

研究終了報告書

「アクチン細胞骨格動態の構成的理解と制御」

研究期間:2020年12月～2024年3月

研究者:宮崎 牧人

1. 研究のねらい

動物細胞の形態変化は、細胞膜を裏打ちするアクチン細胞骨格が生み出す力の精密な時空間制御によって駆動される。アクチン細胞骨格は、主にアクチン線維とミオシン分子モーターから構成される「動的な高次構造体」であり、構造の多様な変化が細胞運動や細胞分裂、極性形成など、生命活動に本質的な機能を生み出している。さらに、それらの機能を組み合わせることで、受精卵から身体が出来上がる複雑な発生のプロセスをも可能にしている。

私は、細胞骨格が細胞機能を制御する仕組みを解明するために、精製タンパク質および細胞質抽出液を封入した人工細胞を構築し、主に細胞骨格タンパク質と脂質膜から構成される非常に単純な系でも、生細胞で観察される多様な細胞骨格構造の自己組織化や細胞機能を再現できる事例をいくつか発見してきた。しかし、我々が構築して来た再構成系と生細胞との間には未だに大きな隔りがある。それは我々の系では1回、しかも一方向の変化しか起きないのに対して、細胞では時々刻々と、さらに場合によっては双方向に繰り返し細胞骨格構造を変化させることで極性形成、分裂、運動など様々な機能を次々に繰り返していることである。アクチン細胞骨格は Rho や Rac などの上流の制御シグナルに応じてダイナミックに構造を変化させる柔軟性を持っていることが、生細胞を用いた研究で明らかになっている。その一方で、温度変化や外力などによるアクチン活性の変調に耐えられる頑強性も持ち合わせていなければ、細胞分裂や極性形成など、失敗が決して許されない重要な細胞機能を司ることは出来ないはずである。外乱に耐えられる頑強性とダイナミックな構造転移を引き起こせる柔軟性を、どのような仕組みで同時に獲得できているのだろうか？アクチン細胞骨格の多様な構造転移と、それに伴う細胞の形態変化を支配する力学法則はどのようなものか？

本さがけ研究では、動物細胞の細胞膜表層にもっとも普遍的に存在し、細胞の形態転移を駆動している「コルテックス」と呼ばれるアクチン-ミオシンの網目構造に焦点を絞る。これまでの研究で得られた知見と細胞骨格再構成の独自技術を統合し、アクチン-ミオシンの分子活性の時空間制御が細胞骨格の構造転移、細胞態転移を引き起こし、細胞機能が発現するまでの連鎖反応を支配する法則を解明するという挑戦的目標を掲げた。

2. 研究成果

(1) 概要

アクチン-ミオシン活性の制御メカニズム: アクチン-ミオシンの収縮力の制御機構について2つの研究テーマを遂行した。まず、アクチン-ミオシンの収縮力による膜変形を制御しているドレブリンと呼ばれるアクチン結合タンパク質に着目した。アクチンとミオシン、ドレブリンからなる収縮システムの再構成系を構築。赤外レーザーを用いた温度操作技術を顕微鏡に導入することで、体温付近での実験に成功した。その結果 37℃付近で、ドレブリンの濃度依存的な収縮力の制御が最

も鋭敏になることを発見した(テーマ A)。ミオシンは、その調節軽鎖のリン酸化によって力発生が制御されているが、その反応機構は不明な点が多い。そこで調節軽鎖をリン酸化させる酵素の中で主要な酵素のひとつであり、細胞運動や分裂、アポトーシスなどの膜変形を制御している ZIP キナーゼの生化学反応の解析を行なった。得られた反応速度式を用いて、ZIP キナーゼによるミオシンのリン酸化反応を精度高く予測することが可能になった(テーマ B)。

