

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750140

研究課題名(和文)MRLCリン酸化状態と非筋アクトミオシン束の収縮力の関係性

研究課題名(英文)Contractile forces of nonmuscle actomyosin bundles regulated with MRLC phosphorylation

研究代表者

松井 翼 (Matsui, Tsubasa)

名古屋工業大学・工学部・研究員

研究者番号：50638707

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)：接着細胞が基質に対して発生する非筋アクトミオシン収縮により発生する力は、形態維持、分化や運命決定に重要な役割を担っていることが近年分かってきた。これまでに非筋アクトミオシン収縮はMRLC分子のリン酸化によって調節されていることが組織レベルの研究によって明らかにされてきたが、一方細胞レベルでMRLCリン酸化状態と収縮力を直接的に計測されていない。そこで本研究では、シリコーンゲルを利用した細胞発生力アッセイを用いてMRLC変異体株間での発生力を比較した。その結果、MRLCリン酸化の亢進だけではなく、MRLCリン酸化のダイナミクスもまた力の発生に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Contractile forces generated by nonmuscle actomyosin contraction in adherent cells play important roles in cellular morphology, differentiation, and cell fate decisions. It would be considered that the forces are regulated by phosphorylation of MRLC molecules. This finding was based on smooth muscle tissue level researches. However, no direct measurements of the forces have been performed at individual cell levels. To elucidate this relationship, we perform silicone gel based-contraction assay. Our study suggests that cells generate higher forces with increase in phosphorylation of MRLC. Moreover, we found that MRLC mutants with exchangeable amino-acid residues are more effective in generating contractile forces.

研究分野：生体材料学

キーワード：メカノバイオロジー 非筋ミオシン ストレスファイバー 細胞バイオメカニクス

### 1. 研究開始当初の背景

非筋アクトミオシン束をはじめとする細胞内タンパク質複合体は生化学シグナルの時間的・空間的濃度勾配の結果、主として酵素反応によるタンパク質リン酸化制御を受けることで重合・脱重合といった状態制御が行われている。さらに、複合体を構成している分子の入れ替わり(分子ターンオーバー)もまた複合体の維持に重要とされている。しかしながら、この複合体形成が生化学的因子のみによって制御・調節されるのではなく、力学的因子によっても制御・調節されていることが近年明らかにされつつある。この特徴として、自身が発生する力や外部から負荷される力によっても重合・維持の調節がなされていることが挙げられる。非筋アクトミオシン束は骨格筋のミオシンと同様にミオシン ATPase 加水分解反応で得たエネルギーを用いてアクチン線維をたくり寄せることで力を発生する。ここで、非筋アクトミオシン束と骨格筋ミオシンとの相違点であり重要な点は、ATPase 活性はミオシン調節鎖(以下 MRLC) というミオシン結合分子のリン酸化状態によって調節されている点である。MRLC のリン酸化酵素として ROCKs や MLCK などが知られており、これらの酵素の時空間的な分布によって非筋アクトミオシン束の動態調節・収縮調節がなされていると考えられてきた。さらに、いくつかの報告により非筋アクトミオシン束は自身が発生する力によって自らの重合を促進し、また外力負荷によっても重合・維持されることが知られつつある。特に、非筋アクトミオシン束内に存在する非筋ミオシンは負荷依存的な ATPase 活性を有しており、ミオシンの進行方向に押されるような状態では ATPase 活性は高く、逆に進行方向とは逆に引っ張られるような状態ではその活性は低くなることが知られつつある。

このように、非筋アクトミオシン束内非筋ミオシンの活性は MRLC のリン酸化状態と負荷の両方の因子によって調節されているようである。しかしながら、MRLC のリン酸化状態と収縮力との連関は、組織レベルでは報告されているものの細胞・複合体レベルにおいては直接的な証拠が出されていないのが現状である。というのも、非筋アクトミオシン束は細胞内に存在しており、化学的・力学的条件を制御するのが困難だったためと考えられる。そこで申請者はこれまでに非筋細胞から非筋アクトミオシン束を単離し、細胞外環境で収縮力を計測する実験系を構築し ATP 濃度依存的・ひずみ量依存的非筋アクトミオシン束固有の収縮特性を計測してきた。実際には前述のように、MRLC リン酸化状態によってもその収縮特性は変化すると予想されるため、リン酸化状態を摂動とした際の収縮特性を計測することがより深い非筋アクトミオシン束の理解につながることは明らかである。

