

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：57601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840057

研究課題名(和文)細胞内におけるアクチン構造多型の検出とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Detection of structural polymorphism in actin inside a cell and elucidation of its physiological meaning.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン構造は細胞機能に重要である。しかし、アクチンの構造多型は細胞内では検出されておらず、その生理学的な関連についてもわかっていない。本研究では細胞内のアクチン構造多型を検出するため、分子内FRETシステムを用いた。

FRETプローブを結合させたアクチンをPtK2細胞に接着細胞用のエレクトロポレーターを用いて導入し、共焦点顕微鏡により観察した。PtK2細胞内のFRETレシオ値は局所的に異なっており、このことは細胞内においてもアクチン構造は多様であることを示している。細胞内のアクチンは複数の構造をとり、細胞機能に関与していることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Structural change of actin is important for cell functions. However, such polymorphism of actin has not been detected in cells, and its physiological relevance is unclear. In this study, to detect polymorphism of actin in cell, intramolecular FRET system was used.

Actin with the FRET probe was introduced into PtK2 cells using electroporator optimized for adherent cells, and were observed by confocal microscopy. The FRET ratio (intensities of acceptor/donor) in PtK2 cells differed locally, indicating that actin structure in cells is also variable. This revealed that actin subunits in cell take multiple conformations, and involved in cell functions.

研究分野：生物物理

キーワード：アクチン 構造

1. 研究開始当初の背景

アクチン分子はラージドメインとスモールドメインの2つのドメインから構成され、これらドメイン間の相対的な角度が変化することが知られている。アクチンフィラメント内のアクチンサブユニットにおいてもこの角度変化を伴う構造変化が生じることが、電子顕微鏡や蛍光色素を用いた解析などによって示唆されている。特にアクチン結合タンパク質との相互作用はアクチンサブユニットの構造をダイナミックに変化させ、この構造変化がアクチン結合タンパク質の機能に深く関与するとされている。例えば、細胞運動や細胞質分裂に関与するアクチン結合タンパク質であるコフィリンはアクチンフィラメントのピッチを短くし、二つのドメイン間の角度を大きく変化させる。また、我々はこの構造変化に重要であるとされるアミノ酸残基に変異を導入すると構造変化が抑制され、コフィリンが結合できなくなることを示した。これらのことから、二つのドメイン間で起こる構造変化が細胞運動や細胞質分裂などの細胞機能に重要であることが推察される。しかし、細胞内においても、*in vitro*と同様にアクチンサブユニットの構造が変化し、細胞内のアクチン構造が多様であることは観察されておらず、細胞の機能との関連についても詳細はわかっていない。

2. 研究の目的

細胞内におけるアクチン構造の分布を検出し、その重要性を検証する。また、アクチン構造変化を抑制する変異アクチンを細胞内に導入し、細胞内アクチンの構造変化を抑制した際の影響を調べる。これにより細胞機能に果たすアクチンフィラメント構造多型の生理的役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 分子内 FRET による細胞内アクチンの構造解析

我々はアクチンの分子構造を調べるため、アクチン分子内に2種類の蛍光色素を結合させ、これらの色素間で生じるFRET(Forster Resonance Energy Transfer)を細胞内におけるアクチンの構造変化検出に用いた。このFRETアクチンを調製するため、色素導入条件の最適化を行った。蛍光色素はそれぞれのドメインの先端に結合させた。色素を結合させるため、アクチンにシステイン、およびグルタミン残基をそれぞれのドメイン先端に導入した。これらのアミノ酸残基にマレイミド反応、およびトランスグルタミナーゼを介したカダベリンとの反応を利用して蛍光色素を導入した。

得られたFRETアクチンの細胞内への導入方法を検討した。導入には市販されているタンパク質導入試薬とエレクトロポレーターを検討した。細胞は、細胞骨格の観察に適しているとされるPtK2細胞を用いた。

FRETアクチンを導入した細胞のドナーとアクセプター蛍光を共焦点顕微鏡により観察し、Ratio解析を行った。

(2) 変異アクチンの細胞内への導入

アクチンの構造変化が抑制されている変異アクチン(G146V変異アクチン)を蛍光色素によりラベルした。ラベルは一般的にアクチンの蛍光標識に用いられる374番目のシステイン残基を標的に行った。この蛍光変異アクチンを細胞内にFRETアクチンと同様の方法で導入し、共焦点顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) 分子内 FRET による細胞内アクチンの構造解析

アクチン分子への蛍光色素導入のため、反応時間と酵素の濃度条件を最適化した結果、色素の導入率が70%以上となった。このFRETアクチンにドナー色素の励起光を照射し、蛍光スペクトルを測定すると、ドナー蛍光に加え、アクセプターの蛍光を測定することができた。このFRETアクチンを細胞内に導入する方法を検討した結果、エレクトロポレーターを用いた場合が、最も効率よく細胞内に導入でき、細胞内でFRETアクチンの局在を観察することができた。エレクトロポレーターによりFRETアクチンをPtK2細胞に導入し、FRETを確認するため、アクセプターをレーザー照射により退色させた際のドナー蛍光の強度を調べたところ、蛍光強度が回復していることが確認できた(図1)。これにより、FRETアクチンが細胞内においてFRETを生じていることを確認した。