細胞骨格の構造転移メカニズム: アクトミオシンの分子活性の時空間制御が細胞骨格の構造転移を生じさせる仕組みを解明するために、フォトソグラフィ技術を用いて構築したパターン化脂質膜上で、任意の形状のアクチンネットワーク構造を自己組織化させる基盤技術を開発した(テーマ C)。この技術によって、アクチン重合活性を調節する因子の空間制御を可能とした。共焦点顕微鏡によるマイクロメートルスケールの三次元構造観察と、全反射蛍光顕微鏡による膜上での分子動態の1分子観察を組み合わせることで、脂質膜上での局所的な分子反応から細胞スケールの高次構造体が自己組織化する仕組みの解明が可能になると期待される。

細胞形態転移メカニズム: テーマ B で解明した ZIP キナーゼによるミオシン活性化の分子機構を再構成系に導入することで、動的コルテックスの再構成を行なった。リボソームの内側にコルテックスを再構成し、ZIP キナーゼによるミオシンのリン酸化でコルテックスの収縮力を増大させることで、ブレブ様の膜変形を誘導させることに成功した(テーマ D)。ブレブ形成には2通りあり、その仕組みを物理モデルで定性的に説明することに成功した。本研究は、アクトミオシンの収縮反応が細胞の形態変化、さらには細胞機能を生み出す仕組みの解明につながると期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「アクチン結合タンパク質ドレブリンによる収縮力制御の分子メカニズムの解明」(Hiroaki Kubota, Hiroyuki Ogawa, Makito Miyazaki (co-first), et al., Nano Letters 2021)

哺乳類の胎児は、母親の胎内で成長する。このとき、神経細胞の軸索が伸長し、別の神経細胞とつながることで正常な脳が発達する。軸索が伸びる仕組みは成長円錐と呼ばれる先端部にあり、成長円錐に局在し、アクトミオシンの収縮力による膜変形を制御しているドレブリン E と呼ばれるタンパク質に着目した。アクチンとミオシン、ドレブリン E からなる収縮システムの再構成系を構築し、赤外レーザーを用いた素早く精密な温度操作技術を顕微鏡による計測技術と組み合わせることで、体温付近での実験に成功した(図 1a)。

室温の時は、これまでの報告通り、ドレブリンEがミオシンとアクチン繊維の相互作用を阻害するという結果であった。赤外レーザーを用いてサンプルの温度を上げると、瞬時にドレブリンEが結合したアクチン繊維が動き出すこと

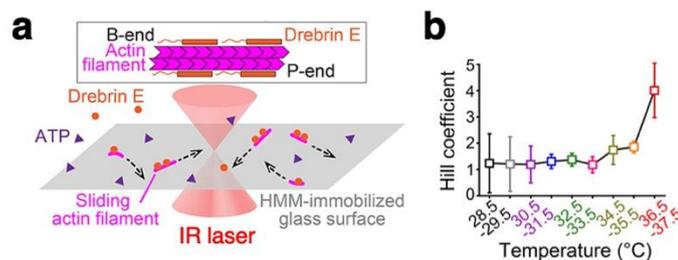


図1. ドレブリンによる収縮力制御の再構成実験 a. 実験系, b. ドレブリンの濃度とアクチン繊維の滑り速度の関係から得られたHill係数の温度依存性

を見出した。温度とドレブリンEの濃度を様々に変えて実験を繰り返したところ、37°C付近で、しかもちょうどドレブリン E が生体内の濃度の範囲にあるとき、濃度が少し変われば力の On/Off が鋭敏に変化する (Hill 係数が最大になる)、すなわち On/Off を効果的に切り替えられる特徴があることを発見した (図 1b)。この発見は、母体の体温が一定に維持されることで、アクチオシンの収縮力の制御が精密化され、神経系の正常な成熟を支える役割があることが示唆された。

研究テーマ B「ミオシンのリン酸化反応による収縮力制御の分子メカニズムの解明」 (Makito Miyazaki, Mayu Yamaguchi, Yosuke Yamazaki, *under revision*)

