

# 研究報告書

## 「細胞形状と運動の自己組織的挙動の理解と操作」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 澤井 哲

### 1. 研究のねらい

真核細胞の多くにみられるアメーバ状の細胞変形は、膜の裏打ちにおけるアクチンの重合と、アクチンフィラメントの編成・解体、それによって細胞膜が伸展したり、収縮する過程からなっている。これらの過程は、柔軟なテンポとタイミングでおこなわれ、物体への接触、誘因物質が引き起こす反応などの外部からの刺激と、細胞内の自律的なダイナミクスとが、ときにはせめぎ合い、ときには調和しながら進行する。細胞内部のフィードバックから生み出される自律的な動態には、パターン形成として大きく分けて主に二つの側面があると考えられる。一つは、細胞外リガンドからの入力がなくとも、細胞膜上のシグナル因子が、自律的に増幅と抑制を繰り返しながら、時間と空間的な対称性を破る現象、もう一つは、細胞骨格系のフィラメントの自己駆動性と配向・架橋により、マクロレベルのメッシュワークが自発的な対称性の破れをともなって形成・解体する現象である。膜上の脂質シグナルは反応拡散系、細胞骨格系は内部駆動的な非平衡ソフトマターであり、それぞれが非平衡・非線形系に固有の自己組織的な動力学を示し、細胞の形状と運動の理解と操作にとって極めて重要な視点である。歴史的にこれらはそれぞれ独自の学問的背景から派生している経緯もあり、両者が組合わさった系の理解は発展途上にある。細胞に目を向けると、両者は極めて密接な相互依存的関係にあると考えられる。膜上のリン脂質シグナルは膜の裏打ちのアクチンフィラメントの構築と解体を調節しており、微弱な信号が増幅されることで、ランダム性の高い細胞遊走や食作用に伴う膜変形を駆動している。一方で、アクチンフィラメントの形成は細胞膜の伸長や、曲げを生み出し、膜の局所的な物性の変化によってリン脂質シグナルも調節されていると予想される。こうしたダイナミクスがいかに影響しあっているか、さらには外部からの摂動によってどのように変調されるかを理解することは、走化性や地形依存的な遊走、さらには食作用などのダイナミクスの基礎づけにとって重要な課題である。そこで、本研究では、これらの豊かな動態を詳細に解析できる実験対象に、細胞運動のモデル生物、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* を選び、系に内在する自己組織的なダイナミクスの非線形動力学的特徴付けと、動態特性の理解に基づいた細胞操作を目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の形質膜の裏打ちでは、数マイクロメートルのスケールで生じる樹状アクチンフィラメントの構築と脱構築が、ホスファチジルイノシトール3リン酸 (PI(3,4,5)P3) の産生を伴って空間的に伝播する現象 (以下 F-アクチン/PIP3 波と呼ぶ) が知られている。同様の現象は、免疫細胞、上皮細胞、神経細胞、ガン細胞など多岐にわたって見られ、食作用、マクロピノサイトーシス、細胞遊走などの背後にある共通の素過程、すなわち樹状

アクチンフィラメントの基本動態と考えられる。本研究課題では、形質膜上のホスファティジルイノシトールリン酸の産生、その上流の PI3 キナーゼ及び低分子 G タンパク Ras 活性の動態、下流のアクチンの動態を生細胞イメージングを中心に定量的に解析し、F-アクチン/PIP3 波の周期性と位相抽出から、波の起点の位置、波の形状、位相の空間的な配置を定量し、反応拡散ダイナミクスにおいて典型的に見られる興奮性の波の性質を明らかにした。これと並行し、PI3 キナーゼの活性化制御についての数理モデルの定式化と、これに基づいた動態予測を行い、アクチン重合に依存する正のフィードバックを仮定することによって、様々な測定結果が説明できることを示した。また、細胞外からの摂動として、走化性誘引物質として働く細胞外 cAMP の影響を調べたところ、F-アクチン/PIP3 波は cAMP 投与によって直ちに消失することが明らかになった。さらに、基質の接着性、形状について波の成立条件を明らかにし、走化性遊走とは独立に方向的な運動が駆動されることを示した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「知覚・制御系の自己組織化ダイナミクスの解析」

