

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：57601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06603

研究課題名(和文)アクチン分子構造の力学応答によるアクチン結合タンパク質の親和性変化の解析

研究課題名(英文) Analysis of affinity changes of actin-binding proteins by mechanical response of actin molecular structures

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

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)：本研究ではアクチンの構造状態を検出可能なFRET actinを用いて、細胞に力刺激を加えた際の細胞内のアクチン構造の変化と、アクチン結合タンパク質であるコフィリンとアクチニンの局在変化を調査した。その結果、力刺激により細胞内のアクチン構造が変化することを確認した。さらに力刺激によってコフィリンについては張力がかかっていると思われるアクチンに対しては親和性が低下する一方、アクチニンについては集積すること現象が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細胞が力を受けると細胞内アクチンの分子構造やアクチン結合タンパク質の局在が変化することが確認された。細胞は生体内で血流や隣接する別の細胞、または細胞自身が持つ別のタンパク質は発生させる力など内外からの力によって、その機能を変化させることが知られている。今回の成果は、その原理解明に重要な知見を与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated the changes in actin structure and the localization of the actin-binding proteins, cofilin and actinin, upon force stimulation of cells using FRETactin, which can detect the conformational state of actin. As a result, I confirmed that the intracellular actin structure was changed by force stimulation. In addition, I found that force stimulation decreased the affinity of cofilin for actin, which is considered to be under tension, while actinin accumulated.

研究分野：生物物理

キーワード：アクチン 力応答

1. 研究開始当初の背景

アクチンフィラメントは細胞運動、細胞質分裂、細胞内輸送、筋収縮など様々な細胞機能において中心的な役割を果たしており、これらの機能は多様なアクチン結合タンパク質との相互作用による。細胞がこれらの機能を発揮するには細胞内でアクチン結合タンパク質が適切に局在し、アクチンフィラメントと相互作用することが重要である。また、細胞は内外からの力を感じ、応答するが (e.g. Janmey et al., 2007)、これらの力刺激によりアクチンフィラメントやアクチン結合タンパク質との相互作用が影響を受けることが知られている (Schramm et al., 2017, Winkelmann et al., 2020)。

アクチンモノマーはラージドメインとスモールドメインの2つの主要なドメイン構造から形成される。これらのドメイン間の相対的な位置関係は重合前後や、アクチン結合タンパク質との相互作用により変化する。この構造変化は、フィラメントの安定化や、アクチン結合タンパク質の機能発揮に重要である。例えば、重合後、2つのドメインが平板化することで安定したフィラメントが形成される (Oda et al., 2009)。また、アクチン脱重合タンパク質であるコフィリン存在下のアクチンサブユニットはドメイン間が傾いており、このことでアクチンフィラメントを不安定化すると考えられている (Galkin et al., 2002)。これらの構造学的知見はアクチン自身やアクチン結合タンパク質が機能を発揮するのにアクチンの構造変化が重要であることを示している。また、アクチンの構造変化はアクチンフィラメントに加わる力によっても生じることが示唆されている (Shimozawa et al., 2009)。これらのことから、アクチンフィラメントへの力の負荷は、アクチン分子構造を変化させ、その結果、アクチン結合タンパク質との相互作用に影響を与えると推察される。これらの一連の現象が、細胞が力を感じ、応答する能力に関連している可能性が指摘されている。

2. 研究の目的

電子顕微鏡等によりアクチンは多様な構造を取ることが知られてきているが、これらの実験は精製したアクチンを用いたものである。一方、我々は過去の研究において、細胞内でもアクチンは複数の構造状態を取り得ることを明らかにした。これら研究から細胞内アクチンの多型性が細胞の力感知や力応答にも関与している可能性が考えられた。しかし、細胞内における力によるアクチン構造の変化とアクチン結合タンパク質との相互作用変化については明確にされていない。そこで本研究では、細胞に力刺激を加えた際の細胞内アクチン構造変化を検出し、力依存的なアクチン結合タンパク質の相互作用変化との関連性について理解することを目的とした。

3. 研究の方法

過去、我々はアクチンの構造変化を検出するために FRET actin を用いて、細胞内アクチン構造の分布を検出している。この FRET actin ではアクチンのラージドメイン、スモールドメインのそれぞれの先端に2つの蛍光色素を結合させてあり、分子内 FRET により構造状態の違いを検出することができる (Noguchi et al., 2015)。

