

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

「基質の地形と接着性によって変調されるアメーバ形態のダイナミクス」

"Modulation of amoeboid cell morphology by substrate topography and adhesivity"

氏名 本田 玄

真核細胞の多くはアクチン骨格系の構築と解体に媒介された、膜の伸展と収縮の素過程からなる変形を示す。細胞の形態変化および遊走は、細胞の栄養摂取、分裂、発生、組織修復、免疫応答、癌の浸潤といったあらゆる機能の基礎となる過程であり、環境からのさまざまな制約に対する適応性を備えている。細胞の形態は骨格系に支えられたものであり、環境要因への対処の多くは遺伝子発現の変化を待たない即時的なものであるから、細胞の形態および行動における環境適応性は細胞骨格系の状態とその制御の性質に依る面が大きい。本研究では、アメーバ細胞の形態変化の過程を主な対象として、基質の地形と接着性が及ぼす影響についてそれぞれ解析した。

第1部では、基質表面の地形に依存した細胞の形態変化を解析した。細胞の移動や貪食のような過程は、基質表面に沿った膜の伸展によって媒介されるため、基質の硬さや地形といった物理的な要因に影響される。基質表面に存在する数十 nm～数  $\mu\text{m}$  スケールの溝や山型のライン（以下、リッジ）の形状は、これに沿った方向への細胞の伸展や移動を促すことから、生体内では細胞外マトリックスを構成するコラーゲン繊維等の配

向が神経ネットワークの構築や、組織の修復、免疫応答、癌の浸潤などに関わると考えられている。貪食は、バクテリアのような直径数マイクロメートルの粒子を細胞膜の変形によって細胞内へと取り込む過程であるが、その成否が粒子の大きさだけでなく形状にも左右されることが報告されている。貪食過程においては、粒子との接触面から膜の変形が生じ、F-アクチンの重合によってカップ状の膜構造(ファゴサイティックカップ)が形成される。カップの先端は粒子表面に沿って伸展していき、粒子を完全に包み込んだところで膜が閉じて貪食胞が形成され、粒子は細胞内に取り込まれて分解される。粒子の形状が貪食の成否を分けることは、細胞膜の伸展過程が基質表面の地形によって影響されることを示しているが、この点がいま一步明らかとなっていないのは、細胞と粒子の相対的な向きをそろえることの難しさや、粒子形状の種類の制約といった実験的な困難が一因である。モデル生物である細胞性粘菌では、これまでに細胞の運動や貪食に関わるアクチン構造の分子的な構成がよく調べられている。細胞性粘菌においては、カップ状の膜構造の形成には Ras GTPase やイノシトールリン脂質 PI(3,4,5)P3 等が関わり、細胞膜上に F-アクチンのスポット状の局在が形成されることを必要とする。これに類似の分子構造をもつスポット状の F-アクチン構造は細胞の基質面側にも見出され、アクチン波と呼ばれている。アクチン波を構成する分子の空間配置は、貪食を媒介するカップ状の膜構造と知られている限りすべて一致している。また、Ras GTPase や PI3K の活性制御に干渉した際にこれらの生成頻度や持続性は同様の傾向で変化することから、同一の Ras、PI3K、F-アクチン間のフィードバック経路を介した F-アクチンの一過的な重合反応によって形成されることが示唆されている。本研究では、集合期の細胞性粘菌の底面に形成されるアクチン波を対象とし、微細加工技術によって作製したマイクロスケールの構造をもつ基質上において、その生成、伝播、消滅の過程を解析した。その結果、基質上のリッジ構造によって細胞底面でのアクチン波の生成率が上昇し、生成位置は溝よりもリッジ側へ偏る傾向が見られた。また、生起後の波は基質上の凸曲面上へ誘導され、凹曲面上からは排除される傾向があることが明らかにした。興味深いことには、基質の曲率に依存したアクチン波の伝播に伴い、リッジに沿った細胞の直進運動や、方向転換、細胞前端の分岐などが観察された。アクチン波を伴った細胞のリッジ構造への追従性は、PI3K 活性の阻害、基質接着、走化性誘引物質 cAMP による刺激によってアクチン波を消滅させることで失われた。PI3K への依存性から、この過程は先行研究で報告されているナノスケールの地形に沿った F-アクチンの伝播を伴う PI3K 非依存性の細胞移動とは異なるものと考えられる。以上から、基質表面のマイクロスケール

