

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23612003

研究課題名(和文)力学刺激受容機構としてのアクチン線維の構造変化

研究課題名(英文)Structural changes in the actin filament associated with tension sensing

研究代表者

辰巳 仁史(TATSUMI, Hitoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20171720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：我々のこれまでの研究によって、アクチン線維が力学受容機構を内在していることが明らかになった(Hayakawa et. al., 2011)。しかし、アクチン線維にある力学受容機構がどのような分子メカニズムで動作しているかは依然不明であった。本研究ではアクチン線維に光ピンセットで張力を負荷しそのねじれ揺らぎを分析した。実験からアクチン線維のねじれ揺らぎは、その内在張力の上昇にともなって減少することが明らかになった。この実験結果は“張力の上昇がアクチン線維のねじれ方向の揺らぎを減少させ、アクチン線維に内在するコフィリンの結合場所の外部への露出を抑制している”という仮説を支持するものであった。

研究成果の概要(英文)：Molecular and biophysical mechanisms, including how mechanical forces are sensed, are totally unknown. ADF/cofilin proteins are the most preferable candidate for the stress fiber disassembly induced by tension decline in the fiber. Here, we propose a hypothesis that tension in an actin filament prevents the filament from being severed by cofilin. To test this, we prepared single actin filaments tensed with optical tweezers. When the fiber was tensed, it was severed after the application of cofilin with a significantly larger delay in comparison with the control filaments. Direct measurement of the torsional fluctuation of a single actin filament was made under different stresses, which indicated that the standard deviation of the fluctuation was reduced by an applied force of ca. 5 pN. These results demonstrate that tension in the actin filament reduces the binding of cofilin, resulting in a decrease in the effective severing activity of cofilin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：アクチン コフィリン 力学刺激 切断 光ピンセット 一分子イメージング 分子ゆらぎ 近接場光

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞骨格や接着構造を対象にした研究を進める中で、細胞骨格(ストレス線維:アクチン線維束)が力の伝達媒体として関与することを発見した(Hayakawa et al., J Cell Sci. 2008)。この時点で、力の伝達媒体であるアクチン自身が力学受容の装置として働いている可能性はあったが、詳細な検討をするには至らなかった。その後、科学研究費補助金基盤(C)「アクチンファイバーの構造変化は新しい力学受容機構として働く」代表者辰巳仁史(H20-22)により、アクチン線維が力学受容機構を内在していることを示す証拠を得ることができた。図1に示すようにアクチン線維を光ピンセットを用いて引っ張ると、コフィリンによるアクチン線維の切断は抑制される。一方で張力負荷を受けていないアクチン線維はコフィリンによる切断を受ける。この結果はチャネル以外に機械受容する実体(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る(Hayakawa et al., 2011)。しかし、力学受容機構であるアクチン線維がどのようなメカニズムで動作しているかは依然不明である。本研究はこれまでの研究成果に基づいてこの分子的メカニズムの解明に関する研究を進展させるものである。