ミオシンは、その調節軽鎖 (MRLC) のリン酸化によってモーター活性が活性化され、収縮力を生み出せようになることが知られているが (図 2a)、リン酸化の反応機構は不明な点が多い。そこで調節軽鎖をリン酸化させる酵素の中で主要な酵素のひとつであり、細胞運動や分裂、アポトーシスなどの膜変形を制御している ZIP キナーゼの生化学反応の解析を行なった。まず、リコンビナントの調節軽鎖を用いて、ZIP キナーゼによる調節軽鎖の T18 と S19 のリン酸化は互いに独立であること、S19 のリン酸化反応が T18 に比べて少し速いことを明らかにした (図 2b)。続いて、調節軽鎖のみの場合のリン酸化速度と、調節軽鎖がミオシン重鎖と複合体を形成している場合のリン酸化速度を比べたところ、調節軽鎖がミオシン重鎖と複合体を形成している場合の方が、リン酸化速度が低下することを見つけ、その原因は ZIP キナーゼがミオシン重鎖とも相互作用することを共沈実験によって見出した。調節軽鎖の T18 と S19 それぞれのリン酸化のミカエリスメンテン型の反応速度式に加えて、ZIP キナーゼとミオシン重鎖との相互作用 (拮抗阻害) を取り入れた3つの連立式で、ZIP キナーゼによるミオシン複合体のリン酸化反応を精度高く予測することができた (図 2c)。

これら一連の実験によって、ZIP キナーゼがミオシンを活性化させる生化学反応機構の全容を明らかにした。

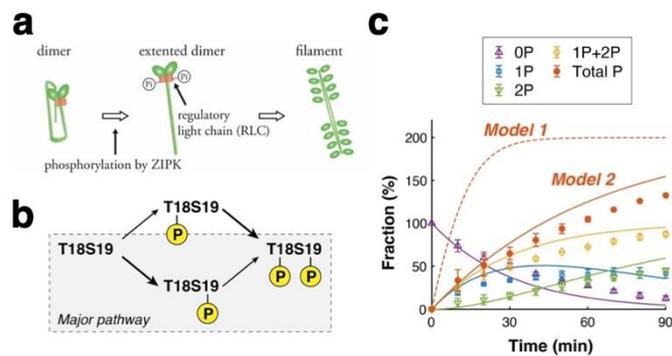


図 2. ミオシン調節軽鎖のリン酸化による収縮力制御メカニズム a. ミオシンの活性制御メカニズム, b. ZIPキナーゼによるミオシン調節軽鎖のリン酸化反応経路, c. ZIPキナーゼによってリン酸化されたミオシン複合体 (重鎖+軽鎖) の時間変化。点: 実験データ、破線: ZIPキナーゼとミオシン軽鎖の相互作用のみを考慮したモデル、実線: ZIPキナーゼとミオシン重鎖の相互作用も含めたモデル

研究テーマ C「アクチン細胞骨格動態の時空間制御技術の開発」

パターン化脂質膜 (Yosuke Yamazaki, Yuuri Miyata, Kenichi Morigaki, Makito Miyazaki, *Nano Letters* 2024)

細胞膜上にはアクチン重合やミオシンのモーター活性を調節する因子が複数種類局在し、それらの濃度の時空間的な変化が、膜直下に形成されるアクチン細胞骨格動態を制御していると考えられている。この仕組みを解明するために、フォトソグラフィ技術を用いて構築した

