

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：57601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18530

研究課題名(和文)細胞内アクチンのメカノセンサーとしての機能検証

研究課題名(英文)Functional validation of actin as a mechanosensor in cells

研究代表者

野口 太郎 (Noguchi, Taro)

都城工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：90615866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン分子は様々な構造状態を取り、このことが細胞運動や細胞分裂など様々な細胞機能に重要であると考えられる。アクチンの構造変化は力によっても引き起こされることが示唆されている。つまり、アクチンの分子構造はメカノセンサーとして機能する可能性がある。しかし、細胞内において、アクチンフィラメントの力による構造変化は確認されていない。本研究ではアクチンの分子構造を検出可能なFRETアクチンを細胞内に導入し、ガラスニードルによって力刺激を与えた。その結果、細胞の押された領域のFRET強度が増加することが確認された。この結果は機械的刺激により細胞内のアクチン分子構造が変化することを示している。

研究成果の概要(英文)：Actin molecule takes multiple conformation, which may play an important role in the cell functions such as cell migration and cell division. Conformational changes of actin are speculated to be induced by external forces. Thus, atomic structure of actin subunits may act as a mechanosensor. However, in cells, conformational changes of actin filament by external force have not been shown. In this study, FRET actin, which is able to detect changes of actin structure, were introduced into PtK2 cells, and the cells pushed by glass needle. FRET intensity at the pushed site significantly increased, indicating clearly that the atomic structure of actin in cells changes in response to mechanical force.

研究分野：生物物理、生化学

キーワード：アクチン 構造 FRET

### 1. 研究開始当初の背景

アクチンは筋収縮や細胞運動、細胞質分裂など様々な機能を担っている。これらの多様な役割は多種のアクチン結合タンパク質との相互作用によるものである。アクチン分子構造は一定ではなく、多型性を示すことがわかっている。アクチンの構造多型性はアクチン結合タンパク質との相互作用を制御し、多様なアクチン機能に関与していると考えられている。実際、我々もアクチン構造を検出可能な FRET アクチンを開発し、細胞内外においてアクチン結合タンパク質との相互作用によりアクチン構造が変化することを確認している。さらにアクチン構造の変化は *in vitro* の実験において、アクチンフィラメントに加わる力によっても変化することが示唆されている。つまり、細胞はアクチンの分子構造の変化により力を感じ、アクチン結合タンパク質との相互作用に影響を与えることで機能を変えている可能性がある。しかし、細胞内においてアクチン分子構造が力によって変化することは確認されておらず、詳細については不明であった。

### 2. 研究の目的

細胞内のアクチン分子が細胞にかかる力によって変化することを確認するため、FRET アクチンを細胞内に導入し、力による構造変化の検出を以下の方法で試みた。

#### ① FRET アクチンの力による応答性の確認

FRET アクチンを重合させ、ガラスニードルを用いてアクチンに張力を与えることで FRET に変化が生じるか確認する。

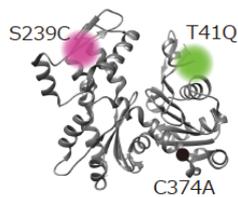
#### ② *in vivo* による構造変化の検出

FRET アクチンを細胞内に導入し、細胞をガラスニードルにより押し込む。このときの FRET の変化により、細胞内アクチンの構造変化を検出する。さらに細胞内のアクチンに張力を与えていると考えられるミオシン分子の阻害剤の効果調べる。

