

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370069

研究課題名(和文) 張力によるアクチンの構造変化と、それに依存したミオシンの結合増加および局在制御

研究課題名(英文) Tension-induced conformational changes of actin filaments and their influence on actin binding and intracellular localization of myosin.

研究代表者

上田 太郎 (Uyeda, Taro)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・総括研究主幹

研究者番号：90356551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞においてさまざまな重要現象に中心的に関与するアクチンフィラメントの機能分化機構を解明するため、アクチンフィラメントに張力が負荷されるとミオシンIIの結合が促進されるという仮説の検証を試みた。その結果、アメーバ細胞内のフィラメントに負荷される張力を見積もることができた。そうした張力をin vitroでフィラメントに負荷しミオシンIIの結合量の変化を見る実験に関しては、概ね実験系を確立でき、今後の測定への展望が開けた。蛍光エネルギー移動法による観察も最終的な結論を得るに至っていないが、細胞内のフィラメントに構造多型性があることが確認できた。

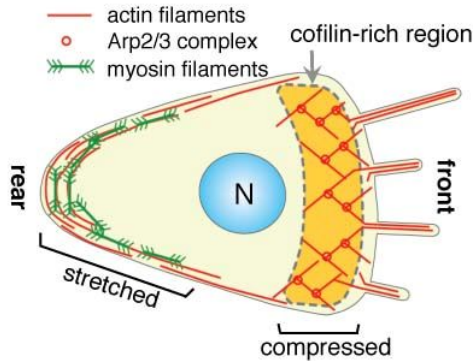
研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism by which actin filaments perform different functions in vivo, we tested the hypothesis that tension applied to actin filaments increases affinity for myosin II. We were able to estimate the tension applied to actin filaments in amoeba cells. Experimental system to visualize myosin binding to tensed actin filaments in vitro was established, opening an avenue to directly test the hypothesis in vitro in the future. Some progress was also made in attempts to visualize tensed actin filaments in amoeba cells using a FRET-based system, demonstrating that the actin filaments in cells are polymorphic.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクチン ミオシン メカノセンシティビティ

1. 研究開始当初の背景

アクチンフィラメントは、真核細胞の細胞運動や細胞内物質輸送等のさまざまな現象で非常に重要な機能を果たしている。たとえば、運動中の細胞性粘菌アメーバの前部では、アクチンフィラメントの伸張が仮足を前方に押しだし、後部ではミオシン II と相互作用して後端を収縮させる(下図)。このよう



に、細胞内にはアクチンフィラメントを主成分とする多様な構造が共存し、それぞれ特異的な機能を果たしている。このようなアクチンフィラメントの機能分化は、相互作用しているアクチン結合タンパク質の差異に基づくと考えられている。たとえば細胞前部のアクチンフィラメントは Arp2/3 依存的に重合し、コフィリンにより脱重合する。一方後部のアクチンメッシュワークには、ミオシン II フィラメントやフィラミンなどが結合し、収縮性を担っている。それでは、個々のアクチンフィラメントは、どのようにして適切なアクチン結合タンパク質と結合するのだろうか。これについては、アクチンフィラメントの高次構造の差異(たとえば樹状構造とメッシュ構造)が影響しているという可能性や、細胞局所的な生化学的シグナリング(Rho の活性化や  $Ca^{2+}$  の上昇など)による制御が想定されているケースもある。しかしそうした説明が難しいアクチン結合タンパク質も数多く、アクチンフィラメントの機能分化メカニズムの全体像は未解明である。

一方アクチンフィラメントの構造解析は近年大きく進歩し、その結果、アクチンフィラメントの構造には多型性があり、単一の構造を想定すべきではないという考えが提唱されている(Galkin *et al.*, 2010)。これに関連してわれわれは、アクチンフィラメントと微量の HMM (ミオシン II の可溶性断片) を ATP 存在下、*in vitro* で混合すると、HMM がまばらに結合したフィラメントと全く結合しないフィラメントが共存することを見いだした。この現象については: アクチンフィラメントには協同的な構造多型があり(*e.g.*, Egelman and Orlova, 1995)、平衡関係にある複数の構造状態のうちいくつか

