

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26650050

研究課題名(和文)細胞を遊走させる回転するストレスファイバ

研究課題名(英文)Rotation of stress fibers in migrating fish keratocytes

研究代表者

岩楯 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アメーバ運動は様々な生物学的現象において不可欠な役割を果たす。魚類表皮の遊走細胞ケラトサイトのストレスファイバは、移動方向に垂直に配列している。このストレスファイバのユニークな配列は、アメーバ運動で独特の役割を果たしているかもしれない。本研究では、まず、ストレスファイバが細胞体内の細胞質を取り囲むように立体的に配置されていることを明らかにした。さらに、移動中のストレスファイバが車輪のように回転することを3次元動画で直接的に示した。ストレスファイバの一部を破壊すると、細胞は左右のバランスの崩壊させた。以上、ストレスファイバの回転がケラトサイトのアメーバ運動で車輪の役割を果たすことを示している。

研究成果の概要(英文)：Crawling migration plays an essential role in a variety of biological phenomena. Keratocytes are wound-healing cells in fish skin. Stress fibers in keratocytes align almost perpendicular to the migration-direction. It seems that in order to efficiently retract the rear, it is better that the stress fibers align parallel to it. The unique alignment of stress fibers in keratocytes may play other roles. Here, we reveal that the stress fibers are stereoscopically arranged so as to surround the cytoplasm in the cell body; we directly show, in sequential three-dimensional recordings, their rolling motion during migration. Ablation of parts of the stress fibers induced the collapse of the left-right balance of crawling migration. The rotation of these stress fibers plays the role of a wheel in crawling migration of keratocytes.

研究分野：生物物理学

キーワード：ケラトサイト 細胞遊走 アメーバ運動 アクチン ストレスファイバー

1. 研究開始当初の背景

アメーバ運動は神経組織の形成から好中球の免疫応答にまで見られる普遍的な細胞機能である。運動中、細胞は前端の伸長と後端の収縮を繰り返す。これまでアメーバ運動（遊走）の原動力は細胞前端の伸長と後端の収縮だとみなされてきた。ところが、魚類表皮細胞ケラトサイト (keratocytes) は繊維芽細胞よりも10倍速く運動するにも関わらず、前端の伸長に伴い基質へ発揮する牽引力は繊維芽細胞の1/10に過ぎない。この事実は前後端の伸長収縮が運動の原動力であるという説と矛盾する。ケラトサイトの細胞質はラグビーボール様の形態で、ボール表面の長軸方向にストレスファイバというアクチンフィラメントが束化した太い繊維構造が並ぶ。研究代表者らは、共焦点顕微鏡を用いて、焦点面の高さを変えながら運動中のケラトサイトを観察したところ、細胞上面のストレスファイバは前方に動き、底面のファイバは動かないことを発見した。ケラトサイトはストレスファイバを用いて新規の遊走メカニズムを駆動しているのかもしれない。

2. 研究の目的

ストレスファイバが回転することを、直接、3次元動画として記録することで実証する。さらに、ストレスファイバの回転がアメーバ運動の原動力であり、アメーバ運動の実体が細胞の“転がり”であることを証明する。

3. 研究の方法

ケラトサイトを固定しアクチン及びミオシンを免疫蛍光染色する。固定した細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察しZ軸方向の詳細な断層像を撮影する。これを3次元再構築することで、ストレスファイバの細胞内の詳細な配置を検討する。

ケラトサイトは継代培養不可能で初代培養の少数の細胞で実験を行う必要がある。また、基質からの剥離や強い光などのダメージに弱い。研究代表者らは、以前、基質に接着したまま剥離のダメージを与えず細胞に分子を導入できる装置（マイクロポレータ）を開発した（岩楯・継山 2012 特願 2012-77178）。熱帯魚 *Terapus*

nicaraguense から単離したケラトサイトに、マイクロポレータを用いて、アクチンフィラメントを特異的に染める蛍光色素 (Alexa-phalloidin) を導入しストレスファイバを可視化させる。このケラトサイトの接着したプレパラートを光シート顕微鏡、あるいは共焦点レーザー下に置きストレスファイバの回転動作を3次元動画として記録する。

