

細胞遊走を制御するアクチン細胞骨格の時空間的自発的統合制御原理の解明

所属：立命館大学 薬学部

助成対象者：河野 貴子

共同研究者：

概要

細胞遊走は、免疫応答、組織の再生、癌や動脈硬化症などにおいて重要な役割を果たす。アクトミオシンの収縮は遊走細胞の後方で優位に亢進しており、遊走の駆動力を発生するだけでなく、遊走方向の前後における非対称な形態の形成、遊走方向の安定化など、細胞遊走全般を制御する。このため、遊走細胞において、アクトミオシンの収縮は、時間的・空間的に統合された制御を受けるが、細胞全体で時間的・空間的に調和したアクトミオシンによる収縮を制御するメカニズムは明らかではない。本研究では、細胞遊走の遂行を担う一連のアクトミオシンの収縮を時間的・空間的に統合制御するメカニズムを数理解析と実験的検証により明らかにする。

Abstract

Cell migration plays an important role in immune responses, tissue regeneration, and development of cancer and arteriosclerosis. Actomyosin contraction is predominantly enhanced at the rear of migrating cells, and generates the driving force for motility. In addition, the posterior actomyosin contraction induces asymmetric cellular morphology, and stabilizes migrating direction. It is essential for cell migration to control the spatiotemporal actomyosin contraction appropriately. However, it has not been clarified what mechanisms regulates harmonic spatiotemporal actomyosin contraction. In this study, we have clarified the mechanisms producing harmonic spatiotemporal actomyosin contractility using both theoretical and experimental analysis.

研究内容

【背景・目的】

細胞遊走は、免疫応答、組織の修復・再生、癌や動脈硬化症などの疾患の進行において重要な役割を果たす。アクチオシンの収縮は遊走細胞の後方で優位に

亢進しており、遊走の駆動力を発生するだけでなく、遊走方向の前後における非対称な形態の形成、遊走方向の安定化など、細胞遊走全般を制御する(図 1)。このため、遊走細胞において、アクチオシンの収縮は、時間的・空間的に統合された制御を受ける。しかしながら、脳のような中枢機構を持たない遊走細胞において、細胞全体で時間的・空間的に調和したアクチオシンによる収縮を制御するメカニズムは明らかではない。本研究では、細胞遊走の遂行を担う一連のアクチオシンの収縮を時間的・空間的に統合制御するメカニズムの解明を目指す。

遊走細胞の後方では、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho が Rho-kinase を活性化し、ミオシンをリン酸化することにより、アクチオシンが収縮する(図 2)。一方、リン酸化ミオシンは、ミオシン脱リン酸化酵素によって脱リン酸化され、アクチオシンは弛緩する(図 2)。

ミオシン脱リン酸化酵素は Rho-kinase によってリン酸化され、リン酸化されたミオシン脱リン酸化酵素は酵素活性が抑制される(図 2)。このように、

Rho-kinase とミオシン脱リン酸化酵素の活性バランスが、遊走細胞後方でのアクチオシンの収縮を制御している。そこで、ミオシンのリン酸化の制御メカニズムを明らかにするために、数理モデルを構築した。単純化のために、まず空間的な拡散を含まない均一系で、ミオシンのリン酸化の制御システムの解析を行った。

血管内皮細胞にトロンビン作用させると Rho/Rho-kinase を介してミオシンのリン酸化が亢進する。トロンビンは Rho を一過的にしか活性化しないが、下流シグナルであるミオシンのリン酸化は持続する。この特徴的な挙動をヒントにミオシンのリン酸化の制御原理を解析する。トロンビンによるミオシンのリン酸化を再現できる数理モデルを構築し、解析した。その結果、既知のシグナル伝達経路のみでは、ミオシンのリン酸化の挙動を再現することは難しく、新規シグナル伝達経路の存在が不可欠であること、また、新規シグナル伝達経路は、ミオシン脱リン酸化酵素が自己脱リン酸化することで、脱リン酸化酵素活性を亢進させるポジティブフィードバックであることが推定された(図 2)(Kaneko-Kawano *et al.*

