

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24年 3月31日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590270

研究課題名（和文）多様な細胞内アクチン高次構造上でのミオシン滑り運動解析：レール特性と機能を探る

研究課題名（英文） Analysis of myosin sliding on wide variety of actin- rails.

研究代表者

石川 良樹（ISHIKAWA RYOKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20212863

研究成果の概要（和文）：種々の細胞運動を担っているミオシン運動につき、「裸の状態」のアクチン繊維上を滑走するのと、「様々なアクチン結合タンパク質が結合したアクチン繊維上」を滑走するので違いはあるか？という疑問のもと、ミオシン滑り運動解析を行った。脳特異的なアクチン結合タンパク質であるドレブリンがミオシンVに及ぼす影響を調べたところ、ミオシンVは、ドレブリンを結合させたアクチン線維上を、裸のアクチン線維と同じ滑り速度で滑走したが、結合してから遊離するまでの走行距離&時間は短かった。ドレブリンは、ミオシン前足頭部のアクチンへの結合を抑制したが、後足頭部のADP遊離には影響を与えなかった。以上の結果は、ドレブリンで飽和したアクチン線維上では、ミオシンVのアクチンへの結合親和性が低下し、その結果ミオシン滑り運動が阻害されていると示唆される。ドレブリンは神経成長円錐の辺縁部と中心部の境界の静的なアクチン線維上に局在しているが、このアクチンレールがミオシン活性を阻害することによってこのような振る舞いをしている可能性が高いものと思われる。

研究成果の概要（英文）：To examine whether or not brain-specific actin binding protein drebrin affects the activity of myosin-V, we observed the sliding of myosin-V on F-actin in the presence or absence of drebrin. We found that myosin-V slides on drebrin-decorated F-actin as fast as “naked” F-actin, whereas sliding distance and attachment time were smaller in the presence of drebrin than that in the absence of drebrin. Drebrin inhibits the binding of leading head to F-actin, but does not inhibit the release of ADP from trailing head. These results suggest that drebrin modulates the affinity of myosin-V to F-actin, thus inhibits the activity of myosin-V, and affects the motility of the central zone of nerve cell growth cones.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アクチン、ミオシン

1. 研究開始当初の背景

- (1) 過去 20 年間、我々の研究室をふくめた国内外で、種々のアクチン結合蛋白質の発見・解析が集中的に行われた (Ishikawa R et al (1991) J. Biol. Chem. 266, 21784-21790; Ishikawa R et al, (1998) J. Biol. Chem. 273, 26991-26997; Ishikawa R et al, (2003) J. Neurochem. 87, 676-685)。その結果、「アクチン分子単独では、単量体である G-アクチンと、それが重合した線維状の F-アクチンの二種類の形態しか取れない。これにアクチン結合蛋白質が結合してはじめて、束構造、網目構造、凝集構造といった高次構造が形成される」という事が明らかにされた。
- (2) また近年、GFP 融合蛋白質による生態観察技術が急速に進展し、アクチン結合蛋白質動態の解析が可能になった。これらの解析により、それぞれのアクチン高次構造複合体を構成する主要なアクチン結合蛋白質は出そろった感があった。たとえばフィロポディアではファシン、ストレスファイバーではミオシン II とトロポミオシン・カルデスモン、接着斑では α アクチニン、ラメリポディアでは Arp2/3 などである。
- (3) 一方、モーター部位が従来のミオシン (ミオシン II) と同じで、他の部分の構造が全く異なる種々のミオシンが見つかり、ほ乳類細胞ではミオシン I、ミオシン II、ミオシン V、ミオシン X 等が主に発現することが判って来た。ミオシン II を含むこれらのミオシン系モーター蛋白質とアクチンとの相互作用解析は生物物理学の分野で大きく進展し、1 分子の挙動が予想できるまでになっていた。

2. 研究の目的

- (1) ミオシンの滑り運動解析は裸のアクチン線維上でなされており、実際に細胞内で存在するであろうアクチン形態、すなわち多くのアクチン結合蛋白質を含む高次構造複合体上でのアクチン・ミオシン相互作用解析は殆ど行われていなかった。従来行われて来た「裸のアクチン線維」とミオシンとの滑り運動は、「高次構造複合体」でも同一であろうか？予想される答えは否である。ATP の消費という生化学的データによれば、主要なアクチン結合蛋白質を結合させるとミオシンの

ATPase 活性が変化するという報告が我々を含め数多くなされている (Ishikawa R et al, (1991) J. Biol. Chem. 266, 21784-21790 など)。また我々は、主要な「アクチン結合蛋白質を結合させたアクチン線維」のミオシン II 上での滑り速度が、「裸のアクチン線維」と異なるという例を示して来た (Ishikawa R et al (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 359, 398-401)。

- (2) そこで本研究では、それぞれのアクチン高次構造複合体のミオシンレールとしての特性を明らかにし、高次構造複合体の細胞内機能を探る事を目的として、以下の実験を行った。

3. 研究の方法

フィロポディア、ラメリポディア、ストレスファイバー、接着斑といった細胞内アクチン高次構造複合体に局在する主要構成蛋白質を用いて *in vitro* で疑似複合体を再構成し、これをレールとしたミオシン 1 分子滑り運動解析を行った。

- (1) 各種タンパク質は、大腸菌発現系、バキュロウイルス発現系、及び組織より直接精製した。
- (2) ミオシンの蛍光標識は、avi-tag もしくは myc-tag を付加した発現タンパク質に、アジンピオチン系、あるいは抗 myc 抗体系を利用して Q-dot 標識を行った。アクチンの蛍光標識はローダミンファロイジンで行った。
- (3) フローセルにニトロセルロースを用いてミオシンを固定した。または、アジンピオチンの系を用いて、アクチンを固定した。前者には蛍光標識をしたアクチン繊維を、後者には蛍光標識をしたミオシンを流してやり、ATP 存在下で分子運動を観察した。種々のアクチン結合タンパク質を飽和状態で結合させたアクチン繊維で同様の解析を行い、比較検討を行った。解析には、SIT カメラ、高感度 CCD カメラをセットした全反射蛍光顕微鏡システムを用いて分子の動きを録画し、スピード解析を行った。
- (4) また、アクチンレールとして細胞からアクチン高次構造複合体の単離を遠心法を使って試みた。

4. 研究成果

- (1) 過去バラバラに行ってきた、アクチンミオシン相互作用に対する各種アクチン結合タンパク質の影響を網羅的に再検討した。その結果、平滑筋トロポミオシンはアクチンミオシン滑り運動を促進、ドレブリン、カルデスモン、コフィリンは滑り運動を阻害することが再確認された。これは、裸のアクチン繊維と、これらアクチン結合タンパク質を結合したアクチン繊維では、ミオシン上の滑り運動に違いがあることを、強く示唆している。
- (2) 神経成長円錐の細胞接着部、特に成長円錐辺縁部と中心部の境界：アクチンアークと呼ばれる部分に局在するドレブリンを結合させたアクチンレールにおけるミオシンVの1分子解析を行なった。ミオシンVは、ドレブリンを結合させたアクチン線維上を、裸のアクチン線維と同じ滑り速度で滑走したが、結合してから遊離するまでの走行距離&時間は短かった。またドレブリンは、ADP-Pi状態の前足頭部のアクチンへの結合が抑制されたが、後足頭部のADP遊離には影響を与えなかった。以上の結果は、ドレブリンで飽和したアクチン線維上では、ミオシンVはアクチンへの結合親和性を抑制し、その結果ミオシン滑り運動が阻害されていると示唆される。前述の通りドレブリンが局在するアクチンアークは、活発に運動する辺縁部と静的な中心部との境界に存在する。ドレブリン/アクチンレールがミオシン活性を阻害することによってこのような振る舞いをしている可能性が高いと思われる。以上の結果をKubota et al (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 643-648 に発表した(主な発表論文(3)参照)。
- (3) 本研究と間接的に関連するプロジェクトとして、フィロポディアのアクチン束化タンパク質ファシンでアクチン/ファシン束を再構成し、その上でのミオシンVの動きを原子間力顕微鏡で観察するという試みを、金沢大のグループが主体となって行った。結果的にこの系はうまくいかなかったが、金沢大のグループがその後アクチンレールの系を開発し、その上でのミオシンVの動きを原子間力顕微鏡で直接観察することに成功した(Kodera et al (2010) *Nature* 468, 72-76; 主な発表論文(2)参照)。今後アクチン/ファシン束上でのミオシンVの動きの直接観察に成功すれば、本研究で提示した問題の一つの解答が得られるものと思われる。
- (4) PC12細胞を分化させた後、ローダミンファロイジンでアクチン繊維を安定化し、細胞を破碎、遠心により核分画を取り除き、さらに遠心で分画を行い、形態的にフィロポディアに酷似したアクチン束の単離に成功した。電気泳動ではまだ不純物を多く含んでいるが、アクチン構造を保っているため、アクチンレールとして使用できるものと思われる。今後、これをレールとしたミオシンの1分子解析を試みていきたい。

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7件)

- (1) Wang HH, Nakamura A, Yoshiyama S, Ishikawa R, Cai N, Ye LH, Takano-Ohmuro H, Kohama K. (2012) Down regulation of myosin light chain kinase expression in vascular smooth muscle cells accelerates cell proliferation: Requirement of its actin-binding domain for reversion to normal rates. *J. Pharmacol. Sci.* in press. 査読有 DOI: 10.1254/jphs.11213SC
- (2) Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, Ando T. (2010) Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468, 72-76 査読有 DOI: 10.1038/nature09450
- (3) Kubota H, Ishikawa R, Ohki T, Ishizuka J, Mikhailenko SV, Ishiwata S. (2010) Modulation of the mechano-chemical properties of myosin V by drebrin-E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 643-648 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.120
- (4) Takatsuki H, Rice KM, Asano S, Day BS, Hino M, Oiwa K, Ishikawa R, Hiratsuka Y, Uyeda TQ, Kohama K, Blough ER. (2010) Utilization of myosin and actin bundles for the transport of molecular cargo. *Small* 6, 452-457 査読有 DOI: 10.1002/small.200901369
- (5) Katayama K, Watanabe M, Tanaka H, Hino M, Miyakawa T, Ohki T, Ye LH, Xie C, Yoshiyama S, Nakamura A, Ishikawa R, Tanokura M, Oiwa K, Kohama K (2010) Stimulatory effects of arachidonic

acid on myosin ATPase activity and contraction of smooth muscle via myosin motor domain. **Am. J. Physiol. (Heart Cir. Physiol.)** **298**, H505-514
査読有
DOI:10.1152/ajpheart.00577.2009

(6) Xie C, Zhang Y, Wang HH, Matsumoto A, Nakamura A, Ishikawa R, Yoshiyama S., Hayakawa K, Kohama K, Gao Y. (2009) Calcium regulation of non-kinase and kinase activities of recombinant myosin light-chain kinase and its mutants. **IUBMB Life** **61**, 1092-1098
査読有
DOI: 10.1002/iub.266

(7) Wang HH, Nakamura A, Matsumoto A, Yoshiyama S, Qin X, Xie C, Zhang Y, Gao Y, Ishikawa R, Kohama K. (2009) Nonkinase activity of MLCK in elongated filopodia formation and chemotaxis of vascular smooth muscle cells toward sphingosylphosphorylcholine. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** **296**, H1683-1693 査読有
DOI: 10.1152/ajpheart.00965.2008

[学会発表] (計3件)

- (1) Nakamura A, Matsumoto A, Xie C, Yoshiyama S, Ishikawa R, Kohama K. (2010) The novel calmodulin-binding site of the smooth muscle myosin light chain kinase. 第83回日本薬理学会年会 大阪
- (2) Ishikawa R (2009) Dynamics of fascin, cofilin, and drebrin in growth cones: Comparison with the results obtained by in vitro analysis. 第52回日本神経化学学会大会 伊香保
- (3) 石川良樹、加藤薫、五十嵐道弘、小浜一弘 (2009) 成長円錐におけるドレブリンとコフィリンの役割 神経組織の成長・再生・移植研究集会第24回学術集会 伊香保

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

(1) 名称: 束化アクチンを用いたマイクロアクチュエータ

発明者: 日野瑞城、小濱一弘、石川良樹、中村彰男、須齋 嵩、大島昭子、大岩和弘
権利者: 国立大学法人群馬大学、独立行政法人情報通信研究機構

種類:

番号: 特許第4799007号

取得年月日: 平成23年8月12日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 良樹 (ISHIKAWA RYOKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 20212863

(2) 研究分担者

中村 彰男 (NAKAMURA AKIO)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 30282388

小浜 一弘 (KOHAMA KAZUHIRO)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

(2009年度のみ研究分担者)

研究者番号: 30101116