

研 究 報 告 書

「細胞運動解析のためのマルチレイヤーモデル構築」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 24 年 2 月

研 究 者：菅原 路子

1, 研究のねらい

非筋細胞の運動は、例えば免疫作用における白血球の貪食活動、創傷治癒過程における線維芽細胞の移動、神経ネットワーク形成における神経細胞の伸展、癌の転移における癌細胞の移動など、生体内の様々な場面で見られる普遍的な現象の一つである。細胞運動の多くは、アクチンフィラメントを主とする細胞骨格の再構築により生じ、各種アクチン関連タンパク質がその再構築に影響を及ぼすと考えられ、ミクロな視点からこれらの細胞内シグナル伝達メカニズムが明らかになりつつある。一方細胞をマクロに捉えると、細胞膜、細胞質および細胞周囲の流体の相互作用により細胞が運動すると考えられる。従って、細胞運動を包括的に理解するためには、タンパク質個々のレベルで解明するだけでは十分ではなく、それをマクロな運動メカニズムと結びつけ、細胞全体を一つのシステムとして理解することが重要である。そこで本研究では、細胞のマクロモデルと細胞運動を制御するミクロなタンパク質レベルのシグナル伝達機構を関連付けて解析する手法を考案し、細胞運動に関するマルチスケールな数理モデルを開発することを目的とする。

2, 研究成果

(1) マクロな細胞運動メカニズムの理解

まず初めに、アクチンダイナミクスに基づく細胞運動の典型パターンの把握と、それに伴う細胞形状パラメータを解析することを目的に、マウス線維芽細胞由来の培養細胞株である Swiss 3T3 Albino を用い、細胞運動計測を行った。細胞を培養する環境を構築するとともに、細胞運動の微分干渉顕微鏡画像を取得する環境を整備した。この手法の利点は、何も操作されていない細胞の運動の様子をそのままに観察できることである。しかし一方で、運動に伴う細胞の形状パラメータを、画像解析手法に基づき求めることが困難であった。そこで、共焦点レーザ顕微鏡を導入し、GFP-actin を発現させた細胞の運動を詳細に観察する環境を整備した。なお最終年度より研究環境が変わったことに伴い、これまでと同様の実験環境の整備・構築を再度行ったことを申し添える。

環境整備とともに、細胞運動に伴う形状パラメータの変化を解析する手法の構築を進めた。本研究において実験に用いた、マウス由来の線維芽細胞である Swiss 3T3 Albino の場合、運動速度が遅く、細胞前方の突出から後方の収縮までの一連の過程を 1 サンプルから得ることは困難であった。しかしながら、細胞運動過程を部分的に捉えることにより、運動に伴う局所変形に対する形状パラメータの違いを求めるとともに、細胞内部のアクチンタンパク質と変形の関係を定量できつつある。

一方この研究課題の実施を通し、当初考えていたマクロな細胞のモデル化を既存の弾性力学および流体力学に基づいて構築することに対し、疑問を抱くこととなった。特に細胞内部は微細構造に満ちており、細胞膜は弾性のみならず粘弾性要素が大きく、運動に伴う変形は非

