

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命動態の理解と制御のための
基盤技術の創出」
研究課題「細胞間接着・骨格の秩序形成メカニズムの
解明と上皮バリア操作技術の開発」

研究終了報告書

※1年追加支援での実施分を赤字で追加※

研究期間 2013年10月～2020年3月

研究代表者：月田 早智子
(大阪大学大学院生命機能研究科、
特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

【背景】 上皮細胞シートにおける個々の細胞は、アドヘレンスジャンクション(AJ)やタイトジャンクション(TJ)などの細胞間接着装置によって強く接着し、敷石状の規則正しい細胞輪郭を有する。この上皮細胞シートは、マクロには胸腔・腹腔など大きな生体コンパートメントの領域を、ミクロには血管や腸管、尿細管などの管腔を覆い、各コンパートメントに応じた様々なバリア機能により生体内外に適切な微小環境を形成する。その際、上皮細胞シートのアピカル膜は、微絨毛や繊毛を形成することで構造的に分化すると同時に、多機能性のチャネルやトランスポーターの集積により機能的にも分化する。本プロジェクトでは、このような上皮細胞アピカル膜の分化に伴いアピカル領域に特殊に発達するアピカル骨格を見だし、それらが TJ を起点として構築されることから、両者を合わせて「アピカル複合体」と定義した。本プロジェクトは、「アピカル複合体」を生体内の構造的・機能的秩序を生み出すシステムとして理解し、秩序が生み出されるメカニズムについて分子・細胞・組織・器官の生体構造階層を網羅して数理生物学的に理解し、操作法を開拓すべく発足した。

【体制】 このプロジェクトは4つの研究グループの協働体制で推進し、まず第一にアピカル複合体による生体内の構造的・機能的秩序形成を統合的に理解することを目指した。分子・細胞・組織・器官での *in vivo* 機能解析を主に担当するグループ(月田 G)を中心に、その基盤としての AJ の機能を解析するグループ(米村 G)、分子レベルでの *in vitro* 機能再構築による秩序形成のエッセンスを抽出するグループ(大岩 G)と、これらの実験データを数理モデルの視点で解析するグループ(石原 G)が有機的に協働することで統合的な理解を目指してきた。分子・細胞・組織・器官レベルという階層横断的な実験とそれぞれの秩序形成機構に迫る数理モデル化を行ない、これらの研究を統合して、アピカル複合体による構造的・機能的秩序の創出原理の理解とその操作技術の開拓に務めた。

【研究成果】 気管上皮多繊毛細胞のアピカル骨格の秩序形成について自己組織化の観点から、実験と理論の両面で、そのメカニズムを世界で初めて明らかにした。まず第一に、気管上皮多繊毛細胞のアピカル骨格にリンクして整列する繊毛基底小体のライブイメージング法を新規に確立した。この観察法を基礎技術として、基底小体配列とアピカル骨格の秩序化を定量的に解析する手法を開発した(月田 G)。その結果、アピカル骨格系の重合・脱重合と収縮力を考慮した「アクティブ流体モデル」を構築した(石原 G)。作成した「アクティブ流体モデル」は、気管上皮多繊毛細胞分化過程における基底小体配列やアピカル骨格の秩序化、薬剤処理による摂動実験の結果を再現すると同時に、秩序形成における平面内細胞極性の重要な関与を提示した。さらに、アピカル骨格による気管粘液繊毛輸送の機能創出原理を実験と理論の両面から明らかにした。一般上皮培養細胞系を用いた実験では、アピカル骨格と TJ のリンクを見出し、TJ アピカル複合体の提案に至った。特にアピカル微小管と TJ を繋ぐタンパク質群 TJMAPs の解析により、アピカル複合体が果たす役割を明らかにした(月田 G)。また、3次元培養により、形態形成の動的秩序解析を行なった。細胞間接着装置の張力感受性を再現する数理モデルを構築して、力学シグナルが形態形成に果たす役割の一端を明らかにした(米村 G)。

In vitro 再構築実験では、微小管とタンパク質モーターを用いてアピカル微小管ネットワーク形成を再現し、動的秩序形成を解析し(大岩 G)、その数理モデルを構築した(石原 G)。微小管関連タンパク質(MAPs)が持つ微小管を束化する能力(糊性)と微小管を滑らせる運動能のバランスによって、様々な形態の微小管ネットワークが生み出されることを明らかにした。数理モデルと統合することで、多繊毛上皮細胞の分化過程で転写量が増加する MAPs の役割を明らかにすることもできた。

階層縦断的に実験と数理モデル化を一気通貫で行う生物学的・数理的解析の融合によって、「アピカル複合体」をより広義に捉えることが可能となり、細胞内外シグナルを情報媒体とした細胞・組織分化と機能創発のメカニズムの一端を明らかにできた。記載レベルに留まりやすい細胞生物学研究を数理的に理解することが可能となり、「アピカル複合体」が生体内の構造的・機能的秩序を生み出す

