

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700448

研究課題名(和文)アクチンダイナミクスに基づく非筋細胞運動の突出形成メカニズム解明

研究課題名(英文)Mechanism of protrusion during cell migration based on actin dynamics

研究代表者

菅原 路子 (Sugawara, Michiko)

千葉大学・工学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：30323041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：アクチンダイナミクスの動的再構築に関する数値解析と、細胞運動における突出端形成の定量的計測を融合させることにより、細胞運動における突出形成メカニズム解明を目指した。数値解析の結果、細胞内の多彩なアクチン構造形成には、アクチン濃度、および重合核形成に関する反応速度が関与することが示唆された。また、光応答性細胞培養基板を用い細胞を非対称に形状制御し、引き続き細胞運動を誘起した結果、細胞運動の開始には形状極性が重要であり、かつ核-中心体ベクトルがそれに影響を及ぼすことがわかった。また、細胞内の焦点接着斑とストレスファイバの時空間形成ダイナミクスが、運動の方向性を決定する一つの要因であることが示された。

研究成果の概要(英文)：An attempt was made to clarify the mechanism of the formation of protrusion, which is the origin of the cell migration, by combining the numerical analysis of actin dynamics with quantitative measurement of the protrusion formation during migration. As a result of the numerical analysis, various intracellular actin structures could be achieved by the variations on concentration of actin protein and rate constant of nucleation. The experiment on the initiation of cell migration using photoactivatable substrate, in which cells were confined into geometrical polarity and thereby cell migration was induced, revealed that the asymmetric geometry of the cell was a key factor for inducing the cell migration, and that nuclear-centrosomal axis also affect it. In addition, it was suggested that intracellular spatio-temporal dynamics of the formation of focal adhesion together with actin stress fibers play an important role in directionality of cell migration.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生体医工学

キーワード：細胞運動 アクチンダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

非筋細胞の細胞運動は、例えば創傷治癒過程における線維芽細胞の移動、神経細胞の軸索伸展、さらにはガン細胞の浸潤から転移の過程など、生体内の様々な場面で見られる普遍的現象である。このような細胞では、細胞膜近傍のナノスケール現象に着目すると、アクチンフィラメントを主とする細胞骨格の動的再構築が生じており、それが細胞運動の駆動源と考えられる。一方細胞をマクロに捉えたと、細胞膜近傍における細胞骨格の再構築に加え、接着斑形成、さらには核を含む細胞内の流動が相互に作用することにより、細胞全体が運動すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞運動の第一段階かつ駆動源と考えられる突出の形成メカニズムを明らかにする。具体的には、動的細胞形状制御基板を用い、細胞の初期形状および伸張形状を単純なものに制御したうえで細胞が運動する場合、および細胞が実際に複雑な形状変化を伴い運動する場合の双方において、細胞運動に伴う突出形成に関する定量計測を行う。また、突出に関わるアクチンネットワーク形成モデルを構築し、実験において計測困難であるナノスケール現象を予測する。そして、数値解析結果と実験結果の比較に基づき、細胞運動の突出形成メカニズムを明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

(1) 動的細胞形状制御基板を用いた細胞の突出形成メカニズムの解明

実験には、上皮ガン細胞の一種である HeLa 細胞、および細胞遊走研究に多く用いられる NIH3T3 細胞を用いた。(独)物質・材料研究機構 中西淳独立研究者にご協力いただき、光応答性細胞培養基板を用いて細胞運動実験を実施した。光応答性細胞培養基板を用いると、フォトマスクを介した UV 光の照射により、細胞非接着性の基質上に、任意形状の細胞接着性パターンを形成することが可能となる。本実験では、UV 光の一次照射により、三角形の細胞接着部位を形成し、そこに細胞を播種することにより、細胞の初期形状を三角形に拘束した。また、その後細胞運動を誘起する際は、UV 光の二次照射により、細胞接着部位を拡張した。

