

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657130

研究課題名(和文)力によるアクチン線維のゆらぎとアクチン - コフィリン相互作用の制御

研究課題名(英文) Single molecule imaging and kinetic analysis of actin filament-cofilin interactions modulated by fluctuations of the actin filament.

研究代表者

早川 公英 (Hayakawa, Kimihide)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任講師

研究者番号：60467280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン切断タンパク質コフィリンのアクチン切断活性は、アクチン線維が引っ張られて張力が発生している条件下では抑制される。本研究では、アクチン線維へのコフィリン結合を超解像一分子イメージングにより解析した。アクチン線維へのコフィリン結合には協同性があり、65nm(アクチン26分子)程度の空間定数で協同性がアクチン線維上を伝搬することを明らかにした。また、アクチン線維のゆらぎが大きい部分では、コフィリンがアクチン線維により結合しやすいことを明らかにした。アクチン線維に力がかかっている状態では、アクチン線維の構造的なゆらぎが減少することによってコフィリン結合が抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Actin-depolymerizing factor/cofilin proteins preferentially sever actin filaments when the filament was not tensed. We performed real-time single molecule imaging of the binding of cofilin to single actin filaments without tension. Our results show that the binding of a single cofilin molecule enhances the binding of additional cofilin within 65 nm (across 26 actin protomers) of the initial binding site. The fluctuations of the actin filaments was positively correlated to the on-rate of cofilin binding.

研究分野：生物物理

キーワード：アクチン コフィリン 張力 ゆらぎ 協同性

1. 研究開始当初の背景

細胞は、細胞内外の力学的環境を感知して応答する。アクチンストレス線維はアクチン-ミオシン相互作用によって収縮力を発生しており、収縮力が低下した場合や細胞外基質が柔らかい場合など、ストレス線維に生じる張力が減少するような条件ではストレス線維が崩壊する。我々は、アクチン切断タンパク質コフィリンが、力の減少依存的にアクチン線維を切断するという驚くべき事実を、精製したアクチンおよび精製コフィリンを用いた *in vitro* 再構成系で明らかにした (図 1)。

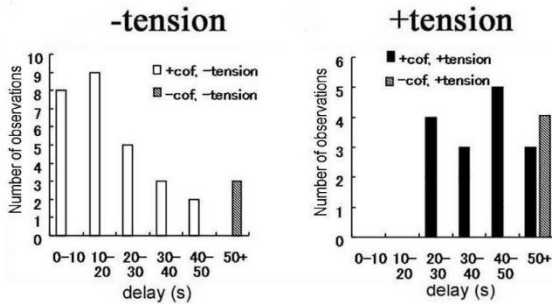


図 1 精製アクチンを光ピンセットで操作しながら蛍光ライブイメージングし、コフィリンを添加してからアクチン線維が切断されるまでの時間を計測したヒストグラム。右がアクチン線維に引張り力を負荷していない場合、左がアクチン線維に引張り力を負荷した場合。引張り力を負荷すると切断までの時間が約 1.7 倍延長された。

先行する生化学的研究からアクチン線維にコフィリンが結合する際には、アクチン線維を構成するアクチンのうちで一部のアクチンの方にコフィリンが結合できること、コフィリン結合によりさらなるコフィリン結合が促進されること (結合の正の協同性) が明らかにされている。また、電子顕微鏡観察からは、コフィリンの結合によりアクチン線維のねじれが増加する様な構造変化が起こることが明らかにされている。これらの事実から、我々はアクチン線維のねじれゆらぎが張力負荷により減少し、コフィリンのアクチンへの (協同性) 結合、あるいはコフィリンによるアクチン切断が抑制されるという仮説をたてた。

2. 研究の目的

アクチン線維に引張り力がかかっている状態でコフィリンのアクチン線維への結合が変化するかどうかを明らかにするのが最終的な目的である。一般的な生化学的解析手法では “全てのアクチン線維に引張り力が負荷された状態” を発生させなければ速度論的な解析を行うのは極めて困難である。これに対して一分子イメージングでは “引張り力が負荷されたアクチン線維を選択して解析する” 事が可能であるため、一分子イメージングによる生化学的解析を行うことにした。しか

し、一分子イメージングを用いたアクチン線維とコフィリンの相互作用解析は過去に全く行われていないため、まず (1) 力がかかしていない状態のアクチン線維とコフィリンの相互作用を一分子イメージングにより解析することを第一の目的とした。その後 (2) 力がかかっている状態、あるいはねじれゆらぎが抑制された状態のアクチン線維とコフィリンの相互作用を解析し、力によってアクチンコフィリン相互作用がどのような影響を受けるかを明らかにすることを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

コフィリンのアクチン線維への結合・解離を一分子レベルで解析するために、蛍光標識したアクチンと微量のピオチン標識アクチンが共重合したアクチン線維をガラス表面にアビジン-ピオチン反応で固定し、同じく蛍光標識したコフィリンのアクチン線維への結合を全反射照明によりイメージングした (図 2)。アクチン線維へのコフィリン結合の on-rate, off-rate を計測した。また、超解像を用いた画像解析により、コフィリンが協同性に結合する際の結合部位の特定を行