常に大きい。単一細胞レベルにおける細胞の構成方程式を実験的に検証する必要性を感じている。

(2) ミクロな細胞運動メカニズムの理解に向けた実験系構築

(1)の結果を受けて、細胞運動の突出過程に着目し、それに伴うミクロなアクチンモデル構築(後述)に焦点を絞って研究を進めることとした。(1)の観察によると、特に操作しない細胞の運動の場合、細胞膜全体において極めてランダムに filopodia 様突出が繰り返され、そのうちに細胞前方のある範囲において lamellipodia 様突出が見られ、細胞が前方に運動する。その様子は極めて不規則であることから、ミクロなアクチンモデルを構築した場合、通常の細胞運動との比較は困難であり、構築モデルの検証がもっとも大きな課題になると考えた。そこで、(独)物質・材料機構 中西淳独立研究者に協力を依頼し、中西研究者が開発のケージド培養基板を用いた、高精細な動的細胞運動制御および観察システムを構築した。その結果、細胞を第一段階として 20 μm 四方に形状制御したうえで、そこから 20 μm および 5 μm の幅に細胞を伸張させ(図 1(a), (b))、その過程を高精度かつ連続的に観察することが可能となった。これにより、任意の幅を持った lamellipodia 様突出過程に対するミクロなアクチンモデル解析に対し、モデル検証するための実験基盤を確立した。

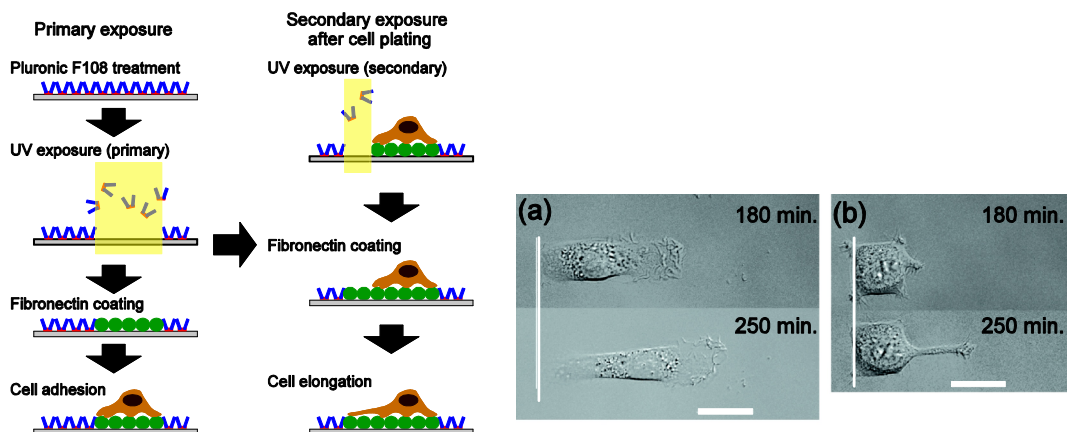


図1 動的細胞運動制御の概念図(左)および細胞への適用結果(右(a)および(b))

(3) ミクロな細胞運動メカニズムの理解に向けた数値解析モデル構築

細胞運動の第一段階と考えられる前方部の突出においては、細胞内でアクチンタンパクおよびその関連タンパク質が様々な反応を伴い動的にアクチン構造を変化させているといわれ、“dendritic nucleation model”が提唱されている(図2)。ここで提唱されている種々の反応に対し、*in vitro*実験から反応速度定数やタンパク質の濃度依存性などが求められているものの、実際の細胞が運動している状況においてそれらを計測することは困難である。そのため、突出における細胞内の動的アクチン構造変化の詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、提唱されているモデルに基づく複数の反応速度方程式に対し、Gillespie法を用い、反応が時間とともに進行する様子を解析するとともに、それに伴うアクチンネットワークの構造変化を求めた。

