

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770175

研究課題名(和文)細胞内高次アクチン構造体の棲み分けを決めるメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the spatio-temporal regulated formation mechanism of cellular actin-based structures.

研究代表者

水野 裕昭(Mizuno, Hiroaki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00620204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内でアクチン結合蛋白質間の相互作用は、高次アクチン構造体の形成・崩壊を時空間特異的に制御するが、その詳細は未だ不明である。哺乳動物フォルミンmDia1は、前進的にアクチン重合している間、線維構造に沿って回転する(螺旋回転)。本研究ではmDia1の螺旋回転が、アクチン線維にねじれ応力を与え、アクチン脱重合因子コフィリンの結合や線維切断活性に対する抵抗性を向上することを見出した。加えて、N末端領域を介して細胞構造に結合したmDia1が、コフィリン抵抗性のアクチン線維を多数形成することも見出した。これらの結果は、mDia1の螺旋回転が、コフィリンの機能に対抗する機構として働くことを示している。

研究成果の概要(英文)：In cells, the formation of actin structures is regulated by the interaction between actin regulatory proteins. Formin homology proteins (formins) play an essential role in the formation of actin stress fibers and yeast actin cables. A mammalian formin mDia1 rotates along the long-pitch helix of F-actin during processive actin elongation (helical rotation). Helical rotation may impose torsional force on F-actin in the opposite direction to the twisting of F-actin by an actin depolymerizing factor cofilin. In the present study, we revealed that helical rotation of mDia1 imposes torsional force on F-actin and enhances resistance against the cofilin binding and the filament severing activity of cofilin. In addition, an active mutant of mDia1 tethered to cellular structures through its N-terminal region induces the formation of F-actin resistant to actin disassembly. These results indicate that helical rotation of mDia1 functions as an antagonistic mechanism to the cofilin activity.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格 アクチン フォルミン コフィリン 螺旋回転 螺旋構造

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は柔軟にその形を変えながら移動や細胞質分裂を行い、生命を維持する。この細胞の形態変化は、アクチンが線維化・脱線維化し、アクチンストレスファイバーや収縮環などのアクチン構造体を空間特異的に構築・崩壊することによって行われている。細胞内の様々なアクチン結合蛋白質は、アクチン構造体特異的に結合し、構造体の構築・崩壊を制御している。だが、どのようにして、アクチン結合蛋白質が結合特異性を持ち、機能の異なる高次アクチン構造体を空間特異的に構築できるのかについては明らかになっていない。例えば、アクチン重合核形成因子である Arp2/3 complex とフォルミンは、共に急速なアクチン重合核形成と線維伸長を行うが、Arp2/3 complex は枝分かれした線維を形成し、フォルミンは長距離で直線状な線維を形成する。Arp2/3 complex とフォルミンは、出芽酵母において、それぞれアクチンパッチとアクチンケーブルという異なる構造のアクチン構造体を同一空間に形成する。しかしなぜ、アクチンケーブルに Arp2/3 complex が結合しないのか、そしてアクチンパッチにフォルミンが局在しないのか、その棲み分けは明らかになっていない。このようなアクチン構造体とその構成因子の棲み分けは、他のアクチン結合蛋白質やアクチン脱重合因子にも見られる。例えば、アクチン束化因子ファシンは、フィロポディア内でアクチンバンドルを形成し、ストレスファイバーには局在しない。逆にトロポミオシンは、ストレスファイバーに局在し、フィロポディアには局在しない。またアクチン脱重合因子コフィリンはラメリポディアに局在するが、ストレスファイバーには局在しない。アクチン結合蛋白質コロニンは、相同性の高い領域でアクチン線維に結合するが、コロニンアイソフォーム間の細胞内局在は異なる。このアクチン構造体やアクチン結合蛋白質の棲み分けはどのようにして決まっているのだろうか。これらを明らかにすることは、細胞接着やがん細胞の浸潤、細胞質分裂などの、細胞の生命維持の根幹となるメカニズムを深く理解するためにも重要である。

## 2. 研究の目的

私は、以前に哺乳動物フォルミン mDia1 が、プロセッシブにアクチン重合をしている間、アクチン線維の二重螺旋構造に沿って回転していること(以後、螺旋回転と呼ぶ)を一分子蛍光偏光法によって可視化した。アクチンの 374 番目のシステインに結合した蛍光色素テトラメチルローダミン (TMR) は、線維軸に対して 45 度方向に振動する偏光を放出する。そのため、アクチン線維を顕微鏡視野内で 45 度方向に配置した時、線維内サブユニットと結合した TMR は、その配向に応じて縦偏光もしくは横偏光を放出する。このアクチン線維が線維軸を中心に回転した場合、