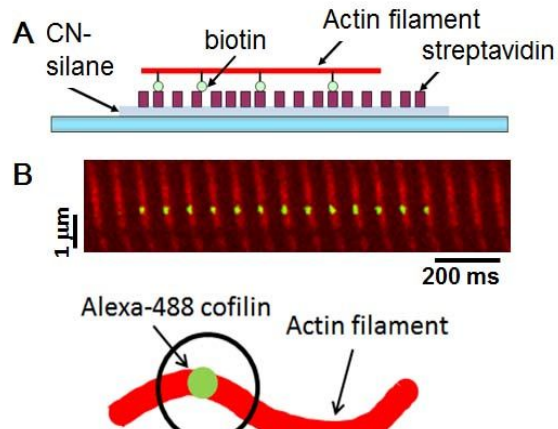


図 2 アクチン-コフィリン相互作用の一分子イメージングの模式図。ガラス表面を CN-シランでコートし、アビジンまたは抗ピオチン抗体を共有結合させ、ピオチン標識アクチンを含むアクチン線維を結合させる (A)。赤で表示されたガラス表面のアクチン線維に Alexa 標識されたコフィリン (緑の点) が結合するのが観察できた (B 上段)。アクチン線維上の直径 600nm の円内を対象として標識コフィリンの輝度変化を解析した (B 下段)。

った。アクチン線維を牽引するため、ガラス表面をコートしたシランの CN 基に直接サイトカラシンを共有結合させ、そのサイトカラシンにピオチン標識アクチンを含むアクチン線維の b 端を特異的に結合させた。ピオチンアクチン-アクチン共重合線維にアビジン標識された磁気ビーズを結合させ、電解研磨した磁極をもつ電磁石を用いて牽引した。アクチン線維が牽引された状態で蛍光標識コフィリンを添加しアクチン線維への結合を

観察した。

4. 研究成果

まず、アクチン線維をガラス表面に固定し、アクチン線維に張力が発生していない状態のアクチン-コフィリン相互作用を全反射照明顕微鏡により一分子レベルで解析した。ガラス表面への架橋点となるビオチンアクチンを 1~2%にしてアクチン線維が長軸方向に約 1 μm おきにガラス表面に架橋されるような条件では、生化学的手法で求められたアクチン-コフィリン相互作用の速度論的数値に概ね合致する結果が得られたことから、バルク溶液中でのコフィリン-アクチン線維相互作用がおおむね一分子レベルでイメージング出来たと考えられた。一つのコフィリンがアクチン線維に結合すると、65nm(約 26 アクチン分子)の距離までさらなるコフィリンの結合確率が上昇したことから、コフィリン結合の協同的効果はアクチン線維の遠方まで伝搬すると考えられた。(図 3)

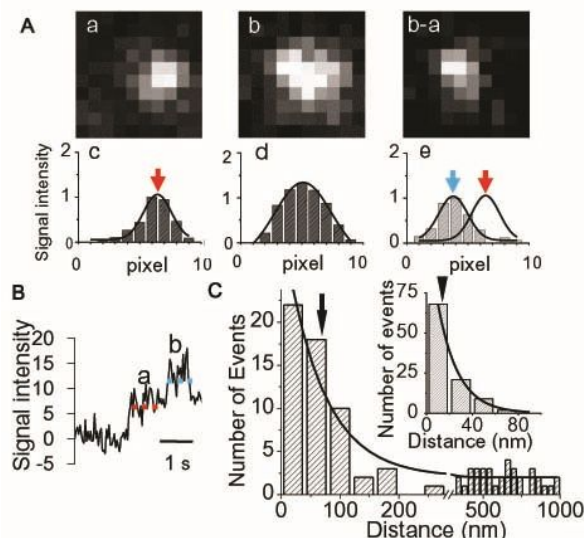


図 3. (A)アクチン線維にコフィリンが一分子結合した状態(a)と、新たにもう一分子のコフィリンが結合した状態(b)の蛍光像とその差分像(c)。(C)輝度重心から求めたコフィリン 2 分子間の距離とその確率分布。コフィリン結合の正の協同性の空間分布を反映する。インセットは同一コフィリン分子の輝度重心変位量で、この実験系の空間分解能をしめす。

また、アクチン線維の空間的ゆらぎとコフィリンの結合確率が相関していたこと(図 3)、アクチン線維を牽引するとねじれゆらぎが減少したことから、アクチン線維に張力が発生するとアクチン線維のゆらぎが減少し、コフィリン結合が抑制されることが示唆された。ビオチン標識アクチンの含有量を増加させて、ガラス表面により強固にアクチン線維を結合させてアクチン線維の自由度を束縛するとコフィリンのアクチン線維への結合が大きく減少したこともこの仮説を支持していた。これらの結果は学術論文として発表