この FRET actin を電ポレーションにより CFP-コフィリン、または CFP-アクチニンを発現させた PtK2 細胞内に導入し、マイクロニードルを用いて細胞に力刺激を加えた際の FRET 変化(アクチン構造の変化)、および CFP 局在変化(アクチン結合タンパク質の局在変化)を解析した (図1)。

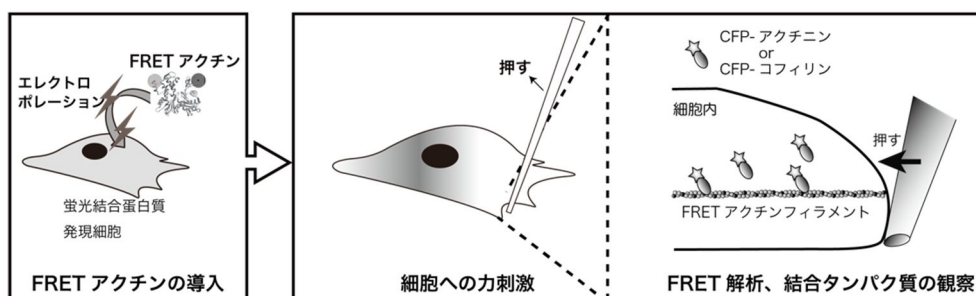


図1 実験の概要図

FRET actin を、CFP 融合アクチン結合タンパク質を発現させた細胞に導入し、マイクロニードルで細胞を押し、この時の FRET 変化と CFP 蛍光の変化を解析する。

4. 研究成果

CFP-アクチニンを発現させた細胞に FRET actin を導入し、ガラスニードルで力刺激を加えたところ、ほとんどの細胞で細胞が押された領域付近の FRET 強度が増加し、過去の我々の研究と同様の結果が得られた。また、単位アクチン量に対する CFP-アクチニン蛍光 (CFP/Donor) の変化を調べたところ、多くの細胞で押された領域のアクチニン量が増加することが示唆された (図 3)

一方、CFP-コフィリンに対しても同様の実験を行ったところ、FRET actin の FRET 強度の変化はアクチニンの時と同様に FRET 強度が増加する細胞が多かったが、CFP-コフィリン (CFP/Donor) については、アクチニンとは逆に減少する細胞が多くみられた (図 3)

以上の結果は、細胞内アクチンの分子構造が力により変化し、その結果、アクチン結合タンパク質の局在が変化することを示唆しており、その挙動はアクチン結合タンパク質の種類によって異なる可能性を示している。

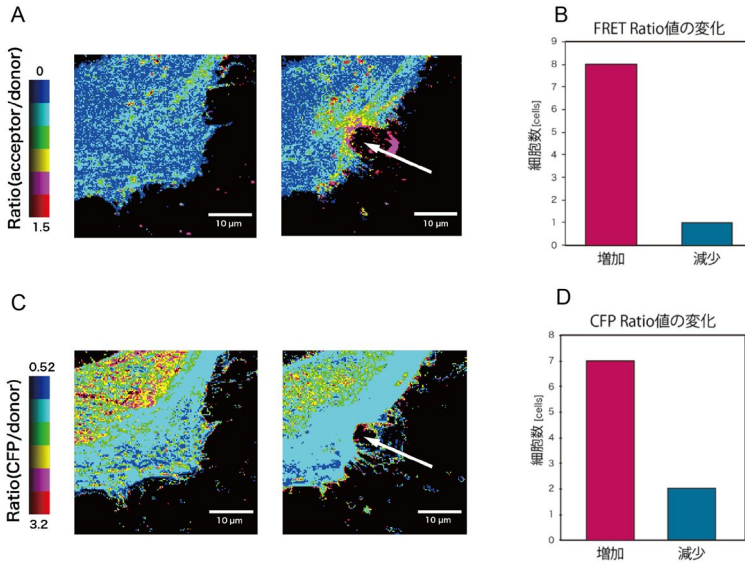


図 2 CFP-アクチニン導入

細胞に対する力の負荷

A: 力刺激した際の FRET ratio (acceptor/donor) 解析画像。C: 力刺激した際の CFP ratio (CFP/donor) 解析画像。A,B 中の矢印がニードルで押された箇所を示している。

