基質上での細胞の振る舞いの違いは、ミオシン II を欠損した細胞性粘菌アメーバでは検出されなかった。以上の結果は、運動するアメーバ細胞は、基質の硬さを情報として移動方向を決めることを示唆し、また、ミオシン II の集積が細胞の伸展に依存することを示唆している³⁴。
- (4) 我々が考案する仮説（図 3A）に基づいて運動するアメーバを模した機械モデル（図 3B）を試作し、仮説にしたがう運動をおこなうか検討した。モーターで自走する動力部材を細胞内で伸長退縮する加速に見立てて製作した。製作した試作機は、それぞれの仮足の伸長のタイミングに合わせて、後端の退縮を誘発する動作を示した。これは、仮説を証明するための機械モデルのプロトタイプとして、今後機械モデルとしての精度を高められると期待している。



前端的複数（図では3つ）の仮足でアクチンが重合し張力（矢印）が生じる。それぞれの仮足は後端と力学的に接続されており、後端の張力は前端それぞれの張力の合力となる。張力の大きさに従ってミオシンIIが集積し退縮がおきる。



Aを模した機械モデルのプロトタイプを作成した。それぞれの仮足を、モーターで自走する動力部材で作成し、ばね定数の異なるバネで負荷と接続した。

図3 機械モデルの作成

<参考文献>

1. Uyeda, Q.P.T., Iwadate, Y., Umeki, N., Nagasaki, A. and Yumura, S. (2011). Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain. *PLoS ONE* 6: e26200.
2. Iwadate, Y., Okimura, C., Sato, K., Nakashima, Y., Tsujioka, M. and Minami, K. (2013). Myosin-II-mediated directional migration of *Dictyostelium* cells in response to cyclic stretching of substratum. *Biophysical Journal* 104: 748-758.
3. Okimura C. and Iwadate Y. (2017). Directional cell migration in response to repeated substratum stretching. *Journal of the Physical Society of Japan* 86: 101002.
4. Okimura, C., Sakumura, Y., Shimabukuro, K. and Iwadate, Y. (2018). Sensing of substratum rigidity and directional migration by fast-crawling cells. *Physical Review E* 97: 052401.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsujioka, M., Uyeda, T.Q.P., Iwate, Y., Patel, H., Shibata, K., Yumoto, T. and Yonemura, S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Actin-binding domains mediate the distinct distribution of two Dictyostelium Talins through different affinities to specific subsets of actin filaments during directed cell migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0214736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0214736	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 Okimura, C., Taniguchi, A., Nonaka, S. and Iwate, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Rotation of stress fibers as a single wheel in migrating fish keratocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28875-z	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 沖村千夏, 谷口篤史, 野中茂紀, 岩橋好昭	4. 巻 59(2)
2. 論文標題 車輪細胞見つけた!	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 094-096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.094	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 Okimura, C., Sakumura, Y., Shimabukuro, K. and Iwate, Y.	4. 巻 97
2. 論文標題 Sensing of substratum rigidity and directional migration by fast-crawling cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Review E	6. 最初と最後の頁 52401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevE.97.052401	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 Okimura C. and Iwdate Y.	4. 巻 86
2. 論文標題 Directional cell migration in response to repeated substratum stretching	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the Physical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 101002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7566/JPSJ.86.101002	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 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Iwdate Y.
2. 発表標題 Rigidity sensing for directional migration in fast crawling cell
3. 学会等名 Active Matter Workshop 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖村千夏、岩楯好昭
2. 発表標題 魚類表皮ケラトサイトのストレスファイバの回転に伴う核と細胞膜の運動
3. 学会等名 生体運動合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩楯好昭
2. 発表標題 エレボマシン雷神 (ハンディエレクトロポレーター)
3. 学会等名 イノベーションジャパン2019 -大学見本市-
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okimura C. and Iwadate Y.
2. 発表標題 Movement of inner nucleus and outer cell membrane of a rotating stress fiber-wheel in a migrating keratocyte
3. 学会等名 第57回生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖村千夏、作村諭一、島袋勝弥、岩楯好昭
2. 発表標題 速いアメーバ細胞の Rigidity Sensing
3. 学会等名 生体運動合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾 元、沖村千夏、堀 学、岩楯好昭
2. 発表標題 ゾウリムシ表層シート繊毛の頭から広がるメタクロナルウェーブ
3. 学会等名 生体運動合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ジャニサ、吉村翠、江本光、沖村千夏、岩楯好昭、島袋勝弥
2. 発表標題 アメーバ運動する線虫精子の牽引力測定
3. 学会等名 生体運動合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖村千夏、作村諭一、島袋勝弥、岩楯好昭
2. 発表標題 細胞性粘菌や好中球の基質の硬さ感知
3. 学会等名 生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋仁珠、沖村千夏、岩楯好昭
2. 発表標題 魚類ケラトサイトの遊走メカニズムに微小管は必要ない
3. 学会等名 生物物理学会第56回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖村千夏、谷口篤史、野中茂紀、岩楯好昭
2. 発表標題 魚類表皮の遊走細胞ケラトサイトの車輪
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会シンポジウム「先端イメージングが解き明かす新しい細胞像」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 沖村千夏、谷口篤史、野中茂紀、岩楯好昭
2. 発表標題 A wheel for migration in fish keratocyte
3. 学会等名 生物物理学会第55回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日俣直彦、沖村千夏、堀学、岩楯好昭
2. 発表標題 Sources of metachronal wave in Paramecium cilia
3. 学会等名 生物物理学会第55回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 沖村 千夏、 谷口 篤史、 野中 茂紀、 岩楯 好昭
2. 発表標題 魚類ケラトサイトのストレスファイバの車輪
3. 学会等名 生体運動合同班会議
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 エレクトロポレーション用電極付きキュベット	発明者 山本朋彦、岩楯好昭、沖村千夏、継山晴進、二階堂正隆、	権利者 株式会社ヤマガタプラスチック、山口大学
産業財産権の種類、番号 意匠、意願2020-16484	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関