システムとして機能するという概念が確立された。これは、「生命動態の制御のための基盤技術」や「上皮バリア操作技術」といった応用につながる概念であるため、アピカル複合体の構築・力学特性を操作することで生体機能制御を可能にする操作基盤の開拓につながった。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 気管上皮多繊毛細胞の繊毛基底小体のライブイメージングとその整列機構の解明

概要:

気管上皮多繊毛細胞のアピカル面において、アピカル骨格に沿って、整列する繊毛基底小体の高解像・長時間ライブイメージング法を確立した。繊毛基底小体の整列・配向とアピカル骨格系の秩序化を定量的に解析する手法を開発した。その結果、アピカル骨格系の自己組織化による多繊毛整列の数理モデルとして、骨格系の重合・脱重合と収縮力を考慮したアクティブ流体モデルを構築した。粘液繊毛輸送に重要な多繊毛配列の秩序化メカニズムが世界に先駆けて明らかにされ、アピカル骨格による気管組織機能としての粘液繊毛輸送の操作基盤が開拓された。

2. TJ アピカル複合体の分子機構の解明と生体における機能の解明

概要:

上皮細胞のアピカル面直下には細胞骨格層が存在している事を発見し、アピカル膜と細胞骨格層をアピカル複合体と呼称することにした。また、アピカル細胞骨格層の一つである微小管ネットワークと TJ とを繋ぐタンパク質群 TJMAPs を同定し、その解析を行った。その結果、TJ とアピカル微小管は相互作用する事で、生体の発生や上皮細胞の形態を制御していることを明らかにした。これらの発見はオーガナイザーであるアピカル複合体の操作基盤を開拓することにつながるものである。

3. 試験管内再構築系による微小管ネットワーク形成のメカニズムの解明

概要:

試験管内再構築技術を用いて、微小管とタンパク質モーターであるキネシンが自己組織的に形成するネットワークの振る舞いを定量的に解析し、その数理モデル化に成功した。微小管とキネシンは細胞の形態形成、細胞分裂や細胞内物質輸送などの重要な生命機能の基盤を担う細胞骨格の主要要素であり、このネットワークの動態観察システムの構築と数理モデルの確立は、生命現象の様々な場面で現れる細胞内秩序構造の形成メカニズムの解明とその秩序構造の操作技術につながる事が期待される成果である。

4. アドヘレンスジャンクションを介した張力応答性の分子機構の解明と上皮細胞形態形成

概要:

細胞間に張力を伝達するアドヘレンスジャンクションの α -カテニンが、張力によって分子構造・機能を変化させることの張力応答メカニズムが、高分解能の分子構造解析によって、明らかにされた。そのメカニズムについて、物理化学的、細胞生物学的に検証した。さらに一分子レベルの全反射顕微鏡、原子間力顕微鏡技術を用いて光学的に証明した。数理モデルの構築により、 α -カテニンの張力応答性が上皮細胞形態形成に重要であることが明確にされた。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 気管上皮多繊毛上皮細胞のライブイメージング技術の開発

概要:

本プロジェクトとともに開発を始動し、オリンパスとの協働により完成した顕微鏡システムは、光学限界を超える高分解能で、数日間に及ぶ長期間のライブイメージングを、低侵襲で行うことが出来る。このシステムは実際に有効性が評価され、商品化に貢献することができた。こうした産学連携プロジェクト及び光学系開発は、基礎研究の発展を助けるだけでなく、技術の発展という意味で将来の検査技術・診断技術の向上に寄与するものである。

2. アクティブ流体に基づいた数理モデルスキームの構築

概要:

本プロジェクトで展開した数理モデルとしてのアクティブ流体モデルは、アピカル骨格の重合/脱重合と収縮力による自己組織化が、多繊毛細胞の基底小体の整列過程や、微小管構成系という異なる系について有効であることを示した。理論的な観点からは、チューリングパターンに代表される化学濃度等のスカラー量によるモデル記述から、ベクトル量・テンソル量に基づいたパターン形成理論への展開を行ってきたといえる。このようなモデルスキームは、数理モデルの可能性を広げるものであり、数理科学や理論生物学的にもさらなる展開へつながり得る。

3. 器官形成における力学的要因の解明

概要:

試験管内で生体内の器官形成を再現する試みは数多く成されているが、その殆どがケモカインなどの化学的シグナルによるもので、力学的な相互作用を理解・応用していく試みは少ない。本プロジェクトで行っている3次元培養法の検討や、原子間力顕微鏡を用いた生体内の時間スケールに則した張力作用過程の詳細な解析は、力学的な過程を用いて器官形成を操るための重要な知見を与えるものである。上記化学的な操作と組み合わせることで、器官形成の理解と操作に新たな可能性を提示するものである。

<代表的な論文>

Herawati E, Taniguchi D, Kanoh H, Tateishi K, Ishihara S, Tsukita S. (2016). Multiciliated cell basal bodies align in stereotypical patterns coordinated by the apical cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 214:571-586.

