

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14746

研究課題名(和文)細胞膜張力がアクチンのパターン制御を通して管状組織の機械的強度を調節する

研究課題名(英文)Tubular tissue mechanics modulated by patterned actin cytoskeleton

研究代表者

内田 清薫(関根清薫)(Sekine, Sayaka)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00794398

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): 生体の管構造を支持する細胞内骨格として、リング状のアクチン繊維が等間隔に並ぶ現象が複数の組織・生物種で報告されている。本研究はその形成機構を明らかにするため、ショウジョウバエ气管細胞の内腔面に現れる等間隔アクチンリングに着目し、遺伝学的解析、超解像顕微鏡技術による詳細な観察、そして粗視化分子動力学モデルによるシミュレーションを行った。その結果、数十nmのアクチン微小体集合体が管の周方向に優位に動き、徐々に融合することでリング状になっていることを見出した。微小集合体に必要な分子を同定し、それに基づいたシミュレーションを行ったところ、精度の高い等間隔アクチンパターンを再現することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管や消化管など生体内で広く見られる管構造は、物質を効率的に運ぶのに有利だが、一方で拡張やねじれに耐える柔軟かつ強靱な細胞骨格が必要とされる。本研究は、その一つとして等間隔アクチンリングという骨格パターンが採用されていると考え、その形成機構を明らかにした。この成果により、管構造不全の治療への応用、そして人工管組織構築の改善が期待される。

また、生体内でのアクチンパターンの形成過程をここまで詳細に解析した例は少なく、これまで培養細胞での観察に留まっていた微小集合体を生体内で再発見するとともに、その挙動が組織形成に強く関わるといった生物学的意義を見出したということで学術的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文): Here we show the periodic circumferential actin cables were originated from the actomyosin nanoclusters at apical cortex of the tracheal epithelial cells. During expansion of the tracheal tube, the nanoclusters showed dynamic circumferential motility and biased-fusion that led to the directional cable formation. The clustering of actin filaments were dependent on crosslinkers, whereas sensing of the tubular axis were strongly dependent on the formin family protein. Based on our computational simulations with feasible parameters, the regularly-spaced clusters were self-organized by the interplay of actin filaments and crosslinkers, which also ruled the size and distance between the clusters. Altogether, we propose the self-organized actin nanoclusters as functional units which are sensitive for tubular axis, thus enables the periodic circumferential patterning in the tubular development.

研究分野：発生分子生物学

キーワード：アクチン 管構造 超解像顕微鏡 ショウジョウバエ 粗視化分子動力学モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

管構造は生体内のさまざまな組織に見られ、遠位の細胞へ物質を輸送するのに効率的な形態である。管構造が機能するためには内腔からの圧力や、曲がりにも耐える強度を与えつつ、生体の成長に合わせて径や長さを最適化させる動的な支持システムが必要とされる。近年、リング状のアクチン繊維が等間隔に配列する現象（等間隔アクチンリング）が、複数の組織で見出された（Matussek et al., 2006, Xu et al., 2013）。この現象は、アクチン重合の性質を巧みに利用した機構があることを示唆する。本研究は、等間隔アクチンリング形成・調節の分子機構を解明し、生物が管の機械的強度を調節するために採用した基本戦略は何か、という問いに挑む。

ショウジョウバエ気管では、胚後期に内腔への分泌が上昇し、内腔からの圧力が増大することで内径が拡張するとされており、この時にアクチンリングが初めて形成される（図）。間隔は気管の内径に関わらず約 500nm だが（Hannezo et al., 2015）その調節機構は不明である。

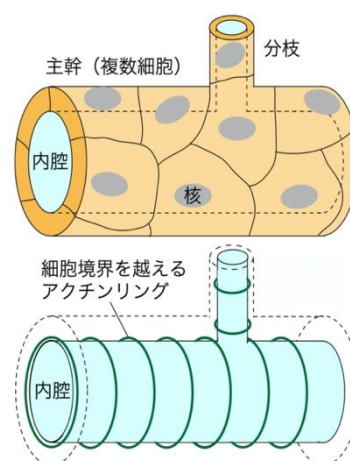
### 2. 研究の目的

本研究は、管構造において細胞膜に特定のアクチン結合分子をリクルートすることで、等間隔アクチンリングのパターン形成・調節を行い、管構造の機械的強度を上げるという仮説を検証するため、以下を明らかにすることを目的とする。

#### 等間隔アクチンリング形成過程に見られるアクチンパターン

#### 等間隔アクチンリング形成・調節に必要なアクチン結合分子の同定 粗視化分子動力学モデルによるシミュレーション（共同研究）

本研究はショウジョウバエの遺伝学を生かし、生体管構造におけるアクチン動態を徹底的に理解しようというものである。最先端のイメージング技術を用いて、これまで困難だったアクチンの自己組織化パターンを生体内で観察するうえで、定性・定量的な解析の枠組みを作ることも重要である。



