

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13832

研究課題名(和文) 張力センサー生体分子のナノ構造力学特性の解明

研究課題名(英文) Nano-mechanical Behaviors of Tension-sensing Proteins

研究代表者

安達 泰治 (Adachi, Taiji)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40243323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：張力センサー生体分子の一つとして知られるカテニン β は、細胞間張力を感知し、それを増幅する機能を有することが知られている。本研究では、張力作用下におけるカテニン β の力学的挙動を明らかにすることを旨とし、単一分子のAFMナノ引張試験を行った。その結果、張力作用によりカテニン β の立体構造が変化し、アンフォールディングしにくい状態でシグナル分子を待ち受ける適応的な張力感知メカニズムが存在することが明らかとなった。また、ピンキュリンの結合により、張力の作用下で活性化したカテニン β の構造が、力学的に強化されることが示された。以上より、カテニン β の適応的なナノ構造力学特性を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：At adherens junctions, β -catenin is known to act as a tension sensor and accelerate the positive feedback of intercellular tension by recruiting vinculin. In this study, we aimed at elucidating the mechanism how β -catenin retains its activated state while avoiding unfolding under tension. Based on nano-tensile testing using atomic force microscopy, we found that mechanically activated β -catenin fragment exhibited higher mechanical stability than a non-activated one. Through the comparison with mutated and segmented fragments, we found that the key intramolecular interactions within β -catenin act as a conformational switch. We also demonstrated that β -catenin adaptively changes its conformation under tension to a stable intermediate state and settles into a more stable state reinforced by vinculin binding. Our findings suggest that the characteristics of β -catenin enable the functional dynamics of multicellular tissues.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：張力感受センサー分子 ナノ構造力学試験 原子間力顕微鏡 ナノバイオメカニクス カテニン

1. 研究開始当初の背景

生体組織の発生・形態形成の過程において、細胞間に作用する張力が、多細胞組織の形態を決定する上で重要な役割を担っている。細胞間には、力のセンシング機構が存在し、それに対応して発生したアクティブな張力により、複雑な組織形態形成のダイナミクスが作り出される(図1)。近年、細胞間の接着結合部位において、細胞間の「張力のセンシングと力のフィードバック制御」の機構が存在することが明らかとなりつつある。

本研究では、その張力センシング能力を有する分子の候補として、 α カテニン分子をターゲットとして研究を進める。この分子は、細胞間の張力の作用により、新たにピンキュリン分子を誘導する。すなわち、ピンキュリン分子を介した新たなアクチン細胞骨格の結合により、さらに大きな力を産み出すことが示唆されている。これは、細胞間において、引張られると引張り返すという正のフィードバック機構が存在していることを示しており、多細胞システムの形態形成ダイナミクスを理解する上で、非常に重要なナノ分子レベルの力の制御機構である。

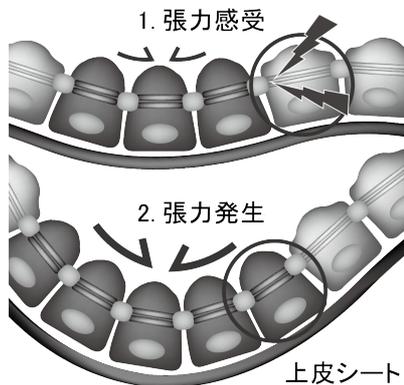


図1 張力による多細胞組織の変形

2. 研究の目的

本研究では、細胞間接着における張力センサー分子として知られる α カテニンを対象として、原子間力顕微鏡(AFM)を用いたナノ引張実験によるナノバイオメカニクス研究分野を開拓する。特に、AFMを用いた単分子力学測定を活用することにより、張力作用下における α カテニンが、力学活性化状態を維持するための力学的分子適応メカニズムの解明を目指す。

生体を構成する細胞は、分子レベルで張力を感じ、これに対するフィードバック制御により、機能適応的に力の調節を行うことが知られている。この生体分子の張力センサー機構の解明は、多細胞組織の発生・形態形成における力の寄与を理解するだけでなく、その機構の積極的な活用による幹細胞技術を用いた三次元生体組織・器官構築の医工学的制御の基礎を与える。さらに、ナノ材料・構造の分子レベルの力制御機構を創製する新たな考え方を与えるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) α カテニン融合タンパク質

