京都大学学術情報リポジトリ
KURENAI 紅
Kyoto University Research Information Repository

京都大学
KYOTO UNIVERSITY

Title	FRET imaging and statistical signal processing reveal positive and negative feedback loops regulating the morphology of randomly migrating HT-1080 cells.(Abstract_要旨)
Author(s)	Kunida, Katsuyuki
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2012-03-26
URL	http://hdl.handle.net/2433/157454
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

Kyoto University

京都大学	博士（　医学　）	氏　名	国田　勝行
論文題目	FRET imaging and statistical signal processing reveal positive and negative feedback loops regulating the morphology of randomly migrating HT-1080 cells. （画像データの統計信号解析に基づく細胞運動のフィードバック制御機構の解明）		

（論文内容の要旨）

細胞運動は胎発生、創傷治療、癌細胞の浸潤・転移などの様々な場面で見られる基本的な生命現象である。これまでの研究から、細胞膜でのイノシトールリン脂質の集積と Rho ファミリーG タンパク質の活性化がアクチン細胞骨格系の再編成を促し、これが細胞運動を引き起こすという分子機構が提唱されている。しかしながら、これらの知見の多くは生化学や分子生物学的な手法を基にして得られてきたものであり、これらの分子が細胞運動過程で時間的・空間的にどのように制御されているかについては、ほとんど定量的に評価されていない。この問題を解決するために、本研究では、FRET バイオセンサーと統計信号解析の手法を用いて、細胞運動時におけるシグナル伝達分子の時空間的な動態を定量的に明らかにすることを試みた。

まず、ヒト線維肉腫由来細胞株 HT-1080 細胞の自発的な細胞運動過程における Rho ファミリーG タンパク質（RhoA, Rac1, Cdc42）の活性とイノシトールリン脂質（PI(3,4,5)P3）の局在を FRET バイオセンサーにより可視化した。次に、取得した画像データを用いて、細胞の輪郭情報の経時変化を調べる画像解析アルゴリズムを開発し、細胞膜の伸張・退縮として表現される形態変化の時空間情報を定量化した。

得られた形態変化の時空間情報に対して自己相関解析を行った結果、一見乱雑な細胞の形態変化の中に、持続的な膜伸長や退縮、周期的な伸縮、そして伸展膜の側方伝播波という秩序だった形態変化のパターンを抽出できた。この結果は、自律的な細胞の形態変化において、周期的な応答や進行波を生じるフィードバックシステムが存在していることを示唆する。そこで、FRET イメージングにより得た分子活性の時空間情報を定量化し、相互相関解析により分子活性と形態変化の間の時間位相ずれを定量的に解析した。その結果、細胞膜が進展し始めてから１−２分後に Rac1, Cdc42 が活性化するという、これまでの知見とは異なる結果が得られた。また、種々の阻害薬を処理したときの分子活性と形態変化の過渡応答解析を行った結果、アクチン重合阻害薬 Latrunculin B で細胞を処理すると Rac1 の活性が持続的に減少した。これは、細胞膜が伸展した後に Rac1 が活性化するという時間位相ずれを良く説明し、アクチン細胞骨格から Rac1 へのポジティブフィードバックが存在することを示していた。さらに、PI3-K 阻害薬 LY294002 で細胞 を処理すると、Rac1 活性が一過的に減少し、その後に基底レベルまで回復する「適応現象（adaptation)」が引き起こされた。この適応現象を再現するシグナル伝達モデルを数値解析により検討した結果、Rac1 からアクチン骨格系への負のフィードバック経路が存在するモデルが予測された。これを相互相関解析、及び阻害薬による干渉実験により検証した結果、Rac1 からアクチン細胞骨格系への負のフィードバック経路は MLCK（Myosin Light Chain Kinase）を介していることが明らかになった。

以上の研究により、細胞運動を制御するシグナル伝達系において Rac1、アクチン細胞骨格、及び MLCK から構成される正と負のフィードバック経路の存在を示すことが出来た。この２つのフィードバック経路が、自発的な細胞運動過程において観察される秩序だった形態変化を生じさせていると考えられる。また、このような細胞運動制御機構の詳細な解析は、がん細胞の浸潤や転移を阻害する抗がん剤開発の一助となると期待される。

（論文審査の結果の要旨）

細胞運動は胎発生、癌細胞の浸潤・転移などを規定する重要な生命現象である。これまでに細胞運動に関与する多くの分子が同定されてきたが、それらの動的ネットワークは未だ十分には明らかにされていない。本研究では、ヒト線維肉腫由来 HT-1080 細胞のライブビデオ画像を統計信号解析し、自発的な細胞運動を制御する分子ネットワークの解明を試みた。まず Rho ファミリーG タンパク質（RhoA、Rac1、Cdc42）の活性とフォスファチジルイノシトール３リン酸の局在の変動を FRET バイオセンサーでビデオ画像として記録した。まず、これらのビデオ画像を用いて細胞膜の伸張・退縮を定量化し、自己相関解析を行ったところ、形態変化の振動や伝播という秩序パターンが抽出された。次に、伝搬運動の形態変化の分子活性に対する相互相関解析を行い、細胞が伸張（または退縮）してから、約 2 分後に Rac1 の活性化（または不活性化）が起きることを明らかにした。この時間遅れの分子ネットワークを明らかにするために、阻害薬を用いた摂動解析と数値モデルの探索を行った結果、F-アクチンから Rac1 への正のフィードバック、及び Rac1 から F-アクチンへの負のフィードバックの存在が予測された。さらに、この負のフィードバックをミオシン軽鎖キナーゼが仲介することを、阻害剤等を用いて明らかにした。この正と負のフィードバック経路が、自発的な細胞運動過程のパターン発生に重要な役割を果たすことが考えられた。

以上の研究は、細胞運動という重要な生命現象に関与する分子機構の解明に貢献し、細胞生物学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成　24　年　2 月　23 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降