TMR 一分子の蛍光偏光は、縦偏光から横偏光に、横偏光から縦偏光にと交互に連続的に入れ代わる。この手法を用いて、私はガラス表面上に固定した mDia1 から 45 度方向に伸長しているアクチン線維を可視化した。その結果、アクチン線維上の TMR 一分子の蛍光偏光は、線維が 36 nm 伸長する度に縦偏光から横偏光、横偏光から縦偏光と入れ替わり、線維構造に沿って回転していることが明らかになった。このプロセッシブなアクチン重合の間にかかる mDia1 の螺旋回転は、アクチンモノマー結合蛋白質プロフィリン存在下でも、ADP と結合したアクチン (ADP-アクチン) からの伸長の間でも見られた。また、mDia1 と結合したアクチン線維の barbed end からアクチン脱重合が起こること、そしてその脱重合がプロフィリンによって加速されることを初めて可視化し、この mDia1 を介した脱重合の間にも mDia1 の螺旋回転は見られた。このフォルミンの螺旋回転は、出芽酵母フォルミン Bni1p でも見られた。これらの結果は、フォルミンが忠実にアクチン線維の barbed end で、線維構造に沿って回転しながらアクチン重合・脱重合をすることを示している。以前に我々の研究室では、カエル XTC 細胞内で一分子可視化された mDia1 が、アクチン線維の barbed end と結合したまま、毎秒 720 個のアクチンサブユニットを barbed end に加え、毎秒 2  $\mu\text{m}$  でプロセッシブに移動しながら線維を伸長することを報告している。また、細胞内のアクチン線維は互いにクロスリンクされている。これらのことも踏まえて考えると、細胞内でフォルミンは、互いに架橋されたアクチン線維の barbed end で螺旋回転しながらアクチン重合をしていること考えられる。では仮に、フォルミンが細胞構造に固定され螺旋回転が抑制された時、フォルミンの螺旋回転による負荷はどこに蓄積するのだろうか。以前の私の研究では、mDia1 の螺旋回転が強制的に止まったとき、プロセッシブなアクチン重合は停止した。このことは、アクチン重合中の mDia1 の螺旋回転が、アクチン線維にねじれ応力を与え、その応力がアクチン線維に蓄積し、アクチン重合が停止した可能性を示している。この mDia1 が与えるねじれ応力は、線維の螺旋が緩む方向にねじれると考えられる。一方で、コフィリンが結合したアクチン線維のねじれは、きつくなることが知られている。これらのことは、フォルミンが発生するねじれ応力が、アクチン線維のねじれを介して、線維のターンオーバーに深く関与することを示唆している。本研究では、*in vitro* の研究から、アクチン線維の動的な構造変化がアクチン結合蛋白質に与える影響を、また、細胞内での一分子観察から、細胞内で様々な異なる機能を発揮するアクチン構造体の棲み分けのメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

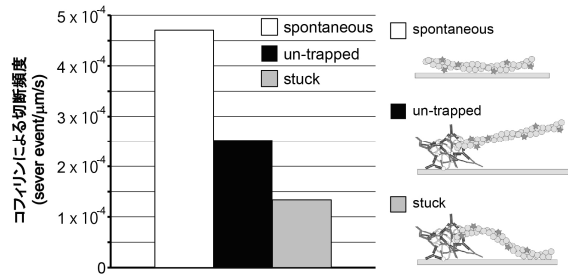
本研究では、まず、mDia1 がアクチン線維にねじれ応力をかけた時に、アクチン結合蛋白質の機能がどのように変化するかを可視化した。私の以前の研究から、ガラス表面に固定したmDia1 から伸長するアクチン線維のやじり端側をガラス表面上に固定したとき、mDia1 を介したアクチン重合が線維に螺旋構造が緩む方向にねじれ応力をかけることが想定されている。私は、このねじれ応力をかけられたアクチン線維とかけられていない線維を用いて、各線維に対するアクチン脱重合因子コフィリンの結合とコフィリンによる線維切断活性を全反射顕微鏡 (TIRF microscopy) を使って可視化した。

