

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21247021

研究課題名（和文）負の張力センサーとして機能するアクチン線維：その物理化学機構の解明

研究課題名（英文）Actin filaments work as a negative tension sensor: elucidation of its physiochemical mechanism

研究代表者

曾我部 正博 (SOKABE MASAHIRO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10093428

研究成果の概要（和文）：伸展および弛緩した単一アクチン線維に、アクチン線維切断因子(ADF)コフィリンを添加したところ、コフィリンは弛緩したアクチン線維にのみ選択的に結合し、これを切断した。すなわち、アクチン線維は自身の（負の）張力に応じたコフィリン活性の調節を介して、自らの動態（崩壊）を制御する“負のメカノセンサー”として働くことが実証された。アクチン線維が弛緩すると長軸周り（モノマー間）の回転ゆらぎが増大し、コフィリンが結合しやすくなるものと推定された。

研究成果の概要（英文）：The actin depolymerizing factor (ADF) cofilin was found to bind selectively to relaxed actin filaments and severed them, indicating that actin filaments work as a negative tension sensor through a tension dependent regulation of cofilin activity. It is supposed that increased torsional fluctuations of relaxed actin filaments accelerate the cofilin binding to them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,200,000	3,960,000	17,160,000
2010年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2011年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
総計	35,300,000	10,590,000	45,890,000

研究分野：細胞生物物理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物物理学

キーワード：メカノセンサー、アクチン線維、コフィリン、ゆらぎ、1分子観察、分子動力学

1. 研究開始当初の背景

アクチン細胞骨格の動態は、細胞の形態変化や運動において中心的役割を果たしている。それは Rho を始めとしたアクチン調節蛋白質によって制御されているが、力学刺激も極めて重要な制御因子であることが分かってきた。しかし「力」がどのようにアクチン細胞骨格の動態制御に関わるのかは全くの謎である。これまでの薬理学を中心とした研究によって、細胞接着斑 (FA) とそこに連結するストレスファイバー (SF、アクトミオシンの束) は、それぞれが SF の張力で維持され

ており、張力が下がるとその構造がやや緩慢（分のオーダー）に崩壊することが知られている。言い換えると、SF は緩むと切れるという、およそ単純な物理的現象と正反対の挙動を示す。我々はその背後には何らかの化学因子、おそらく細胞質内のアクチン脱重合因子 (ADF) が関与すると推測した。これを確認するために、細胞膜をディジトニン処理し、膜を透過性にして細胞質を取り去ったセミインタクト細胞で弛緩刺激を与えたところ、SF は全く変化しなかった。そこで、可能性のある ADF を順次加えたところ、ADF/コフ

インリンの添加によって生細胞で観測された弛緩による SF の消失が再現できた。従って、コフィリンは弛緩したアクチン線維を選択的に脱重合（切断）することで SF の消失を導くという仮説が考えられた（図 1）。言い換えると、張力の有無によるアクチン線維 (AF) の構造的違いがコフィリン活性を制御している可能性がある。

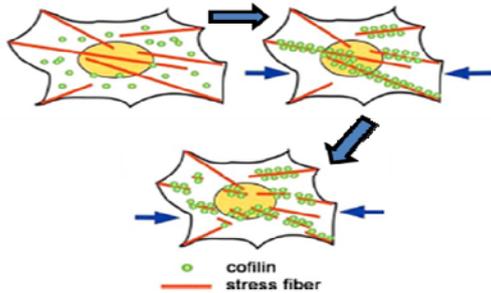


図 1. 細胞を予め一軸（水平）伸展した基質（PDMS）上に培養した後、弛緩させることで SF に弛緩刺激を与えると、コフィリンは弛緩度の大きい SF に選択的に結合して、これを切断するというモデル。

