

研究終了報告書

「潜在する生命のゲノムが創出する原始細胞骨格機能の具現化」

研究期間：2021年4月～2024年3月

研究者：松林 英明

1. 研究のねらい

本研究は、ゲノムスケールの DNA 合成が自在に行えるようになることを想定し、DNA の配列情報としてコードされるゲノムの機能を、人工細胞の形で直接発現させるような技術の確立を目指しています。特に、細胞骨格による細胞の変形や運動、細胞外分子の貪食といった動的な機能に焦点をあて、それらの機能をボトムアップに理解することで、真核生物が細胞骨格と細胞膜動態の機能を獲得するために必要な要素を同定することを目的としました。この研究目的に向け、本研究では、アクチン細胞骨格の機能を人工細胞の形でボトムアップに再構成する手法の確立に取り組みました。また、非モデル生物の細胞骨格の発現系を構築することで、哺乳類よりも primitive な細胞骨格の機能解析を可能にする方法論の開発に取り組みました。このような方法論の確立を通して、アクチン細胞骨格の機能を発現するための最小要素を明らかにし、将来的に、進化の過程の一端を明らかにしていくことが、本研究のねらいです。

2. 研究成果

(1) 概要

アクチン細胞骨格機能の再構成：アクチン細胞骨格の機能を人工細胞の形で再構成するため、細胞サイズのリポソーム内において、タンパク質の膜局在化を光操作する実験系を構築し、細胞遊走で見られる様な非対称なアクチンの局在化を実現しました。さらに、細胞骨格系のタンパク質の光操作によってリポソームの運動を誘導する条件を見出しました。この過程で、次の様な成果を得ました。(1)培養細胞内でアクチン重合とアクチンによる力発生を誘導するツールの開発、(2)光応答性タンパク質を応用した人工細胞内でのタンパク質局在制御手法の確立、(3)アクチン重合因子の光操作法の開発と、アクチンの極性化の再構成、(4)細胞骨格因子の光操作による、細胞サイズリポソームの運動制御。

非モデル生物アクチンの無細胞合成：哺乳類のアクチンと非モデル生物のアクチンについて、無細胞翻訳系による合成条件の検討を行い、アクチンの重合臨界濃度を超える 3 μM 程度の濃度で合成できる条件を見出しました。さらに、合成したアクチンの重合活性を超遠心によるアッセイと、全反射顕微鏡での繊維構造の観察によって確認しました。これらは、活性を持った状態で非モデル生物のアクチンを無細胞合成できることを示す初めての結果です。また、アフィニティタグと精製条件の検討から、合成アクチンを精製する条件を見出しました。これらは、今後非モデル生物のアクチンと、アクチンの進化についての研究を進めるための、足がかりとなる結果です。

PI3K による細胞運動の新規制御機構の解明：哺乳類細胞の運動を司る脂質キナーゼ PI3K

について、新規機能が見出されたため、細胞運動との関係を解析しました。PI3Kの制御サブユニットに、エンドサイトーシスのアダプター分子であるAP2の結合モチーフがあることを明らかにし、このモチーフがPI3Kの細胞内局在を制御し、細胞運動を負に制御することを明らかにしました。これは、細胞の運動原理や細胞骨格系の制御機構への理解を深めるうえで、重要な知見となります。

(2) 詳細

培養細胞内でのアクチン細胞骨格操作系の開発

アクチン細胞骨格系の再構成を目指すにあたり、まず、培養細胞内でアクチンの重合や力発生を操作するツールを開発を行いました。アクチン重合核形成促進因子とFRB-FKBPからなるタンパク質化学操作系と融合したタンパク質を作成し、ライブイメージング等の方法で機能評価しました。アクチン重合核形成促進因子の局在化によって、細胞小器官の変形や、細胞膜の突出が誘導されることが示されました。これらの成果の多くの部分は、現京都大学の中村秀樹准教授との共同研究の形で行われ、論文として発表しました(Nakamura et al., Cell Reports, 2023)。