パターン化脂質膜上で、任意の形状のアクチンネットワーク構造を自己組織化させる基盤技術を開発した。具体的には、光で重合する性質を持つ人工脂質を用いてガラス基板上に脂質二重膜を張り、パターン照明で局所的に人工脂質を重合させた後（以下、ポリマー膜と呼ぶ）、重合していない脂質を界面活性剤で洗い流した。その後、ポリマー膜が張られていない箇所に、別の種類の脂質膜をリポソーム融合法で展開させることで（以下、流動膜と呼ぶ）、パターン化脂質膜を構築した（図 3a）。流動膜に Ni-NTA を融合した脂質を混ぜておき、His-tag を融合したアクチン重合活性化因子を局在させることで、アクチン重合を空間的に制御可能にした（図 3b）。この技術によって、再構成系の構成タンパク質の組成や濃度などの生化学的パラメーターだけでなく、アクチン重合活性化因子の空間的局在を自在に制御できることが可能となった。共焦点顕微鏡によるマイクロメートルスケールの三次元構造観察と、全反射蛍光顕微鏡による膜上での分子動態の1分子観察を組み合わせることで、脂質膜上での局所的な分子反応から細胞スケールの高次構造体が自己組織化する仕組みの解明が可能になると期待される。

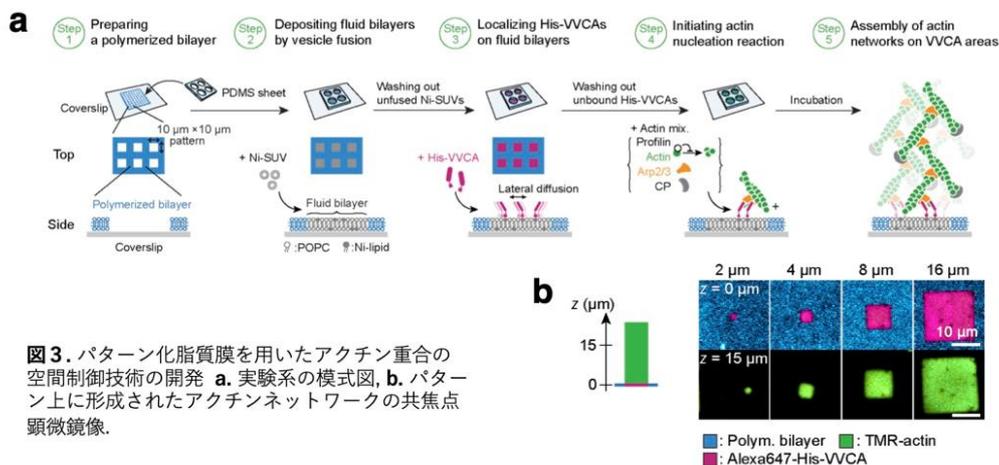


図 3. パターン化脂質膜を用いたアクチン重合の空間制御技術の開発 a. 実験系の模式図, b. パターン上に形成されたアクチンネットワークの共焦点顕微鏡像。

研究テーマ D「膜変形プロセスの再構成」

アクチンコルテックスは、分裂期に見られる細胞の球状化 (Cell rounding) や、細胞運動時に見られるブレブと呼ばれる膜突出や、アポトーシス時に見られる、複数のブレブ形成が同時に生じる現象など、さまざまな膜変形プロセスを制御していると考えられているが、その仕組みは未解明な部分が多い。そこで、コルテックス動態と多様な膜変形モードの対応関係を明らかにするために、リポソーム内側にコルテックスを自己組織化させ、その収縮による膜変形の再構成を行なった。具体的には、リポソームの内側にアクチンネットワークを再構成し、テーマ B で解明した ZIP キナーゼによるミオシン活性化の分子機構をこの系に導入することで、収縮力の増大に伴う膜変形を誘導させることに成功した。ブレブ形成には2通りあり、その仕組みを物理モデルで定性的に説明することに成功した。

また、本さがけ領域内の交流を通じて、これまでは交流のなかった研究者と共同でシンポジウムを主催したり、共同研究の可能性についてたくさんの議論が生まれた。さがけ研究者在任期間中は研究スペースの都合とマンパワー不足、さらに異動が重なったこともあり、共同研究の開始には至れなかったが、今後数年間のうちに領域内の研究者と大型予算を申請し、共同研究を開始したいと考えている。