PIP3/F-actin 波の時空間パターンの特徴について、位相ダイナミクスを抽出し、平面波、回転波の形状がいかに生み出されているかを明らかにすることを目的とした。F-アクチンやイノシトールリン脂質(PI(3,4,5)P3, PI(4,5)P2)などを標識する融合蛍光タンパク発現株を作出し、コンフォーカル顕微鏡による生細胞タイムラプス画像を取得し、詳細かつ定量的な画像解析を行った。その結果、PIP3/F-actin の波は、基質側の形質膜のランダムな場所で生成され、回転波の中心には位相の特異点が存在していることが明らかになった。特異点は、自己充足的に興奮をくりかえすらせん波の中心(端)で、一対となっているものはその間で維持される波面が比較的平面的に膜を押し出していること、単独に隔離された特異点で維持されるらせん波は、一方向的に回転することで膜を回転させながら押し出していた。波は、同心円状やらせん状の形状をとって伝播しており、波と波が正面衝突すると波は互いに消滅する(原著論文[4])。周期性は、約 5-6 分程度で、細胞端で波が反射する場合と、消失する場合の二通りが観察された。特異点の生成の詳細な解析によると、新しい波が古い波の後方に衝突する際に特異点が生じていた。一方、波のフロント同士の衝突では特異点の生成・消滅は起こらず、パターン遷移を引き起こさないが、発火した波が、前にある波の後方にある場合には正負の特異点対生成し、パターンの変化を引き起こしていた。これらの性質はゲル内のペルーズフジャボティンスキー反応(BZ 反応)や、固体表面での触媒反応など、代表的な非平衡系でこれまでに知られている波の性質と一致している(著作物[1,2])。これらの解析から、細胞性粘菌で見られる大規模な膜変形の少なくとも一部は、興奮性のらせん波の振動と位相、幾何学的な特徴から理解できること、またこれら进行操作する方法として、BZ 反応などの非平衡系のパターン形成において開発

されてきた摂動法の応用可能性が示唆された。

### 図 1 PIP3/F-actin 波の空間的位相特異点の変遷

(上段) PIP3 を可視化する PHcrac-RFP の共焦点顕微鏡像から得た位相マップ(基底面側;左から右に



- clockwise 特異点
- anti-clockwise 特異点
- ➡ 並進的膜変形
- ↪ 回転的膜変形
- フロントとバックの衝突
- ▶ フロント同士の衝突



フロント同士の衝突

フロントとバックの衝突

およそ数分の時間経過を示す;色は PIP3 の周期的変動の位相を表す)。波の背面における新規波の生成によって、位相特異点対生成する(点線部分)。特異点の周りでは時計回り(白丸)と反時計回り(黒丸)に波が回転し、進行波が回転をともなった膜の伸張を引き起こす。(下段)位相の特異点の交代の様子。

### 研究テーマ B 「デカップルした固有運動系の構成と解析」

アクチン骨格系自身がおもつ不安定性から出現する膜変形と、PIP3 依存の膜変形成分を切り分けることを目的とした。薬剤処理と遺伝学的操作を併用することで、これらの径路の一部もしくは全て抑制した細胞を解析した。PI3 キナーゼを阻害する LY294002 処理した細胞や PI3K の欠損株においては、アクチン/PIP3 波の発生が顕著に抑えられた。また、この研究を進める中で、思いがけずカテキンが同様の薬理的作用があることを見出した(原著論文[5])。アクチンの重合を抑え、波の発生を押させた細胞では、新規発生の波同士の衝突が減少するため、波の形状と性質を捉えるのに適していることがわかった。樹状のアクチンフィラメント形成には、枝分かれの核形成を担う Arp2/3 複合体の活性化が必須であり、これは WASP や Scar/WAVE 複合体の調整下にある。Scar/WAVE 複合体の活性化を HSPC300 によって可視化したところ、波の先端において顕著な活性化が認められた。Scar/WAVE 複合体の一因子である PIR121 は、アクチンの樹状フィラメント生成を抑制し、欠損株 *pirA<sup>-</sup>*は、アクチンフィラメントが過剰に生じることが知られている。*PirA<sup>-</sup>*株において同様の生細胞画像解析を行ったところ、PIP3 の局所的なパルスの発生頻度が増加したが、持続的な波の生成はむしろ観察されなくなった。これらの解析から、PIP3 の調節機構はランダム性、興奮性の起源に近く、アクチンフィラメントがある中間的な濃度レンジで揺らぐことができることが、空間的に興奮が伝播するために重要である