一方で複合体を形成するフォルミンや、細胞膜にアンカーされるフォルミンを発現させた細胞内で、アクチンメッシュ構造に取り込まれたサブユニットの寿命や、コフィリンの結合量がどのように変化するかを、高解像蛍光顕微鏡で観察した。mDia1 は、N 末端側に Rho Binding Domain (RBD) と Diaphanous Inhibitory Domain (DID) を持ち、C 末端には Diaphanous Autoregulatory Domain (DAD) を持っている。Inactive な状態では mDia1 の DID と DAD が結合し、アクチン重合能が抑制されている。低分子 G 蛋白質 Rho は、細胞膜に結合しており、外部からの刺激を受け活性化され、mDia1 を活性化し、DID と DAD の結合が解離し、C 末端側にある Formin homology domain 1 と 2 (FH1 と FH2) がアクチンと結合できるようになり、アクチン重合が開始される。このことから、mDia1 が細胞膜と結合した Rho によって活性化されることも考えられ、細胞膜に固着した mDia1 が螺旋回転によってアクチン線維にねじれを与える可能性がある。そのため、mDia1 全長 (mDia1 full) や N 末端領域を持つ mDia1 活性化型変異体 ( C63 )、N 末端を持たない mDia1 活性化型変異体 (mDia1 FH1-FH2) をそれぞれ発現させた細胞間で、アクチン線維の寿命やコフィリンの結合量を比較した。

### 4. 研究成果

ストレプトアビジンコートされたガラス表面に mDia1 を固定し、mDia1 からビオチン化アクチンを含むアクチン線維を伸長させた。固定された mDia1 から伸長しているアクチン線維のやじり端側が、ビオチン-アビジン反応によって固定したとき、mDia1 は、アクチン線維にねじれ応力をかけ、線維の伸長を停止した (stuck F-actin)。このような条件下のアクチン線維に、Xenopus コフィリン 2(Xac2) を添加し、その線維の長さで切断されるまでの時間から、各線維の切断頻度を計測した (右上図)。

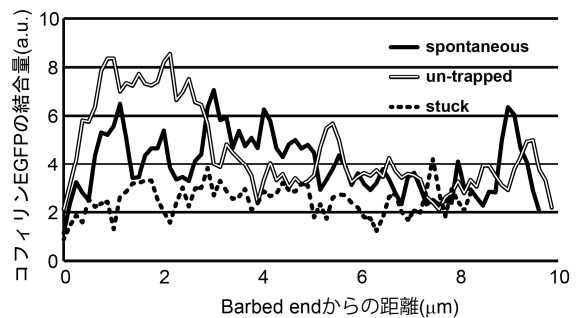
Stuck F-actin は、自発的に伸長しているアクチン線維 (spontaneous F-actin) や、線維の一部が固定されること無く mDia1 から伸長している線維 (un-trapped F-actin) より



も、それぞれ 5 倍と 3 倍高い切断抵抗性を示した。

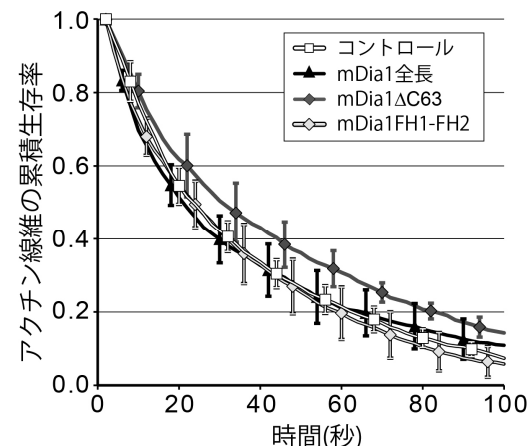
このことは、mDia1 の螺旋回転は、アクチン線維にねじれ応力をかけ、その結果、線維切断が抑制されたことを示している。

また、大腸菌から精製した recombinant コフィリン-EGFP を用いて、spontaneous F-actin、un-trapped F-actin、そして Stuck F-actin へのコフィリンの結合を蛍光顕微鏡下で観察した (下図)。

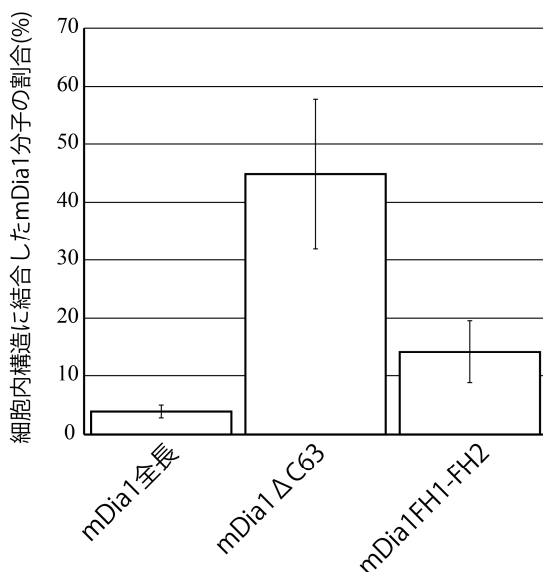


その結果、stuck F-actin へのコフィリンの結合量は、spontaneous F-actin や un-trapped F-actin と比べて半分に低下した。これらの結果は、mDia1 とアクチン線維の回転自由度が失われたとき、mDia1 の螺旋回転は、アクチン線維にねじれ応力をかけ、コフィリンによる線維切断とコフィリンの結合に対する抵抗性を増強することを示している。