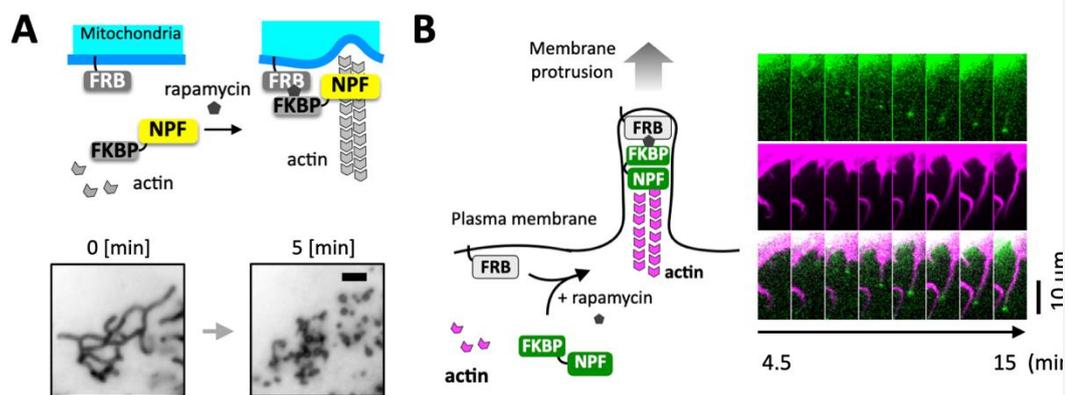


図1：培養細胞内でのアクチン細胞骨格操作系の開発

人工細胞内タンパク質光操作系の構築と条件検討

次に、細胞運動のような非対称で動的なタンパク質の局在制御を人工細胞で再現するための技術開発を行いました。人工細胞の筐体としては、細胞サイズのリポソームを用い、タンパク質局在操作は光応答性タンパク質を用いた実験系を構築しました。光操作に用いる光応答性タンパク質、脂質膜へのタンパク質のアンカー条件、リポソームの作製方法などを検討し、リポソーム内の任意の方向の脂質膜表面にタンパク質を局在化させる技術を確認しました。

人工細胞内でのアクチン操作系の構築

人工細胞内でのアクチンの操作を試みるため、アクチン細胞骨格系を光操作タンパク質と組み合わせた実験系を構築しました。その過程で、アクチン結合タンパク質についての精製法

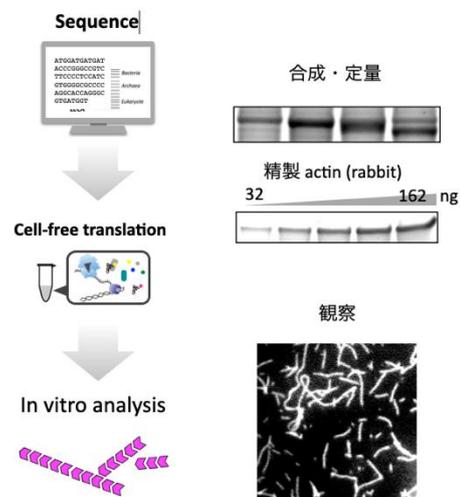
の改良を行いました(Nakajima,...,Matsubayashi*, submitted)。反応系の改良を通して、遊走中の細胞が示すような非対称なアクチンの局在を人工細胞内に再構築するための条件を見出しました。また、同様の実験系について、タンパク質化学操作系を用いた実験系を構築し、リポソームの変形が誘導されることを明らかにしました (Razavi et al., Sci. Adv. in press)。

運動の再構成と因子の同定

上記のアクチンの光操作系について、実験系に加えるタンパク質の組み合わせとその濃度、脂質組成、溶液の浸透圧、ガラス基板の修飾条件、分子混雑因子の有無などの検討から、光刺激した方向へ細胞サイズリポソームの運動を誘導する条件を見出しました。また、リポソームの運動を誘発するのに必要な因子の組み合わせの同定を進めました。

