

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650248

研究課題名(和文)細胞内「張力ホメオスタシス」の分子メカニズムの立証と普遍性の調査

研究課題名(英文)Mechanisms of cellular tensional homeostasis

研究代表者

出口 真次(Deguchi, Shinji)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30379713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が張力を発生して構造を維持することは古くから指摘されているが、なぜ一定の大きさの張力を出し続けることができるのかは不明のままである。本研究者らはこれまでに細胞が張力を維持する分子メカニズムを調べ、非筋II型ミオシンが不可欠な役割を果たすことを明らかにしてきたが、その分子機構は定かではなかった。そこで本研究による蛍光イメージングにより、非筋II型ミオシンが細胞内で力を支えるときには基質であるアクチンからほとんど解離せず、従来考えられていたものより効率的に力を維持し続けることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms regarding cellular tensional homeostasis, i.e., cellular tension is somehow maintained within cells, remain unclear. Previous studies including ours have indicated that nonmuscle myosin II plays a critical role in the maintenance of cellular tension in addition to the well-characterized ATP-dependent generation of the tension. Here we found that the affinity of nonmuscle myosin II to actin is significantly increased once the complex bears tension within stress fibers or cells. Thus, our results suggest that tension-dependent regulation of the rate of ATPase by myosin is essential to achieve the tensional homeostasis.

研究分野：生体医工学

キーワード：張力ホメオスタシス 炎症慢性化 非筋II型ミオシン 細胞バイオメカニクス メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

細胞が張力を発生して構造を維持することは古くから指摘されているが、なぜ一定の大きさの張力を出し続けることができるのかは不明のままである。細胞が何らかの状態を一定に保ち続ける機能は一般にホメオスタシスと呼ばれる。そこで細胞による張力の維持機構を張力ホメオスタシスと呼び、本研究者らはこれまでに様々な研究を行ってその分子メカニズムを調べてきた。これは分子生物学と物理学が密接に関与する複合問題である。これまでに本研究者らは非筋 II 型ミオシンが張力ホメオスタシスに不可欠な役割を果たすことを明らかにしてきたが、その分子機構は定かではなかった。

2. 研究の目的

細胞内の張力発生要素は非筋 II 型ミオシンである。非筋 II 型ミオシンに結合するミオシン調節軽鎖 (myosin regulatory light chain, MRCL) が非筋 II 型ミオシンとアクチンの相互作用を調節する。そこで MRCL の変異体を用いて非筋 II 型ミオシンによる張力の発生状態を制御し、その際の関連分子の安定性を調べることによって細胞が張力を長時間持続して維持できるメカニズムを調べる。

3. 研究の方法

非筋 II 型ミオシンが張力ホメオスタシスを作り出す要因になっていると考え、そのアクチン相互作用を制御する MRCL の変異体 (協力: 北海道大学高橋正行氏) を用いる。MRCL のリン酸化レベルが高いほどミオシンはアクチンと相互作用して、収縮活性を高める。この MRCL の擬似リン酸化状態と擬似脱リン酸化状態を蛍光タンパク質付き変異体として実現し、それをヒト骨肉腫 U2OS 細胞に安定発現させて、共焦点レーザーを用いて FRAP (fluorescence recovery after photo-bleaching) 実験を行う。蛍光の回復からターンオーバー速度を算出し、リン酸化状態すなわちアクチンとの相互作用状態については細胞の張力値に応じた MRCL の安定性を調べる。なお MRCL は非筋 II 型ミオシンとの結合親和性が高いために、MRCL の観察は非筋 II 型ミオシンのそれと同等と仮定する。

4. 研究成果

MRCL の変異体をヒト骨肉腫 U2OS 細胞に導入・安定発現株を作製し、FRAP によって MRCL のターンオーバー速度を測定した。その結果、MRCL の擬似リン酸化状態ではターンオーバー速度が極めて遅く、一方、擬似脱リン酸化状態ではターンオーバー速度が比較的速いことがわかった。MRCL の擬似リン酸化状態では、高強度レーザーによる蛍光褪色直後に 1 割程度蛍光が回復するが、それ以降はほとんど回復しなかった。MRCL は主に

アクチンストレスファイバーを形成する非筋 II 型ミオシンに結合し続けていると考えられる。ストレスファイバーは数百ナノメートルの太さを有する細胞内線維であるために、その表面だけは周囲の MRCL と分子交換しうるが、表面以外ではほとんど分子交換されず、そのために蛍光が 1 割以上は回復しなかったと考えられる。この現象は、MRCL の擬似リン酸化状態では非筋 II 型ミオシンが発生する細胞内張力が大きく、非筋 II 型ミオシンとアクチンの架橋に作用する張力も大きいために、非筋 II 型ミオシンによる ATP 加水分解サイクルにおける ADP 放出が抑制され、非筋 II 型ミオシンとアクチンが安定した結合を続けることに起因すると考えられる。従って、張力が大きいほど非筋 II 型ミオシンはアクチンと結合を続けて、ATP の加水分解を伴わずにエネルギー的に効率的に張力を支えやすくなり、細胞張力の維持すなわち張力ホメオスタシスに貢献する、という分子・物理モデルを得ることができた。