B (FRET ratio) と D (CFP ratio) は押された付近の力刺激前後の Ratio 値の変化率を計算し、10%以上の変化した細胞を“増加”、10%未満を“減少”としてカウントした。

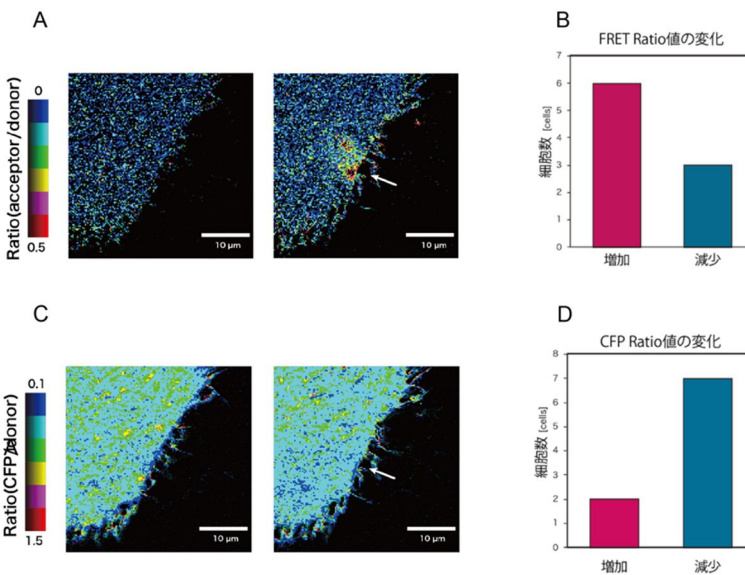


図 3 CFP-コフィリン導入

細胞に対する力の負荷

A: 力刺激した際の FRET ratio (acceptor/donor) 解析画像。C: 力刺激した際の CFP ratio (CFP/donor) 解析画像。A,B 中の矢印がニードルで押された箇所を示している。

B (FRET ratio) と D (CFP ratio) は押された付近の力刺激前後の Ratio 値の変化率を計算し、10%以上の変化した細胞を“増加”、10%未満を“減少”としてカウントした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kuroda Kyohei, Shinshima Futaba, Tokunaga Shoichi, Noguchi Taro Q.P., Yamauchi Masahito, Nobu Masaru K., Narihiro Takashi, Yamada Masayoshi | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Assessing the effect of green tuff as a novel natural inorganic carrier on methane-producing activity of an anaerobic sludge microbiome | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Environmental Technology & Innovation | 6. 最初と最後の頁 101835 ~ 101835 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.eti.2021.101835 | 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 Kuroda Kyohei, Narihiro Takashi, Shinshima Futaba, Yoshida Mio, Yamaguchi Haruka, Kurashita Hazuki, Nakahara Nozomi, Nobu Masaru K., Noguchi Taro Q.P., Yamauchi Masahito, Yamada Masayoshi | 4. 巻 0 |
| 2. 論文標題 High-rate cotreatment of purified terephthalate and dimethyl terephthalate manufacturing wastewater by a mesophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor and the microbial ecology relevant to aromatic compound degradation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Water Research | 6. 最初と最後の頁 118581 ~ 118581 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.watres.2022.118581 | 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 Xuguang Lin, Numin Galaqin, Teina Tainaka, Keiya Shimamori, Masahiro Kuragano, Taro Q.P. Noguchi, Kiyotaka Tokuraku | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Real-Time 3D Imaging and Inhibition Analysis of Various Amyloid Aggregations Using Quantum Dots | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 1978 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21061978 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|-------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 山下詩織, 野口太郎 |
| 2. 発表標題 力刺激により引き起こされる細胞内アクチンの構造変化とアクチン結合タンパク質の局在変化 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 山之口奨悟, 野口太郎 |
| 2. 発表標題 Flat構造またはTilted構造が安定化されたF-アクチンの作成と機能解析 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Miyu Kawano, Mitsuhiro Iwaki, Taro Q.P. Noguchi |
| 2. 発表標題 Analysis of G63D mutant actin that caps the pointed-end of actin filament |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|