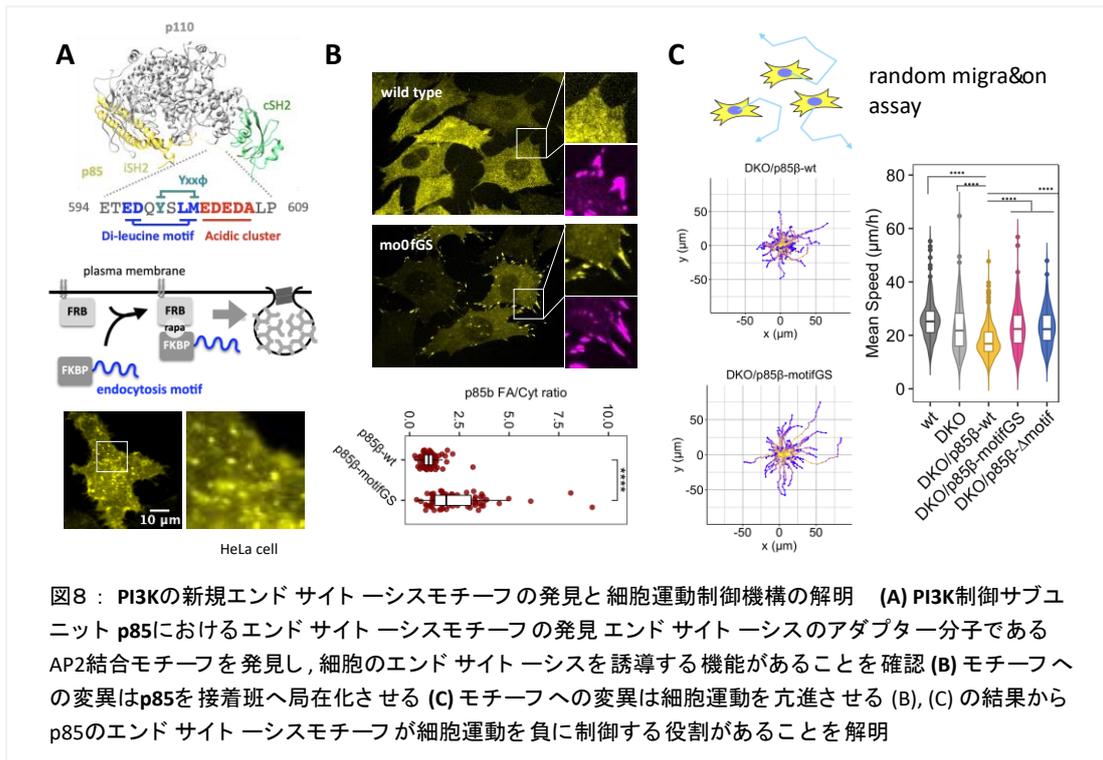
非モデル生物のアクチンの無細胞合成系と評価

アクチン細胞骨格機能の起源を探ることを目的に、非モデル生物のアクチンについて、無細胞合成と評価を進めました。複数種類の非モデル生物のアクチンについて、アクチンも重合臨界濃度を越える $3 \mu\text{M}$ 程度の濃度で合成できることが確認されました。また、超遠心や全反射顕微鏡の結果から、無細胞合成したアクチンの重合活性を支持する結果を得ました。さらに、アフィニティ精製タグによって合成アクチンを精製する条件を確立しました。



PI3K のエンドサイトーシスモチーフと細胞運動制御機構の解明

アクチン細胞骨格の上流で細胞運動のシグナルを制御する PI3K について、新たな制御機構を見出し、哺乳類細胞の運動原理の理解を深める点で重要な知見も得られました。PI3K は $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ を産生する脂質キナーゼで、触媒サブユニットである p110 と制御サブユニットである p85 から構成されます。FRB-FKBP からなるタンパク質化学操作系を用いた実験の過程において、偶然にも p85 に新規のエンドサイトーシス活性があることを見出し、エンドサイトーシスのアダプター分子である AP2 との結合モチーフがあることを明らかにしました。また、このモチーフが p85 の細胞内局在を制御し、細胞運動のブレーキとして働くことを明らかにしました。研究成果を論文として発表しました (Matsubayashi* et al., Nature Communications, 2024)。



3. 今後の展開

細胞運動の再構成については、反応の効率化や持続性の向上、光以外の入力への応答などの発展を目指します。さきがけ研究期間中には、JST の SciFos 活動に参加し、第一三共株式会社、富士フィルム株式会社、協和キリン株式会社の 3 社へのインタビューを行いました。インタビューでいただいたフィードバック等、応用の方向性も検討してきたいと考えています。非モデル生物のアクチンの合成については、今後は、精製アクチンの生化学的解析や、リポソーム内への封入と形態観察、構造解析を進めます。また、結合タンパク質の探索などを検討しており、予備的な結果を得ています。

4. 自己評価

本研究では、細胞運動を細胞サイズのリポソームからなる人工細胞と精製タンパク質で再構成するという課題に挑戦しました。人工細胞内のタンパク質光操作を確立し、実験系の最適化と条件検討を繰り返しおこなってきたことで、人工細胞の運動を精製タンパク質の操作によって誘導するという成果を得ることができました。また、その過程で人工細胞内にアクチンの極性を形成する条件の確立や、リポソームの運動を誘導するための最小要素の同定を進めました。さらに、細胞運動のメカニズムについて、偶然の発見から新たな制御機構を明らかにすることができたほか、人工細胞系の実験から、今後の研究に発展しうる新たな仮説も得られています。

非モデル生物の細胞骨格系の合成についても、今後の研究の足がかりとなる成果が得られています。研究期間中に、さまざまな共同研究の機会にも恵まれ、また、主催したセミナーなどから計算科学的手法を研究に取り入れることにも至っています。

JST とジョーンズホプキンス大学との研究契約の成立が 2021 年の 4 月まで半年程度遅れてしまった

ことや、研究期間中に東北大学へ異動し研究室のセットアップをおこなったことなどから、当初の計画よりもやや遅れが生じた部分もありますが、さきがけの支援のもとに独立した研究環境を構築することができました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