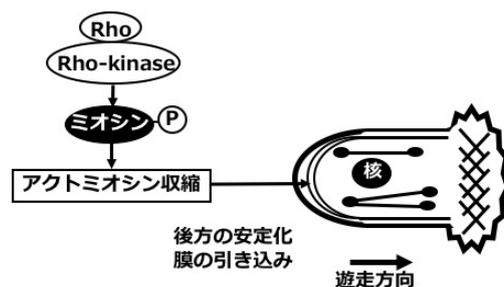


図 1 遊走細胞におけるアクチオシンの収縮制御

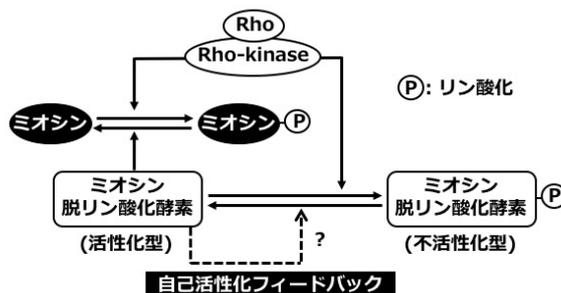


図 2 ミオシン脱リン酸化酵素の自己活性化フィードバック

2012)。また、ミオシン脱リン酸化酵素によるポジティブフィードバックによって、ミオシンのリン酸化が「双安定性」というスイッチのような特徴を示すことを予測した (Kaneko-Kawano *et al.* 2012)。双安定性は上流シグナルが一過的にでも閾値を越えると不可逆的に活性が切り替わる。すなわち、Rho の活性化が一過的であっても、ミオシンのリン酸化は持続すると考えられる。また、ミオシンのリン酸化の双安定性は上流シグナルの組み合わせによって、収縮の持続や振動のようなリズムが、空間における拡散を考慮すると自発的なパターン形成が起こり、周期的な細胞尾部における収縮や遊走方向の維持、収縮の非対称性局在を生み出す可能性がある(図 3) (Kondo & Miura, 2005)。加えて、申請者が構築した数理モデルは、神経の活動電位の伝播モデルであるホジキン-ハクスレーモデルの要素を抽出したフィッツフュー-南雲方程式と数式的にはほぼ同じ形をしている。フィッツフュー-南雲方程式は進行波という分子活性が空間内を一定方向に伝播する波を発生することが知られている (図 3) (Murry, 2002)。本研究では、双安定性によって生み出されるパターンやリズムの発生が、遊走細胞における一連のアクトミオシンの収縮を統合的に制御する原理であるかを検討していく。このすべての基盤は、ミオシンのリン酸化が双安定性を示すことにあり、ミオシンのリン酸化の双安定性を誘導するには、フィードバックループの存在が不可欠である。よって、本研究では、第一に数理解析から予測されたミオシン脱リン酸化酵素による自己脱リン酸化フィードバックが実在するか検討した。

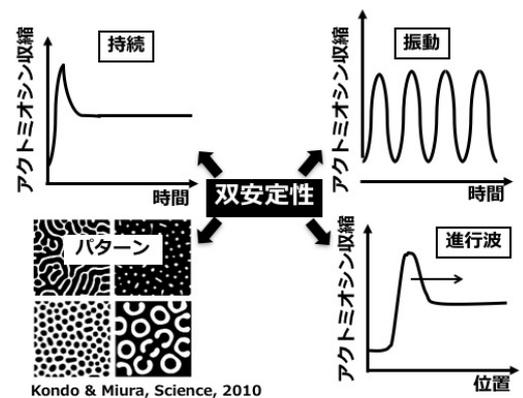


図3 双安定性から生み出されるパターンとリズム

【結果】

1) ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化シグナル伝達経路の実証

リン酸化 CPI-17 は、ミオシン脱リン酸化酵素の活性抑制タンパク質として知られている。そこで、CPI-17 のリン酸化模倣変異体を培養細胞に過剰発現させ、ミオシン脱リン酸化酵素のリン酸化レベルを測定した。その結果、CPI-17 を過剰発現した細胞ではミオシン脱リン酸化酵素のリン酸化が亢進していた。すなわち、*in vivo* において、ミオシン脱リン酸化酵素が自己脱リン酸化することが示唆された。次にミオシン脱リン酸化酵素が他の脱リン酸化酵素を介さず、直接、自己脱リン酸化するか *in vitro* で検証した。精製したミオシン脱リン酸化酵素のみを加え、試験管内で脱リン酸化反応を行なった。その結果、自己脱リン酸化反応が見られたことから、ミオシン脱リン酸化酵素は他の酵素を介さず、直接、自己脱リン酸化することが明らかになった。これらの結果から、数理解析から予測されたミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化によるポジティブフィードバックが実

在することを実験により証明することができた。

2) ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化阻害変異体の探索

細胞内におけるミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化シグナル伝達経路の役割を解析するために、ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化を特異的に阻害する阻害変異体の作製を行った。ミオシン脱リン酸化酵素は基質タンパク質と結合し、脱リン酸化する。ミオシン脱リン酸化が自己脱リン酸化するのであれば、ミオシン脱リン酸化酵素同士が結合すると考えられる。そこで、ミオシン脱リン酸化酵素同士の結合領域を同定した。さらに、結合領域のみの変異体を過剰発現するとミオシン脱リン酸化酵素同士の結合が阻害され、自己脱リン酸化を抑制することができた。よって、この変異体をミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化阻害変異体として用い、生理機能の解析に用いた。