ことが示唆された(原著論文[4])。ホスファターゼ PTEN の欠損株においては、波の形状に特徴的な変化が見られたが、波そのものは維持されたため、PI3K の役割が大きいと考えられる。また、活性型 Ras を Raf1 の RBD ドメインで、活性型 Rac を Pak の CRIB ドメインによって可視化したところ、両者とも PIP3/F-actin 波との顕著な共局在が確認された。PIR121 は Rac との相互作用が先行研究で指摘されていることから、活性型 Rac と SCAR/WAVE による樹状フィラメント形成が波の持続的な伝搬にとって必須であること、これと共に活性型 Ras と PI3 キナーゼの活性化による波の核形成の重要性が示唆された。また、PI3K を阻害した細胞においても、Rac や Scar/WAVE 複合体の活性化やランダムな膜変形は見られるため、PI3K 非依存の膜変形と、PI3K 依存の波上の膜変形が通常の細胞では重なりあっていることが示された。得られた知見は、研究テーマ A の解析、研究テーマ D の数理モデル解析へと繋げた。また、全く思いがけない発見として、アクチン重合を阻害した細胞を解析から、走化性誘引物質として働く cAMP の産生と、細胞外 cAMP の波の発生もアクチンに依存することも明らかになった(原著論文[2])。

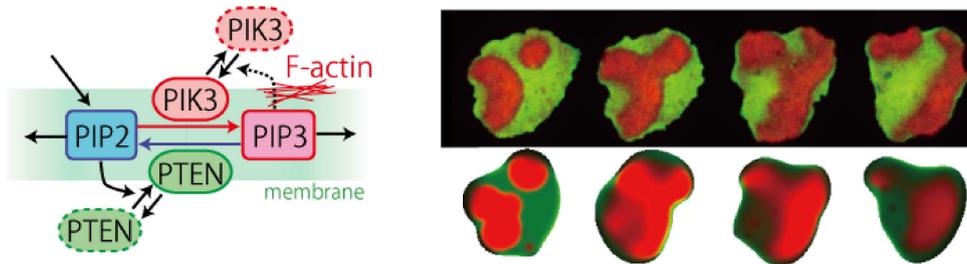
#### 研究テーマ C 「自己組織化ダイナミクスの摂動と操作」

アクチン/PIP3 波の動態と走化性運動との関係を解析した。特に、時空間的に変調された刺激に対する応答に着目し、それを実現するためにマイクロ流体デバイスを用いた解析を行った(原著論文[2])。その結果、走化性誘引分子である cAMP 刺激によって、アクチン/PIP3 波が消失すること、cAMP 投与から解放後1分以内に波が発生しやすいことを突き止めた。これらの結果から、アクチン/PIP3 波の動態は cAMP への走化性とは排他的であることが示された。また、こうしたマクロ流体デバイスを応用する中で、層流の向きを360度自在に変化させられるデバイスの着想を得て、これを新たに開発した(原著論文[1] 特許出願)。また、アクチン/PIP3 波の物理的環境への依存性を解析し、接着性の違う表面によって波の生成頻度、さらに基質の凹凸による波への摂動と運動を解析した(投稿論文準備中)。

#### 研究テーマ D 「自己組織化ダイナミクスの理論・数値解析」

解析結果は、PIP3/F-アクチンの波が興奮性の波であることを強く示唆する。興奮系としての振る舞いが、どのような分子機構から現れるのか、先行研究の知見に基づいて、PIP2 から PIP3 へのリン酸化反応がアクチン重合によって促進されること、また、PIP3 から PIP2 への脱リン酸化反応は PIP2 によって促進されるという二つの正のフィードバックループを考え、2変数方程式を導出した。相空間解析をおこなった結果、興奮系の出現が確認され、フィードバックが強くなると、サドルノード分岐を起こして新しい固定点が現れ、興奮性が失われることが予想された。これらのモデル予想は *pirA* 欠損株を用いた検証実験からも支持された。

PIP3/F-アクチン波と細胞膜の形態との関係をより理解するため、界面の形態変化を表現する数値シミュレーションを、フェーズフィールド法を用いて行った。シミュレーションの結果、膜上の離れた二点の位置から新に発火し伝播する同心円状の進行波によって生じる膜変形では、はじめに境界方向へ伝播した波面によって、発火点を結ぶ直線上の細胞膜が伸張すること、ほぼ同時に内側へ伝播する側の波面は、発火点を結ぶ直線上では波面が互いに衝突して消滅し、その後、それとは垂直方向への伝播は続くため、膜の伸張は発火点を結ぶ直線とは直交した方向に生じることがわかった。この発火のタイミングのずれで形態が楕円形か扇状になるかが決まる事が実際の細胞の観察との比較検討からあきらかになった。また、細胞端で波が反射する条件を探索した結果、膜の伸長のしやすさに強く依存することが示された。これらの結果を、テーマCの波を操作して仮説検証を行う実験へと繋げた。



