

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：27101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700454

研究課題名(和文) 平滑筋細胞分化過程におけるアクチン繊維構造体の物理特性解析

研究課題名(英文) Analysis of physical properties of actin filaments during differentiation of smooth muscle cells

研究代表者

木原 隆典 (Kihara, Takanori)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：90436535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン繊維は平滑筋細胞の分化制御を担うと考えられている。本研究はアクチン繊維に結合する平滑筋細胞特異的転写因子CRP2に着目し、CRP2がアクチン繊維の構造・物性にどのような影響を与えるか検討を行った。CRP2の溶液中における構造を明らかにし、さらに溶液中においてCRP2がアクチン繊維に結合して繊維径を増大させること、繊維の持続長を伸長させることを明らかにした。さらにCRP2は平滑筋細胞のマクロな機械特性も増大させた。以上より、CRP2がアクチン繊維の構造・物性を制御する因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Dynamics of actin filaments regulate differentiation of smooth muscle cells. In this study, I examined the effects of CRP2, which is a specific transcription cofactor for smooth muscle cell related genes, on structure and physical property of actin filaments. The structure of CRP2 in solution was demonstrated using small angle X-ray scattering analysis. CRP2 increased the diameter and the persistent length of the actin filaments by binding with actin filaments. Furthermore, the mechanical properties of smooth muscle cells were increased by overexpression of CRP2. Therefore, I clarified that CRP2 was a factor regulating the structure and physical property of actin filaments in solution.

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：CRP2 アクチン繊維 平滑筋細胞 構造 物性 X線小角散乱 原子間力顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

アクチン繊維は周囲の環境や細胞の状態に応じてダイナミックに変化し、細胞表面構造や形態を変化させる。さらにアクチン繊維は転写因子や細胞内シグナル伝達とも深く関わっており、アクチン繊維の構造変化によって遺伝子発現も変化する。このようにアクチン繊維は細胞の物理的・生物的制御因子として重要な役割を担う。

平滑筋細胞は生体内でその表現系を遊走能・増殖能が発達した増殖型と筋収縮可能な収縮型とで転換する。この形質転換は平滑筋細胞の分化・脱分化の過程であり、発生および恒常性維持に重要な役割を果たす。

平滑筋細胞の分化制御を担う転写因子の一つとして CRP2 (cysteine glycine rich protein 2) がある。CRP2 はアクチン繊維と相互作用し、アクチン繊維の状態が CRP2 の機能制御に重要な役割を果たす可能性が示唆されている (Kihara et al., 2011)。さらにアクチン繊維は平滑筋細胞の分化調節に重要な役割を担うことが報告されている。しかし、アクチン繊維の物理的機能が平滑筋細胞の分化においてどのように作用しているかは不明である。

## 2. 研究の目的

こうした平滑筋細胞分化過程におけるアクチン繊維の役割を明らかにするためには、平滑筋細胞の分化過程におけるアクチン繊維構造の物理環境を明らかにすると共に、この物理環境が平滑筋細胞の分化制御にどのように作用するか明らかにすることが必要となる。そこで本研究ではアクチン繊維に結合する CRP2 に着目し、平滑筋細胞内のアクチン繊維による物理環境形成に CRP2 がどのように働くか明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CRP2 の構造解析

溶液中において CRP2 がどのような構造を有しているのか明らかにするため、X 線小角散乱法にて解析を行った。構造解析には、マウス CRP2 を His タグと融合させたりコンビナント CRP2 を大腸菌にて発現させ、抽出・精製を行ったものを用いた。CRP2 の構造は X 線小角散乱データから Svergun らの構造予測モデルを用いて推察した。

### (2) アクチン繊維に対する CRP2 の作用の解析

CRP2 がアクチン繊維と結合することで、アクチン繊維の構造にどのような作用を与えるかについて、X 線小角散乱実験、透過型電子顕微鏡観察、アクチン繊維溶液の粘性解析によって研究を行った。さらにアクチン繊維の物性に関しては、共焦点顕微鏡を用い、CRP2 結合時におけるアクチン繊維の画像を取得し、そこからみかけの持続長を算出した。

### (3) CRP2 の発現による細胞の物理特性解析

CRP2 を発現させた細胞の物理特性がどのように変化するかについて原子間力顕微鏡によって解析を行った。CRP2 発現ベクターはエレクトロポレーションによって導入し、CRP2 を発現した細胞に対してその物理特性の計測を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 溶液中における CRP2 の構造

大腸菌にて発現・抽出・精製を行った His タグ融合マウス CRP2 の溶液中における構造を X 線小角散乱法にて解析を行った。

CRP2 は溶液中に高濃度で置いておくと、一日で凝集体を形成した。そのため、X 線小角散乱の測定にあたっては測定直前に限外過によって CRP2 の濃縮を行い、タンパク質濃度の測定と並行して実験を行った。