AF はアクチンモノマーが螺旋状に重合した構造をとるが、コフィリンが結合すると、その部位の螺旋のピッチが増加する方向に捻れ、その後切断が生じるとされている。申請者らは、伸張刺激によりアクチン線維に発生した張力が、このような構造変化、もしくはコフィリンのアクチンへの結合自体を抑制することでアクチン線維の切断を防ぐという斬新な仮説を発想し、それを実験的に検証しつつある。具体的には、単一アクチン線維 (AF) にミオシンコートしたビーズを結合させ、光ピンセットによりビーズを操作して AF を伸長した状態でコフィリンを添加し、フィラメントが切断されるまでの時間を測定した。その結果フィラメント切断に要する時間は弛緩時（平均 17s）に比べて、張力存在下では約 2.5 倍に延長した。これは、コフィリンによるアクチン切断活性がアクチン線維の伸長で生じた張力によって抑制されることを強く示唆している。

2. 研究の目的

アクチン線維 (AF) が自らの張力を感じて ADF/コフィリンの結合/活性を調節することで、自らの動態を制御する“メカノセンサー”であることを実証し、その物理化学機構を解明することである。そのために以下の 3 つの目標を設定した。コフィリンによるアクチン線維の切断過程は、AF への結合と切断の 2 段階からなる。そこでまず、1) アクチン線維の伸長（張力発生）が、コフィリンの AF への結合を抑制するか否かを結合過程の 1 分子

イメージングで直接検証する。次に 2) そのような張力依存的なコフィリンの結合/活性が AF のどのような構造変化に起因するのかを明らかにする。我々は、AF の長軸周りの回転（捻れ）ゆらぎの変化であると予想している。最後に、3) AF へのコフィリン結合によって、回転ゆらぎがどのように変化するのかを解析し、切断過程の物理化学機構を推測する。

3. 研究の方法

- (1) 切断抑制に必要な張力の測定：カバースリップ上に、磁気ビーズを結合した AF メッシュを貼り付け、磁石で距離に応じた牽引力を負荷して、コフィリン存在下での切断の力依存性を定量的に見積もった（図 2）。
- (2) コフィリン結合の直接観察：ローダミン染色した AF をカバースリップに貼り付け、伸長刺激有り・無し状態で、FITC 染色したコフィリンを添加して、1 分子 TIRF イメージングで直接コフィリンの結合を測定した（図 3）。
- (3) AF の回転揺らぎの測定；一端に蛍光標識したガラスビーズを結合した単一 AF をカバースリップから吊り下げ、アクチン線維の軸周りの回転ゆらぎを 1 分子イメージングで測定した（図 4）。
- (4) AF の回転揺らぎのシミュレーション：アクチン分子 14 個からなる AF のモデルを構築し、分子動力学シミュレーション (NAMD 2.6、CHARMM27) を行い、張力によるアクチン線維の回転ゆらぎの変化をシミュレーションした（図 5）。

4. 研究成果

- (1) コフィリンによる AF 切断の抑制に必要な張力の評価：力非依存的な ADF ゲルズリン存在下で、磁気ビーズを結合した AF に磁場をかけて牽引力を負荷すると（図 2）、ほぼ磁石からの距離の 2 乗に反比例して AF が切断された。同様の実験をコフィリン存在下で行うと、1pN 以下では明瞭な効果は見られないが、2pN から切断抑制が見られ 4pN 以上ではほとんど切断されないことが分かった。

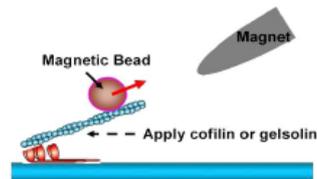


図 2. 磁気ビーズを結合した AF に磁場をかけて任意の牽引力を負荷する。AF に負荷される力はビーズと磁石の距離の 2 乗（磁力）に反比例する。

(2) コフィリンは弛緩した AF に選択的に結合する：カバースリップに貼り付けたアクチンメッシュをガラスピペットで引っ掻いて、ピペット先端とメッシュを繋ぐ AF を形成し、ピペットを動かして、弛緩、および徐々に伸張した状態を作った。ここに FITC ラベルしたコフィリンを添加し、TIRF イメージングによってコフィリンの結合を実時間 (33 frame/sec) で解析した。その結果、コフィリンは弛緩した AF に選択的に結合する (結合確率が高い) ことが判明した。

