

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650022

研究課題名(和文)新しい張力センサーの設計

研究課題名(英文)Design of a new mechano-sensor

研究代表者

箱嶋 敏雄 (HAKOSHIMA, TOSHIO)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：00164773

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)：細胞は機械的な力を感じ取る。本研究では接着結合(adherens junction)での張力のセンサー本体として働くことが最近解明された  $\beta$ -catenin に注目して、張力依存的な相互作用が期待できる関連制御タンパク質も動員して、センサーとしての動作の解析を進めるとともに、タンパク質工学的手法で、センサータンパク質の光学的な素子化の可能性について追求した。その結果、 $\beta$ -catenin の張力に対する力学的性質をコンホメーション変化まで還元することができた。また、張力依存的な相互作用に関わるいくつかの制御タンパク質についても張力感受性解析の基礎が整ってきた。

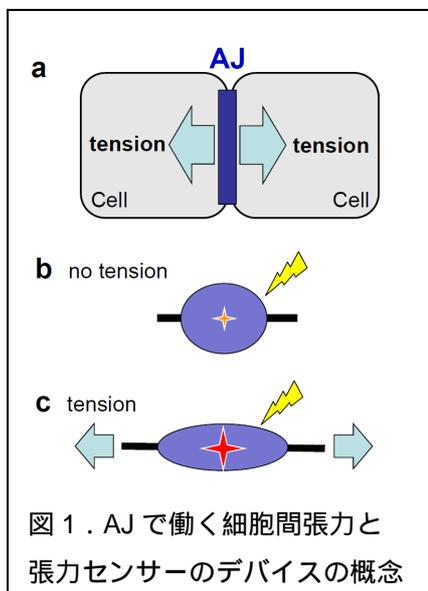
研究成果の概要(英文)：Cells are able to sense mechanical forces. In this study, we focus on  $\beta$ -catenin, which has been elucidated to function as a mechanosensor at adherens junctions of cells. Together with other proteins that are expected to interact with  $\beta$ -catenin in a force-dependent manner, we have analyzed the force-sensing actions of  $\beta$ -catenin and tried to create fusion proteins that are able to show force-dependent luminescence. We have succeeded to show a relationship between the force-sensing properties of  $\beta$ -catenin and conformational changes occurred in the protein molecule under tension. We have also provided molecular basis for further analysis of the force-sensing properties of other protein molecules.

研究分野：生物学

キーワード：タンパク質 構造変化 張力 構造転移 細胞骨格 細胞接着 タンパク質工学 蛍光

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、細胞骨格や細胞接着の制御を担う Rho ファミリーの低分子量 G タンパク質を介したシグナル伝達タンパク質の構造生物学を推進してきた。細胞内の張力は、Rho によって活性化する Rho-kinase (ROCK) を介して myosin が活性化されて発生することがわかっている。一方、接着結合 (adherens junction, AJ) は形態形成に必須な細胞間接着であり、接着分子 cadherin (膜タンパク質) が細胞内で、 $\alpha$ -catenin と  $\beta$ -catenin とを介して F-actin に結合している。最近、張力依存的に vinculin が  $\alpha$ -catenin に結合して、この vinculin を介して F-actin への結合が補強されることによって、AJ を介して引っ張られると、引っ張り返すことが発見された (Yonemura *et al.*, *Nature Cell Biol.* 2012) (図 1a)。



研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか： 1 個の細胞が分裂を繰り返して、そのたびに AJ 等を形成して互いに張力を調整しながら形態形成が始まると考える時、個々の AJ にかかっている張力を三次元的に可視化できれば、形態形成時の隠れた制御機構が見えてくるに違いない。本研究では、細胞骨格を担うタンパク質中に容易に組み込める汎用性の高い、光る「張力センサーデバイス」の可能性を検討して、幾つかのデバイスユニットを試作する (図 1b, c)。

当該分野における本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義： 細胞間接着には密着結合 (TJ) やデスモソーム等が存在するが、細胞極性を制御しつつ最初に形成されるのが AJ であることがわかっている。AJ での張力応答性の機能を抑えると、形が変形することも最近わかった。この発見は、組織や器官の細胞同士が AJ を介して常に引っ張り合うことで、形態形成や形態保持されているこ

とを意味している。張力依存的な vinculin と  $\alpha$ -catenin 結合の機構は、米村等と協同で、複合体等の構造決定や物理化学的な解析から既に解明してある (投稿準備中)。申請者等は、「細胞間に働く張力が精密に制御されることによって、発生・分化段階で様々な形態が生成されたり、あるいは、形態形成後には形態 (あるいは弾力性) の保持の役割を担っている」と仮説を立てて、細胞生物学、構造生物学、生物物理学等の様々な角度から全貌を解明すべく複合研究チームを形成しつつある。細胞生物学上重要な「生物の形作り」に関して、全く新しい理解の仕方を提出できるかも知れない。