### 3. 研究の方法

#### 等間隔アクチンリング形成過程に見られるアクチンパターン

ショウジョウバエ胚後期における、気管内腔面のアクチンリングの形成過程を詳細に観察する。アクチン自己組織化パターンを捉えるには、高解像度での観察が望ましい。そこで、超解像顕微鏡技術の一つである、Zeiss 社の Airyscan を利用した共焦点顕微鏡でのライブ画像観察を行う。得られた画像の定性・定量的な解析を行うことにより、等間隔アクチンリング形成過程をステップに分けると共に、自己組織化パターンとの類似性を検討する。

#### 等間隔アクチンリング形成・調節に必要なアクチン結合分子の同定

等間隔アクチンリング形成・調節に必要なアクチン結合分子を探索するため網羅的スクリーニングを行う。アクチン結合分子をコードする遺伝子について、RNAi 系統をライブラリーから取り寄せ、気管細胞でのみ発現させた場合の表現型（アクチンリングの方向異常、ケーブルの長さ、個体の致死性について）を調べる。異常の認められた各アクチン結合分子の局在を確認する。

#### 粗視化分子動力学モデルによるシミュレーション（共同研究）

上記で得られたアクチン結合分子の性質に基づき、粗視化分子動力学モデルによりシミュレーションを行う。アクチン繊維、アクチン結合分子のそれぞれの量や長さを変えた時の、パターン変化をシミュレートするとともに、実験結果と検証することで、リングパターン形成とその間隔の調節に必要な要素を明らかにする。

#### 4. 研究成果

ショウジョウバエ胚後期の気管上皮細胞内腔面において、周方向へ等間隔に現れるアクチンリングの形成過程を超解像イメージングにより観察した。その結果、等間隔アクチンリングは、数十ナノメートル径のアクチン微小集合体（ナノクラスター）を前駆体としていることが明らかとなった。アクチンナノクラスターは、それぞれ周方向へ優位に微小運動をしており、さらにお互いが周方向へ融合することでケーブル状に長く連なり、最終的にリングになることを見出した。また、ショウジョウバエの全てのアクチン結合分子を対象とした遺伝学的スクリーニングにより、ナノクラスターの構成に必須のアクチン結合分子も複数同定した。

これらのアクチン結合分子の発現を抑制した際に、ナノクラスターの挙動へ与える影響を定量的に解析した。PIV解析をした後にフーリエ展開を行うことで、個々のナノクラスターの異方性を明らかにするとともに、微小運動に周期性が無いかを検証した。その結果、各ナノクラスターは周方向へ優位に微小運動をする一方で、周期性は見出されなかった。これは、個々のクラスターが管状組織の軸方向を感知して、それぞれが自律的に運動していることを示唆している。

アクチン重合開始因子の一つであるForminタンパク質を欠損させると、ナノクラスターは異方性を失ったため、軸情報の感知にはDAAMが必要であることが明らかとなった。また、各種のクロスリンカーの発現を抑制してクラスターサイズが小さくなったところ、やはり異方性を失った。以上により、このナノクラスターは特定の分子が集積する集合体として一定のサイズまで成熟することで、等間隔アクチンリングパターンを形成する機能的なユニットとなることが明らかとなった。

ナノクラスターから等間隔ケーブル形成までの一連の過程は、共同研究者の理研BDRの柴田達夫博士、多羅間充輔博士の開発した粗視化分子動力学モデルに基づいたシミュレーションにより再現され、アクチン・ミオシンII・アクチン結合分子がナノクラスターおよびストライプを自己組織化することが示された。以上の成果を各種学会で発表し、論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Toshiya Ando, Sayaka Sekine, Sachi Inagaki, Kazuyo Misaki, Laurent Badel, Hiroyuki Moriya, Mustafa M. Sami, Yuki Itakura, Takahiro Chihara, Hokto Kazama, Shigenobu Yonemura, Shigeo Hayashi	4. 巻 29
2. 論文標題 Nanopore Formation in the Cuticle of an Insect Olfactory Sensillum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1512-1520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.03.043	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sayaka Sekine, Housei Wada, Mustafa Sami, Shigeo Hayashi
2. 発表標題 The rapid biased-disconnection of discrete actomyosin clusters form circumferential actin cable in the tubular tissue
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sayaka Sekine
2. 発表標題 Super-resolution live imaging of supercellular circumferential actin cable formation during tracheal tubulogenesis
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sayaka Sekine, Mustafa M. Sami, Housei Wada and Shigeo Hayashi
2. 発表標題 Emergence of circumferential actin cables from clustered cross linked actin filaments during tubulogenesis
3. 学会等名 Annual meeting of Japanese society of developmental biology 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sayaka Sekine, Mustafa M. Sami and Shigeo Hayashi
2. 発表標題 Emergence of circumferential actin cables from clustered cross linked actin filaments during tubulogenesis
3. 学会等名 14th Japan Drosophila Research Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsusuke Tarama, Sayaka Sekine, Tatsuo Shibata, Shigeo Hayashi
2. 発表標題 Microphase separation of actomyosin during tracheal development in Drosophila embryo
3. 学会等名 物理学会第77回年次大会
4. 発表年 2022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