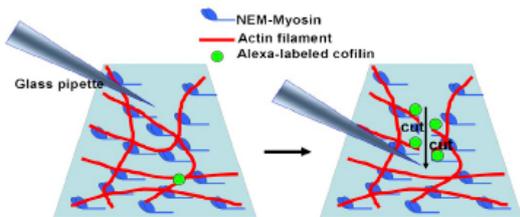


図 3. NEM ミオシンを塗布したカバースリップに固定した AF メッシュ引っ掻くことで、ピペット先端と AF メッシュを架橋する AF が形成できる

(3) 張力は AF の回転ゆらぎを抑制する：図 4 に示す方法で AF の軸周りの回転ゆらぎの張力依存性を調べた。数 pN の牽引力で回転ゆらぎが顕著に減少した (図 4C→D)。

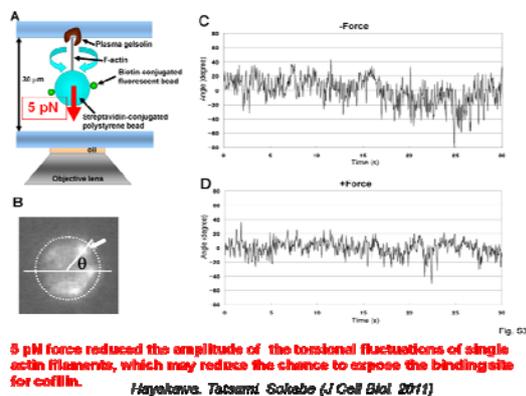


図 4. 一端に蛍光標識したガラスビーズを結合した AF をカバースリップから吊り下げて回転ゆらぎを計測する (A, B)。レーザーピンセットで数 pN の牽引力を負荷すると回転ゆらぎ (C) が減少する (D)。

また、アクチン分子 14 個からなる AF モデルの分子動力学計算を行い、回転ゆらぎが張力で減少することを再現できた (図 5)。

以上の結果から、数 pN 程度の張力で AF の回転ゆらぎが減少し、コフィリンの結合が抑制されることがほぼ明らかとなった。生理条件では AF の張力は数 pN 以上であり、な

ぜ生理条件で AF や SF が構造を維持できているのかの根拠も明らかとなった。

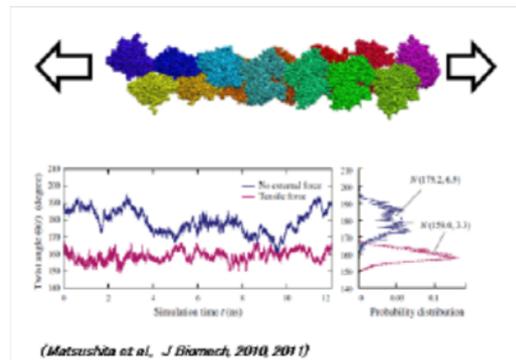


図 5. アクチン 14 分子からなる AF の分子動力学計算。無負荷時の AF の回転ゆらぎ (青色) は牽引力の負荷による張力増大で抑制された (赤色)。

(4) コフィリンの結合で AF の歳差揺らぎが大きくなる；コフィリン結合後のアクチン線維の切断機構に迫るべく、アクチン線維の回転ゆらぎに対するコフィリンの影響を図 4 と同じ手法で解析した。その結果、弛緩したアクチン線維にコフィリンを添加すると、軸周りのゆらぎは変化しないか、むしろ減少した。

一方でアクチン線維全体の歳差揺らぎが大きくなった (図 5 右下)。この結果は、おそらくコフィリンの空間協同的結合による AF の機械特性の変化 (コフィリンロッドの形成、図 6 左下の赤色部位) によると予想された。コフィリンロッド部位はコフィリン非結合部位よりも曲げ弾性率が大きく (硬く) なり、ロッドが複数形成されると、あたかもヌンチャクのような機械特性となり、(図 6 左下の模式図を参照) 観察されたような歳差揺らぎの増大を招いたと思われる。

