

氏 名 山本 啓

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2334 号

学位授与の日付 2022 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Studies on the optogenetic tools to decrease the intracellular
contractile force

論文審査委員 主 査 中山 潤一
基礎生物学専攻 教授
青木 一洋
基礎生物学専攻 教授
藤森 俊彦
基礎生物学専攻 教授
宮崎 牧人
京都大学 白眉センター 特定准教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Yamamoto, Kei

論文題目 Studies on the optogenetic tools to decrease the intracellular contractile force
(細胞内収縮力を低減する光遺伝学技術に関する研究)

Actomyosin contractility generated cooperatively by nonmuscle myosin II (NMII) and actin filaments plays essential roles in a wide range of biological processes, such as cell motility, cytokinesis, and tissue morphogenesis. To analyze the function of contractile force, small chemical compounds have been widely used. While these compounds have allowed researchers to better understand the function of NMII, it is still technically challenging to control their actions at the subcellular resolution because of their rapid diffusion. To overcome the limitation, recent efforts have been devoted to the development and application of optogenetic tools to manipulate cell signaling related to actomyosin contractility. Although many of these tools enhance actomyosin contractility, tools that decrease actomyosin contractility below the basal level have not yet been developed. In this study, I developed an optogenetic tool, named OptoMYPT, to decrease actomyosin contractility at the subcellular level.

The NMII is inactivated by the dephosphorylation of its light chains (MLCs). To decrease the intracellular contractile force by light, I focused on MYPT1, which is a regulatory subunit of myosin light chain phosphatase. The strategy of OptoMYPT to decrease contractile force is based on inducing membrane translocation of the PP1c-binding domain (PP1BD) in MYPT1 with light, resulting in the co-recruitment of endogenous PP1c at the plasma membrane and dephosphorylation of MLC beneath the plasma membrane. As an optogenetic switch in this study, I mainly employed the improved Light-Induced Dimer (iLID) system, which binds to its binding partner, SspB, upon blue light illumination and dissociates from SspB under the dark condition. I first

optimized the length of PP1BD and confirmed the efficient light-induced membrane translocation of the PP1BD and exogenous/endogenous PP1c.

To evaluate whether the OptoMYPT dephosphorylates MLC in a blue light-dependent manner, I directly measured phosphorylated MLC with immunofluorescence. The blue light was locally illuminated at the lamellipodia in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells expressing OptoMYPT proteins. The quantification of phosphorylated MLC fluorescence intensity in dark and light illuminated areas revealed a partial but significant reduction in the phosphorylated MLC level. Based on the western blotting analysis, I also found that the global blue light illumination partially decreased the phosphorylated MLC level. In addition, membrane protrusions were observed in the light-illuminated lamellipodial region, consistent with the morphology of the cells treated with NMII inhibitors.

Next, I examined whether the decrease in MLC phosphorylation by OptoMYPT affects actomyosin-based contractile force. To do this, I employed traction force microscopy, which is a method of estimating the force with which cells pull on a substrate. The traction was decreased by local blue light illumination to the lamellipodial region in randomly migrating MDCK cells expressing OptoMYPT proteins. I further applied OptoMYPT to the *in vivo* system by using *Xenopus laevis* embryos. The cell-cell junctions became wavy in shape by blue light illumination, suggesting decreased actomyosin contractility. To directly validate this, I combined laser ablation with optogenetic experiments. This is because the tension along the cell-cell junction can be estimated by measuring the recoil velocity of the cell-cell junction after laser ablation. The recoil velocity of the cell-cell junction was significantly slower in OptoMYPT cells than in Control cells, indicating the reduced tension at the cell-cell junction by OptoMYPT.

Finally, I applied the OptoMYPT system to elucidate the mechanical regulation of the actin cortex during cytokinesis. In this process, actin, NMII, and cross-linkers

constitute a contractile ring in the equatorial plane, and generate force to divide a cell into two daughter cells. On the other hand, the tension developed in cortical actomyosin counteracts the force in the contractile ring. Due to the highly dynamic nature of cytokinesis, it is still challenging to understand to what extent the cortical actomyosin contributes to ring constriction. Using OptoMYPT, I found that the relaxation of cortical tension at both poles accelerated the furrow ingression rate, revealing that the cortical tension substantially antagonizes constriction of the cleavage furrow. By combining the coarse-grained physical model with the experimental data, I estimated that the resisting force exerted by the cortices corresponds to 15%~31% of the ring tension.