一方で、Xenopus XTC 細胞内に mDia1 変異体を過剰発現させ、それらの細胞内に、我々が以前見出した新規蛍光アクチンプロブ、DyLight-labeled アクチン (DL-アクチン) を電機穿孔法にて導入した。細胞内に導入された DL-アクチンは、細胞内のアクチン線維に取り込まれる。私は細胞内アクチン線維に取り込まれた DL-アクチンの寿命を計測し、各線維の生存率を求めた (下図)。



mDia1 全長や N 末端を持たない mDia1 の活性化体(mDiaFH1-FH2)を過剰発現させた細胞内のアクチン線維の生存率は、コントロール細胞内のアクチン線維と同様だった。対して、N 末端側配列を持つ mDia1 活性化体 (mDia1 C63) を過剰発現させた細胞内のアクチン線維は、コントロール細胞や mDia1 全長、mDiaFH1-FH2 を過剰発現させた細胞内のアクチン線維よりも、生存率が増加した。このことは、mDia1 C63 が細胞内で脱重合抵抗性のアクチン線維を形成することを示している。また、細胞内一分子観察法を用いて、各 mDia1 変異体の細胞内構造に結合する割合を比較した。この観察法では、細胞内に低密度で発現した蛋白質分子が細胞内構造に結合したとき、分離したひとつの蛍光スポットとして可視化することができる。そこで、各細胞内で可視化された蛍光スポット数を、細胞に発現した蛍光分子の総蛍光強度で割ることで、細胞内構造に結合した分子の割合を計測した(下図)。



その結果、細胞内に発現させた mDia1 C63 は、mDia1 全長や mDia1FH1-FH2 よりも細胞内構造に結合する分子が多かった。これらの結果は、N 末端領域を介して細胞内構造に結合した恒常的に活性化されている mDia1 が、アクチン線維の脱重合抵抗性を向上することを示している。加えて、mDia1 C63 を発現した細胞内のアクチン線維は、コントロール細胞内のアクチン線維よりも、コフィリンの結合が低下した。これらの結果は、N 末端を介して細胞構造に結合した mDia1 は、コフィリン結合と線維脱重合に対して抵抗性を持つアクチン線維を形成することを示している。本研究で得られた結果は、細胞内構造に N 末端を介して結合したフォルミンが、細胞内でコフィリン抵抗性のアクチン構造体の構築し、コフィリンの棲み分けに寄与する可能性を示している。

## 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 6 件)

(1) Mizuno, H. and Watanabe, N.: Rotational movement of formins evaluated by using single-molecule fluorescence polarization. *Methods Enzymol.* 540, 73-94 (2014) 査読あり  
DOI: 10.1016/B978-0-12-397924-7.00005-4.

(2) Yamashiro, S., Mizuno, H., Smith, M. B., Ryan, G. L., Kiuchi, T., Vavylonis, D. and Watanabe, N.: New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales. *Mol. Biol. Cell*, 25, pp1010-1024 (2014) 査読あり  
DOI: 10.1091/mbc.E13-03-0162.

(3) Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K. and Watanabe, N.: F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. *Nat. Cell Biol.*, 15, pp395-405 (2013) 査読あり  
DOI: 10.1038/ncb2693.

(4) Mizuno, H. and Watanabe, N. mDia1 and formins: screw cap of the actin filament. *Biophysics*, 8, pp95-102 (2012) 査読あり  
DOI: 10.2142/biophysics.8.95

(5) 渡邊直樹, 水野裕昭: フォルミンタンパク質のアクチン二重螺旋に沿った回転重合化学と生物 第 50 巻 第 11 号 801 806 (2012) 査読あり  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/50/11/50\\_801/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/50/11/50_801/_pdf)

(6) 山城佐和子、圓岡真宏、水野裕昭、渡邊直樹: アクチン研究の最新動向 構造から調節, 恒常性, 可視化, モデリングまで 実験医学 第 30 巻 第 18 号 2998-3005 (2012) 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 水野裕昭、山城佐和子、渡邊直樹: 一分子蛍光偏光を用いたアクチン線維の螺旋構造に沿ったフォルミンの回転運動の可視化. 日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム 招待講演(口頭)(2013 年 11 月 16 日, 名古屋)

(2) 水野裕昭、山城佐和子、渡邊直樹: Actin filament stabilization by helical rotation of mammalian formin mDia1. 第 35 回日本分子生物学会年会(口頭)(2012 年 12 月 12 日, 福岡)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

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

取得状況(計 0件)

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

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

水野 裕昭 (MIZUNO HIROAKI)  
東北大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号：00620204

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：