1. Hideki Nakamura, Elmer Rho, Christopher T. Lee, Kie Itoh, Daqi Deng, Satoshi Watanabe, Shiva Razavi, **Hideaki T. Matsubayashi**, Cuncheng Zhu, Eleanor Jung, Padmini Rangamani, Shigeki Watanabe, Takanari Inoue, ActuAator, a Listeria-inspired molecular tool for physical manipulation of intracellular organizations through de novo actin polymerization, *Cell Reports*. 2023 Oct 31;42(10):113089

力学的な力は、細胞運動や分裂などといった細胞機能を支える重要な要素ですが、従来、細胞内の力を操作する方法が乏しく、細胞内での力発生やその影響の多くが未解明でした。本研究では、リステリア菌のアクチン核形成促進因子である ActA を改変し、細胞内の意図した位置でアクチン重合を誘発し、アクチン重合による力を発生させる分子ツール“ActuAator”を開発しました。ActuAator は、ミトコンドリア、ゴルジ体、核、RNA 顆粒などの細胞内構造を変形できることを明らかにし、細胞内メカノバイオロジーを研究するための有用なツールになりうることを示しました。

2. **Hideaki T. Matsubayashi***, Jack Mountain, Tony Yao, Amy F. Peterson, Abhijit Deb Roy, Takanari Inoue*, Non-catalytic role of phosphoinositide 3-kinase in mesenchymal cell migration through non-canonical induction of p85 β /AP-2-mediated endocytosis, *Nature Communications*. 2024 Mar 23;15(1):2612.

PI3K は PI(3,4,5)P₃ を産生し、細胞の運動や増殖を活性化する脂質キナーゼです。従来、PI3K の触媒サブユニットである p110 と細胞内シグナルとの関係が広く解析されてきていましたが、制御サブユニットである p85 と PI(3,4,5)P₃ シグナル系との関係や非触媒的機能の多くは未解明でした。本研究では、p85 の天然変性領域にエンドサイトーシスのモチーフを見出し、そのモチーフがクラスリンとダイナミンに依存したエンドサイトーシスを誘発できることを明らかにしました。また、このエンドサイトーシスモチーフを変異した p85 は、細胞内で接着斑に局在化し、線維芽細胞の運動速度を向上させることから、p85 が非触媒的に細胞運動を制御していることを示しました。

3. Yuta Nihongaki, **Hideaki T. Matsubayashi**, Takanari Inoue, A molecular trap inside microtubules probes luminal access by soluble proteins, *Nature. Chemical. Biology.*, 2021 May 3, 17, 888–895. doi: 10.1038/s41589-021-00791-w

真核生物の細胞骨格である微小管は、細胞運動や染色体の分配などの重要な機能を担っています。近年、微小管の内腔側からの翻訳後修飾によって微小管の剛直性が制御され、細胞運動や増殖などに影響を与えることが指摘されてきましたが、修飾酵素などの制御因子がどのように微小管内腔にアクセスできるのかは明らかになっていませんでした。本研究では、ラパマ

イシン依存的 Chemically inducible dimerization (CID) 技術を応用し、微小管内腔へのタンパク質輸送経路として、(1)重合に伴ったプラス端からの導入、(2)拡散による微小管の末端や側方からの導入という2つの経路が存在することを明らかにしました。

(2)特許出願

研究期間全出願件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

- (1) 第61回日本生物物理学会年会 2023年11月16日、“試験管内合成とタンパク質光操作による人工細胞膜の機能拡張”
- (2) SPEED Journal Club 2023年11月10日、“細胞運動を駆動するPI3Kの新規制御機構の解明とアクチン系の再構成”
- (3) 生物物理学会サブグループ「人工細胞モデル&分子ロボティクス」第4回研究会 2023年1月25日、zoom、“人工細胞内でのアクチン重合光操作と細胞運動の再構成”
- (4) 国際会議 Gordon Research Conference, Directed Cell Migration, 2023年1月9日 “Synthesizing motility in artificial cells by asymmetrically reconstituted actin polymerization”
- (5) 国際会議 CCD talk, 2022年5月27日、米国 ジョーンズホプキンス大 “Synthesizing motility in artificial cells by asymmetrically reconstituted actin polymerization”

総説

- (1) 松林英明, 人工細胞は真核生物の起源に迫れるか? Viva Origino, 2021年49巻4号 p. 13- 査読あり, 招待あり

受賞

日本蛋白質科学会 若手奨励賞 (2024年、年会)

プレスリリース

細胞運動のアクセルである酵素PI3Kに秘められたブレーキを発見 エンドサイトーシス分子AP2との相互作用を介した新たな細胞運動の制御機構

東北大学 <https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2024/03/press20240327-03-cell.html>

JST <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20240327-3/index.html>

Tohoku University

https://www.tohoku.ac.jp/en/press/researchers_unveil_pi3k_enzymes_dual_accelerator_and_brake_mechanisms.html

Eurekalert! <https://www.eurekalert.org/news-releases/1042353>