遊走中のケラトサイトのストレスファイバの一部に強い赤外レーザーを照射することで破断させる。ストレスファイバの破断によって、細胞の運動がどのような影響を受けるかを観察する。

4. 研究成果

まず、固定したケラトサイトでアクチン及びミオシンを染色し、共焦点レーザー顕微鏡で詳細に観察した。するとストレスファイバが細胞体内の細胞質を取り囲むように立体的に配置されていることがわかった (図1)。

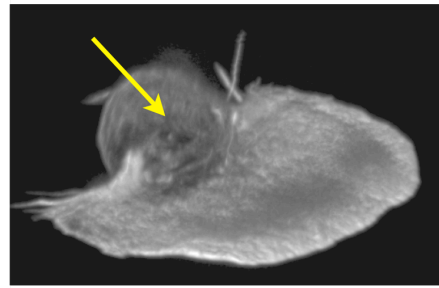


図1 固定した魚類表皮ケラトサイトのアクチンフィラメント蛍光の3次元像。葉状仮足の後ろに細胞体 (矢印) が見える。

さらに、生きたケラトサイト細胞のアクチンフィラメントを染色し、ストレスファイバを可視化させた。これを光シート顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察するとストレスファイバが細胞体内で車輪のように回転しているようすを3次元動画として直接的に示すことができた。得られた3次元動画の細胞体部の縦断面像を取得した (図2)。この断面画像ではストレスファイバが細胞体の表面に輝点として見られた。この輝点の回転速度からストレスファイバの回転速度や回転速度と細胞の遊走速度との関係を解析することができた。

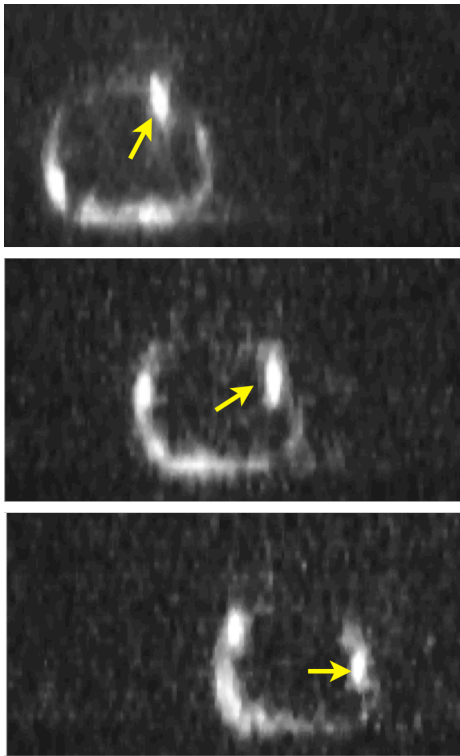


図2 遊走している魚類表皮ケラトサイトの細胞体縦断面のアクチンフィラメント蛍光像。細胞体の表面をストレスファイバ(矢印)が回転している。

続いて、人為的にレーザー光をストレスファイバの一部に照射しストレスファイバを破断させた。すると遊走中の細胞は遊走の左右のバランスの崩壊させ、運動が破綻することがわかった(図3)。運動の破綻後、細胞は新たにストレスファイバを構築し、遊走を再開させた。