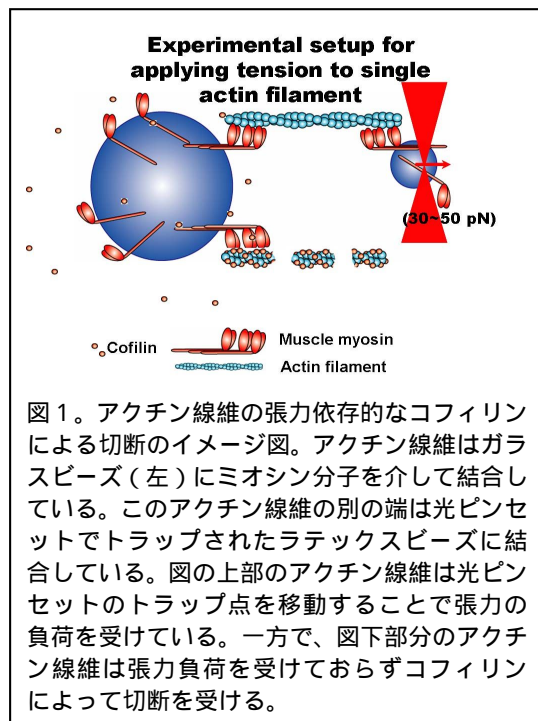


図1. アクチン線維の張力依存的なコフィリンによる切断のイメージ図。アクチン線維はガラスビーズ(左)にミオシン分子を介して結合している。このアクチン線維の別の端は光ピンセットでトラップされたラテックスビーズに結合している。図の上部のアクチン線維は光ピンセットのトラップ点を移動することで張力の負荷を受けている。一方で、図下部分のアクチン線維は張力負荷を受けておらずコフィリンによって切断を受ける。

2. 研究の目的

代表者の最近の研究によって、アクチン線維が力学受容機構を内在していることが明らかになった。その結果は、細胞膜の機械受容チャネル以外に機械受容する分子実体(アクチン線維)が存在することを明確に示すものであり、大変重要な発見である。しかし、アクチン線維にある力学受容機構がどのような分子メカニズムで動作してい

るかは依然不明である。本研究の目的は、アクチン線維1本に機械(伸長)刺激を与えたときの構造変化に対応する信号を直接測定することで力学受容機構の分子・物理メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

張力はどのような構造上の変化をアクチン線維に起こし、コフィリンの結合を抑制するのであるか? われわれは、力をアクチン線維に負荷するとアクチン線維の張力が増加し、アクチン線維を構成しているGアクチン分子間の運動の自由度が下がるのではないかと考えている。それによって、アクチン線維の長軸の周りの回転が抑制されて、その結果コフィリンの結合サイトがコフィリンに対して露出しなくなるというものである。これまでにコフィリンを結合したアクチン線維について報告されている電子顕微鏡画像はアクチンのねじれピッチの変化を示唆している(Galkin et al., 2002)。この結果は、コフィリンの結合におけるアクチン線維のねじれの重要性を示唆するものである。したがって、考えられる最も有力な仮説は、アクチン線維への伸長刺激は、アクチン線維を構成しているGアクチン分子間の運動の自由度を下げてアクチン線維の長軸の周りの回転を抑制し、その結果コフィリンの結合サイトがファイバーの外部に露出しなくなるというものである。

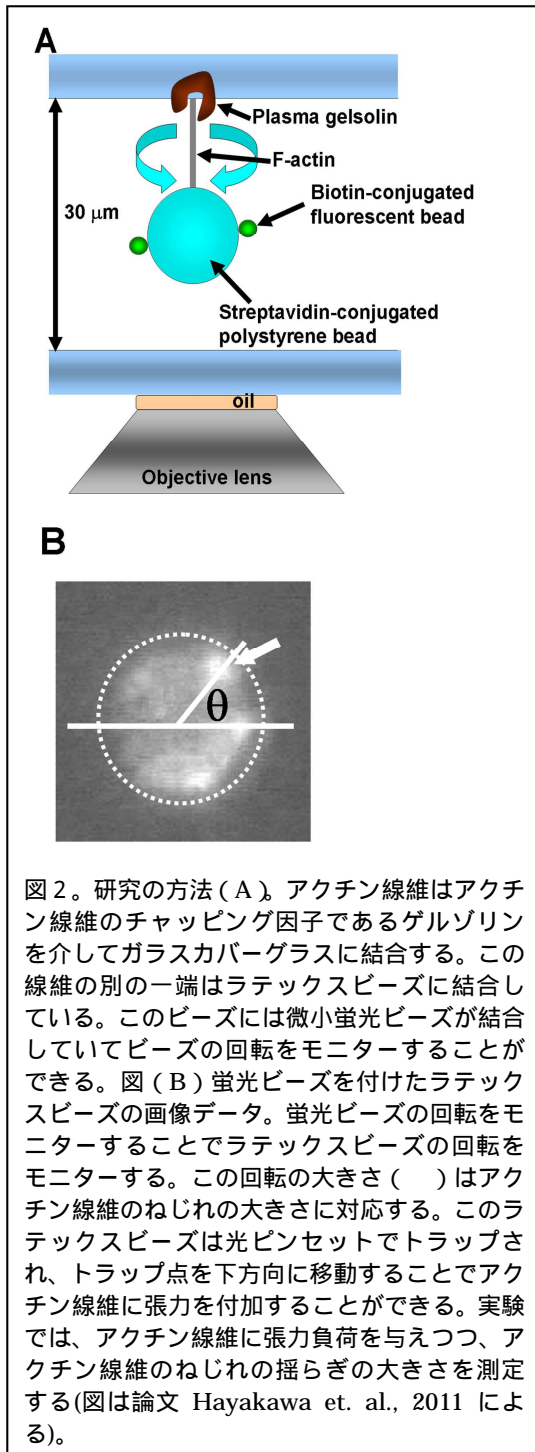
この仮説を検証するために、アクチン線維にラテックスビーズを取り付け、このアクチン線維をカバーガラスに接着することで、カバーガラスからアクチン線維のついたラテックスビーズをぶら下げる実験系を構成する。ガラスの比重は1.8なのでアクチン線維に非常に小さな力(~0.01 pN)が負荷される。この実験系にコフィリンを投与して、コフィリンのアクチン線維への結合によりアクチン線維がねじれてラテックスビーズの回転が生じるかどうか、またその後アクチン線維の切断が生じるかどうかを検討する。回転とともに切断が起きるならば上記の仮説が支持されたことになる。