### 2. 研究の目的

MRLC リン酸化状態と発生力との関係について、これまでに平滑筋組織レベルでの研究が行われてきた。また個々の細胞レベルでは、原子間力顕微鏡を用いることで非筋アクトミオシン収縮活性の亢進により細胞が硬くなるといった間接的な比較がなされているが、細胞が発生する力と MRLC リン酸化状態を直接的に比較した研究はなされていない。そこで本研究では、独自の細胞発生力アッセイ系を用いることで、MRLC のリン酸化状態と細胞発生力との関係を明らかにすることを目的とする。また、アクトミオシン収縮により発生する力が、非筋ミオシンの負荷依存的な ATPase 活性への影響を明らかにするため、MRLC 変異体間での非筋アクトミオシン束の分子の入れ替わり速度に与える影響を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) ヒト骨肉腫細胞株 U2OS 細胞に MRLC 変異体遺伝子を導入し、安定発現株を樹立した。導入した MRLC 変異体は収縮活性制御アミノ酸残基として知られている 19 番目セリン(S19)と 18 番目スレオニン(T18)を、それぞれ非リン酸化としてアラニン(A)へ置換、擬似リン酸化としてアスパラギン酸(D)へ置換した変異体を用いた。それぞれの変異体には緑色蛍光タンパク質 EGFP、または赤色蛍光タンパク質 mRuby2 を融合させており、後述する発生力アッセイ系において異なる変異体を共培養する際に変異体を区別した。
- (2) 細胞が発生する力により、シリコーンゲル基板の表層に形成されるシワの向き、本数、長さ、シワの間隔などから、細胞が発生する力の向きや大きさを比較可能な独自の細胞発生力アッセイ系を用いる(図1)。本研究では、異なる蛍光タンパク質でラベルした MRLC 変異体発現 U2OS 細胞を同一基板上に播種し、その際に発生するシリコーンゲル基板のシワの本数を計測することで、MRLC リン酸化状態と発生力の大きさのランク付けを行った。
- (3) MRLC リン酸化依存的な ATPase 活性と、アクトミオシン収縮により発生する力が、非筋アクトミオシン束における非筋ミオシン-アクチン間の結合状態にどのような影響を与えるか検討するため、光褪色後蛍光回復法を用いることで、各 MRLC 変異体発現 U2OS 細胞内の非筋アクトミオシン束の分子の入れ替わり速度の計測を行った。

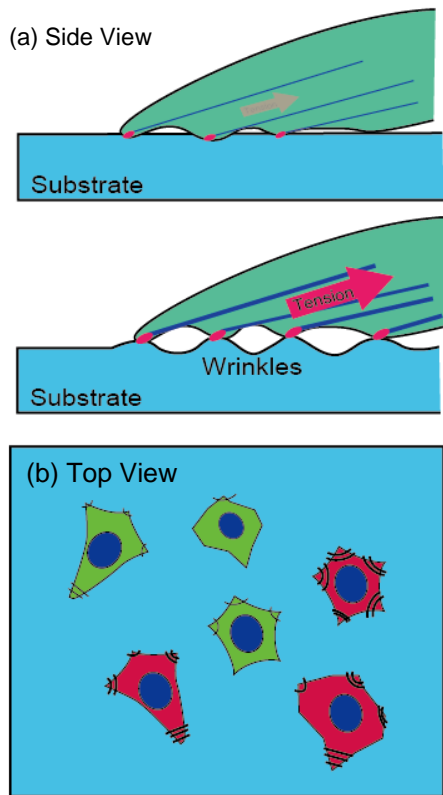


図 1 シリコンゲル表面に形成されるシワを利用した細胞発生力アッセイ系 (a) 側方図、(b) 平面図

#### 4. 研究成果

- (1) 独自の細胞発生力アッセイ系を用いて、MRLC リン酸化変異体導入細胞における発生力の大きさの比較を行った。MRLC のリン酸化アミノ酸残基に擬似リン酸化変異導入した S19D/T18D においては、S19A/T18A および S19/T18A よりも大きな収縮力を発生することが明らかとなった。つまり、リン酸化が亢進するほど収縮力も大きくなった。しかしながら、面白いことに S19D/T18D 変異体発現細胞は、野生型 (S19/T18) 発現細胞よりも収縮力は小さくなった。この結果は、MRLC のリン酸化・脱リン酸化のダイナミクスもまた収縮力の発生に重要な役割を担っていることが示唆された。
- (2) 細胞発生力アッセイにより MRLC のリン酸化と発生する力との対応関係が明らかになったのを踏まえて、発生する力および MRLC リン酸化状態と、非筋アクトミオシン束の動態調節との関係を明らかにすべく光褪色後蛍光回復法により分子の入れ替わりについての検討を行った。野生型、S19A/T18A、S19/T18A 変異体では6割程度まで蛍光輝度の回復が見られた一方で、S19D/T18D 変異体ではほとんど回復が見られなかった。つまり、