**図2 数理モデル解析による波と膜変形の関係の理解**

(左) PIP3 産生に関わる反応の模式図 (右上) PHcracRFP/PTEN-GFP のスナップショット。(右下)フェーズフィールドモデルによる膜変形解析。発生タイミングがずれた二つの波面が衝突すると、おうぎ形の膜変形が実現される。

### 3. 今後の展開

F-アクチン/PIP3 波のダイナミクスの発生は、この数年間に粘菌以外に、神経細胞、マクロファージ、マスト細胞などの細胞において報告が相次いでいる。本研究で得られた描像や現象、操作方法が、細胞性粘菌以外の細胞にどこまで適用できるか、今後の課題である。現象の一般性が強く意識される学術的状况にある一方で、波ダイナミクスの細胞機能は依然として不確かである。細胞性粘菌においては、通常、膜状受容体の制御下にあるエンドサイトーシスが、過剰な Ras 活性によって、恒常的になっているとする見方があり、このことは、波のダイナミクスが必ずしも細胞遊走とは連動していないと言う本研究の知見と整合している。がん細胞に見られる過剰な栄養の取り込みの背景には、マクロピノサイトーシスなどの過剰な膜変形ダイナミクスが考えられ、波ダイナミクスとの関連が注目される。また、細胞基質依存的な細胞遊走は、免疫細胞や、がん細胞で報告が増えており、同様のアクチン構造との関連が示唆されている。複雑な組織内で細胞が這いまわれる足場の地形をいかに知覚しているか、今後の展開にとって重要な視点で

ある。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

[研究目的の達成状況]

テーマA,Bの波の基本的なダイナミクスの抽出、アクチンとPI3キナーゼとの連動の解析、テーマCの数理モデル検証については、概ね実現することができた。テーマCについては、基質依存性な性質を明らかにしたことで、波と運動操作を実現することに成功した。これらの成果は、これまで記載的な描像にとどまっていたアクチン波の動態について、定量的なデータからその実態に近づくもので、走化性(chemotaxis)や地形依存的な遊走(topotaxis)、さらには食作用(phagocytosis)と行った、現象の背後にある基礎的ダイナミクスの理解が大きく前進したと考えている。一方、当初の目的であった光遺伝学を用いた、状態操作については、操作系を細胞性粘菌で確立するに至ったものの、波の操作までには至らなかった。このことは、この現象の分子描像の不足を示しており、今後の課題である。また、当初想定していた走化性との連動は、むしろそれを否定する結果となり、それを明らかにする過程で、新たなマイクロ流体デバイスや走化性に関する知見を得るという、予想外の成果があった。

[研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)]

研究費執行は計画通りに進め、開始時計画より消耗品などのランニングコストをなるべく削減し、その代わりに細胞の構成的理解と操作に欠かせない、各種顕微鏡類、分子生物実験装置の整備できたことで、実験が飛躍的に進んだ。本研究には、間接的に協力いただいた方を含めると、スタッフに加えて、実施場所を大学に選んだという地の利を生かし、生物学、物理学、薬学、化学と多様な学問的背景を持つ学生からの協力にも恵まれた。

[研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)]

本研究課題を通して、当初の研究計画では予想していなかった方向での技術的発展があった。一つは、共焦点顕微鏡やライトシート顕微鏡を利用して、研究開始当初は2次元で考えてばかりいた問題に対して、高い精度と分解能で3次元動態の時系列データが導入されたことである。組織内の免疫細胞やがん細胞の運動特性には、地形依存的な3次元膜的膜変形の動態の理解と操作が重要であり、また、器官創生、損傷治癒など3次元組織のパターン形成への理論的な枠組み、解析手法などの技術応用を含めて、今後の研究展開が楽しみである。二つ目は、細胞外の誘引物質勾配の時空間的制御について、世界で唯一とも言える精度を実現するようになった点である。新規開発のデバイスについては特許出現を行っており、極めて汎用性の高いデバイスであることから、応用開発への波及が期待される。デバイスをを用いた細胞運動解析については、免疫細胞の特性の解析へと

