

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19220

研究課題名（和文）アクチン細胞骨格を直接操作できるオプトジェネティクスツールの開発

研究課題名（英文）Development of optogenetics tools for manipulation of the actin cytoskeleton

研究代表者

宮崎 牧人（Miyazaki, Makito）

京都大学・理学研究科・特定准教授

研究者番号：40609236

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：動物細胞には主にアクチン線維とミオシン分子モーターから構成されるアクチン細胞骨格が普遍的に存在しており、細胞運動・分裂・極性形成など、生命活動に本質的な機能を生み出している。分子生物学的研究からアクチン細胞骨格を制御しているタンパク質が特定されてきたが、それらのタンパク質が細胞骨格の構造転移を引き起こし、多種多様な細胞機能を制御している物理メカニズムはほとんど未解明である。そこで本研究では、近年急速に開発が進んでいる光遺伝学技術を用いて、アクチン重合反応を操作できるツールの開発を行ない、光刺激によって細胞内のアクチン重合反応を誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アクチン細胞骨格は動物細胞に普遍的に存在する高次構造体であり、細胞運動・分裂・極性形成など、生命活動に本質的な機能を生み出している。光遺伝学の発展によって、さまざまな種類の光操作ツールが開発されつつあるが、アクチン細胞骨格を直接操作できる光操作ツールの開発はまだ発展途上である。そこで我々は、シンプルで拡張性の高い設計で、アクチン細胞骨格を直接制御できる光操作ツールのデザインを提案した。我々の研究を進展させることで、細胞機能や発生過程を光で操り、本来の機能を抑制したり、本来備わっていない機能を発現させたりすることが可能になれば、基礎生物学から再生医療まで多方面への応用展開が期待される。

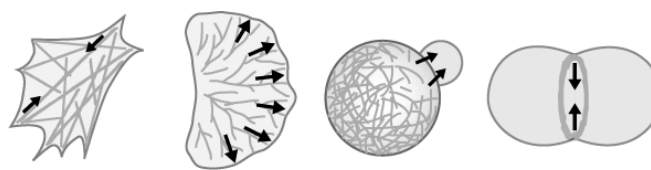
研究成果の概要（英文）：The actin cytoskeleton mainly composed of actin filaments and myosin molecular motors regulate various functions of animal cells including cell motility, division, and polarity establishment. Molecular biological studies have identified the key molecules regulating the actin cytoskeletal dynamics. However, the physical mechanism how these regulatory proteins modulate the actin cytoskeletal dynamics and drive cellular functions remains an open question in cell biology. To understand the mechanism, we designed an optogenetic tool that can manipulate actin polymerization. We succeeded in inducing actin polymerization in animal cells by photostimulation.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクトミオシン 光遺伝学 再構成

1. 研究開始当初の背景

動物細胞には、主にアクチン線維とミオシン分子モーターから構成されるアクチン細胞骨格が普遍的に存在する。アクチン細胞骨格の構造転移は多様な細胞の形態転移を引き起こし、細胞運動・分裂・極性形成など、生命活動に本質的な機能を生み出している (図1)。



種類	ストレスファイバー	葉状仮足	コルテックス	収縮環
機能	形態維持・運動	運動	形態維持・運動	分裂

図1: アクチン細胞骨格の多様な構造と機能

長年の分子生物学的研究から Rho や Rac、Cdc42 などのアクチン細胞骨格を制御している上流のシグナルタンパク質や、それらのシグナルタンパク質に応答してアクチン重合を活性化させるフォルミンや Arp2/3 複合体、ミオシンの調節軽鎖をリン酸化させて収縮を活性化させる ROCK などのアクチン細胞骨格制御タンパク質の存在が次第に明らかになってきた。一方で、フォルミンや Arp2/3 複合体によるアクチン重合の活性化や、ミオシンのリン酸化による収縮力の活性化、アクチン線維を架橋するアクチニンや、アクチン線維と細胞膜を繋ぐアニリンなどのアクチン結合タンパク質の活性変化が、どのようにして細胞骨格の構造転移を引き起こし、多種多様な細胞機能を制御しているのか、その力学反応メカニズムはほとんど未解明である。