α カテニンの M_I - M_{III} ドメイン(275-628残基)は、張力無負荷時ではピンキュリン結合に対する自己阻害構造を形成する。 α カテニンの自己阻害構造は、ピンキュリン結合部位(325-360残基)を含む M_I ドメイン(275-391残基)と、 M_{II} - M_{III} ドメイン(510-633残基)の相互作用により生じる。このことから、張力による M_I / M_{II} - M_{III} 相互作用の破断により、 α カテニンが自己阻害構造を解放し、自らピンキュリンに対する活性化状態を示すと考えられる。また、 M_I ドメインは、 M_{II} - M_{III} ドメインに比べ不安定なヘリックス束を形成することが示唆されている。

本研究では、野生型 M_I - M_{III} ドメイン、 M_I / M_{II} - M_{III} 相互作用を抑制した変異型 M_I - M_{III} ドメイン、 M_I ドメイン、および、 M_{II} - M_{III} ドメインに対して融合タンパク質(N末端:GSTタグ、C末端:Hisタグ)を精製した(図2a)。

(2) 単分子力学測定

α カテニン両末端のタグを標的として、ガラス基板およびAFM探針(0.02 N/m; Olympus Co.)を化学修飾した。

まず、MPTMS(Sigma Aldrich Co.)により基板をシラン化した。次に、Maleimide- C_3 -NTA(DOJINDO Lab.)を反応させた。 N_2Cl_2 によりNTAを担体化させた後、 α カテニンを基板に固定した。一方、APTES(Sigma-Aldrich Co.)によりAFM探針をシラン化した。NHS-PEG-Maleimide(NANOCS Inc.)を反応させた後、Glutathioneを修飾した。また、Glutathioneと未反応のMaleimide基を2-Mercaptoethanol(Sigma-Aldrich Co.)でブロッキングした。

AFM探針を基板に近づけ、GlutathioneとGSTタグを結合させた後、 α カテニン分子に対して直接張力を負荷した。張力作用下の分子構造変化を明らかとするため、本研究では二種類の張力負荷手法:

(A)一定速度(500 nm/s)の張力負荷、および、
(B)分子構造変化の待ち時間(1 s)を設けた張力負荷、
を適用した(図2b)。

(3) フォースカーブ解析

AFMを用いた単分子力学測定により、 α カテニンの張力-伸び量関係を示すフォースカーブ(図2c)を取得した。分子のアンフォールディングにおける中間状態は、のこぎり歯状パターンとして観察される。

各フラグメントの残基数から算出される伸び切り鎖長 L_{cf} を考慮し、リンカー高分子(PEG)の伸長による伸び量のオフセット L_{offset} を求めた。次に、力の変化量 ΔF_T が閾値 ΔF_{th} (40 pN)を超えたピークを検出し、力のピーク値 F_u を評価した。また、Worm-like chainモデルへのフィッティングにより、各中間状態の伸び切り鎖長 L_c を推定した。

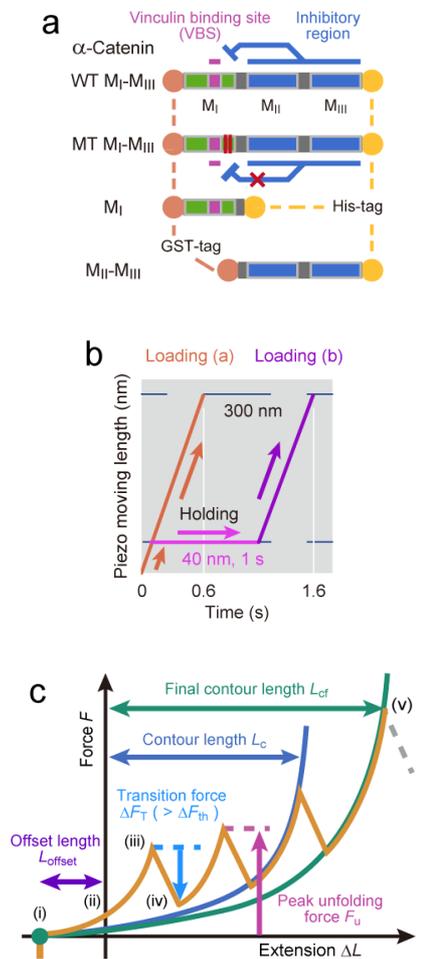


図2 AFMを用いた単分子引張実験

4. 研究成果

(1) 張力作用下における α カテニンの分子構造変化

取得したフォースカーブを図3aに示す。張力負荷(A)と比べて、張力負荷(B)のフォースカーブにおいてはより大きな力のピーク値 F_u が観察された。 α カテニンのアンフォールディング過程を明らかにするため、数百個のフォースカーブをもとにピークの点密度 n_d を評価し、等高線図(縦軸: F_u 、横軸: L_c)を作成した(図3bc)。

