

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「オールオプティカルメカノバイオロジー
の創出に向けた技術開発と発生生物学への応用」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者：倉永 英里奈
(東北大学 大学院生命科学研究科
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

研究開発項目1)「オプティカルな手法による力学操作」では、細胞の力学過程を光で活性化・不活性化する技術の開発を目的とした。

倉永グループは、光刺激により会合状態が変化する光応答タンパク及び光により不活性化する蛍光タンパクを用いて、上皮細胞の力学発生装置であるアクチン制御分子を光活性化・不活性化させることに成功した。光力学活性化プローブを発現するショウジョウバエ系統を作製し、発生中の上皮組織に摂動を加えることで、中間目標である「ショウジョウバエ上皮組織の人工的変形」を達成した。光力学不活性化プローブとしては、光によるターゲットタンパク質の不活性化技術(CALI 法)を導入し、蛍光タンパク質 SuperNova を使用して、収縮に関与するMRLCの不活性化を *in vivo* で実現した。このプローブを使用して、組織形成過程における細胞接着リモデリングの新たなメカニズムを解明した。岡田グループは、生体内への光操作を成功させるためのサンプル固定と超解像観察法の確立および集光技術開発を行った。

研究開発項目2)「オプティカルな手法による力学計測」では、渡邊グループによって確立しているブリルアン散乱光計測システムおよび SHG 偏光計測を生命現象の観察に利用し、柴田グループと協力して細胞内の粘弾性を推定する計測原理の開発と検証を実施した。

渡邊グループは、光第二高調波顕微鏡を基盤とした生細胞内における筋活性評価技術確立し、倉永グループと共同で、ショウジョウバエ蛹内部における筋活性評価を実現した。より具体的には、単位収縮長当たり力発生に寄与するミオシンの比率を推定できた。また、光感受性ミオシン阻害剤を用いることで、生心筋細胞の拍動を光で制御することに成功した。ブリルアン散乱光顕微鏡による細胞内粘弾性計測は、生体分子によるブリルアン散乱メカニズムの解明が、それだけで大きな研究課題になることが判明したため、代替案であるマイクロレオロジー計測を基盤とした細胞内粘弾性計測を実施した。細胞内に遺伝子工学的に導入した蛍光プローブの挙動から核内 DNA の粘弾性を見積もる手法を確立し、その動態変化の検出にも成功した。岡田グループは、力学応答の蛍光プローブ開発と 1 分子揺動計測の開発を行った。柴田グループと共同で、細胞膜の揺らぎ等から膜の張力を推定する方法を開発している。

研究開発項目3)「オプティカルな手法による細胞動態」では、本研究提案により開発した基礎的技術(光操作・光計測)を用いて、ショウジョウバエ組織に人工的摂動を加え、発生過程で起こる生命現象を再現(実践)することを目指した。まず、倉永グループは、項目1)で構築した「ショウジョウバエ上皮組織の人工的変形」の変形メカニズム解明のため、上皮細胞のZ軸方向(頂端部、側部、基底部)に光応答装置を局在させるノックイン系統を作製して解析した。その結果、組織変形の力学制御に関する新しいメカニズムを解明した。柴田グループはこの新しいメカニズムを数理モデルに導入し、新たな上皮組織の人工変形モデルを構築した。この人口変形モデルにおける組織の力学計測については、渡邊グループと共同で実施した。また、項目1)で構築した光力学不活性化プローブについては汎用的であり、ショウジョウバエ組織にみられる細胞集団移動の力学モデルの検証についても活用し、2つの新たな制御分子の発見につなげることができた。

集団細胞移動への光力学計測技術の導入については、岡田グループと倉永グループで共同して遂行している。特に細胞内で自己集合する球状超分子複合体に蛍光タンパク質を融合した GEM (Genetically Encoded Multimeric-tag)を用いた計測法の開発については、すでにショウジョウバエ系統を用いて、集団移動する細胞での観察を開始している。力学計測の計算式の確立は、岡田グループと柴田グループにより開発中であり、それらを用いてショウジョウバエ組織の集団細胞移動の力学原理を解明し、成果報告へつなげる。

(2)顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

1. 光力学不活性化プローブの利用:細胞接着リモデリングに必要な sdk の発見

概要:

