

令和 3 年 4 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2017～2020

課題番号：17KT0110

研究課題名（和文）セミ人工細胞開発による遊走細胞の前後極性創成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of anterior-posterior polarity creation mechanism of migrating cells using artificial cell manipulation

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ケラトサイトは紡錘型の細胞体の前方に三日月型の広大な葉状仮足を持った形状を維持したまま移動運動する。細胞の中でアクチンミオシンの束であるストレスファイバが細胞の移動方向とは必ず垂直に配置している。本研究では細胞外の基質の硬さなど機械的な刺激を細胞が感知してアクチンミオシンの機能で細胞の前後極性が決めるメカニズムを検討した。ケラトサイトのストレスファイバを人為的に破壊すると、細胞の前後極性が不安定になった。また、ケラトサイトとは全く異なるオオアメーバを弾性基質上に接着させ弾性基質を繰り返し伸展させ外部から機械的な刺激を与えると、オオアメーバは仮足を退縮させ、伸展と垂直な方向に前後極性を形成させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オオアメーバが繰り返し基質伸展に反応して前後極性を形成したことから、外部からの機械的刺激に反応して前後極性を形成させるメカニズムは、ケラトサイトにとどまらない普遍的な前後極性形成メカニズムであることがわかった。さらに、オオアメーバが外部からの機械的な刺激に対して前後極性を形成させる時に、ストレスファイバ（アクチンミオシン）の自律的形成がどのように起きるか検討している。本研究をさらに発展させれば、化学的な試薬を用いない非侵襲な方法で、細胞の移動方向の制御が可能になる。これはがん転移の制御や、傷跡の残らない傷修復など新しい医療応用に発展する可能性を持つ。

研究成果の概要（英文）：Keratocytes migrate while maintaining their shape with a vast crescent-shaped lamellipodium in front of the spindle-shaped cell body. In a migrating keratocyte, stress fibers, which are bundles of actomyosin, are always arranged perpendicular to the migration direction of the cell. In this study, we investigated the mechanism by which cells sense mechanical stimuli such as the rigidity of substrate and generate the anterior-posterior polarity of cells by the function of actomyosin. Artificial destruction of the stress fibers in keratocytes resulted in unstable anterior-posterior polarity of the cells. In addition, when Amoeba proteus cells, which are completely different from keratocytes, are dispersed on an elastic substrate and the elastic substrate is repeatedly stretched in order to give a mechanical stimulus from the substrate, the cells retract the pseudopodia and has anterior-posterior polarity in the direction perpendicular to the stretch.

研究分野：生物物理学

キーワード：アメーバ運動 細胞運動 ミオシン アクチン

1. 研究開始当初の背景

細胞遊走は多様な生命現象に関わる普遍的な機能である。多くの細胞は基質に接着すれば、誘引物質等が無くても前後極性を自律的に形成し遊走できる。走化性遊走等では“極性”は細胞外に誘引物質の濃度勾配等としてはじめから存在するので、細胞内のシグナル伝達経路の分子実体の同定がメカニズムの解明になる。一方、細胞外に極性が存在しない場合、細胞の中で極性が自律的に生み出される仕組みを知ることからメカニズムの解明が始まる。魚類上皮細胞ケラトサイトは半月形の形態で、弧を前とし後部にストレスファイバを配置した前後極性を維持し遊走する¹。ストレスファイバはアクトミオシン(アクチンとミオシン II からなる繊維)が太く長く成熟した構造体で、両端で基質に接着し基質を牽引すると同時に自身に張力を発生させている。我々はこれまでにストレスファイバを切断すると前後極性が崩壊すること²、また、ミオシン II が張力の増大したアクトミオシンに集積することを発見した³。

2. 研究の目的

張力によって集積したミオシン II はアクチンフィラメント同士を架橋しアクトミオシンを増大させると考えられる。我々は、遊走細胞の自律的な前後極性形成メカニズムとして、細胞内の任意のアクトミオシンで、ミオシン II 結合によるアクトミオシン増大と張力増大の正のフィードバックが生じ、ストレスファイバが形成される。ストレスファイバ付近はその収縮力で仮足伸長が妨げられ細胞後端になるという「ストレスファイバの自律的形成による前後極性創成仮説」を提案しこれを証明する。

3. 研究の方法

- (1) オオアメーバ (*Amoeba proteus*) を弾性基質上に這わせ、弾性基質を一定方向に繰り返し伸展させたときオオアメーバの移動方向がどのように制御されるかを観察する。
- (2) オオアメーバが接着遊走している弾性基質で、オオアメーバが仮足を伸長している付近を局所的に微小針で伸展させる。このときの仮足の振る舞い、細胞内分子動態を観察する。
- (3) 魚類表皮ケラトサイトのストレスファイバは blebbistatin によって消失することが知られている。細胞形状決定におけるストレスファイバの役割を検討するため、魚類表皮ケラトサイトに blebbistatin を作用させストレスファイバを消失させた時のケラトサイトの形状の変化を詳細に記録する。