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 4 件)

1. Saito, A.C., Matsui, T.S., Ohishi, T., Sato, M., Deguchi, S., Contact guidance of smooth muscle cells is associated with tension-mediated adhesion maturation. *Experimental Cell Research*, 327, 1-11, 2014.
2. Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S., Microcontact peeling as a new method for cell micropatterning. *PLOS ONE*, 9, e102735, 2014.
3. Deguchi, S., Nagasawa, Y., Saito, A.C., Matsui, T.S., Yokoyama, S., Sato, M., Development of motorized plasma lithography for cell patterning. *Biotechnology Letters*, 36, 507-513, 2014.
4. Saito, A.C., Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S., Aligning cells in arbitrary directions on a membrane sheet using locally formed microwrinkles. *Biotechnology Letters*, 36, 391-396, 2014.

[学会発表](計 14 件)

1. Deguchi, S., Matsui, T.S., Komatsu, D., Kaunas, R., Sato, M.: Contractile properties of single stress fibers. BMES CMBE (Cellular & Molecular Bioengineering) 2013 Annual Meeting, Puerto Rico, Jan 2-5, 2013.
2. Sakamoto, N., Anno, T., Chubachi, S., Deguchi, S., Sato, M.: Role of Nucleus-Actin Filament Binding in

- Endothelial Cell Responses to Cyclic Stretching. International Symposium on Bio Medical Engineering Interface, Sendai, Mar 15, 2013.
3. Deguchi, S., Matsui, T.S., Saito, A.C., Sato, M.: Subcellular localization of focal adhesion proteins are determined by traction stress-dependent positive regulation. 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics, Seoul, Aug 29-31, 2013.
 4. Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Functional extraction of actin stress fibers for contractile force measurements in vitro. 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics, Seoul, Aug 29-31, 2013.
 5. Matsui, T.S., Deguchi, S.: In vitro contraction analysis of stress fibers isolated from aortic smooth muscle cells, 2013 American Society of Cell Biology Annual Meeting, New Orleans, Dec 14-18, 2013.
 6. Deguchi, S., Matsui, T.S.: A new micropatterning for the study of cellular morphogenesis, 2014 CMBE Conference, San Diego, Jan 7-11, 2014.
 7. Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Araki, T., Ohishi, T.: An alternative method for traction force microscopy. International Symposium on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
 8. Matsui T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Biophysical properties of single actin stress fibers isolated from cultured smooth muscle cells. International Symposium on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
 9. Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S.: Development of a new technique for cell micropatterning. International Symposium on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
 10. Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S.: A novel cell micropatterning technique to circumvent direct adsorption of proteins to PDMS. The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.
 11. Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Load-dependent contractile force generation of actin stress fibers. The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.
 12. Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Araki, T., Ohishi, T.: Force balance in mesenchymal cells revealed by new traction force microscopy. The 4th Japan-Switzerland Workshop on

Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.

13. Deguchi, S.: Active biophysical properties of cells and subcellular components. 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Nov 9-12, 2014.
14. Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S.: Force microscopy developed for screening studies on cultured cells. The 62nd NIBB Conference, Force in Development, Okazaki, Nov 17-19, 2014.

〔図書〕(計3件)

1. バイオメカニクスの最前線. 編者 村上輝夫, 共立出版, 2013: 出口真次, 第2章 細胞による外力感知・適応のメカニズム pp. 7-40.
2. Dojin Bioscience シリーズ・メカノバイオロジー. 編者 曾我部正博, 化学同人: 出口真次, 松井翼, 佐藤正明, 第2賞章 細胞における力の発生と維持機構, 印刷中.
3. Vascular Engineering: Understanding of maintenance and treatment by multidiscipline approach. Editors: Tanishita, K., Yamamoto, K., Springer: Kaunas, R., Deguchi, S., Chapter 6. Cyclic stretch-induced reorganization of stress fibers in endothelial cell, in press.

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: 接触物体が発生する力の計測方法およびこれを用いたスクリーニング方法
 発明者: 出口真次, 横山奨, 松井翼
 権利者: 名古屋工業大学
 種類・番号: 特願 2013-271755
 出願年月日: 2013年12月27日
 国内外の別: 国内

名称: 接触物体が発生する力の計測方法およびこれを用いたスクリーニング方法
 発明者: 出口真次, 横山奨, 松井翼
 権利者: 名古屋工業大学
 種類・番号: 特願 2014-169119
 出願年月日: 2014年8月22日
 国内外の別: 国内

名称: 接触物体が発生する力を可視化および/または定量化するための表面改質方法およびこれを用いたスクリーニング方法, ならびにこれら方法に用いるキット
 発明者: 出口真次, 横山奨, 松井翼
 権利者: 名古屋工業大学
 種類・番号: 特願 2014-245641
 出願年月日: 2014年12月4日
 国内外の別: 国内

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://mbl.web.nitech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口真次 (Shinji Deguchi)

名古屋工業大学・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：