ルのリッジ構造がアクチン波の形成を促進し、アクチン波の伝播とそれに伴う膜の伸展を誘導すると結論した。

第2部では、基質接着性と細胞の形態の関係を解析した。細胞の形態は時々刻々と移り変わるが、特定の形状はくりかえし出現するため、細胞には種類によって典型的な形態があるとみなすことができる。繊維芽細胞は紡錘型をとり、神経細胞は軸索や樹状突起のような特徴的な構造をもつ。上皮細胞や魚のケラトサイトは横に広がった大きな仮足を形成し、半月型の一定の形状を保って移動する。白血球の仮足はこれよりも横方向に狭くなり、細胞体は比較的円形に近い。集合期の細胞性粘菌は縦に長く伸びた形態をとる。このように真核細胞の形態は実に多様であるが、いずれもよく保存されたアクチン骨格系のダイナミクスに基づいた表現型であることを考えれば、これらを統一的な視座に立って理解することが可能であると期待される。細胞の形態は遺伝要因だけでなく、外的要因によっても強い影響を受ける。走化性誘引物質や、溶液の流れ、基質の伸展収縮などは細胞の伸展を促進する。基質の硬さや接着性もまた、細胞の基質伸展性や運動性に強い影響を与える。細胞の接着を阻害した基質を用いて上皮系や間葉系の細胞を挟み込んだ場合、これらの細胞が前後軸方向に安定な極性を形成して通常の約10倍の速さで移動するようになる。これは間葉-アメーバ転移と呼ばれており、同様の形態は細胞の収縮性を強める処理をしたときにも出現する。それでは逆に、アメーバ細胞を上皮系や間葉系の細胞に近づけることは可能だろうか。上皮・間葉系の細胞では前端部に安定なラメリポディアが形成されるが、これは細胞性粘菌をはじめとするアメーバ細胞の一過的な伸展収縮を示す仮足動態とは顕著に異なる。いずれの仮足も Arp2/3 複合体が媒介する F-アクチン樹状構造の構築と解体の反応によって形成されるものであり、その制御には WASP や SCAR/WAVE 複合体が関与する点では共通している。上皮・間葉系の細胞とアメーバ細胞の大きく異なるもう一つの点は、基質接着性である。前者は基質に強く接着して接着斑をよく発達させるのに対し、細胞性粘菌や免疫系の細胞では接着斑は小さくあまり発達しない。基質の接着性は仮足の動態に影響を与える重要な要因である。フィブロネクチンや RGD ペプチドのコート濃度を変えることによって、インテグリンを中心とする接着斑の安定性や分布が変化し、仮足の伸展速度や幅などに影響が生じることが上皮細胞やケラトサイトを用いた実験で示されている。本研究では、集合期の細胞性粘菌および好中球様に分化させた HL60 細胞を使用して、細胞形態における基質接着への依存性を調べた。細胞性粘菌は、接着の弱い条件において細胞膜上に WASP お

よび SCAR 複合体の局在を伴う一過的な膜の伸展が生じるのに対し、基質接着を強めた条件では細胞底面の端部にこれらの持続性の高い局在と接着斑様の構造を伴うラメリポディア様の仮足が形成されることが見出された。SCAR 複合体の膜局在性の変化およびラメリポディア様の仮足の形成は、細胞-基質間の接着を促進する 3 種類の異なるコーティング条件において観察されたことから、基質上の特異的なリガンドに依存した現象ではないことが示唆される。また、ガラスと PDMS によって細胞を物理的に圧着させたときには SCAR 複合体の局在促進およびラメリポディア様の仮足の形成は観察されなかったことから、細胞膜と基質間の距離ではなくこれらの親和性が重要な要因と考えられる。ヒト好中球様細胞においてもレクチンを用いた基質接着の促進により、細胞底面端部において Arp2/3 依存性の F-アクチン重合が促進されることが示唆された。これらの結果から、細胞膜-基質間の親和性の高い接着により細胞底面端部において Arp2/3 依存性のアクチン重合と膜の伸展が促進されることが示唆された。