CRP2 の X 線小角散乱を取得した所、極小角領域において、散乱光の急激な増大が見られた。これは溶液中で一部 CRP2 が凝集していることを示している。この極小角を除いた小角領域からギニエプロットを行い、溶液中における CRP2 の慣性半径を 45.8Å と決定した。さらに X 線小角散乱データから CRP2 の最長原子間距離を 130Å とし、そこから CRP2 の構造モデルを推察した (図 1)。ただし X 線小角散乱データから、CRP2 は比較的広がった構造を取っており、その構造を一意には決定できないと考えられる。

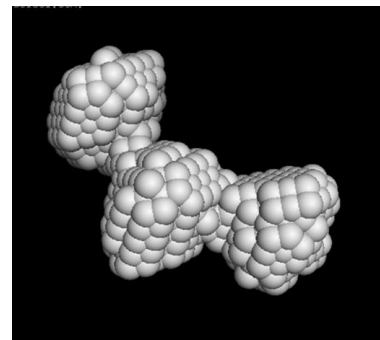


図 1 X 線小角散乱から得られた溶液中における CRP2 の構造

### (2) CRP2 が結合したアクチン繊維の構造

次に、CRP2 が結合することでアクチン繊維の構造がどのように変化するかを X 線小角散乱法にて解析を行った。アクチン繊維の解析にあたっては、ロッド状分子に対する X 線散乱をモデルとした。

実験ではアクチン分子を重合させることで形成した再構成アクチン繊維を用いた。アクチン繊維の X 線小角散乱データから、繊維断面の慣性半径は 38.5Å となった。このアクチン繊維にリコンビナント CRP2 を加えていくと、繊維断面の慣性半径は徐々に上昇し、アクチン分子:CRP2 のモル比率が 1 : 4.6 の時

で 61.4Å となった。これら繊維断面の慣性半径から推察される繊維の直径はアクチン繊維のみで 109Å、CRP2 が 1:4.6 で結合したアクチン繊維で 174Å である。また、アクチン分子が完全にアクチン繊維になっていると仮定した場合のアクチン繊維と CRP2 のみかけの解離定数はおよそ 20 μM であった。

さらに、CRP2 がアクチン繊維に結合することでアクチン繊維の繊維径が増大しているかを透過型電子顕微鏡で観察した。アクチン繊維単独時における繊維の直径は 10.7 ± 1.30 nm、CRP2 をアクチン分子とモル比率で 1:1 加えた時の繊維径は 11.4 ± 1.42 nm であった。このことから、CRP2 が結合することでアクチン繊維の繊維径が増大していることがわかった。

X 線小角散乱データから得られる繊維断面の慣性半径から推察される繊維径の値に比べ、電子顕微鏡で観察された繊維径は小さい。CRP2 は溶液中での分子の慣性半径が大きく、溶液中で比較的伸長した構造を取っている。そのため、アクチン繊維に結合しても CRP2 の構造は比較的伸長しており、その影響で溶液中におけるアクチン繊維の断面の慣性半径が大きな値を示したものと考えられる。一方で、電子顕微鏡像はアクチン繊維を乾燥させており、そのプロセスで CRP2 がアクチン繊維の周辺に凝集した可能性やアクチン繊維と CRP2 の濃度が X 線小角散乱で使ったものより低いためにアクチン繊維に結合している CRP2 が少ないなどが考えられる。これにより、電子顕微鏡観察では CRP2 が結合したアクチン繊維の繊維径がそれほど増大していないのかもしれない。このことは、細胞内などの溶液中では CRP2 が比較的伸長した状態でアクチン繊維に結合しており、アクチン繊維とその他のタンパク質との相互作用を CRP2 が介在できることを示すと考えられる。

### (3) CRP2 が結合したアクチン繊維の物性

次に、CRP2 を結合させることでアクチン繊維の物性がどのように変化するかについてアクチン繊維の持続長を調べることで検討を行った。

アクチン繊維の持続長はローダミンファロイジンにより蛍光ラベルした再構成アクチン繊維をガラス表面に吸着させ、それを共焦点顕微鏡で観察し、繊維の長さや繊維端の長さから持続長を算出した。その結果、アクチン繊維の持続長が 7.2 ± 0.71 μm、CRP2 を結合させたアクチン繊維の持続長は 9.0 ± 1.1 μm となった。このことから、アクチン繊維は CRP2 が結合することで、繊維自体の物性が変化しうることが初めて明らかとなった。

円柱構造体の持続長は物体のヤング率 E と断面二次モーメント I を掛けた EI に比例する。さらに断面二次モーメント I は

$$I = \frac{\pi R^4}{64}$$

で表される。R は円柱の断面半径であり、断面二次モーメントの比は断面半径の 4 乗に比例する。このことから、CRP2 が結合したアクチン繊維の持続長は X 線小角散乱で概算される繊維径から推察される持続長より短いことが分かる。これは、円柱構造体自体のヤング率が低下していることを示している。CRP2 は分子量が 22kDa であるにもかかわらず分子の慣性半径が大きく、明らかにタンパク質としての電子密度がアクチン分子に比べて低い。このことから、アクチン繊維に CRP2 が結合することで、繊維自体のヤング率が低下し、繊維径の増大の効果によって全体として持続長が伸びたものと考えられた。