HMM と高い親和性を持っていた; HMM がアクチンフィラメントに結合すると、協同的な構造変化をアクチンフィラメントに引き起こす(*e.g.*, Oosawa *et al.*, 1972)ので、一分子の HMM が結合すると、結合されたアクチンサブユニットから伝播した構造変化が周囲のサブユニットの HMM に対する親和性を高め、別の HMM 分子の結合を促すことで、ドミノ倒しの様にフィラメントの一部領域が HMM に対して高親和性状態になった、という二つの説明が可能であるが、いずれにしても、アクチンフィラメントには HMM に対する親和性が異なる(少なくとも)二つの構造があることを示唆している。一方、コフィリンとアクチンフィラメントの結合も協同的なので、コフィリンに関しても、アクチンフィラメントにはコフィリンと親和性の高い構造と低い構造があると考えられる。われわれは最近、HMM とコフィリン、および過剰のアクチンフィラメントが共存すると、HMM とコフィリンはそれぞれ相互排他的にアクチンフィラメントと協同的に結合することを見出した。この結果は、HMM に対する親和性が高いフィラメントはコフィリンに対する親和性が低く、逆に HMM に対する親和性が低いフィラメントはコフィリンに対する親和性が高いことを示唆する。以上の結果からわれわれは、細胞内の場所によってアクチンフィラメントの構造が異なることが、コフィリン、ミオシン II を初めとする種々のアクチン結合タンパク質が異なった細胞内局在を示す一因ではないかと考えるに至った(仮説 1)。

さて細胞の後部ではアクチンフィラメントとミオシン II フィラメントの相互作用が張力を発するが、アクチンフィラメントを引っ張ると、らせんピッチが伸びる(Wakabayashi *et al.*, 1994; Matsushita *et al.*, 2011)。したがって細胞後部では、張力発生、ピッチの伸長、ミオシン II 結合量の増加が局所的な正帰還ループを形成し、収縮性の状態を安定化すると期待される。一方細胞前部では、アクチンフィラメントの重合が仮足を前に押し出すためフィラメントには圧縮力がかかる。また細胞前部に局在するコフィリンは張力のかかっていないフィラメントと結合しやすく(Hayakawa *et al.*, 2011)、さらにコフィリン結合はらせんピッチを短縮する(McGough *et al.*, 1999)ことから、細胞前部ではらせんピッチの短縮を含む局所的な正帰還ループが形成されうる。したがって、アクチンフィラメントの構造多型を介して細胞極性が安定化されている可能性がある(仮説 2)。そもそも細胞の前後で異なる正帰還ループができるきっかけとしては、生化学的シグナルによる制御や確率的な揺らぎが想定されるが、力学的刺激による細胞の変

形もきっかけとなり得る。実際、細胞の局所を外力で変形させると、その部分にミオシン II が集積し、後部となって細胞極性が形成されることが知られている (e.g., Verkhovsky et al., 1999)。

これらの仮説を検証するため、細胞内でアクチンフィラメントとミオシン II モーター領域 (S1) の結合を観察したところ、予想通り張力のかかっているアクチンフィラメントは S1 に対する親和性が強いことを見出した (Uyeda et al., 2011)。これは、上記仮説 1, 2 を支持するものである。しかしこの現象が、張力によるアクチンフィラメントの配向の変化や、張力による生化学的な制御の結果間接的に S1 結合量が変化した等の可能性は排除されていなかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、らせんピッチの伸長などのアクチンフィラメントの原子構造の変化がミオシン II モーター領域 (S1) の結合を増加させるという仮説を証明するために、*in vitro* での検証を行う。具体的には、

