

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06167

研究課題名(和文) 偏光と超高解像度顕微鏡でアクチン線維が張力センサーとして働くメカニズムを解明する

研究課題名(英文) Analysis of the actin filament as a mechano-sensor

研究代表者

辰巳 仁史 (Tatsumi, Hitoshi)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：20171720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光分子と偏光イメージング顕微鏡でアクチン線維が備えている力学受容の仕組みを解明した。アクチン線維を独自の偏光顕微鏡の観察面に緩やかに固定して観察した。アクチン線維に結合した磁気ビーズを電磁石により牽引することで、アクチン線維に張力を発生させた。アクチン線維は、ねじれ角( )の揺らぎと局所的な曲げ( )の揺らぎが同時に見られ、力付加により、ねじれと曲げの揺らぎが同時に抑制された。これは張力上昇によりねじれ揺らぎの減少があることを示すだけでなく、理論的に予想された、ねじれと曲げの分子レベルでのカップリングを実験的に明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の生体膜や細胞骨格は外部からの力が働き、細胞の成長、形態変化、運動に伴って変化して、細胞応答を修飾する。機械的ストレスの大きな場所に誘引される中胚葉性幹細胞の存在も知られている。機械受容性幹細胞に抗がん作用を持たせ、がん治療に応用する研究も始まっている。このように力受容は生命科学において重要な地位を締めているが力の受容を行っている分子機構のほとんどは未解明の状態である。本研究の成果はこの力の受容を細胞内のアクチン線維が行っていることを示す研究となっている。また力の受容の分子機構が分かってきたことで力の受容機構をターゲットとする医薬品や医療機器の開発につながる研究に発展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Mechanical force changes the mechanical conditions within the cells and accelerates the reorganization of cytoskeletons in a variety of cells. The molecular mechanisms underlying how tension modulates the mechanical behaviors of a single actin filament have been an important target of investigations. In this study, a direct measurement of the twisting and bending fluctuations of a single actin filament under stresses was performed by employing single-molecule imaging microscopy. We report that the amplitude of the torsional fluctuations and the bending fluctuations of a single actin filament were affected by the force application. The molecular importance of the decrease in the amplitude of the fluctuations for binding of actin-binding proteins is discussed.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクチン線維 力学受容 メカノセンサー 一分子イメージング 一分子力学刺激 偏光測定 分子揺らぎ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、重力や外力のみならず体内の骨格筋や平滑筋の動きに起因する様々な機械的刺激に晒され、これら力学刺激を受容して細胞内骨格の形態変化などさまざまな反応を示す。しかし反応の分子機構のほとんどは未解明の状態である。その最大の理由は、機械刺激の感知機構、言い換えるとメカノセンサーの分子実体とセンサーが細胞の構造や機能に影響をあたえる仕組みの多くが不明な点にある。

2000年初頭まで明瞭なメカノセンサーは細胞膜にある機械受容チャネルと少数の接着関連分子のみであった。我々は研究を進める中で、アクチン線維に力学受容機構が内在していることを示すことができた(Hayakawa et al., 2011, J. Cell Biol. 科学研究費基盤(C)研究(代表者辰巳仁史 H23-25))。我々の研究結果はチャネル以外に張力変化を受容する分子実体(アクチン線維)が存在することを明瞭に示す大変重要な知見であり Faculty 1000 (そのうちの上位 2%) に選ばれた。

コフィリンは複数分子のクラスターを形成しつつアクチン線維へ結合する。我々はコフィリン一分子のアクチン線維への結合を超高解像光学イメージングし、コフィリン一分子の結合がその近傍 65 nm の距離における次のコフィリンのアクチンへの結合頻度を上昇させることを示した(Hayakawa et al., 2014, PNAS, Faculty 1000 受賞)。

コフィリン一分子による切断には時間 ( $10^{3-4}$  秒程度) が掛かり、細胞内でのアクチン線維やコフィリンの密度を考えると実際の細胞内で見られるアクチン線維の活発な切断を説明するには、コフィリンに加えて、アクチン線維を短時間で切断する因子があることが推定されていた。実際にそのような候補因子 AIP1 があり、我々は一分子イメージングを使って AIP1 一分子でコフィリンアクチン線維複合体の切断が起きることを明らかにした。