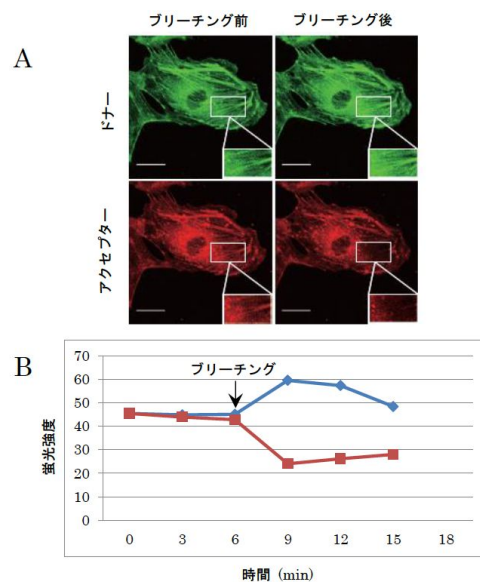


図1 アクセプターフォトブリーチング

A: 細胞の白枠はブリーチングを行った領域。
B: 青と赤の折れ線はドナーとアクセプターの蛍光強度の変化を示す。矢印はレーザーを照射した時間。

さらに蛍光画像から Ratio 解析を行ったところ、細胞内のアクチン構造は均一ではなく、局所的に構造が異なることが示された。特に運動中の細胞においては細胞前部で高い FRET 効率が観察された。また、細胞同士が接触し、細胞に力がかかっていると思われる場所では特に FRET 効率が高く、細胞外からの力によって細胞内のアクチン構造が変化することが示唆された(図2)。

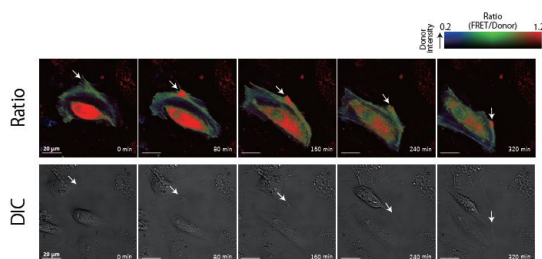


図2 細胞内における FRET アクチンの Ratio 値の変化

矢印は隣の細胞(FRET アクチンは導入されていないため、Ratio 画像では見えない)から押されている場所を示す。

(2) 変異アクチンの細胞内への導入

変異アクチンを蛍光ラベルし、細胞内に導入して観察したところ、導入直後は変異アクチンも正常なアクチンの局在を示したが、数時間経過すると、局在が観察されなくなり、細胞が収縮していく様子が観察された。

これらの結果は、細胞内においてもアクチンは多様な構造をとり、細胞機能に参与してい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2件)

(1) Taro Q.P. Noguchi, Masatoshi Morimatus, Hikikoshi A. Iwane, Toshio Yanagida and Taro Q.P. Uyeda "The role of structural dynamics of actin in class-specific Myosin motility" PlosOne, 10, e0126262. doi: 10.1371, 2015

(2) Nanami Shiozaki, Kentaro Nakano, Yasuharu Kushida, Taro Q.P. Noguchi, Taro Q.P. Uyeda, Dorota Wloga, Drashti Dave, Krishna K. Vasudevan, Jacek Gaertig and Osamu Numata "ADF/cofilin

is not essential but critically important for actin activities during phagocytosis in Tetrahymena thermophila" Eukaryotic Cell, 12, pp1080-1086, doi: 10.1128 2013

[学会発表](計4件)

(1) Taro Q.P. Noguchi, Mio Okazaki, Saku Kijima, Masatoshi Morimatsu, Akira Nagasaki, Yoshiaki Iwadate, Toshio Yanagida and Taro Q.P. Uyeda, "Structural polymorphism of actin detected by intramolecular FRET in vivo and in vitro" ASCB, Dec. 9, 2014, Philadelphia USA

(2) Mio Okazaki, Saku Kijima, Yoshiaki Iwadate, Taro Q.P. Uyeda, Taro Q.P. Noguchi "Polymorphism of actin in cells, detected by FRET-probed actin", 第52回日本生物物理学会年会、2014年9月25日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

(3) 児玉裕紀、貴嶋紗久、野口太郎 FRETプローブ actin によるアクチンの構造変化検出、第86回日本生化学学会、2013年9月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(4) 五十嵐圭、野口太郎 ヌクレオチド状態の変化を伴わないアクチンフィラメントのダイナミックスタビリティ、第86回日本生化学学会、2013年9月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口太郎 (Taro Noguchi)
都城工業高等専門学校物質工学科 講師
研究者番号: 90615866

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

上田太郎 (Taro Uyeda)
産業技術総合研究所セルメカニクス研究グループ
研究者番号: 90356551

長崎晃 (Akira Nagasaki)
産業技術総合研究所セルメカニクス研究
グループ
研究者番号 : 30392640