内在性のショウジョウバエミオシン制御軽鎖(MRLC)のC末端側に、CALIに最適な蛍光タンパク質 SuperNova を CRISPR/Cas9 法を用いてノックインした。作製したノックインショウジョウバエ系統を用いて、組織形成過程におけるアクチオシンの細胞局所での光不活性化を行い、組織形成過程における細胞接着リモデリングの新たな仕組みについて解明することに成功した。本成果は2019年度に論文報告し、JSTと東北大学の共同でプレスリリースを行った。

2. 光力学不活性化プローブの利用:細胞接着収縮に必要な pak3 の発見

概要:

本研究課題において作成した光力学不活性化プローブを、ショウジョウバエゲノムにノックインした系統を用いて、in vivo 集団細胞移動における細胞間のつなぎ替えに必要なタンパク質の検証を行った。上皮細胞集団移動に必要な接着結合部位のつなぎ替えの際に、収縮した接着面のシグナルの濃縮を抑制するキナーゼを同定し、新たなメカニズムの発見に貢献した。

3. ES 細胞の多能性維持に関連する新たなメカノケミカルフィードバックメカニズムの発見

概要:

マウス胚性幹細胞(ES 細胞)で働く転写因子(Nanog、Oct4)の挙動を1分子精度で定量解析し、ES 細胞の分化多能性を維持するための新しいメカノケミカルフィードバックメカニズムを発見した。ES 細胞のクロマチン構造は分化の進行に伴い凝集し、DNA 鎖は「堅く」なる。1分子計測とマイクロレオロジー解析を融合した細胞内粘弾性計測着打つにより、「堅さ」と転写因子と標的遺伝子座の相互作用の関係を初めて定量し、新しい「負のフィードバック機構」の提案に至った。

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. MRLC::SuperNova ノックインショウジョウバエ系統の作製

概要:

光力学不活性化型プローブである MRLC::SuperNova のノックインショウジョウバエ系統を用いた研究により、組織レベルでの細胞力学操作が光操作で可能であることが明らかになった。この方法を用いてメカノバイオロジー研究を実施することにより、発生工学や組織再生における細胞力学応答の理解へと繋がることが期待される。

2. 生体内深部の観察が可能な反射型 SHG 顕微鏡の開発

概要:

開発した光学計測技術をショウジョウバエ深部観察に適応させるための顕微鏡システム開発を行った。SHG 信号は微弱であるため、従来の SHG 顕微鏡は透過型であるが、渡邊グループで保有している SHG 検出の高感度化のノウハウを用いて、高感度な反射型 SHG 顕微鏡を構築し、透過型と比べて遜色のない SHG 画像を取得できている。この顕微鏡、および、上述の SHG 計測によるアクチオシン活性評価法は、モデルショウジョウバエの蛹内部での観察にも適用でき、本研究は、生きたショウジョウバエ蛹内部で筋活性を直接評価できた初めての実験例を提供するに至った。

3. SHG 偏光特性からアクチオシン活性を定量する解析法の確立

概要:

サルコメアが発する SHG 光の偏光特性から、細胞あるいは組織内部で筋肉繊維が収縮する際に働くタンパク質ミオシンの比率を非侵襲で定量できる解析法を確立した。この技術により、生きた心筋細胞内部において、サルコメアひとつのアクチオシン活性の定量に世界で初めて

成功した。当該技術は、メカノバイロロジー分野に新たな計測ツールとして期待されるほか、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)から作製した人工心筋細胞の品質管理や心疾患の診断、放射線被ばくによる晩発性心機能不全の調査などに大きく貢献すると期待できる。

< 代表的な論文 >

1. Uechi H, Kuranaga E., "The Tricellular Junction Protein Sidekick Regulates Vertex Dynamics to Promote Bicellular Junction Extension.", *Dev Cell*, 50(3):327-338. 2019

概要:

内在性のショウジョウバエミオシン制御軽鎖(MRLC)のC末端側に、CALIに最適な蛍光タンパク質 SuperNova を CRISPR/Cas9 法を用いてノックインした。作製したノックインショウジョウバエ系統を用いて、組織形成過程におけるアクチオシンの細胞局所での光不活性化を行い、組織形成過程における細胞接着リモデリングの新たな仕組みについて解明することに成功した。本成果は2019年度に論文報告し、JSTと東北大学の共同でプレスリリースを行った。