3. 今後の展開

運動・分裂機能を備えた人工細胞の創成は、生命の本質的な機能を人為的に再現する挑戦であり、合成生物学において最重要な研究テーマである。本さがけ研究で着目したアクチン細胞骨格は、動物細胞の運動や分裂を駆動する高次構造体であるため、本研究で得られた成果は合成生物学の発展に資すると期待される。本研究で得られた研究成果を基盤として、10年以内には運動機能や分裂機能を備えた人工細胞が開発されると期待している。「運動・分裂機能の再構成」という成果は、合成生物学のみならず細胞生物学や発生生物学等、基礎生物学全般に大きなインパクトを与えるに違いない。本研究で開発した人工細胞をプラットフォームとして構成要素を追加することで、アクチン細胞骨格が様々な生命機能を制御している仕組みを構成的かつ統一的に理解することが可能になると期待される。そうなれば、アクチン動態を光などで操作することで、細胞機能や発生過程を操り、本来の機能を抑制したり、本来備わっていない機能を発現させたりすることが可能になり、基礎生物学から再生医療まで多方面への応用展開が期待される。さらに将来的には、人工細胞を生体組織へ埋め込み、健康状態をモニターできる新規デバイスの開発や、生体組織に埋め込んだ人工細胞から発するシグナルで周辺の生細胞の状態を操作し、組織の正常な再生を促す技術の開発など、医学や再生医工学分野への貢献が期待される。

4. 自己評価

かなり挑戦的な目標を掲げていたこと、研究期間中に異動が重なったこともあるが、研究期間中に半分ほどしか目標を達成することが出来なかったのは、見込みが甘かったと考えている。研究費の執行に関しては、備品等の購入は必要最低限に抑えて、技術補佐員2名を雇用して研究のバックアップ体制を整えられた点は良かったと思う。そのおかげで研究期間中に効率的に実験を進めることができ、複数の論文がまとまりつつある。一方で、もう少し組織的な運営を行えば、より短期間で同等の成果をあげることが出来たのではないかという反省点もある。得られた教訓は今後の研究室の運営に活かしたい。本研究を通して、細胞骨格が司る細胞機能の自在制御、並びに高次の機能を有した有益な人工細胞の創成に資する一定の研究成果が得られたと自己評価する。発生生物学や合成生物学、タンパク質科学など、異分野の学会やシンポジウムから招待講演を依頼されたことは、本研究で得られた成果の社会・経済への波及効果が潜在的にある可能性を示している。その一例として、本研究で得られた成果をきっかけとして、科研費 学術変革(A)「生体秩序力学」の計画班として参画することになった。本領域では、人工細胞を生体組織に埋め込む技術を開発することを目指しており、人工細胞の医工学分野への応用展開が期待される。

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. Hiroaki Kubota, Hiroyuki Ogawa, Makito Miyazaki (co-first), Shuya Ishii, Kotaro Oyama,

Yuki Kawamura, Shin'ichi Ishiwata, and Madoka Suzuki, "Microscopic temperature control reveals cooperative regulation of actin-myosin interaction by drebrin E", *Nano Letters*, 2021, 21, 9526-9533.

神経細胞の成長円錐で、アクチン・ミオシンの収縮力による膜変形を制御しているドレブリン E と呼ばれるタンパク質に着目した。アクチンとミオシン、ドレブリン E からなる収縮システムの再構成系を構築し、赤外レーザーを用いた素早く精密な温度操作技術を顕微鏡による計測技術と組み合わせることで、体温付近での実験に成功した。その結果 37℃付近で、ドレブリン E の濃度依存的な収縮力の制御が最も鋭敏になることを発見した。体温の精密な制御には、タンパク質が出す力を整え、神経系の正常な成熟を支える役割があることが示唆された。

2. Makito Miyazaki, Mayu Yamaguchi, Yosuke Yamazaki, "Quantitative characterization of the kinetics of myosin phosphorylation by ZIP kinase", *under revision*.