2. 研究の目的

(1) 細胞が機械的な力を感知するシステムは古くから知られており、細胞や分子レベルでの研究が進んだ。最近、理研 CDB 米村等によって、接着結合 (adherens junction, AJ) が細胞間での張力のセンサーとして働くことが発見されて、張力を介した形態形成や発生分化が制御されるという全く新しいパラダイムの存在が浮上してきており、形態形成の進行とともに、各細胞間に働いている張力を測定する技術が切望されている。本研究では、研究の進んでいる基本的な細胞張力センサーである  $\alpha$ -catenin や talin の力学的性質を解析するとともに、変異導入等のタンパク質工学的的手法により、センサーとして利用価値の高い素子候補を探る。

(2) 更に、張力依存的に発光 (あるいは消光) する汎用性のある素子を生計出来るかどうかに挑戦する。この素子が出来れば、生きているままの細胞塊が形態を形成する過程で各細胞間にかかる張力を、3D ライブイメージングとして観察することが可能となり、どのような細胞間の力が強弱を調整しながら、形態形成が進行するか可視化できる。

3. 研究の方法

(1) AJ の張力センサー  $\alpha$ -catenin が、どれくらいの大さの張力に感受性を示すかは、*in vitro* で、光ピンセット (あるいは AFM) 等での物理的手段での直接測定で決定可能である。張力感受性を少しずつ変化させた張力感知デバイス部位をもつ一連の変異  $\alpha$ -catenin が作出できれば、このような測定と組み合わせることで、細胞間張力の感受性と形態形成過程との関係が解析可能となり、これまでのメカノ生物学的研究を飛躍的に躍進させる方法論の確立の端緒となる可能性がある。特に、発光タンパク質との融合タンパク質等に展開することで、新しいセンサーを作出することが期待できる。

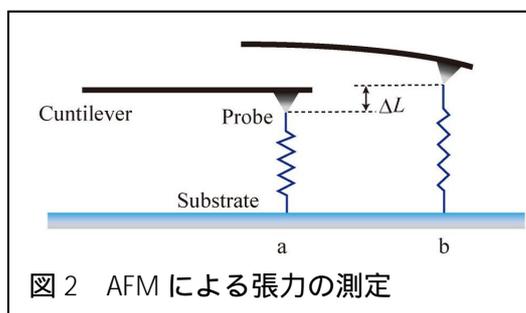


図2 AFMによる張力の測定

(2) 先ず、張力によって消光あるいは変色する GFP の可能性を考えている。GFP は  $\beta$ -barrel 構造を形成しており、N-末 C-末側の  $\beta$ -ストランドは、それらの間に 2 本の  $\beta$ -ストランドを挟んでいる (図 2)。張力を負荷した時に、N-末と C-末側  $\beta$ -ストランドをはがすように力が働く。タンパク質の構造がどれくらいの力の負荷で、どのように変化するかは構造によって大きく異なる。非常に安定なタンパク質の引き延ばしには nN 近い力が必要であるという報告もあるが、 $\beta$ -sandwich 構造 (免疫グロブリン Ig-fold) では 100pN から 200pN 程度の力で引き延ばされる (不可逆の unfolding 状態になる)。この引き延ばしの初期の状態、数 pN から 20pN の負荷、で N-末あるいは C-末側  $\beta$ -ストランド、あるいはその周辺の構造変形が期待される。この付近には、色そのものや発色効率に関係した残基があるので、色調変化等が期待できる。N-と C-末端にはヒスチジンタグ (His6 あるいは His12) を取り付けられた融合タンパク質と発現する。Ni キレート樹脂は化学カップリングでシリコン表面に結合させる。ここではヒスチジンタグを用いるが、GST タグやピオチンタグでも、細胞間張力を念頭においた張力実験 (数 pN からせいぜい 100pN 程度) に使えることはわかっている。本研究では、実験系を設計しようとしているので、負荷に耐えられる。シリコンゴムの延伸で蛍光観察する。有望な候補は、AFM の実験に供する。一方、FRET エネルギー移動の速度定数  $k_f$  は、ドナー蛍光タンパク質の遷移双極子モーメント ( $p_D$ ) とドナー蛍光タンパク質の遷移双極子モーメント ( $p_A$ ) の相互作用ポテンシャルに比例するが、幾何因子としては、距離 ( $1/r_{DA}^6$ ) と配向因子  $\kappa^2$  効いてくる。配向因子  $\kappa^2$  は 2 つの遷移双極子モーメントの配向で決まる。これは、3 つの角度 ( $\theta_D, \theta_A, \phi_{DA}$ ) の関数となり、最小で 0、最大で 4 となる (図 3 下式)。位置が固定されていないと考えられる場合、全角度平均での値 (配向因子  $\kappa^2 = 2/3$ ) が良く用いられているが、本研究では、この配向を蛍光タンパク質間の相互作用で固定することを企てる。