張力負荷(A)の等高線図(図3b)に現れた水平軸に等間隔な三つの領域に着目した。 M_I - M_{III} の各ドメインの伸び切り鎖長がそれぞれ約48nmであることから、張力作用下において各ドメインが順にほどけたことが示された。特に、初期の張力作用下で現れたピークに相当する領域($0 \text{ nm} < L_c \leq 48 \text{ nm}$)の点密度 n_d は、後期に現れた領域($48 \text{ nm} < L_c < 144 \text{ nm}$)の点密度と比べて50%程度低かった。

このことから、張力負荷(A)においては、はじめに不安定な M_I ドメインがアンフォールディングした後、安定な二つのヘリックス束 M_I 、 M_{III} が高頻度でピークを生じながらアンフォールディングしたことが示唆された。

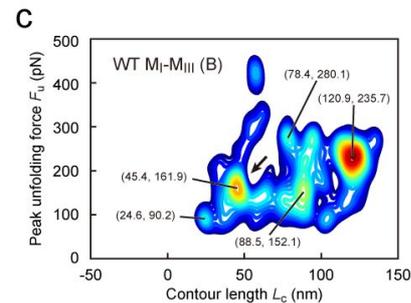
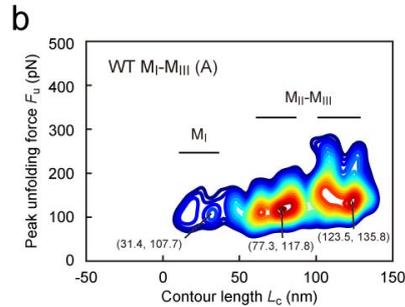
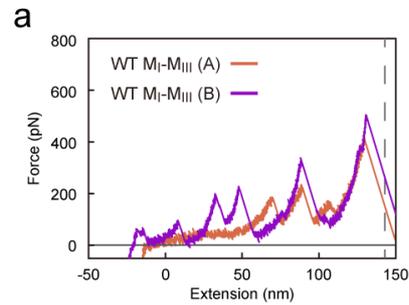


図3 異なる二種類の張力負荷条件下における WT α -catenin の力学応答

一方、張力負荷(B)においては、点密度分布が垂直軸(F_u 軸)上方にシフトし、より大きな力のピーク値 F_u を示した(図3c)。この結果から、 α カテニンが安定な中間状態に構造変化したことが明らかとなった。特に、張力負荷初期に現れた領域($L_c = 45.4 \text{ nm}$ 、図3c矢印)では、正味の伸び量(19.0 nm)は M_I ドメインの伸び切り鎖長の40%以下であった。すなわち、この領域においてピンキュリン結合部位が構造的に保存されていることが示唆された。また、待ち時間における力が、生理学的にも生じうる約10 pN程度に収束することが明らかとなった。一方、待ち時間における伸び量の変化量2.8 nmは、 M_I/M_{II} - M_{III} 相互作用が破断する距離約1 nmよりも大きいことから、 α カテニンが待ち時間において力学活性化したことが示唆された。

以上の結果から、細胞間張力の作用下において、 α カテニンが安定な中間状態に構造変化することが示された。

(2) 構造スイッチングする分子内相互作用

M_I/M_{II} - M_{III} 相互作用が α カテニンの分子構造に与える影響を評価するため、 M_I/M_{II} - M_{III} 相互作用を抑制した変異型 M_I - M_{III} ドメイン、 M_I ドメイン、および、 M_{II} - M_{III} ドメインに対

して一定速度の張力負荷を行った。変異型 M_I - M_{III} ドメインに対して作成した等高線図 (図 4 a) において、 M_I ドメインのアンフォールディングに相当する領域 ($0 \text{ nm} < L_c \leq 48 \text{ nm}$) の点密度 n_d が野生型に比べ増加した。また、その際の力のピーク値 F_u も増加した。この結果から、 M_I / M_{II} - M_{III} 相互作用の抑制により、 M_I ドメインの不安定なヘリックス束が別の構造に変化することが示された。