このような経過からアクチン線維の張力受容機構の解明が偏光や超高解像度イメージング法を駆使することで可能になることを発想することができた。

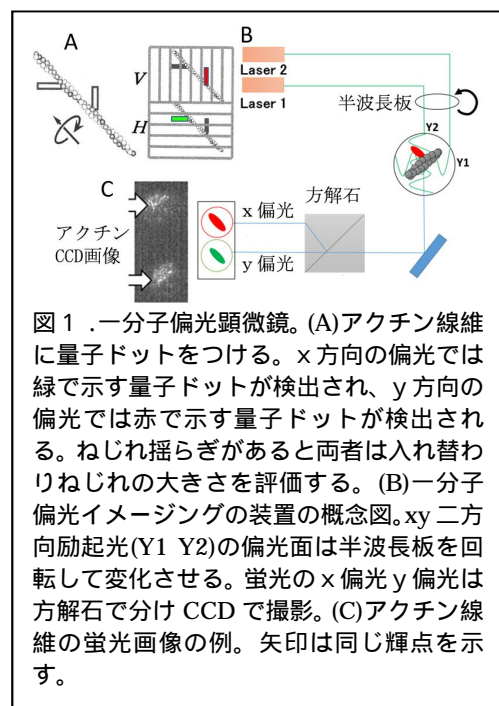
これまでアクチン線維のねじれを評価するためにアクチン線維を蛍光分子ローダミンで標識したところローダミン分子はその方向に依存した偏光を発した。偏光の向きに従った画像を二組取得し画像分析を予備的に行った結果、おそらくアクチン線維のねじれに伴いローダミン蛍光の偏光が変化し、アクチン線維が長軸に沿って自発的にねじれていると推定された。このように研究を実行する基盤的な技術は整いつつある。研究ではローダミン標識と同時に発光粒子量子ドットによるアクチン線維の標識も行う。長波長タイプの量子ドットの発光に限っては強い偏光特性があることが判明した。このことはローダミンと同様にアクチン線維に量子ドットを結合させると、アクチン線維のねじれに従って偏光面の変化を測定でき、二種類の測定を合わせて行うことでアクチン線維のねじれの測定が行われていることをより確実にすることができる。

### 2. 研究の目的

細胞は、重力や外力のみならず体内の骨格筋や平滑筋の動きに起因する様々な機械的刺激に晒され、これら力学刺激を受容して細胞内骨格の形態変化などさまざまな応答を示す。生体膜や細胞骨格は外部からの力が働き、またアクチンストレス線維は自ら収縮することもできるので内在ストレスが存在し、細胞の成長、分裂、形態変化、運動に伴って変化して、細胞応答を修飾する。最近では細胞に作用する機械的ストレスの大きな場所に誘引される中胚葉性幹細胞の存在も知られている。がん組織は硬いので、機械受容性幹細胞に抗がん作用を持たせ、がん組織に到達しがん治療に応用する研究も始まっている(Liu et al., 2017)。近年このような研究領域はメカノバイオロジーと呼ばれ広く注目を集めている。このように力受容は生命科学において重要な地位を締めているが力の受容を行っている分子機構のほとんどは未解明の状態である。その最大の理由は、機械刺激の感知機構、言い換えるとメカノセンサーの分子実体が多くの場合同定されておらず、さらにメカノセンサーが細胞の構造や機能に影響をあたえる仕組みの多くが不明な点にある。本研究では蛍光分子と偏光イメージング顕微鏡でアクチン線維が備えている力学受容の仕組みを解明する。研究後半では量子ドットと超高解像技術をつかってより蛍光分子のデータの補強とともによりねじれのモードの詳細な分析を行い、力の受容の分子機構の解明を行う

### 3. 研究の方法

球状のタンパク質分子である G アクチンを試験管の中で“重合”させると、数  $\mu\text{m}$  から数十  $\mu\text{m}$  のアクチン線維ができる。本研究ではアクチン線維一本をガラスカバー



ガラスに弱く結合させて、アクチン線維のねじれの様子をアクチン線維全長に渡って詳細に分析する(図1)。

アクチン線維のねじれを評価するためにアクチン線維を蛍光分子ローダミンで標識する。ローダミン分子はその方向に依存した偏光を発する。この偏光の向きをそのまま CCD カメラで撮影しても偏光の変化を記録することはできない。そこで偏光の向きに従って光の屈折が変化する方解石プリズムを CCD カメラの前にセットする。方解石プリズムは偏光の向きに従って画像を二組に分ける。予備実験を行った結果、これら二組の画像を CCD カメラで記録することができた(図1)。図1に示すようにアクチン線維がねじれると二つの偏光の強さが入れ替わるように変化することが予想され、予備実験においても、偏光の強さが時間とともに入れ替わることが観察され、アクチン線維が長軸に沿って自発的にねじれを生じていることが分かった。

#### 4. 研究成果

本研究ではアクチン線維一本をガラスカバーガラスに緩やかに固定し、アクチン線維のねじれを評価するためにアクチン線維を発光粒子(量子ドット)で標識する(図2)。またアクチン線維の張力を増すために磁気ビーズを結合する。予備的検討から長波長タイプの量子ドットに限っては強い偏光特性があることが判明した。量子ドットの発光の偏光の向きのため方解石プリズムを CCD カメラの前にセットし、偏光の向きに従って画像を二組に分ける(図1)。予備実験においても、偏光の強さが時間とともに変化し、アクチン線維の長軸に沿ってねじれのゆらぎ(角度)があることが分かった(図2)。