Torisawa T, Taniguchi D, Ishihara S, Oiwa K. (2016). Spontaneous formation of a globally connected contractile network in a microtubule-motor system. *Biophys. J.* 111:373-385.

Maki K, Han SW, Hirano Y, Yonemura S, Hakoshima T, Adachi T. (2018) Real-time TIRF observation of vinculin recruitment to stretched α -catenin by AFM. *Sci Rep.* 25:1575.

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 月田グループ

- ・ 研究代表者: 月田 早智子 (大阪大学大学院生命機能研究科、特任教授)
- ・ 研究項目: アピカル複合体秩序形成メカニズムの解析と操作法開拓のための *in vivo* 解析
- ・ 「アピカル微小管」形成過程の解析
- ・ 初代培養系を用いたライブイメージング
- ・ 「アピカル複合体」マニピュレーション
- ・ 「Active複合体」の解析
- ・ 一般上皮「アピカル複合体」解析
- ・ 「アピカル複合体」の張力制御システムの解析

② 石原グループ

- ・ 主たる共同研究者: 石原 秀至 (東京大学大学院総合文化研究科、准教授)
- ・ 研究項目: アピカル膜の繊毛基底小体の形成過程のモデル化と理論解析
- ・ アピカル膜の繊毛基底小体の配列秩序形成過程のモデル化と理論解析
- ・ *in vitro* 構成実験の数理モデル化と理論解析
- ・ アピカル面の基底小体配列, 配向の画像解析と数理モデル
- ・ 再構成系での微小管ダイナミクスの運動解析と数理モデル

③ 大岩グループ

- ・ 主たる共同研究者: 大岩 和弘 (情報通信研究機構未来ICT研究所、主管研究員)
- ・ 研究項目: アピカル骨格構造秩序形成メカニズム解明のための *in vitro* 再構成実験系の構築と解析
- ・ 既知要素の組み合わせによる *in vitro* 再構成システムの構築特性変調による数理モデルパラメータの妥当性評価
- ・ *in vitro* 実験構成要素の特性変調による数理モデルパラメータの妥当性評価
- ・ アピカル複合体におけるTJの役割および必須要素の特定

④ 米村グループ

- ・ 主たる研究代表者: 米村 重信 (徳島大学大学院医歯薬学研究部、教授 / 理化学研究所生命機能科学研究センター、チームリーダー)
- ・ 安達 泰治 (京都大学再生医科学研究所、教授)
- ・ 箱嶋 敏夫 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、教授)
- ・ 研究項目: 張力感受性と形態形成の相関性の定性的、定量的解析
- ・ 上皮細胞シートの三次元形態形成における細胞間接着装置の張力感受性の解析
- ・ 張力センサー蛋白質の構造と物性解析 ならびに変異張力センサー蛋白質の設計
- ・ ES細胞の器官形成系を利用した形態形成における α -カテニン の役割の検討
- ・ マウスの組織特異的ノックインによる個体形成における張力感受性の役割の検討
- ・ 実験データに基づく三次元vertexモデルの構築と形態形成の予測
- ・ 張力感受性タンパク質の物性解析及び改変タンパク質の設計と作成

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- TJ構成蛋白質claudinの結晶構造解析
藤吉 好則 (名古屋大学CesPI: 細胞生理学センター)
- 一般上皮「アピカル複合体」解析
藤原 郁子 (大阪市立大学)
- アピカル複合体における張力感受性の定量的評価のためのデバイス開発
Sungsu Park (シンガポール大学、シンガポール / Sungkyunkwan University、韓国)
- 上皮細胞の画像解析と解析手法、数理モデリング手法
杉村 薫 (京都大学iCeMS)
Francois Graner (パリ第7大学、フランス)
Philippe Marcq (キュリー研究所、フランス)
Yohanns Bellaiche (キュリー研究所、フランス)
Boris Guirao (キュリー研究所、フランス)
- 細胞内シグナル伝達と細胞極性、細胞運動
澤井 哲 (東京大学総合文化研究科)
中島 昭彦 (東京大学総合文化研究科)
- 微小管ネットワーク形成と光トラップを用いた局所的レオロジー解析
Michael Vershinin (University of Utah、アメリカ)
- タンパク質モーターと微小管との滑り運動によって創出する動的秩序形成解析
佐野 雅己 (東京大学大学院理学系研究科)
Hugues Chate (CEA-Saclay、フランス)
Isabella Guido (Max Planck Institute for Dynamics and Self-Organization, Goettingen, Germany)
- ES細胞におけるゲノム編集、培養法
丹羽 仁史 (熊本大学 発生医学研究所)
永樂 元次 (理化学研究所 多細胞システム形成研究センター)
古田 泰秀 (理化学研究所 多細胞システム形成研究センター)
- α -カテニン とアクチン繊維との結合制御の分子機構
石山 昇 (トロント大学、カナダ)