S19D/T18D 変異体ではほぼミオシン分子とアクチン分子が強く結合したままの状態であることを示している。ここで、非筋ミオシンの ATPase 活性は、進行方向逆向きの力が負荷されると無負荷状態と比較してその ATP 加水分解速度は1オーダー小さくなり、逆に進行方向に押されるとその速度は速くなることが知られている。この負荷とは非筋ミオシン自身が発生する力と等価であるので、前項の発生力の比較から野生型、S19D/T18D、S19/T18A、S19A/T18A の順で回復割合が上昇すると予想されたが、実際には S19D/T18D のみほとんど輝度回復しなかった。MRLC リン酸化は非筋ミオシンミニフィラメントのミオシン分子の動態調節にも関わっていることが知られており、S19D/T18D 変異体では分子の入れ替わりが抑制されているためと考えられる。

本研究において、従来知られているような MRLC リン酸化の亢進による発生力の上昇が確認されたものの、常にリン酸化されたまま (S19D/T18D) であるよりも、時空間的なリン酸化・脱リン酸化サイクルが回る状態の方がより大きな力を発生することができるという新たな知見を得ることが出来た。また、S19D/T18D 変異体では大きな力を発生しつつ、分子の入れ替わり、つまりアクチン・ミオシン間の結合解離がほとんど起きていない状況にあり、エネルギー消費を抑えつつ細胞機能調節にとって重要な力を効率よく発生できる状態にあることが示唆される。今後より詳細に MRLC のリン酸化のダイナミクスと発生力との関係を明らかにするには、MRLC のリン酸化を時空間的にモニターできるような実験系が必須となる。また、個々の細胞レベルで発生する力の比較を行ったが、より詳細には単一の非筋アクトミオシン束レベルでの研究が望まれる。

#### 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2件)

Deguchi, S., Hotta, J., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Viscoelastic and optical properties of four different PDMS polymers, Journal of Micromechanics and Microengineering, 査読有, Vol.25, 97002, 2015  
DOI:10.1088/0960-1317/25/9/097002

Deguchi, S., Kudo, S., Matsui, T.S., Huang, W., Sato, M., Piezoelectric actuator-based cell microstretch device with real-time imaging capability, AIP Advances, 査読有, Vol.

5, No. 6, 067110, 2015.

DOI: 10.1063/1.4922220

〔学会発表〕(計9件)

松井翼, 池田智哉, 出口真次, 負荷依存  
的な非筋アクトミオシン束の動態, 日本  
機械学会第28回バイオエンジニアリング  
講演会, 2016年1月, 東京

大石泰己, 松井翼, 今村道博, 出口真次,  
焦点接着斑の微細構造に関する研究, 日  
本機械学会第28回バイオエンジニアリ  
ング講演会, 2016年1月, 東京

石川晃大, 松井翼, 出口真次, アクチ  
ン結合タンパク質の動態に関する研究, 日  
本機械学会第28回バイオエンジニアリ  
ング講演会, 2016年1月, 東京

Matsui, T.S., Deguchi, S.,  
Characterizing the contractile  
properties of individual actin stress  
fibers, ATEM '15, 2015年10月, 豊橋

Matsui, T.S., Deguchi, S., Revealing  
the dynamics and molecular regulation  
of actin stress fibers, The 8<sup>th</sup>  
Asian-Pacific Conference on  
Biomechanics, 2015年9月, 札幌

松井翼, 池田智哉, 出口真次, アクチ  
ンストレスファイバー内ミオシンのダイ  
ナミクス, 第53回日本生物物理学会年  
会, 金沢

松井翼, 出口真次, 非筋細胞内細胞骨  
格分子の動態イメージング, 日本機械  
学会第27回バイオエンジニアリング  
講演会, 2015年1月, 新潟

Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S.,  
Load-dependent contractile force  
generation of actin stress fibers, The  
4th Japan-Switzerland Workshop on  
Biomechanics, 2014年9月, 志摩

Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S.,  
Biophysical properties of single actin  
stress fibers isolated from cultured  
smooth muscle cells, International  
Symposium on Mechanobiology 2014,  
2014年5月, 岡山

〔図書〕(計1件)

出口真次, 松井翼, 佐藤正明, 第2章 細  
胞における力の発生と維持機構: 細胞力学  
入門, メカノバイオロジー 細胞が力を感じ  
応答する仕組み, 化学同人, 2015年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 翼 (MATSUI TSUBASA)

名古屋工業大学・工学部・研究員

研究者番号: 50638707