3) ミオシン脱リン酸化酵素による自己脱リン酸化シグナル伝達経路の生理的意義の解析

ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化が細胞機能を制御する生理的なシグナル伝達経路であるか、血管内皮細胞における生理的意義を検討した。血管内皮細胞は、血管の内腔に存在し、一層のシート状の構造をしている。さまざまな刺激により、細胞間の接着を緩めて、血管の透過性を亢進させ、選択的な物質透過を制御している。内皮細胞にトロンピンを作用させると Rho/Rho-kinase が活性化し、ミオシンのリン酸化を介して、アクトミオシンが収縮する。アクトミオシンの収縮は細胞間接着を崩壊させ、血管透過性を亢進する。そこで、ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化阻害変異体を過剰発現させ、血管透過性に対する影響を検討した。その結果、変異体を過剰発現させた血管内皮細胞では、ミオシンのリン酸化が亢進し、細胞間接着が崩壊することを見出した。このように、ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化が血管透過性のような細胞機能を制御する生理的な意義をもつシグナル伝達経路であることが明らかになった(投稿準備中)。

【今後】

本研究で、数理解析から推定された新規シグナル伝達経路、ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化シグナルの存在を実験により示すことができた。また、ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化シグナルは、血管内皮細胞において、透過性を制御することから、細胞機能を制御する役割を担ったシグナル伝達経路であることが明らかになった。ミオシン脱リン酸化酵素の自己脱リン酸化はポジティ

ブフィードバックループとしてはたらし、ミオシンのリン酸化を双安定に制御し、空間にパターンやリズムを生み出すと考えられる。今後は以下の点について取り組む予定である。

1) リン酸化ミオシンの双安定性の実証と細胞遊走における双安定性の役割の解析

本研究で、同定した新規ポジティブフィードバックループは数理解析から予測されたミオシンのリン酸化及びアクトミオシンの収縮の双安定制御に必要である。ポジティブフィードバックが実在したことから、ミオシンのリン酸化及び、アクトミオシンの収縮が双安定性を示す可能性が高まった。そこで、数理解析から予測されたようにミオシンのリン酸化が細胞内で双安定性を示すことを実証する。また、ミオシンのリン酸化の双安定性が細胞遊走をどのように制御するのか調べる。

2) 細胞遊走における時間的・空間的に統合されたアクトミオシンの収縮制御原理の解明

アクトミオシンの収縮が双安定であることを基盤とした数理モデルの構築を行い、遊走細胞におけるアクトミオシンの収縮動態を一元的に説明できる数理モデルの構築を目指す。さらに、数理解析から予測される制御原理が遊走細胞におけるアクトミオシンの収縮を一元的に制御するか検討する。

引用文献

- 1) **Kaneko-Kawano T.**, Takasu F., Naoki H., Sakumura Y., Ishii S., Ueba T., Eiyama A., Okada A., Kawano Y., Suzuki K.
Dynamic regulation of myosin light chain phosphorylation by Rho-kinase.
PLoS ONE. 7, 6, e39269, 2012
- 2) Kondo S., Miura T.
Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation.
Science, 328, 5999, 1616-1620, 2010
- 3) Murry J. D.
Mathematical Biology
Springer, 2002

本助成に関わる成果物

[論文発表]

- 1) Suzuki K., Kaneko-Kawano T.
Biological roles and therapeutic potential of G protein-coupled receptors for free fatty acids and metabolic intermediates.
J Phys Fitness Sports Med. 5, 3, 213-227, 2016
- 2) Kaneko-Kawano T., Suzuki K.
Mechanical stress regulates gene expression via Rho/Rho-kinase signaling pathway.
J Phys Fitness Sports Med. 4, 1, 3, 53-61, 2015

[口頭発表]

- 1) Kaneko-Kawano T., Suzuki K.
Rho-kinase によるミオシン軽鎖のリン酸化制御システムの解析
第 57 回日本平滑筋学会, 2015 年
- 2) Kaneko-Kawano T., Ohta A., Makimine K., Yamakawa Y., Suzuki K.
血管透過性制御におけるミオシン軽鎖のリン酸化制御システムの解析
第 62 回日本生化学学会近畿支部会, 2015 年

[ポスター発表]

- 1) Kaneko-Kawano T., Ohta A., Makimine K., Yamakawa Y., Suzuki K.
血管透過性制御におけるミオシン軽鎖のリン酸化制御システムの解析
第 62 回日本生化学学会近畿支部会, 2015 年