### 3. 研究の方法

#### ① FRET アクチンの調製

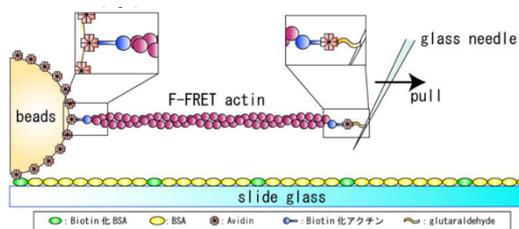
本研究で用いる FRET アクチンはアクチンの 41 番目と 239 番目に、それぞれドナーとアクセプターとなる蛍光色素を結合させる。そのためには 41 番目の Thr を Gln に、239 番目の Ser を Cys に置換した変異アクチンを精製した。精製は変異アクチン発現プラスミドを細胞性粘菌に導入し、大量培養後に Ni カラム、イオン交換カラムなどにより行った。精製した変異アクチンにドナーとなる DyLight488 cadaverine とアクセプターとなる Alexa594 maleimide を混合し、色素を結合させ FRET アクチンとした (Fig. 1)。



**Fig. 1 FRET アクチン**  
T41 と S239 に変異を導入し、ドナー色素 (緑) とアクセプター色素 (赤) を結合させた。374 にある反応性の高い Cys は Ala に置換してある。

#### ② *in vitro* による FRET アクチンの構造変化の検出

FRET アクチンを未染色の野生型アクチン、ビオチン化アクチンと混合し、F-FRET アクチンを得た。F-FRET アクチンの一端を、ガラス表面上においた、アビジンコートしたビーズと結合させ、もう一端をアビジンコートしたガラスニードルで引っ張ることで張力を与えた (Fig. 2)。



**Fig. 2 F-FRET アクチンへの張力負荷**

F-FRET アクチンをアビジンコートしたビーズとガラスニードルを用いて引っ張ることで負荷を与える。

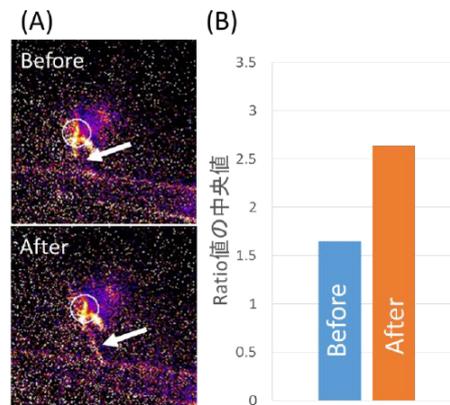
#### ③ *in vivo* におけるアクチン構造変化の検出

細胞に FRET アクチンを導入し、ガラスニードルを用いて細胞に力刺激を与えた。力刺激前後の FRET 値を測定した。

さらに細胞内において、アクチンに張力を与えていると考えられるミオシンに対する阻害剤 (Y27632) を加え、細胞内の FRET アクチンの Ratio 値の変化を調べた。

### 4. 研究成果

FRET フィラメントをガラスニードルで引っ張ると FRET 値が増加することを確認した。



**Fig. 3 張力負荷による FRET の変化**

(A) 白丸はビーズを表す。矢印で示した F-FRET アクチンの部分が引っ張る前に比べて引っ張った後の方が高 FRET を示す黄色の領域が増加している。

(B) 矢印の F-FRET アクチンの Ratio 値を測定した結果。

FRET アクチンを細胞内に導入しガラスニードルで力刺激を与えた結果、ニードルで押された領域について、細胞内の FRET アクチンの Ratio 値に変化が見られた (Fig. 3)。ニードルで抑えていない領域については変化は見られなかった。Ratio 値の変化の大きさはニードルで押し込んだ距離とある程度の相関が見られることがわかった。

ミオシン阻害剤である Y27632 を加え、経時的に観察、撮影された画像から Ratio 値を求めた。その結果、アクチンとミオシンから構成されるストレスファイバーにおいてストレスファイバーの崩壊前に Ratio 値の減少が見られた (Fig. 4)。つまり、阻害剤によりミオシンによるアクチンフィラメントへの張力が除かれたことで、アクチンフィラメントの分子構造が変化したのではないかと考えられる。

これらの結果は細胞内のアクチンが細胞内外から加わる力によって構造を変化することを示している。このようなアクチンの構造変化はアクチン結合タンパク質との親和性についても影響し、その機能を変化させると推察される。つまり、細胞は受けた力に対して、アクチン分子構造の変化を通じてアクチン結合タンパク質の再配置を行うことで、受けた力から逃げるなどの何らかの応答を示ことも考えられる。