(1) 顕微鏡下でアクチンフィラメントに張力を負荷し、ミオシン II の S1 の結合が増大することを直接的に観察し、さらにこの関係を定量化する。

(2) またそうした張力負荷によるアクチンの構造変化を可視化できるようなプローブを開発し、これを細胞内に導入して、*in vivo* での張力負荷とミオシン II 結合の相関を確立する。

(3) 細胞内アクチンフィラメントが受ける張力を定量的に見積る。

これらにより、張力負荷がアクチンフィラメントの構造変化を介してミオシン II の S1 の結合を促進し、機能分化することを可能な限り定量的に検証することをめざす。

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro* でアクチンフィラメントに張力を負荷し、これによりミオシン II の S1 の結合が増加することを示す。いくつか異なる方法が考えられるが、まず技術的ハードルの低い方法で定性的な観察を行う。

(2) MD シミュレーションに基づき、張力負荷によるアクチンフィラメントの構造変化を推定し、そうした構造変化をモニターできるような蛍光プローブ付きアクチンを調製する。これを細胞に導入し、ミオシン II などのアクチン結合タンパク質の局在と張力分布の関連を確立する。

(3) 細胞内アクチンフィラメントにかかる張力を力学的に測定し、えられた結果と *in vitro* で S1 の結合を増加させるのに必要な張力を比較し、張力によるアクチンフィラメントの構造変化を介した S1 の結合促進仮説を定量的に検証する。

## 4. 研究成果

(1) *in vitro* でアクチンフィラメントに張力を負荷し、GFP-変異 S1 の結合量の変化をアクチンフィラメント上の GFP 蛍光強度の変化として検出し、負荷した張力との関連を解明することをめざした。

アクチンフィラメントに張力を負荷する方法として、個々のアクチンフィラメントの両端を光ピンセット等で保持し、力を負荷する直接的な方法と、伸縮性シリコン基盤にフィラメントを固定し、基盤を変形させることでフィラメントに力を負荷する定性的な方法が想定された。前者は、力の絶対値を直接見積もることができるメリットがあるが、いくつかの技術的な困難さがあるため、光ピンセットの専門家との打ち合わせにもとづき、伸縮性基盤を使った定性的な実験を先行させることとした。

シリコン基盤法の場合、2点の技術的な課題が想定された。まず、適切なアクチンフィラメントの固定法が最大の課題として想定され、もう一点は、シリコン基盤上という光学的に困難な条件下で微弱な蛍光シグナルを検出することである。

第一の問題に対しては、ビオチン化アクチンを微量共重合させたアクチンフィラメントを、アビジンを固定したシリコン基盤に固定することは容易であるが、その場合はフィラメントが全長にわたって固定されてしまうため、特にらせんピッチの変化を伴うようなフィラメントの構造変化が阻害され、そうした構造変化に依存した現象 (S1 結合の促進) も阻害されるおそれがある。この問題を解決するためには、ビオチン化アクチンが含まれるセグメントと、含まれないセグメントが交互にならぶようなブロック共重合フィラメントを調製し、ビオチン化アクチンが含まれないセグメントを観察すること、さらにビオチン化アクチンとアビジンの連結に長いリンカーを介することで、回転自由度を与える (すなわちらせんピッチの変化を許容する) ことで解決が可能であると考えられた。

第二の問題に対しては、最近導入した超高感度ビデオカメラを利用し、可能なら共焦点蛍光顕微鏡観察を行うことで背景光を抑えることで解決を図ることとした。

以上の計画のもとで実験に着手したが、手持ちの外力負荷装置によりシリコン基盤を伸長させると、シリコン基盤表面の Z 位置が変化し、かつ、光学軸に対して予測困難な方向に傾くため、高倍率の対物レンズの焦点面にサンプルを保持することがきわめて困難であることが判明した。最終的に外力負荷装置とシリコン基盤作成法を改良することで、100 倍の対物レンズを使ってもある程度の蛍光観察はできるようになった。具体的には、アビジンを介してシリコン基板に固定したビオチン化アクチンと Cy3 蛍光アクチンのブロック共重合体の蛍光像が観察できるようになった。