ラテックスビーズを光ピンセットによってトラップしてトラップ点をz方向に変化させてアクチン線維に力を付加して、アクチン線維のねじれゆらぎの大きさの変化やコフィリンによる回転が生じるかどうかを検討する。これらの実験により、力学受容機構のメカニズムを分子構造変化のレベルで明らかにする(図2)。

4. 研究成果

アクチン線維の長軸の周りの回転のゆらぎを測定し、コフィリンがアクチンに結合するとアクチン線維の長軸の周りの回転のゆらぎに変化が起きるか、また、アクチン線維全体の長軸周りの回転が起きるかを検討する。この回転とアクチン線維が切断に関連があるかを検討する。光ピンセットで、ぶら下がったアクチン線維の先端のラテッ

クスビーズをトラップする。この光ピンセ

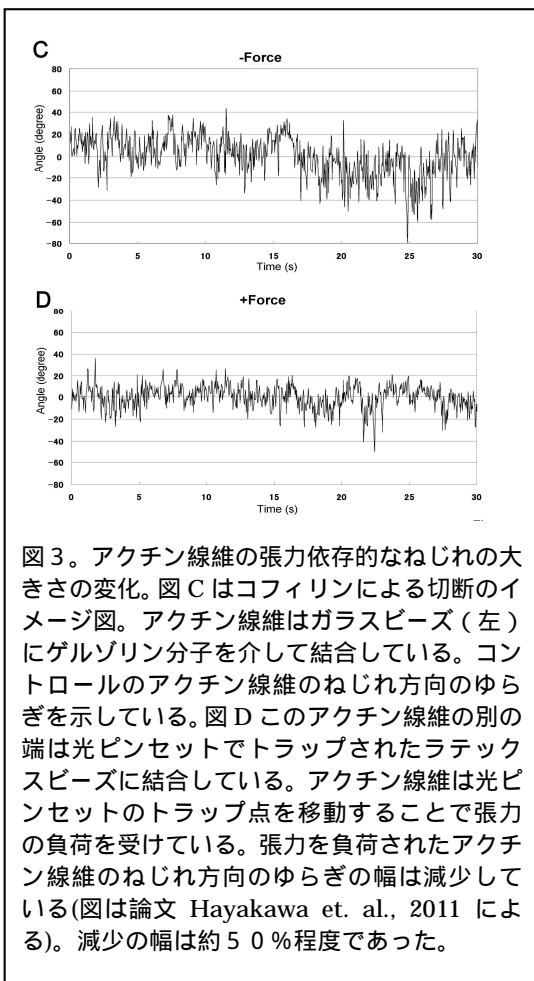


ットのトラップ点を z 方向 (下方向) に移動しアクチン線維に力を付加する。力の付加によってアクチン線維の長軸の周りの回転のゆらぎが減少するかどうかを評価する。回転ゆらぎの減少が見られれば張力が分子の構造的なゆらぎを制限することを示している。アクチン線維に力を付加しつつコフィリンを投与し、ゆらぎが更に変化するかどうかを検討する。ゆらぎの変化が無ければコフィリンのアクチンへの作用が抑制されることを示していると考え。