#### 4. 研究成果

(1) X 線構造解析で明らかになった  $\alpha$ -catenin の張力でコンホメーションが変化する部位 (張力センサー部位) を用いて、AFM での力

学測定を行った。張力負荷によってどのような部分的なコンホメーションの変化が起こるかを解析した。また、一連の変異  $\alpha$ -catenin の張力センサー部位を用いて、張力とコンホメーション変化との関係を解析して、細胞レベルでの解析につなげた。AFM 等での力学測定の結果については論文発表した (理研 CDB 米村等、京都大学・安達等との共同研究)。

また、張力の引き起こす新たな分子間作用の張力センサーへの展開を目指して、昨年度に X 線結晶構造解析の結果を論文発表した N-末端領域を含む  $\alpha$ N-カテニンの D1 ドメインと LIM ドメインをもつ細胞骨格タンパク質の一つである Ajuba との相互解析を精製タンパク質試料で確認した。更に Ajuba の相互作用領域のドメインマッピングを進めた。もう一つの LIM ドメインをもつ細胞骨格タンパク質 Zyxin の組み換えタンパク質の試料調製をした。更に、メカノストレスに反応することが明らかになっている Hippo 経路の制御タンパク質の一つである MOB1 のスイッチ機構を解明して論文発表した。

(2) 本研究で実施する張力センサーデバイスのアイデアは、(A) 蛍光タンパク質の変色の設計であり、これは張力による蛍光タンパク質の構造のゆがみを利用する。もう一つの (B) は、エネルギー移動効率の応用であり、FRET の距離依存性ではなく、むしろ配向依存性を利用するものである。これは、最小あるいは最大のエネルギー移動速度定数を与える配向に固定したドナーとアクセプターの蛍光タンパク質ペアを設計することで達成するというアイデアである。過去の結晶構造データを整理して変異導入や融合タンパク質の設計等を進めた。一方、種々の蛍光タンパク質が既に従来の方法での応用に供されている。そこで、どの系で研究を進めるかは重要なポイントとなるので、物性等種々の条件を検討した。これらの蛍光タンパク質の組み換えタンパク質を張力用のタグを付けて発現・精製したが多くのものは発現がないか、弱かったり、あるいは不溶となった。これらの克服には多くの時間と労力が必要であった。また精製したものについては張力のアッセイ系で有効なコンストラクトをスクリーニングに供する準備をした。更に、張力をかけてその変化を観察するというアッセイ系を試みた。特に、AFM を用いた系では、張力負荷によるタンパク質一分子でのコンホメーション変化による伸長とバネ定数の段階的变化 (タンパク質ドメイン構造に起因すると考えられる) の見積もり等の基礎実験を繰り返して、一定の伸長実験の結果を得た。今後、これらの実験技術により、有効なスクリーニングの確立のための基礎ができた。

#### 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 5 件)

Maki, K., Han, S. -U., Hirano, Y., Yonemura, S. Hakoshima, T. and Adachi, T. (2016). Mechano-adaptive Sensory mechanism of  $\alpha$ -catenin under tension. *Scientific Reports* **6**, 24878, doi: 10.1038/srep24878. 査読有

Kim, S.Y., Tachioka, Y., Mori, T. and \*Hakoshima, T. (2016). Structural basis for autoinhibition and its relief of MOB1 in the Hippo pathway. *Scientific Reports* **6**, 28488, doi:10.1038/srep28488. 査読有

Shibahara, A., Hirano, Y. and \*Hakoshima, T. (2015). Structure of the free form of the N-terminal VH1 domain of monomeric  $\alpha$ -catenin. *FEBS Lett.* **589**(15), 1754–1760. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.053 査読有

Terawaki, S., Kitano, K., Aoyama, M., Mori and Hakoshima, T. (2015). MT1-MMP recognition by ERM proteins and its implication in CD44 shedding. *Genes to Cells* **20** (10) 847–859. DOI: 10.1111/gtc.12276 査読有

Mori, T. Goto, S., Shirakawa, M. and \*Hakoshima, T. (2014). Structural basis of DCAF1 recognition by merlin/NF2 and its implication in tumorigenesis by CD44-mediated inhibition of merlin suppression of DCAF1 function. *Genes to Cells* **19** (8), 603-619. DOI: 10.1111/gtc.12161 査読有

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 2 件)

Hakoshima, T. (2016). Protein modification for crystallization. in *Advanced Methods in Structural Biology* (eds T. Senda, K. Maenaka) Springer, pp. 153–161. (Review)

Hakoshima, T. (2014). Leucine zippers (2<sup>nd</sup> version). in *Citable Reviews in the Life Sciences (eLS)*, John Wiley & Sons Ltd. [DOI: 10.1002/9780470015902.a0005049.pub2]. (Review)

〔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

箱嶋 敏雄 (HAKOSHIMA TOSHIO )  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・教授

研究者番号 : 00164773

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし