

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0077

研究課題名(和文) タンパク質1分子の力学応答計測と収縮環の再構成による細胞分裂機構の階層的理解

研究課題名(英文) Hierarchical understanding of the cell division machinery using an in vitro reconstitution approach

研究代表者

宮崎 牧人 (Miyazaki, Makito)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：40609236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞は細胞分裂時に収縮環と呼ばれるリング状のアクトミオシンバンドルを形成し、その収縮力によって細胞は分裂するが、収縮環が形成される仕組みの多くは未解明である。そこで我々は、収縮環の主要な構成要素である6種類のタンパク質を精製し、収縮環の構造中で生み出される力が構成する6種類のタンパク質の機能をどのように変調させるかを、光ピンセットによる顕微操作を用いて分子レベルで明らかにした。その後、それらのタンパク質を細胞サイズの油中水滴に封入した人工細胞系を用いて、収縮環形成におけるそれぞれのタンパク質の役割を定量的に調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

収縮環はほとんど全ての動物細胞に共通するアクチン細胞骨格であり、細胞分裂という生命に本質的な機能を制御している重要な超分子集合体である。収縮環は主にアクチン線維とミオシン分子モーター、アクチン線維の重合・脱重合を制御する調節タンパク質から構成されている。本研究では、ミオシン分子が生み出す力がアクチン線維を介して、アクチン重合の調節タンパク質の機能を制御している仕組みを解明することができた。この成果は、「力」というローカルな情報が、アクチン線維を介して収縮環というマクロな構造物全体に伝搬し、超分子集合体を統制している精巧な仕組みの理解に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：During cell division, the animal cell assembles the contractile actomyosin ring to separate the cell body into two daughter cells. To elucidate the assembly mechanism of the contractile ring, we purified six key components of the contractile ring including actin, myosin, and formin from living cells. Then, we performed single-molecule manipulation experiments and in vitro reconstitution experiments to address following two questions: 1) How the force generated by myosin molecules modulates the actin polymerization activity of formin transmitted through the polymerizing actin filament. 2) How the force orchestrates proteins to regulate the contractile ring assembly and constriction. Our findings from this project will help us understand the regulatory mechanism of the cytokinetic ring dynamics in living cells.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞分裂 細胞骨格 アクトミオシン 再構成 人工細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物細胞は分裂期になると細胞の形を丸く変化させ、赤道面に収縮環と呼ばれる細胞骨格を形成する。収縮環は主にアクチン線維とミオシン分子モーターから構成されるリング状のバンドル構造であり、アクチン-ミオシン間のすべり運動によるリングの収縮によって細胞は分裂する。申請者は収縮環の形成・収縮メカニズムを解明するために精製したアクトミオシンとアクチン線維の束化因子を細胞サイズの微小液滴に閉じ込めた *in vitro* モデル系を構築し、収縮環様の構造を自発的に形成・収縮させることに成功した (*Nature Cell Biol.* 2015)。この研究によって収縮環の形成・収縮機構を構成的アプローチで研究することが初めて可能になった。この研究ではアクチンとミオシン、 α -アクチニン (アクチン線維の束化タンパク質) の3種類のタンパク質を用いていたが、実際の動物細胞の収縮環には6種類のタンパク質 (アクトミオシンと4種類のアクチン制御タンパク質) が関与していることが明らかになっており、申請者の今までの研究では収縮環の形成・収縮機構を十分に理解できたとは言いがたい。

長年の分子生物学的研究によって、収縮環形成と収縮に関与しているタンパク質が網羅的に調べられてきた。その結果、多くの動物種で保存されているタンパク質は意外にも、アクチンとミオシンを含めて6種類であることが同定された (Glotzer, *Science* 2005)。それらすべてのタンパク質がアクチンと相互作用する性質を持っている。アクチン線維に力がかかった場合、それぞれのタンパク質の機能がどのように変化するかも次第に明らかになって来ており、コンピューターシミュレーションによって収縮環動態を理解しようという動きも出てきている (e.g. Laporte, *Mol. Biol. Cell* 2012)。しかし、すべてのタンパク質の力学応答が十分に理解されている訳ではない。フォルミンは、プロフィリンとともにアクチン重合を加速する。力依存性を調べた先行研究は2例あるが、どちらも実験系の制約でミオシンの出す力の半分程度の力しかアクチン線維にかけられていない。また、アニリンはアクチン線維を束化させる機能を持つことが知られているが (Field, *J. Cell Biol.* 1995)、結合様式や結合の強さはよく分かっていない。アニリンにはフォルミン結合ドメインもあることが示されているが、フォルミンとの結合についてもよく分かっていない。従って、収縮環の形成と収縮に必須なタンパク質はすでに同定されており、それらのタンパク質のアクチン線維に対する機能も明らかにされているが、細胞の中で想定される大きさの力が個々の分子に加わったときにどのように機能が変調されるのか、そして力による分子の機能変調が超分子集合体である収縮環の制御にどのように関与しているのか、その理解はまだ不十分である。

2. 研究の目的

本研究では収縮環の形成と収縮に必須と考えられている6種類のタンパク質 (アクチン、ミオシン、フォルミン、プロフィリン、コフィリン、アニリン) の力学応答特性を明らかにし、ミオシンが生み出す力がアクチン線維を介して他のタンパク質の機能を制御している仕組みを1分子レベルで明らかにすることを中間目標 (目標①) とする。そして6種類のタンパク質を内包した油中水滴及びリポソーム内で再構成したアクトミオシンリングを収縮環のモデル系として用い、アクチン線維を介した力が収縮環というマクロな構造のダイナミクスをどのように制御しているのか、その仕組みを解明することを最終目標 (目標②) とする。

3. 研究の方法

目標①: アクチン線維と相互作用するタンパク質の力学応答を定量化するために、2本の光ピンセットと高速カメラを組み合わせた1分子操作顕微鏡を開発し、それを用いる。

目標②: 申請者がこれまでに確立してきた油中水滴作成技術 (*Protoc. Exch.* 2015, *PNAS* 2017) 及び界面通過法によるリポソーム作成技術 (*Biophys. J.* 2014) を用いる。精製した6種類のタンパク質を油中水滴及びリポソームに封入し、細胞サイズ閉鎖空間内で収縮環を再構成し、収縮環ダイナミクスにおける6種類のタンパク質の個々の役割を定量化する。

4. 研究成果

成果①: フォルミンによるアクチン重合反応の粗過程の観察に成功

1本のアクチン線維のマイナス端に、ビオチン-アビジン結合を介してプラスチックビーズを固定し、さらにアクチン線維のプラス端に、フォルミン (mDia1) をまぶしたプラスチックビーズを結合させた。これらのビーズを2本の光ピンセットで補足し、アクチン重合反応の1分子計測系を構築した (図1a)。溶液中にアクチンモノマーを分散させているため、フォルミンを介してアクチン線維が伸びていく様子を観察できた。アクチン線維の長さ変化を高時間空間分解能で観察すれば、フォルミンがアクチン分子を取り込んでアクチン線維を伸ばしていくプロセスを見ることができるとは思えない。アクチン線維を少し引っ張る方向に張力をかけるようにすることで、プラスチックビーズの熱揺らぎを小さくし、さらに両方のビーズを溶液中に浮かせている実験系にすることで顕微鏡本体の振動に起因するノイズを遮断することに成功。ナノメートルの空間分解能を達成した。そして高速カメラを用いてビーズの変位を高時間分解能で計測することで、階段状にアクチン線維が伸長していく様子を捉えることに成功した (図1b)。

ステップサイズを測ると、一番小さなステップサイズは2.8 nm となり、アクチン線維の電子顕微鏡画像から予想される2.7 nm のステップサイズとほぼ一致したことから、構造予測と矛盾

しない結果となった。一方で、ステップサイズの解析によって、予測できない新しい発見が二つあった。一つ目は、生化学的にはアクチンが重合する条件で実験を行なっているが、分子レベルで見ると頻繁にバックステップが観察されたということである。このことは、マクロに見ればアクチン重合反応が進んでいるが、確率的には脱重合反応も生じていることを意味している。二つ目は、アクチン1分子に対応する長さの2.8 nmの2倍、3倍のステップサイズが頻繁に観察されたことである(図1c)。カメラの時間分解能のせいで、このようなことが見えている可能性は十分にあり得る。すなわち、2回、あるいは3回の重合反応が隣接する2フレーム間で生じることが確率的にあり得る。そこで、そのような仮説のもと、観察しているフレーム間隔では、どのくらいの確率で2倍、3倍のステップサイズが観察されるかを見積もって見たところ、見積もりよりも観察されている2倍、3倍のステップサイズの頻度が優位に高いことがわかった。このことは、フォルミンの動きはアクチン分子の重合反応と必ずしも1対1対応していないことを示唆する。これまではアクチン分子が1つ重合したらフォルミンが2.8 nm前進する、というタイトカップリングモデルが信じられてきた。しかし今回の研究から、アクチン分子の重合反応とフォルミンの動きはルースであることが示唆された(図2)。10年来信じられてきたフォルミンによるアクチン重合モデルを根底から覆すものであり、収縮環形成の分子メカニズムの解明に大きく寄与する発見であると期待される。

論文：Hiroaki Kubota, *Makito Miyazaki, Taisaku Ogawa, Togo Shimozawa, Kazuhiko Kinoshita Jr., and *Shin'ichi Ishiwata, "Processive nanosteping of formin mDia1 loosely coupled with actin polymerization", *Nano Lett.* **18**, 6617-6624 (2018). *corresponding author

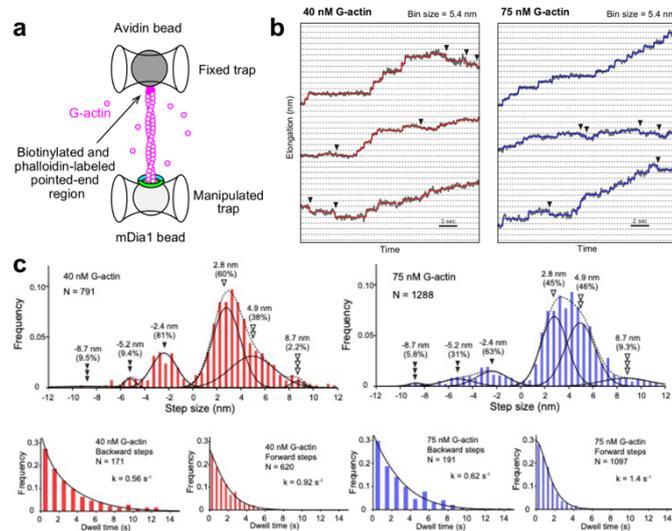


図1：フォルミンがアクチン分子を重合していく粗過程

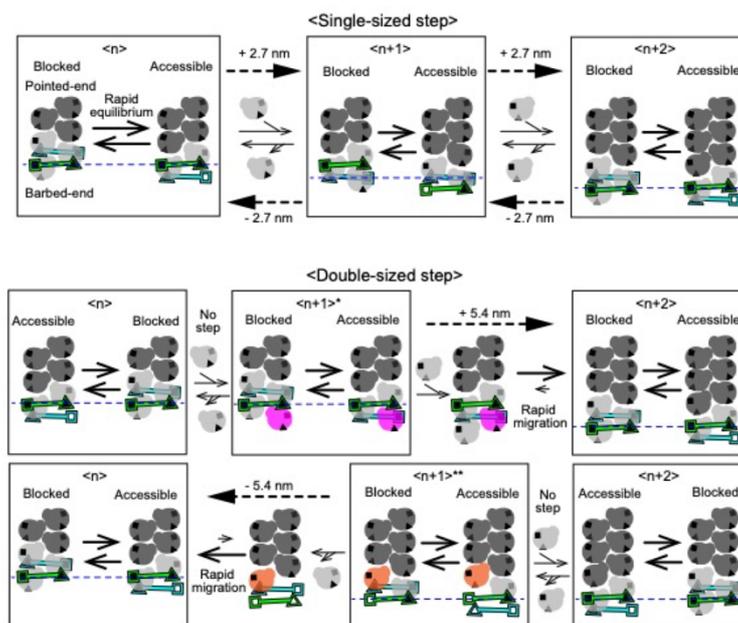


図2：観察結果をもとに提案した、新しいフォルミンによるアクチン重合制御モデル

成果②：フォルミンによるアクチン重合反応の力学的負荷依存性を解明

先行研究では、溶液の流れでアクチン線維に結合したフォルミンに張力をかける方法を使っていたため、最大でも 2.5 pN 程度の力しかフォルミンにかけられていなかった。この範囲ではアクチン重合の反応速度は高々 2 倍程度しか加速しなかった (Jégou, *Nat. Comm.* 2013)。一方で、成果①で開発した我々の光ピンセット顕微操作系は、ミオシンの生み出す最大静止張力と同等の 5 pN 程度の力をかけることが可能である。