次に、ATP 存在下で GFP-変異 S1 を加え、

さらにシリコン基盤を伸展した際に、伸展方向と直交方向のフィラメント（それぞれ張力負荷と圧縮力を負荷した状態に対応）に沿った GFP 蛍光を観察したが、両者に明確な差を見出すことはできなかった。この結果は、張力負荷によって S1 との親和性が增大するという仮説の予測と反するものであるが、今回の実験ではアビジン-ビオチン-アクチンの連結に回転自由度がなかったため、らせんピッチが変化できなかったためである可能性がある。この可能性は、ATP 存在下で S1 がアクチンフィラメントと相互作用するとアクチンフィラメントのらせんピッチが顕著に伸びるというわれわれの最近の高速 AFM 観察の結果 (Kijima et al., 論文投稿中) から支持される。

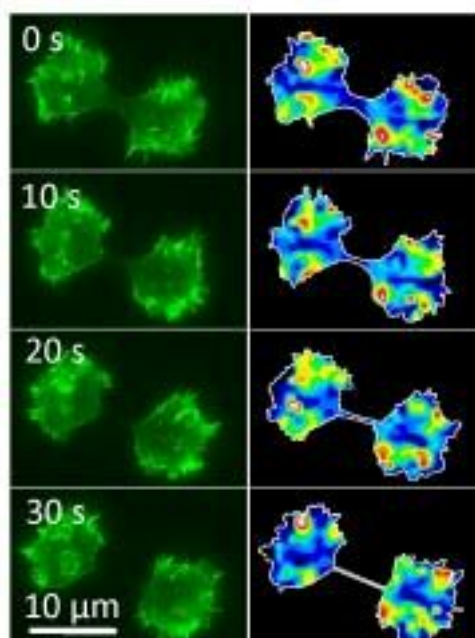
残念ながら本研究期間中に得られた成果は以上であるが、実験系の基礎はほぼ確立したので、今後は、回転自由度を確保したフィラメント固定法を工夫し、仮説の検証を進めていきたいと考えている。

(2) 研究協力者である京都大学の安達泰治教授、井上康博助教らのご協力により、MD シミュレーションに基づき、張力負荷によるアクチンフィラメントの構造変化にともなって距離が変化すると推定されるアミノ酸残基のペアを複数組リストアップし、それぞれのアミノ酸残基を異なる蛍光色素で標識し、力負荷に伴う蛍光エネルギー移動 (FRET) 効率の変化をもとに構造変化の検出を試みることにした。まず手始めに、リストアップされたペアのうち、二重らせん中で横方向に隣り合う二つのサブユニットの 41 番と 233 番の残基ペアを選び、それぞれのアミノ酸残基に異なる蛍光色素を導入した。また大過剰の非標識アクチンと重合させたときに、これら二種の標識サブユニットがフィラメント中で横方向に隣り合って並ぶように両者の界面の荷電残基を反転させた変異 (Wen et al., 2013) も加えた。しかし、調製した標識アクチンは、重合条件下では凝集してしまい正常なフィラメントを形成しなかった。このため、当初予定していた FRET 計測を行うことはできなかった。しかし力負荷にともなって距離が変化すると期待されるアミノ酸残基ペアは他に数種あるので、今後それらについて順次検討を行っていきたいと考えている。

このような当初想定していなかった問題により力センサー FRET アクチンの細胞内での観察はまだ行えていないが、これとは別に以前の研究で調製した分子内 FRET アクチンを細胞性粘菌や動物培養細胞に導入し観察したところ、細胞内で局所的に FRET 効率がばらつくことが見出され、これは、アクチンフィラメントの構造多型性という本研究の基本概念が生理的条件下で確認された重要な成果と考えている (学会発表 1)。