パターンニングに伴う細胞形状の制約、および細胞運動の誘起の過程で、細胞の核 中心体ベクトルに着目した。実験では、固定細胞に対し、中心体に対する免疫染色と核に対するヘキスト染色を組み合わせ、各構造の可視化を行った。また生細胞に対するタイムラプス観察では、蛍光ペクタを一過性に発現させ、中心体および核のダイナミクスを観察した。

(2) 複雑な形状変化に伴い運動する細胞の突出形成メカニズム解明

実験には、マウス由来の線維芽細胞様細胞である Swiss 3T3 細胞を用いた。細胞運動に伴う細胞内骨格タンパク質アクチンと焦点接着を観察するため、蛍光アクチンおよび蛍光ジキシン(ジキシンタンパク質は焦点接着斑に集積するタンパク質の一つ)を一過性に発現させ、それらのダイナミクスを共焦点顕微鏡を用いて観察した。

得られた観察結果に対し、画像処理により、焦点接着斑の大きさ、形成から消失までの時間、および移動距離を求めた。そして、これらのパラメータに基づき、細胞内で形成される焦点接着斑の特性をクラスタリングした。また、ストレスファイバについては、アクチン骨格構造の観察結果に基づき、定性的にその形状の時系列変化を評価した。

(3) アクチンネットワーク形成モデルに基づく細胞の突出形成に関する考察

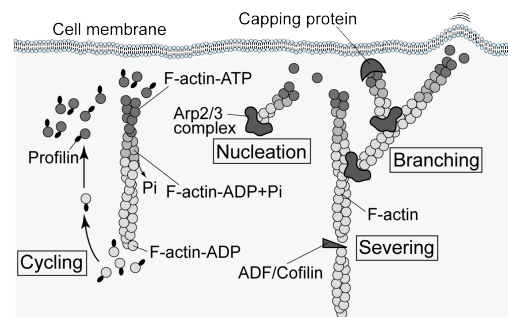
細胞内のアクチンネットワーク形成をふまえ、アクチンフィラメント形成、アクチンフィラメントへの重合阻害、およびアクチンフィラメントの切断を考慮に入れたモデルをこれまでに構築してきた。本研究では引き続き、連立反応速度方程式の解法の一つである Gillespie 法を用い、アクチンフィラメントの分岐形成、すなわち Arp2/3 複合体の機能を考慮したモデルへとモデルの拡張を行った(下図)。具体的には、親アクチンフィラメントへの Arp2/3 複合体の結合、Arp2/3 複合体の活性化、Arp2/3 から娘アクチンフィラメントの伸張、の3ステップに分けて分岐形成を考慮した。

また、細胞内におけるアクチンネットワークは、密な分岐構造を有する葉状仮足から束化した長いストレスファイバまで、その構造が多彩であることをふまえ、アクチンタンパク質濃度および重合核形成における反応速度定数を変化させ、反応場に形成されるアクチンネットワークの違いを検討した。

4. 研究成果

(1) 動的細胞形状制御基板を用いた細胞の突出形成メカニズムの解明

細胞が運動を開始する際の形状極性(形状の非対称性)と核 中心体ベクトルの向きに



アクチンネットワーク構造

着目し、どちらが細胞運動の開始に対する主因となるかを検討した。はじめに、光応答性培養基板を用い、HeLa 細胞の形状を三角形に制約し、形状極性を有する条件下での核中心体ベクトルを調べた。その結果、HeLa 細胞の場合は、三角形の頂点側にベクトルが向くことがわかった。NIH3T3 細胞では、三角形の底辺側にベクトルが向く結果であったことから、細胞を三角形に拘束した場合、細胞種によって核中心体ベクトルの向きが異なることが示された。次に、HeLa 細胞を一次パターンニングによって三角形に拘束した後、二次パターンニングによって三角形の底辺側、ないしは頂点側に拘束をなくし、細胞接着領域を拡張した。その結果、頂点側への拡張では細胞運動が誘起されなかった一方、底辺側への拡張では誘起された。このことから、細胞の形状極性は細胞運動の開始に対する主因と考えられた。ただし、細胞運動が誘起された底辺側への拡張に着目すると、拡張前の核中心体ベクトルの向きの違いにより、細胞の運動性にも違いが見られた。従って、形状極性だけではなく、核中心体ベクトルの向きもまた、細胞運動に影響を及ぼすことが明らかとなった。