成果①と同じ実験系を用いて、アクチン線維に張力を加えた場合のアクチン重合反応の変調を観察した。まず、ATP が結合したアクチン (ATP-アクチン) と ADP が結合したアクチン (ADP-アクチン) を比較したところ、ADP-アクチンの方が張力に対する応答性が高いことがわかった。続いて、フォルミンと共にアクチン重合反応を制御しているプロフィリンを添加したところ、プロフィリンの濃度によって、最大で 10 倍以上もアクチン重合の反応速度が上昇した (図 3)。特筆すべきは ADP-アクチンの場合、無負荷の状態ではアクチン線維は脱重合してしまうが、アクチン線維を介してフォルミンを引っ張ると、脱重合反応から重合反応に転じたことである。アクチン線維にかかる力が、フォルミンによるアクチンの重合反応と脱重合反応を切り替えられることが明らかになった。

トレッドミル反応によってアクチン線維から脱重合したアクチンモノマーには ADP が結合しており、ADP が ATP に交換されるには、1 秒から、条件によっては 50 秒もかかることが知られている (Ca-ADP: $k_{\text{off}} = 1$, Mg-ADP: $k_{\text{off}} = 0.02$)。収縮環はアクチンの重合・脱重合反応が常に生じている動的な構造であり、アクチン線維が密集しているので、脱重合した直後のアクチンモノマー、すなわち ADP-アクチンがフォルミンに取り込まれることも十分に起こりうる。我々の発見は、収縮環中のフォルミンにミオシンが生み出す張力が加わっていれば、うっかり ADP-アクチンを取り込んでしまっても滞りなく重合反応が進むことを示唆しており、収縮環動態を理解する上で重要な成果である。

論文：Hiroaki Kubota, *Makito Miyazaki, Taisaku Ogawa, Togo Shimozawa, Kazuhiko Kinoshita Jr., and *Shin'ichi Ishiwata, “Biphasic effect of profilin impacts on force-sensing mechanism of formin mDial1 on actin polymerization”, *Biophys. J.* **113**, 461-471 (2017). *corresponding author

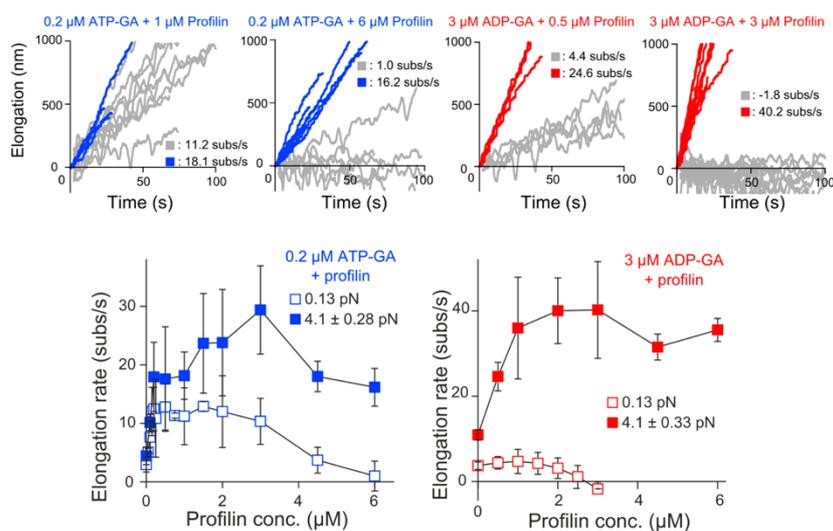


図 3：アクチン重合反応の張力依存性 (プロフィリンあり)

成果③：収縮環動態におけるアクチン調節タンパク質の役割の解明

申請者がこれまでに構築してきた油中液滴系を用いて、収縮環形成におけるフォルミンとプロフィリンの寄与を調べた。まずはこれまでの研究と同様に、アクチン線維の束化因子としてメチルセルロースをモデルとして使い、油中液滴にアクチンモノマー、メチルセルロース、プロフィリン、フォルミンを加えて、プロフィリン、フォルミンの濃度と、アクチンリングの形成確率と液滴サイズ依存性を定量化。続いて、束化因子としてメチルセルロースの代わりにアニリンを用いて、アニリンの濃度とアクチンリングの形成確率との関係性を調べた。またアニリンの代わりにアクチニンやファシンでアクチン線維を束化した場合のリング形成確率も調べ、アニリンの場合と比較した。