4. 研究成果

(1) 2液混合硬化シリコーンを用いて弾性基質を作成した。弾性基質上に多数のオオアメーバを接着させ、基質を一方向に繰り返し伸展させた。伸展率を15%、伸展周期を5秒として繰り返し伸展刺激を与えたとき、オオアメーバは伸展方向とは垂直な方向に移動運動を示すように見えた(図1A)。ある時刻とその30分後それぞれのアメーバの位置を記録し、両者を直線で結んだ線分角度を、伸展方向を0-180°として計測し、角度のヒストグラムを作成すると、移動方向(θ)は90°と270°にピークを持つヒストグラムが得られた(図1B)。さらに、 $\sin\theta$ の絶対値を計算するとその値は有意に0.64より大きな値となった(図1C)。各方向に同じ頻度で移動するとその値は0.64になる。全てのアメーバが伸展と垂直、すなわち90°もしくは270°に移動するとその値は1になる。

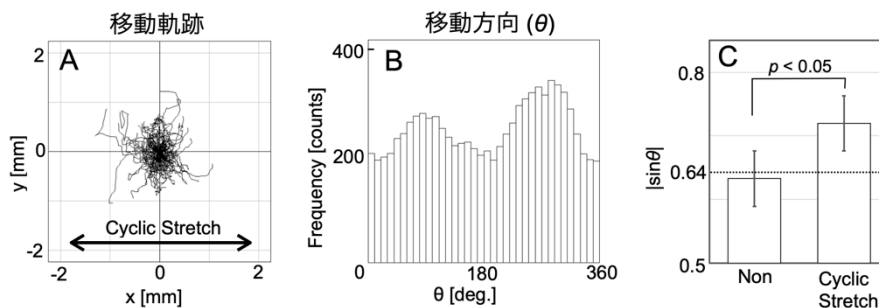


図1 繰り返し基質伸展刺激下のオオアメーバの運動。A) 伸展率15%、周期 5 s で 30 分間刺激を加えたときのオオアメーバの移動軌跡。B) A のデータから作成した移動方向 (θ) のヒストグラム。刺激方向を 0° - 180° とする。C) 伸展刺激なし (左) と刺激あり (右) の $|\sin\theta|$ 。方向性がないとき $|\sin\theta| = 0.64$ 。

(2) オオアメーバ 1 細胞を弾性基質に接着遊走させ、そのオオアメーバが伸長させている仮足付近の基質を、マイクロマニピュレータに接続した微小針で局所的に伸長させ、このときの仮足の振る舞いを観察した。すると、それまで伸長していた仮足は、基質の伸長に反応して、退縮し始めた (図 2 A)。刺激を与えない場合、仮足は当然伸長し続ける (図 2 B 右) が、伸展刺激を与えると、すぐに伸展を止めることが分かった (図 2 B 左)。

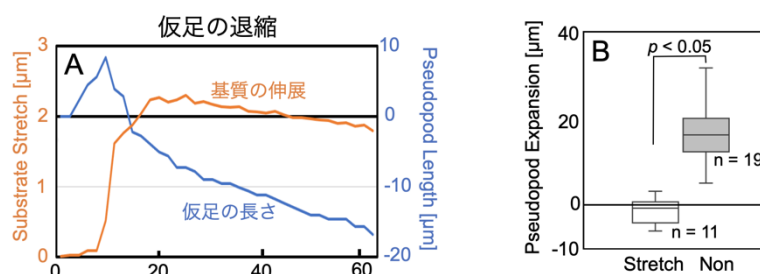


図2 オオアメーバの仮足 1 本への伸展刺激。A) オオアメーバの仮足 1 本の下での基質の人為的な伸展 (左縦軸) と仮足の長さ (右縦軸)。B) 伸展刺激あり (左) と刺激なし (右) の仮足伸長。刺激がないとき仮足は伸長し続けるが、刺激によって退縮する。

(3) 魚類表皮ケラトサイトのストレスファイバは blebbistatin によって消失する。細胞形状決定におけるストレスファイバの役割を検討するため、魚類表皮ケラトサイトに blebbistatin を作用させストレスファイバを消失させた時のケラトサイトの形状の変化を検討した。ケラトサイトは紡錘型の細胞体の前方に三日月型の広大な葉状仮足を持った形状を維持したまま移動運動する。そこで、ケラトサイトの形状を評価する時に三日月の弧に相当する先端部の形状を扇形の弧とみなし、その中心角と半径で定量的に評価した。培養 2 日目のケラトサイトに blebbistatin を作用させ、約 30 分後に、いびつな形のケラトサイトは除外し、左右の対称性を保っているケラトサイト全てにおいて、先端部の中心角と半径を計測し、blebbistatin 処理をしていない場合のケラトサイトの先端部の中心角と半径と比較した。すると中心角が増大する一方、半径は変化しないことが分かった。

<参考文献>

- 1 Nakata et al. (2016) The role of stress fibers in the shape determination mechanism of fish keratocytes. *Biophysical Journal* 110: 481-492.
- 2 Okimura et al. (2018) Rotation of stress fibers as a single wheel in migrating fish keratocytes. *Scientific Reports* 8: 10615.
- 3 Uyeda et al. (2011) Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain. *PLoS ONE* 6: e26200.

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 5件）

1. 著者名 Tsujioka, M., Uyeda, T.Q.P., Iwadate, 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 Iwadate, 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 Iwadate, 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 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、作村諭一、鳥袋勝弥、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 ジャニサ、吉村翠、江本光、沖村千夏、岩楯好昭、鳥袋勝弥
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 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 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 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 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

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 5 5 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 5 5 回年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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