発展しており、さきがけ研究者がこれまで粘菌で培ってきた手法が、より波及する方向性として期待できる。また、研究当初は馴染みのなかった微細加工が、研究手法の標準レパトリーとして確立できたことも、今後の研究展開にとって重要な点と考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

マイクロ流体デバイスを用いて、アクチン/PIP3 波の動態と走化性運動との関係を解析し、走化性誘引分子である cAMP 刺激によって、アクチン/PIP3 波が消失すること、cAMP 投与から解放後1分以内に波が発生しやすいことを発見した。また、マクロ流体デバイスを応用する中で、層流の向きを360度自在に変化させられるデバイスを開発している。このように、現象の発見にとどまらず、意図的に操作することに取り組み、成果を挙げており、この領域の構成的なアプローチに合致した研究の進め方を評価したい。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Nakajima, M. Ishida, T. Fujimori, Y. Wakamoto, <u>S. Sawai</u> , The Microfluidic lighthouse: an omnidirectional gradient generator. <i>Lab on Chip</i> 15, pp. 4382–4394, Oct, 2016.   |
| 2. F. Fukujin, A. Nakajima, N. Shimada and <u>S. Sawai</u> , Self-organization of chemoattractant waves in <i>Dictyostelium</i> depends on F-actin and cell-substrate adhesion. <i>J. Roy. Soc. Interface</i> 13, 20160233, June, 2016.  |
| 3. A. Nakajima, S. Ishihara, D. Imoto and <u>S. Sawai</u> , Rectified directional sensing in long-range cell migration. <i>Nature Communications</i> , Vol.5, Article number 5367, Nov, 2014   |
| 4. D. Taniguchi <sup>†</sup> , S. Ishihara <sup>†</sup> , T. Oonuki, M. Honda-Kitahara, K. Kaneko and <u>S. Sawai</u> , Phase geometries of two-dimensional excitable waves govern self-organized morphodynamics of amoeboid cells., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> , Vol. 110, No. 13, pp. 5016–5021, March, 2013 |
| 5. K. J. McQuade, A. Nakajima, A. N. Ilacqua, N. Shimada and <u>S. Sawai</u> , The green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) blocks cell motility, chemotaxis and development in <i>Dictyostelium discoideum</i> . <i>PLoS ONE</i> 8(3): e59275, Mar, 2013.   |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1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)

受賞

平成24年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

受賞内容:「細胞集団の自己組織化についての研究」

## 主要な招待講演

1. Satoshi Sawai, "Integration of space and time information in long-range cell migration" The 59<sup>th</sup> Annual Biophysical Society Meeting Symposium "Emergent Properties and Collective Behaviors of Complex Systems" (2015年2月8日)(米国 Maryland, Baltimore Convention Center)
2. 澤井哲 「細胞運動にみる興奮性の時空間ダイナミクス」国際高等研究所 研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」2014年度第1回研究会 (2014年12月14日) 国際高等研究所
3. Satoshi Sawai, Wave geometries and cell shape dynamics, The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013 on Quantitative Bioimaging 2013年3月17日 岡崎基礎生物学研究所 日本(愛知県)
4. Satoshi Sawai, "Geometries of phosphatidylinositol waves and large-scale membrane deformation during spreading and random movement of *Dictyostelium*." International workshop on "Active Dynamics on Microscales: Molecular Motors and Self-Propelling Particles" (オランダ、ライデン Lorentz Center)(2012年9月19日)

## 著作物

1. 石原秀至 澤井哲 「反応-拡散-駆動系として理解する細胞の形態変化」  
日本物理学会誌 70(1) p.25-30 (2015)
2. 澤井哲 石原秀至 中島昭彦 「興奮系の自己組織化現象からみる細胞動態」  
実験医学 Vol 31(8) 羊土社 2013年4月号 p. 1217-1223.

## プレスリリース

1. 中島昭彦 澤井哲 「粘菌の「集まれ！」の合図への応答にはダイオードのような整流作用が働いている。」(東京大学プレスリリース 2014/11/6)
2. 石原秀至 澤井哲 「アメーバ細胞の自由自在な形状を決定する仕組みを解明 - アメーバ内で自己組織化する波動と特異点 -」(東京大学プレスリリース 2013/3/8)