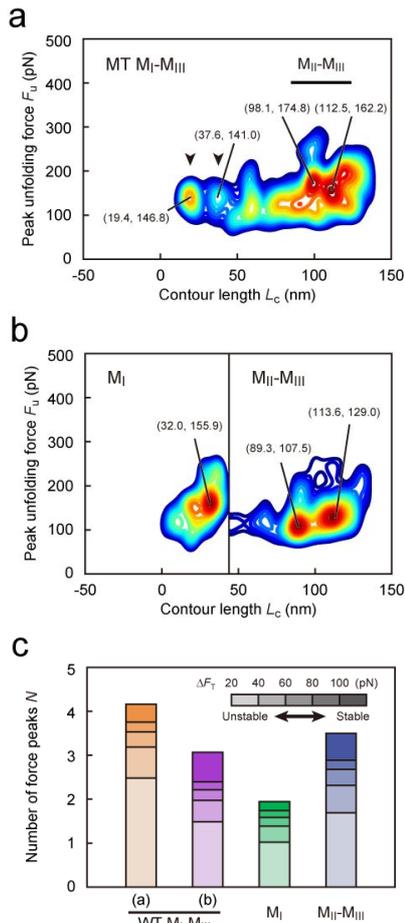


図 4 変異型および部分ドメインの挙動

分割した M_I 、 M_{II} - M_{III} ドメインの等高線図 (図 4 b) においては、ヘリックス束の数に対応した一つ (M_I ドメイン)、二つ (M_{II} - M_{III} ドメイン) の領域が観察された。 M_{II} - M_{III} ドメインの等高線図は、 M_I ドメインの伸び切り鎖長分、右側にオフセットして示した。分割した M_I 、 M_{II} - M_{III} ドメインの点密度 n_d は M_I - M_{III} ドメインの n_d より約 1.5 倍大きかった。このことから、 M_I / M_{II} - M_{III} 相互作用がない場合には各ドメインがより安定な立体構造をとることが明らかとなった。分割した M_I ドメインの力のピーク値 F_u (155.9 pN) は、張力負荷 (A) の野生型 M_I - M_{III} ドメインで見られた F_u (107.7 pN) より大きく、むしろ張力負荷 (B) で着目した領域の F_u (161.9 pN、図 3 c 矢印) とよく一致した。この結果から、張力作用下における M_I - M_{III} ドメインの構造変化は、 M_I / M_{II} - M_{III} 相互作用の完全な破断を伴うことが示された。

α カテニン分子の力学的安定性を明らかにするため、フォースカーブが示すピーク数の平均値 N を算出した (図 4 c)。野生型 M_I - M_{III} ドメインにおいて、張力負荷 (A) と比べ張力負荷 (B) では 40 pN 以下の ΔF_T を示すピーク数が減少したのに対し、100 pN 以上の ΔF_T を示すピーク数は増加した。この結果から、 M_I - M_{III} ドメインが有する不安定なサブ構造が待ち時間において安定なサブ構造に遷移したことが示された。また、張力負荷 (A) における野生型 M_I - M_{III} ドメインのピーク数 N は、分割した M_I ・ M_{II} - M_{III} ドメインのピーク数 N の和より小さかった。以上のことから、 M_I - M_{III} ドメインの大規模な構造変化は、 M_I / M_{II} - M_{III} 相互作用による初期の力学的不安定性に起因することが明らかとなった。

(3) ピンキュリン結合による分子構造強化

ピンキュリン結合が α カテニンの分子構造に与える影響を評価するため、変異型 M_I - M_{III} ドメイン、および、 M_I ドメインに対してピンキュリンを反応させた後、一定速度の張力負荷を行った。その結果、ピンキュリン結合により、変異型 M_I - M_{III} ドメインの示す力のピーク値 F_u が大幅に増加することが明らかになった (図 5 a)。このことから、ピンキュリン結合により、 α カテニンの M_I - M_{III} ドメインが補強されることが示された。

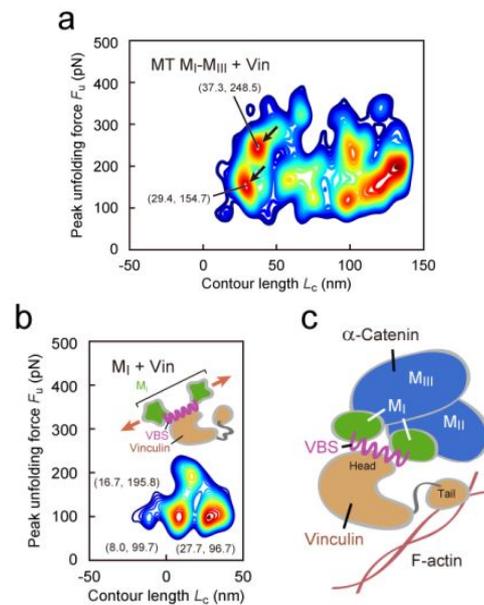


図 5 ピンキュリン結合による挙動の変化

一方、 M_I ドメイン (図 5 b) においては、力のピーク値 F_u が増加した領域 (195.8 pN) および、 F_u が減少した二つの領域 (99.7 pN、96.7 pN) が観察された。この結果から、ピンキュリン結合部位のみが安定なヘリックスを形成し、 M_I ドメイン両末端の部位は不安定な構造に遷移したことが示された。変異型 M_I - M_{III} ドメインと M_I ドメインの結果を比較することにより、 M_{II} - M_{III} ドメインがピンキュリン結合後の M_I ドメインを安定化させる可能性が示唆された (図 4 c)。