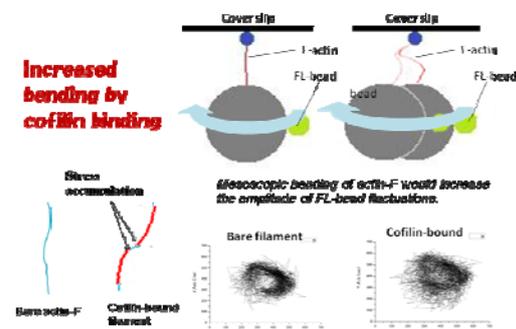


図 6. ガラスビーズの蛍光標識の 2 次元トラジェクトリ。コフィリン結合で歳差揺らぎが大きくなる (右下)。左下はコフィリンロッド (赤色) の形成と応力集中点を示す。

このときロッドと非ロッドの境界は歪が大きくなり、応力集中点になりやすい。すなわちここが AF の切断点ではないかと想像される。逆に言えば、以上に述べた仮説こそがコフィリンによる AF 切断の物理化学機構である可能性がある。その成否や詳細は今後の研究を待たねばならない。

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 39 件)

- ① Grygorczyk R, Furuya K, Sokabe M. Imaging and characterization of stretch-induced ATP release from alveolar A549 cells. *J Physiol*, 591 (5) 1195-1215 (2013) 査読有
- ② Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Mechanosensing by actin filaments and focal proteins. *Commun Integr Biol*, 5(6): 572-577 (2012)査読有
- ③ Sawada Y, Murase M, Sokabe M. The gating mechanism of the bacterial mechanosensitive channel MscL revealed by molecular dynamics simulations : from tension sensing to channel opening. *Channels*, 6(4): 317-331 (2012) 査読有
- ④ Suganuma N, Ito S, Aso H, Kondo M, Sato M, Sokabe M, Hasegawa Y. STIM1 regulates platelet-derived growth factor-induced migration and Ca²⁺ influx in human airway smooth muscle cells. *PLoS ONE*, 7(9): e45056 (2012)査読有
- ⑤ Nomura T, Cranfield CG, Deplazes E, Owen DM, Macmillan A, Battle AR, Constantine M, Sokabe M, Martinac B. Differential effects of lipids and lyso-lipids on the mechanosensitivity of MscL and MscS. *PNAS*, 109(22):8770-8775 (2012) 査読有
- ⑥ Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Actin filaments function as a tension sensor via tension-dependent binding of cofilin to the filament. *J Cell Biol*, 195(5):721-727 (2011) 査読有
- ⑦ Kiyoshima D, Kawakami K, Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Force- and Ca²⁺-dependent internalization of integrin in cultured endothelial cells. *J Cell Sci*, 124(Pt 22):3859-70 (2011) 査読有
- ⑧ Yamamoto K, Furuya K, Nakamura M, Kobatake E, Sokabe M, Ando J. Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca²⁺ waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J Cell Sci*, 124: 3477-83 (2011)査読有
- ⑨ Morioka M, Parameswarane H, Naruse K,

Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y, Suki B, Ito S.

Microtubule dydynamics regulate cyclic stretch-induced cell reorientation in human airway smooth muscle cells. *PLoS One*, 6(10): e26384 査読有

- ⑩ Matsushita S, Inoue Y, Hojo M, Sokabe M, Adachi T. Effect of tensile force on the mechanical behaviors of actin filaments. *J Biomech*, 44(9):1776-81 (2011)査読有
- ⑪ Fujiu K, Nakayama Y, Iida H, Sokabe M, Yoshimura K. Mechanoreception by Motile Flagella revealed by Chlamydomonas. *Nature Cell Biol*, 13(5):630-632 (2011)査読有
- ⑫ Matsushita E, Asai N, Enomoto A, Kawamoto Y, Kato T, Maeda K, Hattori S, Hagikura M, Takahashi K, Sokabe M, Murakumo Y, Murohara T, Takahashi M. Protective role of Gipiie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 22(6):736-747 (2011)査読有
- ⑬ Matsushita S, Adachi T, Inoue Y, Hojo M, Sokabe M. Evaluation of Extensional and Torsional Stiffness of Single Actin Filaments by Molecular Dynamics Analysis. *J Biomech*, 43(16):3162-7 (2010)査読有
- ⑭ Kobayashi T, Sokabe M. Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol*, 22:669-676 (2010)査読有
- ⑮ Yoshimura K, Sokabe M. Mechanosensitivity of ion channels based on protein-lipid interaction. *J Royal Soc Interface*, 7: S307-S320 (2010)査読有

[学会発表] (計 19 件)

- ① Sokabe M (Organizer) Mechanotransduction by actin filaments is realized by tension dependent cofilin severing of actin filaments. 14th International Membrane Research Forum: Meso-Scale Molecular Complexes and Domains and their Functions in the Membrane, March 15-17, 2013, iCeM, Kyoto, Japan
- ② Sokabe M (organizer), Furuya K. Critical role of mechanosensitive ATP release from mammary alveoli in milk ejection. Symposium on "Emerging Roles of Purinergic Signaling in Mechanobiology". Purine 2012 in Fukuoka, May 31-June 2, 2012, Fukuoka, Japan
- ③ Sokabe M. Roles of actin cytoskeleton in cellular mechanotransduction. Symposium on "Force Transduction and Emerging Channels", May 9-12, 2012, Berlin,

- Germany
- ④ Sokabe M. (Plenary talk) How do forces activate mechanosensitive channels in bacteria and eukaryotic cells? Internatl Symposium on Mechanobiology (5th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular biology. November 4-8, 2011, Shanghai/Hangzhou, China.
- ⑤ Sokabe M. (Plenary talk) Comparative biophysics and physiology of cell mechanosensing: from passive to active touch. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, June 1st, 2011, Nagoya, Japan
- ⑥ Sokabe M. (Keynote talk) Nano-Mechanobiology: Sensing Mechanical Stimuli and Substrate Rigidity. Nano · Biomedicine Symposium at 4th Ann Met Nanobiomedical Soc, Feb 21-22, Nagoya, Japan
- ⑦ Sokabe M. (Educational talk) Application of optical recording technique with voltage sensitive dyes to the study of synaptic transmission and plasticity in the brain. SERC School on “Biophysics in Medicine: Advanced Training in imaging of Experimental Models”, 3-9 Feb 2011, Delhi, India
- ⑧ Sokabe M. (Plenary lecture) Biophysical and Evolutionary Aspects of Cell mechanosensing by Mechanosensitive Ion Channels. 7th ABA (Asian Biophysics Association) Symposium. Jan 29-Feb 2, 2011, Delhi, India
- ⑨ Sokabe M. (Plenary talk) Nano-Mechanobiology: Sensing Mechanical Stimuli and Substrate Rigidity. NanoBioMedicine Symposium, Jan 21-22, 2010, Nagoya, Japan
- ⑩ Sokabe M. (Plenary talk) The Impact of Emerging Nano-Mechanobiology. Nagoya University FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevice International Symposium. Nov 15, 2010, Nagoya, Japan
- ⑪ Sokabe M. (Keynote talk) Mechanotransduction at cell membrane and cell-substrate adhesion. The 6th GEM4 Summer School on “Cell-cell and cell-substrate adhesion. July 25-31(29), 2010, Singapore
- ⑫ Sokabe M. (Plenary talk) “Comparative Biophysics of Mechanotransduction: from bacteria to endothelial cells”. The 1st International Symposium on Biorheology, June 2, 2010, Wako, Japan
- ⑬ 曾我部正博 (特別講演)、細胞力覚研究におけるイオンコンダクタンス顕微鏡 (ICM) の有用性と発展性、第 4 回プローブ顕微鏡による表面分析研究会、2012 年 2 月 10 日、名古屋
- ⑭ 曾我部正博、細胞の重力感知をめぐる諸問題と解決の方向性。シンポジウム“今、改めて考える宇宙生物科学”、第 25 回宇宙生物科学学会大会、2011 年 9 月 30 日-10 月 1 日、横浜
- ⑮ 曾我部正博、神経ステロイドによるアルツハイマー病の予防・治療の可能性、生理学研究所研究会“超階層シグナル伝達研究の新展開、2011 年 9 月 29-30 日、岡崎
- ⑯ 曾我部正博 (オーガナイザー)、開会挨拶：“生物に学ぶ柔軟なシステムの探索：ゆらぎと多様性をキーワードとして”の主旨、日本学術会議・学術フォーラム、2011 年 9 月 1 日 名古屋
- ⑰ 曾我部正博 (特別講演)、神経ステロイドの神経保護作用：アルツハイマー病と脳卒中の新規治療法の可能性。Replacement Therapy 研究会、2011 年 7 月 8 日、東京
- ⑱ 曾我部正博 (organizer)、Mechanosensing by ion channels: from bacteria to human. Symposium on “Emerging Mechanobiology”、第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20-22 日仙台
- ⑲ 曾我部正博 (オーガナイザー) 細胞力覚の生物物理学と比較生理学、シンポジウム「メカノトランスダクションと生理機能」第 87 回日本生理学会大会 2012 年 5 月 19-21 日、盛岡
- [図書] (計 9 件)
- ① Sokabe M. A Note on Emerging Mechanobiology. In “Recent Advances in Mechanobiology” (Eds. Yongde, Sokabe, et al), Shanghai Sci Tech Liter Pub House, pp91-94 (2012)
- ② Sokabe M., Sawada Y, Nomura K, Yoshimura K, Kobayashi T. How do forces activate mechanosensitive ion channels in bacterial and eukaryotic cells? *ibid.*, pp95-100 (2012)
- ③ Tatsumi H, Hayakawa K, Hirata H, Sokabe M. The role of actin filaments as a force-transmitter and a force-sensor. *ibid.*, pp153-156 (2012)
- ④ Shi Y, Sokabe M., et al. (eds.) “Recent Advances in Mechanobiology” Shanghai Sci Tech Liter Pub House, 201 pages (2012)
- ⑤ Cai W, Sokabe M., Chen L. Time-window of progesterone neuroprotection after stroke. In “Cerebral Ischemia/Book 1”, (Ed. Balestrino M), InTech, pp 479-496 (2012)

- ⑥ Sokabe M. Methods for processing and analyzing single channel data. In "Modern Patch Clamp Techniques" (Ed. Okada Y), Springer Verlag, pp85-104 (2012)
- ⑦ Tatsumi H., Hayakawa K, Sokabe M. Nanotechnology in mechanobiology: mechanical manipulation of cells and organelle while monitoring intracellular signaling. In "Mechanosensing Biology" (ed. Noda M), Springer Verlag, pp3-19 (2010)
- ⑧ 曾我部正博、細胞はどのように力を感じるのか：細胞力覚研究の最前線、In「次世代バイオメテイクス研究の最前線」(下村編)、シーエムシー出版、pp119-126 (2011)
- ⑨ 曾我部正博 (鑑訳)、第1部 生物学序論：細胞と生理学概論、In「ガイドン生理学(11版)」(原題：Introduction to Physiology:The Cell and General Physiology, In "Textbook of Medical Physiology, Guyton & Hall"), エルゼビア JP、pp3-45 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾我部 正博 (SOKABE MASAHIRO)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10093428

(2) 研究分担者

辰巳 仁史 (TATSUMI HITOSHI)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：20171720

(3) 連携研究者

早川 公英 (HAYAKAWA KIMIHIDE)
名古屋大学・工学研究科・特任講師
研究者番号：60467280