### (4) CRP2 の発現による平滑筋細胞の物理特性解析

ラット大動脈平滑筋細胞株 A7r5 細胞を用いて、EGFP-CRP2 を強制発現した細胞と EGFP のみを発現した細胞との物理特性を原子間力顕微鏡にて計測を行った。物理特性は細胞表面のヤング率とし、原子間力顕微鏡で得られる応力-押込み距離曲線からヘルツモデルにフィッティングすることで求めた。

EGFP のみ、EGFP-CRP2 を発現させた細胞のヤング率の結果を図 2 に示す。EGFP を発現させた細胞におけるヤング率のばらつきは非常に大きい、それぞれの細胞のヤング率の対数平均値はそれぞれ 0.97 kPa と 4.3 kPa であり、明らかに EGFP-CRP2 を発現した細胞の方が高いヤング率を示すことが明らかとなった。

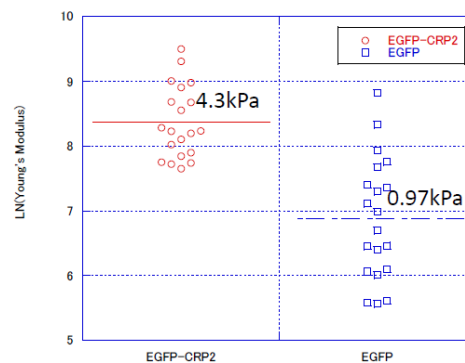


図 2 CRP2 を発現させた A7r5 細胞の物理特性

このことは、CRP2 を発現させることで平滑筋細胞内のアクチン繊維のマクロな構造が変化していることを示している。現状では CRP2 の発現によりアクチン繊維自体の数が増大しているか、アクチン繊維の構造が変化しているか、あるいは両方生じているかは判断できないが、CRP2 を介した平滑筋細胞内のアクチン繊維による物理環境の変化が生じていると考えられる。

#### (5) まとめ

本研究によって CRP2 の溶液中における構造および溶液中において CRP2 がアクチン繊維に結合することでその繊維径が増大すること、アクチン繊維の物性が変化することが明らかとなった。さらに CRP2 はアクチンを介して平滑筋細胞のマクロな機械特性も変化させることが明らかとなった。こうしたアクチン繊維に対する CRP2 の作用が明らかとなったのは世界で初めてである。今後は、こうした CRP2 の作用によって生じる平滑筋細胞内のアクチン繊維の物理環境変化が平滑筋細胞の分化過程にどのように働くかについて検討することで、細胞内の物理環境が平滑筋細胞の分化制御にどのように機能するか明らかになっていくと期待される。

#### 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3件)

Kihara, T., Ito, J., Miyake, J., Measurement of biomolecular diffusion in extracellular matrix condensed by fibroblasts using fluorescence correlation spectroscopy, PLoS ONE, 8 (11), e82382 (2013) 査読有り

DOI: 10.1371/journal.pone.0082382

Shinohara, S., Kihara, T., Sakai, S., Matsusaki, M., Akashi, M., Taya, M., Miyake, J., Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel, J. Biosci. Bioeng., 116 (2), 231-234 (2013) 査読有り

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.02.013

Kihara, T., Yoshida, T., Haghparast, S.M.A., Miyake, J., Elasticity mapping analysis of apical cell periphery actin structures of normal fibroblasts and cervical cancer cells, J. Analytical Sciences, Methods and Instrumentation, 3 (2), 124-129 (2013) 査読有り

DOI: 10.4236/jasmi.2013.32015

##### [学会発表](計10件)

Kihara T., Shinohara S., Shinohara S., Sugimoto Y., Miyake, J., Smooth muscle differentiation related transcription factor CRP2 directly regulates of actin filaments dynamics., 第51回日本生物物理学会年会, 10/28-30 (2013) 京都

伊東潤里, 木原隆典, 山崎淳平, 三宅淳, 細胞内外における分子拡散解析, 第65回日本生物工学会大会, 9/18-20 (2013) 広島

木原隆典, 清水祐司, Haghparast SMA, 三宅淳, 細胞のバイオメカニクス, 日本機械学会 第23回バイオフロンティア講演会, 10/5-6 (2012) 弘前

Kihara T., Shinohara S., ugitomo Y., Miyake, J.,

Smooth muscle differentiation related transcription factor CRP2 directly regulates physical properties of actin filaments., 第50回日本生物物理学会年会, 9/22-24 (2012) 名古屋

##### [図書](計1件)

Shinohara, S., Shinohara, S., Kihara, T., Miyake, J., Regulation of differentiated phenotypes of vascular smooth muscle cells, Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans, Sugi, H. (ed), InTech, pp331-344 (2012)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木原 隆典 (KIHARA, Takanori)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授  
研究者番号：90436535