(2) 複雑な形状変化に伴い運動する細胞の突出形成メカニズム解明

Swiss 3T3 細胞は、葉状仮足を形成し突出するとともに、束化されたアクチンストレスファイバの形成・分解を繰り返しながら、ゆっくりとした遊走能を有する細胞の一つである。この細胞において、蛍光アクチンおよび蛍光ジキシンを発現させ、細胞骨格アクチンおよび焦点接着斑のダイナミクスをタイムラプス観察し、細胞が遊走に伴い方向転換する現象に着目してそのメカニズム解明を試みた。その結果、細胞の突出部では、焦点接着斑の形成と消失の繰り返しが、細胞後方では、アクチンストレスファイバの収縮と焦点接着斑の剥離に伴う細胞体の退縮が見られた。一方、細胞の突出部と後方の間に位置する中間部では、形成された焦点接着斑が成長するとともに、アクチンストレスファイバもまた成長する様子が見られた。このような構造の形成が、細胞が方向転換するメカニズムにつながることを示唆された。

(3) アクチンネットワーク形成モデルに基づく細胞の突出形成に関する考察

これまで研究代表者が構築したアクチンネットワーク形成モデルを拡張し、アクチンタンパク質の濃度および重合核形成の頻度を変化させ、反応場に形成されるアクチンネットワーク構造の違いを調べた。その結果、アクチンタンパク質濃度が低いほど、疎なアクチンネットワークが形成され、また重合核形成の頻度が低いほど、アクチンネットワークを構成するフィラメント長が短い結果となった。従って、葉状仮足のよう短いフィ

ラメントが密にネットワーク形成する場合は、アクチンタンパク質濃度が高く重合核形成頻度も高いことが予想され、一方ストレスファイバが中心の場の形成には、重合核形成頻度が低いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

三浦拓也, 菅原路子, 坪田健一, 劉浩, 細胞遊走の突出過程におけるアクチンダイナミクス解析, 電気学会論文誌 C, 査読有, 134 巻, 2014, 172-182
DOI: 10.1541/ieejelss.134.177

[学会発表](計7件)

[Selected Oral Presentation] Michiko Sugawara, Takuya Miura, Hiromi Miyoshi, Ken-ichi Tsubota, Hao Liu, Dynamics of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions during Slow Cell Migration in Swiss 3T3 Fibroblasts, The 7th World Congress of Biomechanics, 6 July 2014, Boston, USA
[Invited] Michiko Sugawara, Keisuke Ao, Yoshihisa Shimizu, Kazuo Yamaguchi, Hao Liu, Jun Nakanishi, Dynamics of Nuclear Centrosomal Axis in HeLa Cells during Geometrical Confinement and Its Release, International Symposium on Mechanobiology 2014, 21 May 2014, Okayama, Japan

菅原路子, 数値解析に基づくアクチンネットワーク構造の多様性に関する考察, 第26回バイオエンジニアリング講演会, 2014年1月11日, 仙台

三浦拓也, 菅原路子, 坪田健一, 劉浩, 細胞遊走に伴うストレスファイバおよび焦点接着斑のダイナミクス, 第26回バイオエンジニアリング講演会, 2014年1月11日, 仙台

[Invited] Michiko Sugawara, The application of Shell Model to Biological Membranes, Shell and Membrane Theories in Mechanics and Biology: From Macro- to Nanoscale Structure, 17 September 2013, Belarus, Minsk

菅原路子, Arp2/3 複合体がアクチンネットワーク構造に及ぼす影響に関する数値解析, 第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013年1月9日, つくば

三浦拓也, 菅原路子, 坪田健一, 劉浩, 細胞運動の突出過程におけるアクチンダイナミクス解析, 日本機械が一回 2012 年度年次大会, 2012 年 9 月 10 日

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/msugawara2011/>

6．研究組織

(1)研究代表者

菅原 路子 (SUGAWARA, Michiko)

千葉大学・大学院工学研究科・特任准教授

研究者番号：30323041