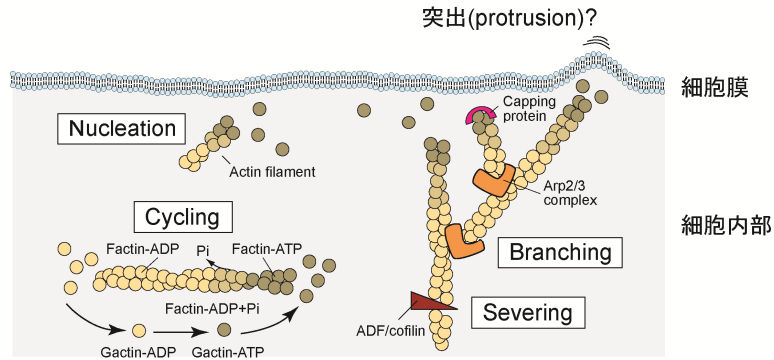


図2 細胞の突出過程において生じるアクチンネットワークに関する反応の模式図

はじめに, *in vitro* 実験が多く報告されているアクチンフィラメントの切断過程について, フィラメントの cycling も考慮してモデル解析を行った. 時間経過に伴う反応場のアクチンフィラメント本数およびフィラメント長さのヒストグラムの変化を実験結果と比較したところ, よく一致した. そこでこのモデルを用いて, 反応場の一端を細胞膜とみなし, その方向にのみフィラメントが伸張し得る条件のもと, アクチンフィラメント場の動的変化を解析した. その結果, ADF/cofilin によるアクチンフィラメントの切断に加え, アクチンフィラメントへの重合を阻害する capping protein も考慮に入れ解析を行ったところ, 考慮しない場合に比較し, 一時的に単量体アクチンが反応場に多く存在し, アクチンフィラメントもより伸張する結果となった(図3). 従って, アクチンネットワークの切断に関わる ADF/cofilin と, アクチンフィラメントへの重合を阻害する capping protein が協調的に働くことにより, 反応場に余剰な単量体アクチンが発生し, 重合阻害されていないフィラメントの伸張が促進されることが示唆された.

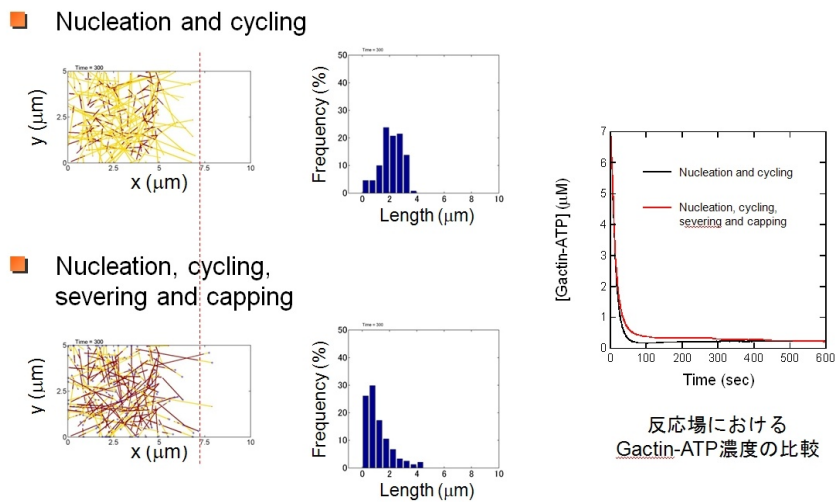


図3 アクチンフィラメント場および反応場における数値解析結果

3, 今後の展開

細胞突出過程におけるアクチンダイナミクス解析モデルについては, 今後は, 細胞内部のタンパク質濃度勾配を考慮できるようモデルを拡張する(現在進行中)とともに, 実験との比較から, モデルの妥当性を検証する. そして, 細胞運動の突出過程における動的アクチンダイナミクスの特性を明らかにする. また一方で, 細胞運動全体に対しては, アクチンとの関連を詳細

に定量解析し、今後の運動モデル構築へと展開することを目指す。このように、タンパク質スケールに基づくモデルと細胞全体の運動モデルの双方からアプローチすることにより、最終的に細胞内の分子メカニズムを考慮した細胞運動モデルを構築し、細胞運動メカニズム解明につなげたい。