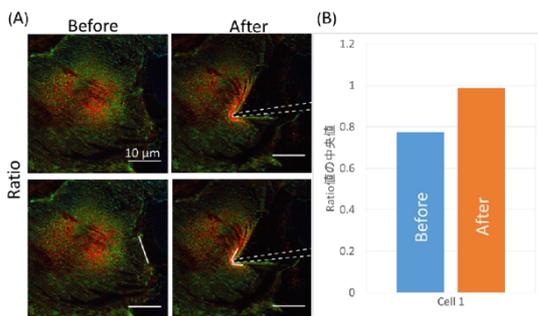


Fig. 3 力による細胞内 FRET アクチンの Ratio 値の変化

(A) FRET アクチンを導入した PtK2 細胞。ニードルによって押し込まれる前後を示した。下側の写真中の白線の領域の Ratio 値を測定した。点線はニードルを表す。

(B) FRET アクチンの Ratio 値の変化を示した。

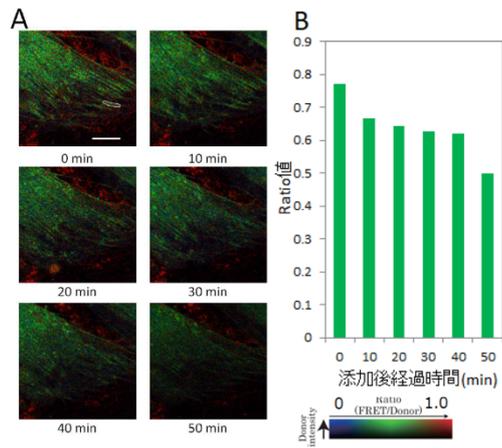


Fig. 4 ミオシン阻害剤による細胞内 FRET アクチンの Ratio 値の変化

(A) ミオシン阻害剤添加後の Ratio 画像。白棒のストレスファイバーについて Ratio 値を求めた。バーを 10 μm を示す。

(B) FRET アクチンの Ratio 値の経時変化を示した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Kien X. Ngo, Nobuhisa Umeki, Saku T. Kijima, Noriyuki Kodera, Hiroaki Ueno, Nozomi Furutani, Umezumi, Jun Nakajima, Taro Q.P. Noguchi, Akira Nagasaki, Taro Q.P. Uyeda "Allosteric regulation by cooperative conformational changes of actin filaments drives mutually exclusive binding with cofilin and myosin" *Sci. Reports*, **6**, 35449, 2016

〔学会発表〕 (計 5 件)

• Taro Uyeda, Kien Ngo, Taro Noguchi, Akira Nagasaki, Noriyuki Kodera, Kiyotaka Tokuraku "Structural polymorphism of actin filaments: its implication in regulation of actin binding proteins and cell motility" 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば市, 2016

• Taro Q.P. Noguchi, Mio Okazaki, Saku T. Kijima, Taro Q.P. Uyeda "Distribution of actin structure in cells, revealed by intramolecular FRET", リーディングプログラム主催国際シンポジウム"アクチン研究の今: 新しいステージを迎えるモータータンパク質研究" 名古屋市, 2016

• 野口太郎, 西中志織, 岡崎美緒, 上田太郎 "細胞内アクチンの分子構造分布" 日本生化学会九州支部例会, 宮崎市, 2017

• Shiori Nishinaka, Taro Q.P. Uyeda, Taro Q.P. Noguchi “Effect of myosin inhibitor on the atomic structure of actin in cells” 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本市, 2017

• Urara Tokuishi, Taro Q.P. Uyeda, Taro Q.P. Noguchi “Atomic structure of actin within cells is changed by external mechanical stimulus” 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本市, 2017

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口太郎 (NOGUCHI Taro)

都城工業高等専門学校 物質工学科

准教授

研究者番号 : 90615866