実際の実験では 2-3 μm のラテックスビーズを数 μm の長さのアクチン線維に結合

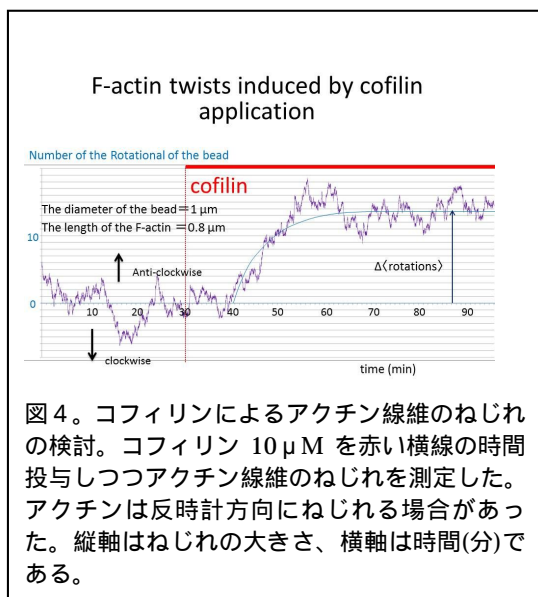
して、このラテックスビーズを光ピンセットでトラップしてその後、光ピンセットのトラップ点を z 方向に移動することでアクチン線維に張力を負荷した。この張力の増加に伴うビーズの揺らぎの変化はビーズにさらに小さい蛍光ビーズを付けてその蛍光ビーズの動きからラテックスビーズの回転ゆらぎの測定の指標とした。

ラテックスビーズの揺らぎは約 5 pN の力負荷により約半分程度に減少することが見られた。これからラテックスビーズのついたアクチン線維のねじれ揺らぎも張力の上昇にともなって減少することが明らかになった。ここから、我々の仮説である、“張力の上昇がアクチン線維のねじれ方向の揺らぎを減少させること、そして、このねじれ揺らぎの減少がアクチン線維に内在するコフィリンの結合場所の外部への露出を抑制している” という説を支持するものであった(図3)。



上記の実験と同様に、アクチン線維にラテックスビーズを取り付け、このアクチン線維をカバーガラスに接着することで、カバーガラスからアクチン線維のついたガラスビーズをぶら下げる実験系を構成する。この実験系にコフィリン 10 μM を投与して、コフィリンのアクチン線維への結合によりアクチン線維がねじれてラテックスビーズの回転が生じるかどうかを検討した。その結果、複

数回の実験においてコフィリンの投与に伴って蛍光ビーズを付けたビーズの回転が観察された。この回転の開始には10分程度の時間遅れが観察される場合があった(図4)。現在もコフィリン投与によるねじれの揺らぎの変化やねじれの増加の検討は継続中である。また、実験溶液のpHを6.7に設定していたので、コフィリンによるアクチン線維の切断は観察されなかった。今後もこの実験を継続して検討する必要がある。



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10件)

. Hiroaki Hirata, Hitoshi Tatsumi, Chwee Teck Lim, and Masahiro Sokabe (2014) Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: a crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions. 査読有 American Journal of Physiology vol.306: C607-20 DOI: 10.1152/ajpcell.00122.2013

H. Iida, T. Furuichi, M. Nakano, M. Toyota, M. Sokabe & H. Tatsumi New candidates for mechano-sensitive channels potentially involved in gravity sensing in *Arabidopsis thaliana* 査読有 *Plant Biology* 16(Suppl. 1) (2014) 39-42 Doi:10.1111/plb.12044