In summary, I developed the OptoMYPT system, which dephosphorylates MLC and decreases actomyosin contractility in a blue light-dependent manner. Using OptoMYPT, I quantitatively estimated the force balance between the actin cortex and the contractile ring during cytokinesis. The OptoMYPT system will provide new opportunities not only to understand cellular and tissue mechanics but also to shape the morphology of cells and tissues with precision and flexibility as desired.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 山本 啓T i t l e
論文題目 Studies on the optogenetic tools to decrease the intracellular contractile force

細胞骨格アクチンとミオシンの複合体であるアクトミオシンは ATP を消費し収縮力を生み出す。アクトミオシンが生み出す収縮力は、細胞の形態変化や胚発生、筋収縮といったさまざまな形態制御に重要な役割を果たす。動物細胞の細胞質分裂では、アクトミオシンが収縮環で力を発生することで分裂溝の陥入を促進し、細胞質をくびりきることで娘細胞を作り出す。分裂期の細胞は多くの場合には球状であることから、分裂期の細胞は細胞表層の張力が間期の細胞より高いことが示唆されている。細胞表層の張力もまた形質膜直下で形成されるアクチンメッシュワークとミオシンによって生み出されている。細胞表層の張力は分裂期に細胞の形状を維持するうえで重要であるが、強すぎる細胞表層張力は収縮環が生み出す張力と拮抗的に働き、細胞質分裂を阻害する。したがって、細胞質分裂を効率よく進めるためには、収縮環が生み出す力と細胞表層の張力が適切に制御されていると考えられていたが、これらの力がどれくらいの割合で調整されているかについては十分に理解が進んでいなかった。

出願者は、この問題に取り組むために、アクトミオシンの収縮力を高い時空間分解能で操作する手法が必要だと考え、まず光遺伝学の手法開発に取り組んだ。ミオシンの収縮活性はミオシン調節軽鎖のリン酸化で制御される。そこで、ミオシン調節軽鎖を脱リン酸化するミオシン脱リン酸化酵素 (MLCP) 複合体の調節サブユニット MYPT に着目した。MYPT の N 末端には MLCP 触媒サブユニットである PP1 と結合するドメインが存在する。この PP1 結合ドメインと iLid-SspB や CRY2-CIB などの青色光によって二量体化が誘導できる光遺伝学を組み合わせることで、光によって内在性の PP1 の細胞内局在を変化させることに成功し、このツールを OptoMYPT と命名した。OptoMYPT 発現細胞に光を照射することで、ミオシン調節軽鎖のリン酸化が減少すること、細胞が基質に引っ張る牽引力が減少することから、OptoMYPT が期待通り光によってアクトミオシンの収縮力を減少させることが明らかになった。さらに OptoMYPT をアフリカツメガエルの胚に導入し、光を照射することで神経外胚葉の細胞間の辺にかかる張力が減少することをレーザーアブレーション実験によって検証した。

次に、出願者は OptoMYPT を用いて細胞質分裂における細胞張力と収縮環が生み出す力の関係性を解析した。OptoMYPT を発現する細胞の細胞質分裂時において、両極にのみ光を照射した。その結果、膜ブレブと呼ばれる構造ができにくくなること、また分裂溝の陥入速度が上昇することの 2 点が分かった。1 点目の膜ブレブに関しては、膜ブレブは細胞張力によって上昇した細胞質の圧力を解消するために生じると考えられており、OptoMYPT の結果は細胞質分裂における細胞表層張力の減少を示していた。2 点目の分裂

溝の陥入速度の上昇については、細胞表層張力の減少により収縮環が生み出す力と拮抗する力が弱くなったためであることが示唆された。細胞表層の張力と収縮環が生み出す力の関係を理解するために、細胞質分裂のメカニクスの数理モデルを構築し、実験により得られた分裂溝の陥入速度のデータから、収縮環が生み出す力を 100 とすると細胞表層張力による抵抗力は 15-30 であるという見積りを得ることができた。

以上の出願者の研究は、従来の手法では困難であった表層張力の解析を可能にした点で細胞分裂研究へ一石を投じたものであり、博士の学位を授与するに相応しいと審査委員会は評価した。