アクチン線維に結合した磁気ビーズを電磁石により牽引することで(図2)、アクチン線維に張力を発生させる。量子ドットの明るさ変化の分析を行うと、アクチン線維は、ねじれ角( $\alpha$ )の揺らぎと局所的な曲げ( $\beta$ )の揺らぎが同時に見られ、力付加により、ねじれと曲げの揺らぎが同時に抑制された。これは張力上昇によりねじれ揺らぎの減少があることを示すだけでなく、理論的に予想された、ねじれと曲げの分子レベルでのカップリングを実験的に明らかにしている(図2)。

これまでの張力受容する分子の研究では力によって張力受容分子の形が単に歪むことが力学受容機構であると想定されてきた。本研究では分子の自発的なゆらぎの振幅などの減少(ねじれゆらぎの多様なモードの変化)が力学受容の分子機構であるとする点で独創的である。これまでアクチン線維のねじれの大きさの評価は行われてきたが、ねじれのゆらぎの出現場所やねじれ曲げゆらぎのモード間の相互作用については研究が行われてこなかったので、学術的独自性は高い。

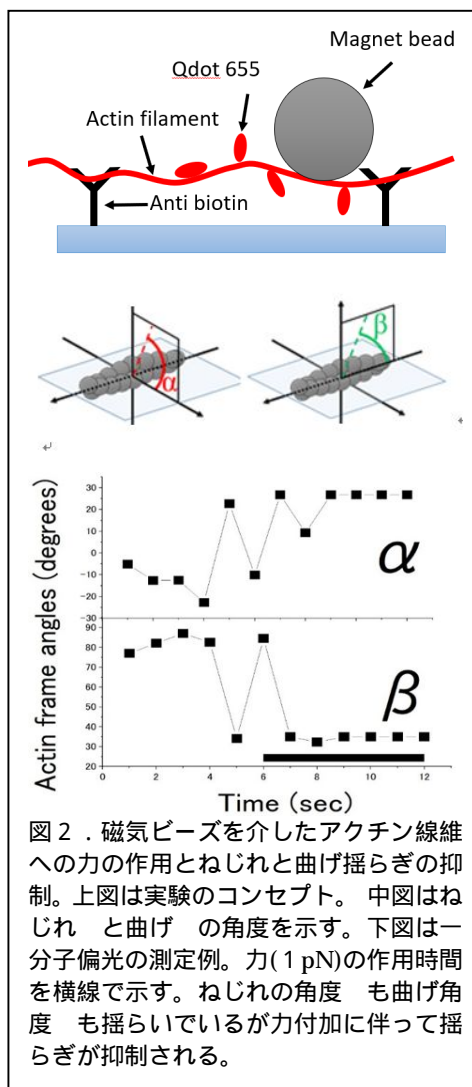


図2. 磁気ビーズを介したアクチン線維への力の作用とねじれと曲げ揺らぎの抑制。上図は実験のコンセプト。中図はねじれと曲げの角度を示す。下図は一分子偏光の測定例。力(1 pN)の作用時間を横線で示す。ねじれの角度も曲げ角度も揺らいでいるが力付加に伴って揺らぎが抑制される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 辰巳仁史	4. 巻 11
2. 論文標題 シロイヌナズナの重力受容の分子機構を探し求めて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bsj-review	6. 最初と最後の頁 4-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24480/bsj-review.11a2.00174	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 Hayakawa, K., C. Sekiguchi, M. Sokabe, S. Ono, and H. Tatsumi	4. 巻 431
2. 論文標題 Real-Time Single-Molecule Kinetic Analyses of AIP1-Enhanced Actin Filament Severing in the Presence of Cofilin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 308-322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2018.11.010	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 該当する
1. 著者名 Kiyoshima, D., H. Tatsumi, H. Hirata, and M. Sokabe. 2018	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Tensile Loads on Tethered Actin Filaments Induce Accumulation of Cell Adhesion-Associated Proteins in Vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.8b02076	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 Ryota Makibatake, Daisuke Oyama, Jun Kawai, and Hitoshi Tatsumi	4. 巻 55
2. 論文標題 Remote sensing of ciliary beating using a SQUID gradiometer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE Trans Mag	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/TMAG.2018.2887183	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kaoru Okura ( 大蔵 かおる ), Takumi Fukuda ( 福田 拓海 ), Hitoshi Tatsumi ( 辰巳 仁史 )
2. 発表標題 アクチン線維に張力を発生させると線維の長軸まわりのねじれは減少する
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辰巳仁史
2. 発表標題 張力センサーとしてのアクチン線維：その揺らぎ解析
3. 学会等名 生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木 良次、辰巳 仁史、宮原 英夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 200
3. 書名 知っておきたい 医工計測技術入門	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------