ミオシンは、その調節軽鎖のリン酸化によって活性化される。本研究では調節軽鎖をリン酸化させる酵素の中で主要な酵素のひとつである、ZIP キナーゼの生化学反応の解析を行なった。ZIP キナーゼによる調節軽鎖の T18 と S19 とリン酸化は互いに独立であること、S19 のリン酸化反応が T18 に比べて少し速いことを明らかにした。ZIP キナーゼはミオシン重鎖とも相互作用することを発見し、この相互作用(拮抗阻害)を取り入れたミカエリスメンテン型の反応速度式で、ZIP キナーゼによるミオシン複合体のリン酸化反応を精度高く予測することを可能にした。

3. Yosuke Yamazaki, Yuuri Miyata, Kenichi Morigaki, Makito Miyazaki, "Controlling physical and biochemical parameters of actin nucleation using a patterned model lipid membrane", *Nano Letters*, 2024, 24, 1825-1834.

フォトソグラフィ技術を用いて構築したパターン化脂質膜上で、任意の形状のアクチンネットワーク構造を自己組織化させる基盤技術を開発した。この技術によって、再構成系の構成タンパク質の組成や濃度などの生化学的パラメーターだけでなく、アクチン重合活性化因子の空間的局在を自在に制御できることが可能となった。共焦点顕微鏡によるマイクロメートルスケールの三次元構造観察と、全反射蛍光顕微鏡による膜上での分子動態の1分子観察を組み合わせることで、脂質膜上での局所的な分子反応から細胞スケールの高次構造体が自己組織化する仕組みの解明が可能になると期待される。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のは件数にのみ含む)

(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

1) 2022 年 4 月 8 日 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

招待講演

1) 「最小構成分子システムによる細胞運動・分裂機能の再構成」、日本化学会第 101 春季大会、2021/3/19

- 2) 「構成論的アプローチで探る細胞骨格機能の自己組織化原理」、基生研セミナー、2021/3/29
- 3) 「人工細胞から探る細胞極性の自己組織化原理」、日本発生生物学会、2021/4/26
- 4) 「人工細胞のサイズ依存性から紐解く細胞内対称性の制御メカニズム」、日本分子生物学会、2021/12/1
- 5) “In vitro reconstitution of the actin cytoskeletal dynamics”, RIKEN BDR Seminar, 2022/4/11
- 6) “Reconstitution of cytoskeletal structures and cell functions”, IPR x RIKEN(BDR) Symposium 2023, 2023/2/21
- 7) 「アクチン細胞骨格動態の再構成」、理研シンポジウム: Synthetic Biology – 生物学の新たな潮流 –、2023/8/2
- 8) 「構成的細胞生物学: つくることで紐解く生命現象の自己組織化メカニズム」、第 63 回 生物物理若手の会 夏の学校、2023/9/6
- 9) “Morphological transitions of lipid vesicles driven by the contraction of cortical actomyosin networks”, 第 61 回 日本生物物理学会、2023/11/4
- 10) “Reconstitution of the membrane blebbing process driven by the contraction of cortical actomyosin networks”, 第 46 回日本分子生物学会年会、2023/12/7
- 11) 「人工細胞で切り拓く生命科学研究の現状と将来展望」、第 1 回 千里 LF 産学学術交流会、2023/12/22
- 12) “Self-assembly of actin cytoskeletal dynamics in artificial cells”, 25th iCeMS International Symposium "Self-Assembly Science for Unlocking Life's Secrets", 2024/1/11
- 13) “Building the cell from molecules: Reconstitution of actin cytoskeletal dynamics and functions”, OIST - さきがけ高次構造体シンポジウム、2024/1/19
- 14) “Building the cell from molecules: Reconstitution of actin cytoskeletal dynamics and cell functions”, The 9th RIKEN Life Science Retreat, 2024/1/29

報道

- 1) 2021 年 12 月 3 日 科学新聞「胎児の神経細胞成熟 温度で精密に制御」