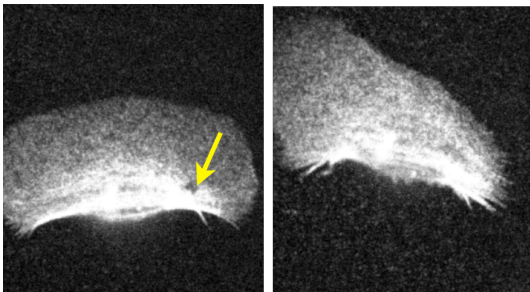


図3 遊走している魚類表皮ケラトサイトのストレスファイバの一部(矢印)を破断させると、細胞はバランスを崩す。

以上の結果は、ケラトサイトの中でストレスファイバが遊走のための車輪の役割をしていることを強く示唆している。

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8件)

- 1 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. doi: 10.1103/PhysRevE.97.052401 査読有
- 2 Okimura C. and Iwadate Y. (2017). Directional cell migration in response to repeated substratum stretching. *Journal of the Physical Society of Japan* 86: 101002. doi: 10.7566/JPSJ.86.101002 査読有
- 3 Nakata, T., Okimura, C., Mizuno, T. and Iwadate, Y. (2016). The role of stress fibers in the shape determination mechanism of fish keratocytes. *Biophysical Journal* 110: 481-492. doi: 10.1016/j.bpj.2015.12.014 査読有
- 4 Sonoda, A., Okimura, C. and Iwadate, Y. (2016). Shape and area of keratocytes are related to the distribution and magnitude of their traction forces. *Cell Structure and Function* 41: 33-43. doi: 10.1247/csf.15008 査読有
- 5 Okimura, C. and Iwadate, Y. (2016). Hybrid mechanosensing system to generate the polarity needed for migration in fish keratocytes. *Cell Adhesion & Migration* 10: 406-418. doi: 10.1080/19336918.2016.1170268 査読有
- 6 Okimura, C., Ueda, K., Sakumura, Y. and Iwadate, Y. (2016). Fast-crawling cell types migrate to avoid the direction of periodic substratum stretching. *Cell Adhesion & Migration* 10: 331-341. doi: 10.1080/19336918.2015.1129482 査読有
- 7 Narematu, N., Quek, R., Chiam, K.-H. and Iwadate, Y. (2015). Ciliary metachronal wave propagation on the compliant surface of

Paramecium cells. Cytoskeleton 72: 633-646.
doi: 10.1002/cm.21266 査読有

- 8 Nakashima, H., Okimura, C. and Iwadate, Y.
(2015). The molecular dynamics of crawling
migration in microtubule-disrupted keratocytes.
Biophysics and Physicobiology 12: 21-29. doi:
10.2142/biophysico.12.0_21 査読有

[学会発表] (計 7件)

1 沖村千夏、谷口篤史、野中茂紀、岩楯好昭
魚類ケラトサイトのストレスファイバの車輪
生体運動合同班会議 2018年1月 法
政大学

2 沖村千夏、谷口篤史、野中茂紀、岩楯好昭
魚類ケラトサイトの遊走のための車輪 生
物物理学会第55回年会 2017年9月 熊本
大学

3 沖村千夏、谷口篤史、野中茂紀、岩楯好昭
魚類表皮の遊走細胞ケラトサイトの車輪
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) 2017年6月 仙台国
際センター

4 沖村千夏、岩楯好昭 Keratocytes have
hybrid mechanosensing system to decide
their migration direction. 生物物理学会第
54回年会 2016年11月 つくば国際会議
場

5 藪田綾音、沖村千夏、岩楯好昭
Relationship between traction forces, and
shape and size of fish keratocytes. 生物
物理学会第54回年会 2016年11月 つく
ば国際会議場

6 岩楯好昭 ケラトサイトの運動とアクチ
ン細胞骨格のダイナミクス 日本物理学会
2016年秋季大会 2016年9月 (招待公演)
金沢大学

7 Iwadate Y. Polarity generation of
crawling cells under cyclic
substratum-stretching. RIMS 共同研究
「ミクロな振る舞いと集団的パターン形成

に係る階層的構造の解明」2016年9月 京
都大学

[その他]

ホームページ:

<http://biophysics.sci.yamaguchi-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩楯 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