本研究では、AFM 単分子力学測定により、 α カテニンが力学活性化状態を維持するための安定な中間状態を示すことを見出した。 α カテニンの分子構造が張力作用下で適応的に変化し、ロバストな細胞間張力感知を実現するメカニズムが示唆された。また、ピンキュリン結合により α カテニンが構造的に強化されることを明らかにした。力学的・生化学的因子に対する α カテニン分子の可塑性は、細胞・組織レベルの構造 - 機能ダイナミクスを理解する手がかりとなり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Yoshinori Hirano, Shigenobu Yonemura, Toshio Hakoshima, Taiji Adachi, Mechano-adaptive sensory mechanism of α -catenin under tension, Scientific Reports, 査読有, Vol. 6, 2016, #24878

DOI: 10.1038/srep24878

Koichiro Maki, Nobuhiko Nakao, Taiji Adachi, Nano-mechanical characterization of tension-sensitive helix bundles in talin rod, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, Vol. 484, No. 2, 2017, 372-377

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.127

〔学会発表〕(計 1 2 件)

Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi, Nanomechanical behaviors of β -Catenin revealed by single-molecule AFM, 21st Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2015), 2015.7, Prague, Czech

牧 功一郎、韓 成雄、安達 泰治、接着結合における張力伝達分子としての β カテニン、第 53 回日本生物物理学会、2015.9、金沢

広橋 佑紀、牧 功一郎、安達 泰治、立体構造変化を伴う接着構成分子間の AFM 相互作用測定、日本機械学会 2015 年度年次大会、2015.9、札幌

Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi, Mechanical roles of beta-catenin for AJ-mediated force transmission, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (APBiomech2015), 2015.9, Sapporo

牧 功一郎、安達 泰治、細胞間張力を感知する α カテニンの力学的分子適応メカニズム、日本機械学会バイオエンジニアリング部門第 28 回バイオエンジニアリング講演会、2016.1、東京

広橋 佑紀、牧 功一郎、安達 泰治、 α カテニンに対するピンキュリン結合の AFM 分子イメージング、日本機械学会バイオエンジニアリング部門第 28 回バイオエンジニアリング講演会、2016.1、東京

Koichiro Maki, Taiji Adachi, Mechano-

adaptive conformational change of α -catenin to sense and transmit intercellular force, European Society of Biomechanics 2016 (ESB2016), 2016.7, Lyon, France

Koichiro Maki, Taiji Adachi, Nanofishing and Structural Imaging of Tension-sensor Protein Employing Atomic Force Microscopy, 日本機械学会第 27 回バイオフロンティア講演会、2016.10、札幌

Taiji Adachi, Role of mechanical force feedback in multicellular morphogenesis: in silico and in vitro studies, The 16th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME2016), 2016.12, Singapore

Taiji Adachi, Mechanical force feedback in multicellular morphogenesis: in silico & in vitro studies, Columbia University Biomedical Seminar, 2016.11, New York

牧 功一郎、安達 泰治、細胞間接着結合における α カテニン分子の力-構造-機能ダイナミクス、第 54 回日本生物物理学会年会、2016.11、つくば

Nobuhiko Nakao, Koichiro Maki, Taiji Adachi, Nano-mechanical measurement of integrin-based focal complex using AFM, CDB Symposium 2017, Toward Understanding Human Development, Heredity, and Evolution, 2017.3, Kobe

〔図書〕(計 2 件)

牧 功一郎、安達 泰治、原子間力顕微鏡による細胞・分子の力学イメージング、病理と臨床、連載：各種顕微鏡の進歩～さまざまな顕微鏡の革新的技術開発が拓く次世代多次元イメージング～、Vol. 33(12)、2016、1351-1357、文光堂

牧 功一郎、安達 泰治、メカノセンシングナル、特集：細胞シグナル操作法、生体の科学、Vol. 66(5)、2015、450-451、医学書院

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 泰治 (ADACHI, Taiji)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：4 0 2 4 3 3 2 3

(2) 研究分担者

井上 康博 (INOUE, Yasuhiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：8 0 4 4 2 9 2 9

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし