

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4月25日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21680039

研究課題名（和文） アクチンストレスファイバの動的力学構造の解明

研究課題名（英文） Relationship between Biophysical Properties and Microstructure of Actin Stress Fibers

研究代表者

出口 真次（DEGUCHI SHINJI）

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30379713

研究成果の概要（和文）：細胞内のホメオスタシスを維持する上で重要な役割を果たすストレスファイバの構造と機能について研究を行った。ストレスファイバの構造（Fアクチン束化構造、タンパク質組成、ミオシン軽鎖リン酸化状態）と機能（アクトミオシンによる収縮運動）が維持されたまま安定的に細胞から取り出すことができる条件を見出した。またストレスファイバが長軸方向に圧縮された際に起こす脱重合の分子メカニズム（ミオシンへの前方負荷によりアクチンから解離しやすくなる）を初めて提示した。

研究成果の概要（英文）：Stress fibers play a key role in regulation of cell homeostasis. Here we investigated their biophysical properties and microstructure. Particularly, we developed a method to isolate stress fibers that are intact with regard to structure (confirmed by western blotting and electron microscopy) and function (confirmed by a contractility assay). We then submitted a molecular mechanism that may underlie the cell shortening-induced disassembly of stress fibers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：ストレスファイバ、バイオメカニクス、メカノセンサー、メカノバイオロジー、生物物理、細胞骨格、非筋アクトミオシン

1. 研究開始当初の背景

ストレスファイバ（Stress fiber：以降、SFと略）は、細胞骨格タンパク質のアクチンを主成分とし、断面直径がおよそ200ナノメートルの繊維状タンパク質複合体である。これまでの実験結果から、SFは細胞内において自らに作用する張力の値に応じて自身の重

合・脱重合（つまり構成分子が集まってより太い繊維として発達するか、あるいは分子が離れ去り繊維構造が消失するか）が制御され、その結果、細胞レベルで見ると細胞が自らに負荷される力の方向を感知するために不可欠なメカノセンサー（「力」、もしくは「ひずみ」といった力学的入（出）力を、生化学的

出(入)力、すなわち酵素作用の活性化などに信号変換)の役割を果たしていることが現象として認められ、その詳しい分子メカニズムの解明に向けた研究が近年進められている(解説文として、例えば「出口、佐藤:アクチンストレスファイバのマイクロ・ナノバイオメカニクス、生体医工学、2008」など)。SFが有するこの機能は、血管内皮細胞を例に挙げると(1)心拍に起因する血管壁内張力や血流せん断応力などの力学的刺激を感知し、細胞自らの構造を環境適応的に変化させ、ひいては動脈硬化の発症を防ぎ、あるいは(2)組織内傷害部位をSFによって感知し、修復のためにコラーゲンなどの細胞外繊維を適応的に配向させることに役立つと考えられている。従って、SFのメカノセンサーとしての機能の詳細を明らかにし、かつその分子メカニズムを理解することは重要であるし、また、「力学」の必須な関与を伴う生命現象という点で興味深い研究課題である。本申請者は、SFが示す上記の力学的刺激感知・応答現象の理解には、その力学的特性(張力に応じてどのように変形する物質であるか、またどの程度の張力値を支えることができる構造物であるか等)を把握することが基本的課題の一つと考え、SFを細胞外へ単離して力学的特性の計測を行ってきた(Deguchi et al.: J. Biomech., 2006)。一方で、私達の成果を発展させた内容で研究を進めるグループが現れている(例えば、実験ではワシントン大学(セントルイス)のYin教授、UCLAのKumar教授、理論解析ではハイデルベルグ大学のSchwarz教授)。しかしそもそもSFがどのような力学的構造を有し、自らが受けた力をどのように下層構成分子に分配するかは明らかにされておらず、この知識なくしては(マクロ現象として現れる)力学的特性・力学的刺激感知現象の分子レベルでの理解につながらない。そこでSFの力学的構造を明らかにすることが重要と考えて本申請研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮細胞などの接着細胞が有する力学的刺激感知・応答機構において、中心的役割を果たす細胞小器官の一つ「ストレスファイバ」(Stress fiber:以降、SFと略する)を対象とした種々の実験を行い、独自の理論解析と併せて、SFの動的な(つまり時々刻々変化する)力学的構造を明らかにすることを目的とする。本研究の実施により、SFが関わる現象のメカニズムを理解するために不可欠な基本情報が得られると期待される。

3. 研究の方法

まず始めに、力学的刺激によるストレスフ

アイバ構造の動的消失機構を調べた。ストレスファイバをラット大動脈由来平滑筋細胞から抽出した。抽出の方法は従来から知られている方法(Katoh et al., Mol Biol Cell, 9, 1998, 1919-1938)に独自の改良を加えたものである。この抽出ストレスファイバにマグネシウムと複合体を作らせたATP(以降MgATP)を作用させる。MgATPの濃度を変えながらストレスファイバの挙動の変化を調べた。

上記の抽出作業において、ストレスファイバの洗浄にはimidazoleをベースに、細胞骨格が安定する低イオン強度の緩衝溶液を用いた。得られたストレスファイバが、細胞内のストレスファイバと比較して、性質が変化していないかを確認することは重要である。そこで抽出作業を行う際の緩衝溶液のイオン強度を(90mMから490mMまで)変えてストレスファイバの抽出を行い、単離ストレスファイバの微細構造を(ネガティブ染色)電子顕微鏡と蛍光顕微鏡で、また、タンパク質組成をウェスタンブロットティングで、さらに、収縮能を独自の実験系でそれぞれ調べた。

4. 研究成果

従来ストレスファイバ内の非筋II型ミオシンにMgATPが結合すると、これを加水分解し、そこで得たエネルギーを利用して短縮運動することが知られている。生理的濃度のMgATPの存在下ではこの短縮が起こるだけではなく、非筋II型ミオシンがアクチンフィラメントから解離して、その結果ストレスファイバが消失することを明らかにした(Matsui et al., 2010, 2011)。ここで、MgATP濃度が低い時には短縮だけが起こるのに対して、高い濃度では消失だけが観察された(図1)。最近の研究で、非筋II型ミオシンがアクチンフィラメントに沿って前方に押されると、アクトミオシン間の結合時間が短くなることが報告されている。このことから、ストレスファイバは等尺性収縮が保たれている時には安定して存在できるが、外部環境から圧縮負荷、すなわち非筋II型ミオシンを急速に前方へ押し込む力が与えられると、アクトミオシンの結合時間が減少し、その結果、両者が解離するという分子メカニズムが浮かび上がった(図2)。このように、力学的刺激を受けたストレスファイバの消失はMgATPの結合だけで実現されることを示した。また、この消失にはアクチン単量体への分解を伴わず、コフィリン等の切断・脱重合タンパク質が関与しないことも示唆された。このように、ストレスファイバがメカノセンサーとして働く分子メカニズムの一端が明らかにされた。

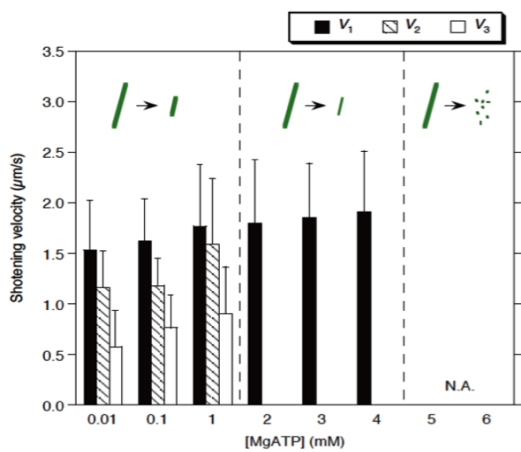


図 1 抽出ストレスファイバに異なる濃度の MgATP を与えた時の収縮速度変化。速度 V_1 、 V_2 、 V_3 はそれぞれ初期長さから 75%、50%、25% の長さまで縮むまでの時間における速度の平均値を表す。MgATP 濃度が 1mM 以下ではおよそ 1.5 から 0.5 $\mu\text{m/s}$ の速度で縮んだ。2 から 4mM の濃度では始め収縮し、徐々に消失した。5mM 以上の濃度では全てが消失した。

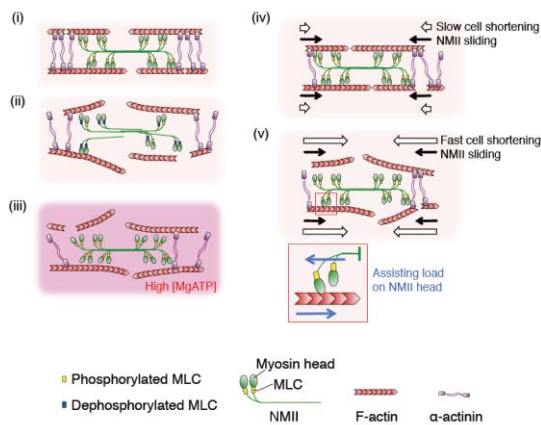


図 2 実験結果から推定されたストレスファイバの動的力学構造モデル。(i)無負荷状態におけるストレスファイバ内のサルコメア要素。(ii) ミオシン軽鎖が脱リン酸化すると脱重合を起こす(構造の消失につながる)。(iii) 高い MgATP 濃度では(ii)と同様に脱重合を起こす。(iv) ストレスファイバに外部から引張負荷が作用するとストレスファイバの構造は安定化する。(v) 一方、外部から圧縮負荷が作用するとミオシン頭部からの MgADP 放出速度が上昇して脱重合を起こす。

電子顕微鏡観察の結果、イオン強度が低いほどストレスファイバに沿って真っ直ぐな繊維束構造が観察された(図 3)。アクチンを蛍光ファロイジンで標識したところ、イオン

強度が低いほどまっすぐなアクチン構造が観察された。タンパク質組成では、アクチンやミオシン(非筋 II 型ミオシン IIA、非筋 II 型ミオシン IIB、平滑筋ミオシン、ミオシン軽鎖)の量に違いは認められなかった(図 4)。一方、 α アクチニンイオン強度が上がるにつれて量が低下する傾向が見られた。また、生理的濃度の MgATP を抽出ストレスファイバに投与したところ、どのイオン強度でもミオシンの収縮能自体は保持されていることが分かった(図 5)。しかし、とりわけ 410mM 以上のイオン強度では収縮しないストレスファイバも観察された。総合すると、高いイオン強度では α アクチニンの分子構造が壊れ、それがストレスファイバの構造と収縮に影響を及ぼした。

上記の評価実験から構造的、成分的、機能的に十分保持されたストレスファイバを細胞から単離する技術を開発できた。さらに、これらの実験からストレスファイバの構造(およびそのタンパク質組成)を詳しく観察することに成功し、かつどのような力学的条件において収縮活動あるいは消失という動的变化を示すかが明らかになった。

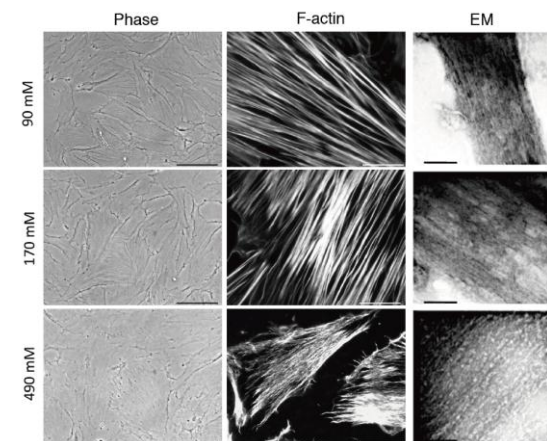


図 3 イオン強度がストレスファイバの構造に及ぼす影響。90mM の低イオン強度下では蛍光顕微鏡および電子顕微鏡レベルで真っ直ぐな形状の束化構造が認められる。生理的値である 170mM 以上までイオン強度が増すと徐々に波状で緩く束化された構造のみが観察された。

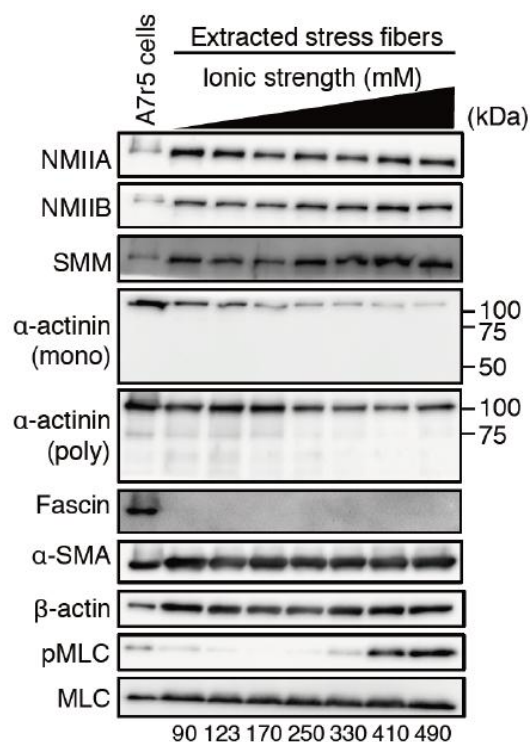


図 4 抽出ストレスファイバから検出されたタンパク質群の一例。NMIIA、NMIIB、SMM は全て異なるミオシン分子のアイソフォームを示す。MLC はミオシン軽鎖を示す。A7r5 cells は使用したラット平滑筋細胞を示す。抽出ストレスファイバ内のこれらのタンパク質が異なるイオン強度 (90 から 490mM) でどのように変化するかを調べた。α アクチニンの発現がイオン強度の増加と共に低下している様子が分かる。

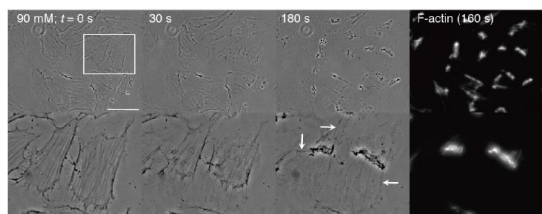


図 5 ストレスファイバの収縮 (イオン強度 90mM)。遅くとも 180 秒後には完全に収縮することが F-actin の蛍光検出の結果から確認された。

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 15 件)

1. Deguchi, S., Matsui, T.S., Sato, M., Simultaneous contraction and buckling of stress fibers in individual cells. *Journal of*

Cellular Biochemistry, 113, 824-832, 2012. 査読有

2. Deguchi, S., Matsui, T.S., Iio, K., The position and size of individual focal adhesions are determined by intracellular stress-dependent positive regulation. *Cytoskeleton*, 68, 639-651, 2011. 査読有
3. Deguchi, S., Y Kawahara, S Takahashi, Cooperative regulation of vocal fold morphology and stress by the cricothyroid and thyroarytenoid muscles, *Journal of Voice*, 25, e255-e263, 2011. 査読有
4. Deguchi, S., Takahashi, S., Tanimura, S., Hiraki, H., Producing single microbubbles with controlled size using microfiber. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2, 385-390, 2011. 査読有
5. Deguchi, S., Bamba, H., Measuring surface geometry of adherent cells using oblique transillumination. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2, 359-363, 2011. 査読有
6. Deguchi, S., Kawahara, Y., Simulation of human phonation with vocal nodules. *American Journal of Computational Mathematics*, 1, 189-201, 2011. 査読有
7. Matsui, T.S., Kaunas, R., Kanzaki, M., Sato, M., Deguchi, S., Non-muscle myosin II induces disassembly of actin stress fibres independently of myosin light chain dephosphorylation. *Interface Focus*, 1, 754-766, 2011. 査読有
8. Kaunas, R., Deguchi, S., Multiple roles for myosin II in tensional homeostasis under mechanical loading, *Cellular and Molecular Bioengineering*, 4, 182-191, 2011. 査読有
9. Deguchi, S., Mechanism of and threshold biomechanical conditions for falsetto voice onset, *PLoS ONE* 6, e17503, 2011. 査読有
10. R. Kaunas, H. Hsu, S. Deguchi, Sarcomeric model of stretch-induced stress fiber reorganization, *Cell Health and Cytoskeleton*, 3, 13-22, 2011. 査読有
11. C. Lee, C. Haase, S. Deguchi, R. Kaunas, Cyclic stretch-induced stress fiber dynamics - Dependence on strain rate, rho kinase and MLCK, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 401, 344-349, 2010. 査読有
12. T.S. Matsui, K. Ito, R. Kaunas, M. Sato, S. Deguchi, Actin stress fibers are at a tipping point between conventional shortening and rapid disassembly at physiological levels of MgATP, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395, 301-306, 2010. 査読有
13. Deguchi, S., Sato, M., Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile

- cells. *Biorheology*, 46, 93–105, 2009. 査読有
14. T.S. Matsui, S. Deguchi, N. Sakamoto, T. Ohashi, M. Sato, A versatile micro-mechanical tester for actin stress fibers isolated from cells. *Biorheology*, 46, 401–415, 2009. 査読有
 15. S. Deguchi, Y. Ishimaru, K. Hashimoto, S. Washio, K. Tsujioka, Measurement and finite element modeling of the force balance in the vertical section of adhering vascular endothelial cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2, 173–185, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計 3 1 件）

1. Deguchi, S., Positive and negative feedbacks in cell adhesion regulation and tensional homeostasis. International Symposium on Cellular Mechanobiology, Kyoto, Mar 16, 2012.
2. Deguchi, S., Cellular tensional homeostasis regulated by myosin II. 2nd BMES-SPRBM Inaugural Conference on Cellular and Molecular Bioengineering (30th Scientific Conference of SPRBM), San Juan, Puerto Rico, Jan 5, 2012.

〔図書〕（計 3 件）

1. 出口真次, バイオメカニクス最前線, 共立出版, 2012, 印刷中
2. Deguchi, S., Sato, M., Chapter 9. Nuclear mechanics and mechanotransduction. pp. 220-233. In “Cellular Mechanotransduction: Diverse Perspectives from Molecules to Tissue”, Cambridge University Press, 2010.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biomech.mech.tohoku.ac.jp/satolab/ddeguchi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口 真次 (DEGUCHI SHINJI)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30379713

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：