これら一連の再構成実験によって、リング形成が促進される条件が見えてきたが、その条件がもっともらしいものなのか否か、生細胞と比較する必要があるという考えに至った。そこで国際共同研究強化(A)の支援のもと、さらに再構成実験を進めて、生細胞との定量的比較を行うことを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kubota Hiroaki, Miyazaki Makito, Ogawa Taisaku, Shimozawa Togo, Kinosita Kazuhiko, Ishiwata Shin'ichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Processive Nanostepping of Formin mDia1 Loosely Coupled with Actin Polymerization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 6617 ~ 6624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.nanolett.8b03277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Hiroaki, Miyazaki Makito, Ogawa Taisaku, Shimozawa Togo, Kinosita Kazuhiko, Ishiwata Shin'ichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Biphasic Effect of Profilin Impacts the Formin mDia1 Force-Sensing Mechanism in Actin Polymerization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 461 ~ 471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2017.06.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 15件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 宮崎 牧人
2. 発表標題 最小構成分子システムによる細胞運動・分裂機能の再構成
3. 学会等名 日本化学会100春季年会, 中長期テーマシンポジウム「次世代分子システムが拓く未来の化学」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makito Miyazaki
2. 発表標題 The actin cytoskeleton dynamics in a cell-sized confined space
3. 学会等名 The 7th International Life-Science Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 牧人
2. 発表標題 アクチン系細胞骨格のin vitro再構成：細胞運動と細胞分裂の仕組みの包括的理解を目指して
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎 牧人
2. 発表標題 タンパク質から見た細胞の世界～タンパク質分子は如何にして”巨大”な細胞を制御しているのか？～
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会，第5回会員総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makito Miyazaki
2. 発表標題 In vitro reconstitution of actin cytoskeleton: Toward a unified understanding of the mechanics of cell motility and division
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makito Miyazaki and Shin'ichi Ishiwata
2. 発表標題 In vitro reconstitution of contractile actomyosin rings
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎牧人
2. 発表標題 構成的アプローチによる細胞骨格の自己組織化メカニズムの解明
3. 学会等名 2017年 日本液晶学会討論会・液晶交流会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Makito Miyazaki
2. 発表標題 Toward a physical understanding of the cell division machinery from the combination of single-molecule and in vitro reconstitution experiments
3. 学会等名 The 3rd Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎牧人
2. 発表標題 細胞骨格のin vitro再構成：システムサイズ依存性から見えてきた自己組織化機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017：第40回日本分子生物学会年会 & 第90回日本生化学会大会）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroaki Kubota, Makito Miyazaki, Taisaku Ogawa, Togo Shimosawa, Kazuhiko Kinoshita Jr., Shin'ichi Ishiwata
2. 発表標題 Single molecule analysis of the processive movement of mDia1
3. 学会等名 The 62nd Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin'ichi Ishiwata, Makito Miyazaki, Katsuhiko Sato, Koutaro Nakagome, Kazuya Suzuki, Jun Takagi, Yuta Shimamoto, and Takeshi Itabashi
2. 発表標題 Dynamic properties of bio-motile systems as a liquid-crystalline structure
3. 学会等名 26th International Liquid Crystal Conference (ILCC 2016) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮崎 牧人
2. 発表標題 細胞骨格構造のin vitro再構成
3. 学会等名 第6回ソフトマター研究会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮崎 牧人
2. 発表標題 細胞骨格のin vitro再構成：細胞骨格が司る細胞機能発現機構の解明を目指して
3. 学会等名 『細胞を創る』研究会9.0 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Makito Miyazaki and Shin'ichi Ishiwata
2. 発表標題 In vitro reconstitution of contractile actomyosin cytoskeleton
3. 学会等名 The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroaki Kubota, Makito Miyazaki, Taisaku Ogawa, Togo Shimosawa, and Shin'ichi Ishiwata
2. 発表標題 Mechanical manipulation of polymerization dynamics of individual actin filament
3. 学会等名 The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Hiroki Eguchi, Takashi Ohki, and Shin'ichi Ishiwata
2. 発表標題 Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings in vitro
3. 学会等名 IGER International Symposium on "Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroaki Kubota, Makito Miyazaki, Taisaku Ogawa, Togo Shimosawa, Kazuhiko Kinoshita Jr., and Shin'ichi Ishiwata
2. 発表標題 Mechanical manipulation of actin polymerization dynamics under the regulation by formin mDia1 and profilin
3. 学会等名 IGER International Symposium on "Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage" (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 宮崎 牧人
2. 発表標題 細胞サイズ閉鎖空間でのアクチン細胞骨格のin vitro再構成
3. 学会等名 定量生物学の会第8回年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎 牧人
2. 発表標題 細胞分裂装置のin vitro再構
3. 学会等名 アクティブマター研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本 一男、原 裕貴・企画 宮崎 牧人・分担執筆	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 148
3. 書名 実験医学2018年8月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----