(3) 外力の見積もりが可能で、かつ、力の方向にアクチンフィラメントが配向しており、

個々のアクチンフィラメントにかかる力を見積もることが可能な実験系を選定した。具体的には、細胞性粘菌のミオシン II 欠損変異細胞が分裂する際、反対方向にアメーバ運動する二つの娘細胞の間に形成される細胞質系を選定した。当初計画では、ミオシン II 欠損変異細胞をマイクロピラーのアレー上で培養し、分裂させ、両方の娘細胞の下のピラーの屈曲から細胞質系にかかる力を見積もる予定であったが、いくつかの技術的な理由より、詳細な透過光による光学顕微鏡観察と両立するマイクロピラーアレーを作成することができなかった。そこでこれまでに使用実績のある、蛍光ビーズを塗布した伸縮性基盤による力測定を行った (下図)。現在詳細なデータ解析中であるが、予備的な計算によると、細胞質系に掛かる力は約 3 nN であ



左の列は GFP-Lifeact によるアクチンフィラメント像、右の列は伸縮性基盤上の蛍光ビーズの変異から計算した牽引力の分布。

った。

また、細胞質系に含まれるアクチンフィラメントの本数を、ローダミンファロイジン染色による蛍光強度、および電子顕微鏡の超薄切片像から見積もったところ、30-100 本であった。

このようにして得られた力をアクチンフィラメントの本数で割ることにより、個々のアクチンフィラメントに負荷される外力を見積もったところ、30-100 pN 程度となり、収縮中の筋肉と同等の比較的大きな値が得られた。これは、非筋細胞内のアクチンフィラメントに負荷される力としては、初めての見積もりになる。

## 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 13 件)

1. Noguchi, T.Q.P., Morimatsu, M., Iwane, A.H., Yanagida, T. and Uyeda, T.Q.P. (2015) The Role of Structural Dynamics of Actin in Class-Specific Myosin Motility. *PLoSOne*, 査読有 10:e0126262.

DOI:10.1371/journal.pone.0126262

2. Ngo, K.X., Kodera, N., Katayama, E., Ando, T., Uyeda, T.Q.P. (2015) Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *eLife* 査読有 4:e04806. DOI:10.7554/eLife.04806

3. Takemoto, T., Ishihara, S., Mizutani, T., Kawabata, K., Haga, H. (2015). Compressive stress induces dephosphorylation of the myosin regulatory light chain via RhoA phosphorylation by the adenylyl cyclase/ protein kinase A signaling pathway. *PLoSOne* 査読有 10:e0117937.

DOI:10.1371/journal.pone.0117937

4. Yumura, S., Hashima, S., Muranaka, S. (2014) Myosin II does not contribute to wound repair in *Dictyostelium* cells. *Biol. Open* 査読有 3:966-973. DOI:10.1242/bio.20149712

〔学会発表〕(計 39 件)

1. Noguchi, T., Okazaki, M., Kijima, S., Morimatsu, M., Nagasaki, A., Iwadata, Y., Yanagida, T., Uyeda, T. (2014) Structural polymorphism of actin detected by intramolecular FRET in vivo and in vitro. The 2014 ASCB/IFCB Meeting, December 9, 2014, Philadelphia, USA.

〔図書〕(計 1 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田太郎 (UYEDA, Taro)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・総括研究主幹

研究者番号：90356551

(2) 研究分担者

祐村恵彦 (YUMURA, Shigehiko)

山口大学・医学研究科・教授

研究者番号：70183986

芳賀永 (HAGA, Hisashi)

北海道大学・先端生命科学研究科・教授

研究者番号：00292045

野口太郎 (NOGUCHI, Taro)

都城工業高等専門学校・物質工学科・講師

研究者番号：90615866

(3) 研究協力者

安達泰治 (ADACHI, Taiji)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：40243323