した。次に、全反射照明顕微鏡を用いたライ

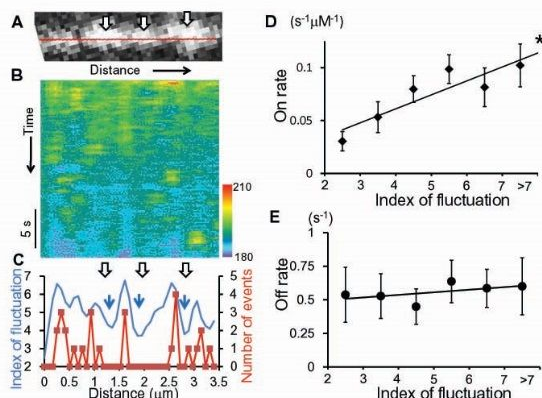


図 4 ガラス表面に結合させたアクチン線維(A)とその蛍光強度変化(アクチン線維の Z 軸方向のゆらぎが反映される)を時間経過を縦軸に取ったキモグラフで示す(B)。アクチン線維のゆらぎの大きさを青で、コフィリンの結合回数を赤で示す(C)。揺らぎが大きい部分ではコフィリンの結合頻度が高くなっている。ゆらぎの大きさとアクチン線維へのコフィリン結合の on-rate (D), off-rate (E)の相関をグラフに示す。結合の on-rate とアクチン線維の構造的ゆらぎには正の相関が見られた。

ブ観察下で、単一アクチン線維に牽引力を負荷しながらアクチン-コフィリン相互作用の一分子観察が可能な実験系の構築を試みた。シアノ基を持つシラン化剤を用いて、サイトカラシン D をガラス表面に直接固定することによってアクチン-ビオチン標識アクチン共重合線維の b 端をガラス表面に固定した。一端が固定されたアクチン線維にアビジン標識した磁気ビーズを結合させて電磁石でビーズを牽引し単一アクチン線維に張力を発生させた。ある程度の割合のアクチン線維はビーズが結合し電磁石により牽引された。しかしながらアクチン線維を牽引するとアクチン線維がガラス表面からわずかに遠ざかり全反射照明の強度が減衰するために、同時にコフィリンの結合を一分子レベルで観察するのは極めて困難であった。光ピンセット法でも同様の問題が発生した。現時点においてアクチン線維の牽引とアクチン-コフィリン相互作用の一分子観察が両立する実験系は構築出来ておらず、今後の検討課題となった。

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 1 件)

(1)Hayakawa K, Sakakibara S, Sokabe M, & Tatsumi H (2014) Proc Natl Acad Sci U S A 111(27):9810-9815. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) Hayakawa K., Sokabe M., Tatsumi H.
“Single molecule imaging of the binding of
cofilin to ATP- and ADP-F-actin”
ATP および ADP 結合アクチンフィラメント
に対するコフィリン結合の一分子観察
日本生物物理学会第 52 回年会 2014 年 9 月
25-27 日、札幌コンベンションセンター（北
海道札幌市）

(2) Hayakawa K., Sokabe M., Tatsumi H.
““Mechano-sensing” by actin filaments”
第 53 回 日本生体医工学会 シンポジウ
ム講演 2014 年 6 月 24-26 日、仙台国際セ
ンター（宮城県仙台市）

(3) Hayakawa K., Sokabe M., Tatsumi H.
“Mechano-sensing by actin filaments.”
International Symposium on Mechanobiology
2014 国際シンポジウム講演、2014 年 5 月
20-23 日、岡山大学（岡山県岡山市）

(4) Hayakawa K., Sakakibara S., Tatsumi H.,
Sokabe M. “Direct measurement of
thermodynamic parameters of cofilin–actin
filament interactions at the single molecule
level.” Biophysical societies, 58th annual
meeting 2014 年 2 月 7-11 日、（ USA、サンフ
ランシスコ）

(5) Hayakawa K., Sakakibara S., Sokabe M.,
Tatsumi H. “Analysis of Cooperative Cofilin–
Actin Filament Interactions examined at the
single molecule level.” 日本生物物理学会第
51 回年会 2013 年 10 月 28-30 日、国立京都
国際会館（京都府京都市）

(6) Hayakawa K., Tatsumi H., Goto T.,
Sokabe M.
「コフィリンのアクチン線維への協同的結
合の直接観察」日本生物物理学会第 50 回年
会 2012 年 9 月 22-24 日、名古屋大学（愛知
県名古屋市）

(7) Sakakibara S., Hayakawa K., Tatsumi H.,
Sokabe M.
「アクチン線維へのコフィリンの協同的結
合の統計力学モデルの作成」日本生物物理学
会第 50 回年会 2012 年 9 月 22-24 日、名古
屋大学（愛知県名古屋市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

早川 公英 (HAYAKAWA, Kimihide)
名古屋大学・医学系研究科・特任講師
研究者番号：60467280