2. Fujita H, Kaneshiro J, Takeda M, Sasaki K, Yamamoto R, Umetsu D, Kuranaga E, Higo S, Kondo T, Asano Y, Sakata Y, Miyagawa S, Watanabe TM. "Estimation of crossbridge-state during cardiomyocyte beating using second harmonic generation", *Life Sci Alliance*. vol. 6, No. 7, e202302070, 2023

概要:

SHG 偏光計測を用いて、生きた細胞や組織の筋活性を非接触・非侵襲で定量的に評価する技術を確認し、疾患患者由来 iPS 細胞から分化した心筋細胞の疾患および治療評価、紫外線被ばくによる晩発的な心機能不全の評価、ならびに、ショウジョウバエ心疾患モデルの心機能不全の評価に応用できることを実証した。

3. Ishikawa S, Iwanaga Y, Uneyama T, Li X, Hojo H, Fujinaga I, Katashima T, Saito T, Okada Y, Chung U, Sakumichi N, Sakai T. "Percoration-induced gel-gel phase separation in a unique polymer network" *Nature Materials*, in press, 2023

概要:

本 CREST で開発した組織深部観察用高分解能イメージング技術を応用して、1 mm 角以上の大きさのゲルの3次元内部構造を観察し、粗密相分離構造形成を実証した。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 倉永グループ

研究代表者: 倉永 英里奈(東北大学大学院生命科学研究科 教授)

研究項目

- ・光力学操作プローブの開発
- ・光力学操作プローブの細胞・組織での検証

② 岡田グループ

主たる共同研究者: 岡田 康志(東京大学大学院理学系研究科 教授)

研究項目

- ・生体組織内での光操作技術および超解像解析技術の開発

③ 渡邊グループ

主たる共同研究者: 渡邊 朋信(理化学研究所生命機能科学研究センター チームリーダー)

研究項目

- ・顕微鏡システムの総合開発および光力学計測手法の開発

④ 柴田グループ

主たる共同研究者: 柴田 達夫 (理化学研究所生命機能科学研究センター チームリーダー)
研究項目

- ・力場を計算する数学手法の開発および力学シミュレーション

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

① 倉永グループ

- ・ EMBL Heidelberg の De Renzis 博士とオプトメカノプローブについて共同研究
- ・ Spanish National Research Council の Enrique Martin-Blanco 博士とオプトメカノプローブについて共同研究
- ・ National University of Singapore の Yusuke Toyama 博士とショウジョウバエ上皮組織の力学計測に関する共同研究
- ・ 東北大学病院腎高血圧内分泌科 阿部高明先生と筋収縮力計測に関して共同研究

② 岡田グループ:

- 超解像イメージング技術・プローブの提供
 - ・ 東北大学病院腎高血圧内分泌科 阿部高明先生
 - ・ 大阪大学生命機能研究科 深川竜郎先生
 - ・ 神戸大学医学系研究科 南康博先生
 - ・ 微生物化学研究所 野田展生先生
 - ・ 新潟大学医歯学総合研究科 神吉智丈先生
 - ・ 東京大学工学系研究科 酒井崇匡先生
- プローブ開発
 - ・ 名古屋大学 ITbM 多喜正泰先生
 - ・ 理化学研究所 CBS 宮脇敦史先生
- 細胞内力学計測
 - ・ Albert Einstein College of Medicine, Prof. Dr. Arne Gennerich
- 産業界との連携
 - ・ オリンパス: 3次元高速高分解能イメージング技術の開発
 - ・ JSR: 超解像イメージング技術の応用(詳細は秘匿事項)
 - ・ 旭化成: 超解像イメージング技術の応用(詳細は秘匿事項)
 - ・ 横河電機: イメージングをベースにした操作技術開発(詳細は秘匿事項)

③ 渡邊グループ: 産業界との連携

- ・ ベンチャー事業化: ビジネスコンペ(広島テックプランター)にてベンチャーキャピタル賞を受賞し、広島地域におけるコネクションを構築した。
- ・ 力学計測を応用した魚の熟成評価(詳細は秘匿事項)。

④ 柴田グループ:

細胞や組織のメカノバイオロジーに関する共同研究(Dr. Yu-Chiun Wang(理研)、他)