Hitoshi Tatsumi, Takuya Furuichi, Masataka Nakano, Masatsugu Toyota, Kimihi de Hayakawa, Masahiro Sokabe, and Hidetoshi Iida Mechano-sensitive channels are activated by stress in the actin stress fibers, which could be involved in gravity sensi

ng in plants 査読有 *Plant Biology* 16(Suppl. 1) (2014) 18-22 Doi: 10.1111/plb.12095

Masatsugu Toyotaa, Takuya Furuichia, Masahiro Sokabea, and Hitoshi Tatsumi a Analyses of a gravistimulation-specific Ca²⁺ signature in *Arabidopsis* using parabolic flights 査読有 *Plant Physiology* 163: p543-54 2013 doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.223313

Takuya Furuichi, Hidetoshi Iida, Masahiro Sokabe and Hitoshi Tatsumi Expression of *Arabidopsis* MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane 査読有 *Plant Signaling and Behavior* 7: 1022-1026, 2012 http://dx.doi.org/10.4161/psb.20783

辰巳仁史 生理学会誌ミニレビュー2012 アクチン線維は機械刺激受容器であるとともに力を伝達し機械受容チャネルを活性化する、日本生理学雑誌 74 巻 p 137-138 査読無

Tatsumi, H., K. Hayakawa, H. Hirata, and M. Sokabe. 2012. The role of actin filaments as a force-transmitter and a force-sensor. In *Recent Advances in Mechanobiology*. Shanghai scientific and technological literature publishing house, 153-156. 査読無

Hayakawa K., Tatsumi H., Sokabe M. Mechano-sensing by actin filaments and focal adhesion proteins. *Communicative & Integrative Biology*; vol 5. 572-577. 2012 査読有

Kiyoshima D, Kawakami K, Hayakawa K., Tatsumi H and Sokabe M. Force- and Ca²⁺-dependent internalization of integrin in cultured endothelial cells. 査読有 *J Cell Sci* 124: 3859-3870, 2011. doi: 10.1242/jcs.088559

Hayakawa K., Tatsumi H and *Sokabe M. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. 査読有 *J Cell Biol* 195: 721-727, 2011. doi: 0.1083/jcb.201102039

〔学会発表〕(計3件)

Title: DIRECT MEASUREMENT OF THERMODYNAMIC PARAMETERS OF COFILIN-ACTIN FILAMENT INTERACTIONS AT

THE SINGLE MOLECULE LEVEL

Kimihide Hayakawa¹, Shotaro Sakakibara²,
Hitoshi Tatsumi², Masahiro Sokabe¹.
Presentation Time: 2/18/2014 1:45:00 PM
Biophysical Society Meeting 2014 San
Francisco US

2013年 第67回日本細胞生物学会：
2013年6月19日(水)~21日(金) 会
場：ウインクあいち(愛知県産業労働セン
ター)名古屋市 Session 17: Cell mechanics
to motility and functions
Actin filaments function as a tension
sensor by tension-dependent binding of
cofilin to the filament
アクチン線維は力学センサーとして働きう
る 辰巳 仁史

International Symposium on Mechanob
iology(The Fifth Shanghai Internationa
l Conference on Biophysics and Molecul
ar biology)Date: November 4-8, 2011 P
lace: Shanghai-Hangzhou, China
Mini-symposium organizer session I:
発表：The role of Actin filaments as a force-tran
smmitter and a force-sensor
Hitoshi Tatsumi

6. 研究組織

(1)研究代表者

辰巳 仁史 (TATSUMI Hitoshi)

名古屋大学 大学院医学系研究科 准教
授

研究者番号：20171720

(2)研究分担者

早川 公英 (HAYAKAWA Kimihide)

名古屋大学 大学院医学系研究科 特任講
師

研究者番号：60467280

(3)連携研究者

曾我部 正博 (SOKABE MASAHIRO)

名古屋大学 大学院医学系研究科 特任
教授

研究者番号：10093428