4、自己評価

本研究課題では当初、細胞運動全体において、細胞膜・細胞質における力学、細胞内タンパク質の濃度勾配、および細胞骨格のダイナミクスを関連付けて細胞運動モデルを構築することを狙った。しかし、細胞膜・細胞質における力学を既存の構成方程式により記述することに違和感を感じたこともあり、狙いを細胞突出過程にしばり、細胞内タンパク質の濃度勾配と細胞骨格のダイナミクスを関連付けた解析を進めた。2次元アクチンネットワーク解析モデルまでは構築したものの、細胞内の不均一性を考慮すると、現況の一樣場を仮定したモデルには限界がある。今後は、細胞内部のタンパク質濃度勾配を考慮できるようモデルを拡張する(現在進行中)とともに、実験との比較から、モデルの妥当性を検証する。そしてさらには、細胞運動の突出過程における動的アクチンダイナミクスの特性を明らかにしていきたい。

一方、時間はかかったものの、現在の研究環境に移り細胞運動計測の実験系を立ち上げ終えたことの意義は大きい。この実験系を用いることにより、現在マクロに見た細胞運動の定量化を進めつつある。この結果を、今後の細胞全体を考慮した運動モデル構築に生かしたい。

本研究期間中、ライフイベントに伴う研究期間延長に際し、重定先生はじめ領域関係の皆様へアドバイスを賜りました。ここに御礼申し上げます。

5、研究総括の見解

本人記載の通り、当初は、細胞をマクロな弾性体としてとらえ、これにタンパク質レベルのミクロな情報を組み入れた細胞運動のマルチレイヤーモデルを構築するという意欲的な課題に取り組んだが、中途より、細胞運動を駆動する細胞突出過程に狙いを絞り、実験と理論面からアプローチするという転換をはかった。突出過程の高精細動的細胞運動制御システムを開発する傍ら、2次元アクチンネットワークモデルのシミュレーションを行い、細胞内の動的アクチン構造変化のメカニズムにおいて端緒を得たことは評価できる。細胞運動に真正面から取り組むという当初の課題はやはり難しかったが、試行錯誤しながら地道に研究を進めており今後の展開を期待したい。

6、主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. 菅原路子, 崔源垞, 中西淳, 山口和夫, 横田秀夫, 八木透, “高精細な細胞運動制御および観察に向けた培養基板へのマイクロパターン形成手法の確立”, 電気学会誌 IEE Japan Transactions on Electronics, Information and Systems, Sec. C, 131(4), 833-839, (2011)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表:

国際

- M. Sugawara, Numerical analysis of formation of dendritic actin networks related on cell movements, The 2011 ASCB (The American Society for Cell Biology) Annual Meeting, Denver, USA, 2011.12.

国内

- 菅原路子, “アクチンネットワークの樹状構造形成に関する数値解析”, 第 24 回バイオエンジニアリング講演会, 大阪, 2012.1.
- 菅原路子, 横田秀夫, “アクチンネットワークモデルに基づく局所細胞運動解析”, 第 22 回バイオエンジニアリング講演会, 岡山, 2010.1.
- 菅原路子, 横田秀夫, “細胞運動の理論的研究に向けたアクチンダイナミクスの動態解析”, 第 47 回日本生物物理学会年会, 徳島, 2009.10.
- 菅原路子, 横田秀夫, “細胞内アクチンネットワーク形成に関する分子動態解析”, 第 22 回計算力学講演会, 金沢, 2009.10.
- 菅原路子, 石井良和, 八木透, 横田秀夫, “細胞運動に伴うアクチンダイナミクスに関する研究”, 電気学会医用生体工学研究会, 東京, 2009.4.
- 菅原路子, 横田秀夫, “Gillespie 法を応用した細胞内アクチンダイナミクス解析”, 第 21 回バイオエンジニアリング講演会, 札幌, 2009.1.

招待公演

- 菅原路子, “細胞運動の計算バイオメカニクス / 子育て中の研究者の日常“, 東京工業大学情報環境学専攻女性研究者招へい講演会, 東京工業大学, 東京, 2009.2.17

受賞

- 平成 21 年度電気学会優秀論文発表 A 賞
受賞発表論文「細胞運動に伴うアクチンダイナミクスに関する研究」