2. 研究の目的

アクチン細胞骨格の分子活性の変化が細胞機能を制御している仕組みを解明するためには、アクチン細胞骨格の制御タンパク質それぞれの時空間活性を互いに独立に操作して、細胞骨格の構造変化を定量的に調べる必要がある。そこで本研究では、近年急速に開発が進んでいる光遺伝学の要素技術を用いて、アクチン細胞骨格ダイナミクスを光で自在に操作できるツールの開発を目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではシンプルで拡張性の高い設計で、シグナルカスケードの最下流に位置する細胞骨格の制御タンパク質を直接操作できるオプトジェネティクスツールを開発する。具体的には LOV-ePDZ 系や PhyB-PIF6 系、iLID-SspB 系など、すでに確立されたオプトジェネティクスモジュールと、アクチン細胞骨格の制御タンパク質を融合させた人工タンパク質をデザインする。そしてそれらの細胞膜上への局在を光で制御することによって、細胞膜直下の制御タンパク質の濃度を増減させ、酵素反応の化学平衡 (アクチン重合反応 vs アクチン脱重合反応、ミオシンリン酸化反応 vs 脱リン酸化反応など) をずらすことで、アクチン重合活性やミオシンモーター活性などを時空間的に制御することを目指す。

まずは複数種類の人工タンパク質をデザインし、それらの機能を精製タンパク質を用いた生化学実験で評価する。続いて、それらの人工タンパク質をコードした遺伝子を各種動物培養細胞及び分裂酵母に遺伝子組み換えで導入してタンパク質を発現させ、光応答性を顕微鏡実験で評価する。人工タンパク質のデザインを改良しつつ、これらの作業を繰り返す行うことで光応答性を高めていき、光操作ツールの最適化を進める。

本研究提案が実現すれば、アクチン細胞骨格を自由自在に操作できる基盤技術が確立される。本研究で得られると期待される成果を基盤として光操作ツールの更なる改良を進めることで、アクチン細胞骨格が司る細胞機能や動物の発生過程を光で操り、本来の機能を抑制したり、本来備わっていない機能を発現させたりすることが可能になれば、基礎生物学から再生医療まで多方面への応用展開が期待される。

4. 研究成果

アクチン重合活性を操作できるオプトジェネティクスツールの開発を中心に行った。アクチン重合反応は、主に Arp2/3 複合体あるいはフォルミンの活性化によって促進されることが知られており、Arp2/3 複合体によるアクチン重合反応の活性化を光で制御することを目指した。Arp2/3 複合体によるアクチン重合活性は、WASP や WAVE などの調節タンパク質によって制御されることが知られている。そこで、初年度は WASP 及び WAVE の Arp2/3 活性化ドメインを大腸菌で発現・精製した後、ピレン染色したアクチンモノマーと混合し、

アクチン重合反応を蛍光マイクロプレートリーダーで計測する実験系を立ち上げた。複数種類の人工タンパク質をデザインし、人工タンパク質の濃度と、Arp2/3 複合体によるアクチン重合反応の反応速度の関係を生化学実験で定量化することで、アクチン重合反応の光操作に適している人工タンパク質のデザインと濃度領域を絞り込んだ (図 2)。

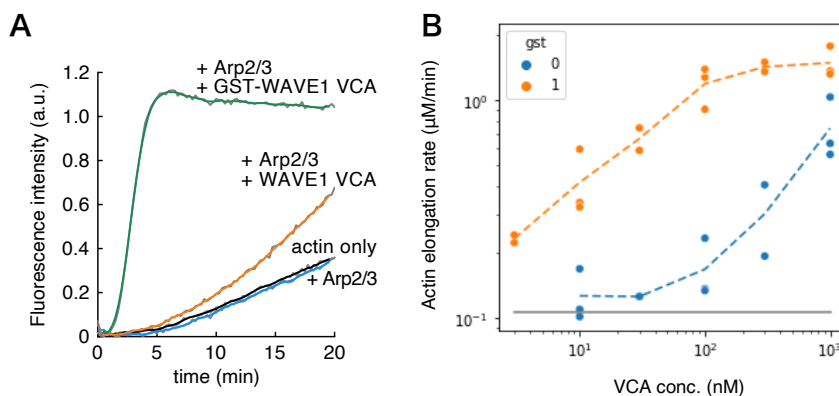


図 2 : ピレンアッセイによるアクチン重合活性化ツールのデザインと濃度領域の検討

A. ピレンアッセイの例。ピレン染色したアクチン (モノマー) を用いることで、アクチン重合反応速度をピレンの蛍光強度の増加から定量化できる。Arp2/3 のみではアクチン重合が活性化されないが (青線)、Arp2/3 の活性化因子である WAVE1 の VCA ドメインを添加することで、重合反応が活性化される (オレンジ線)。WAVE1 のダイマー化により、さらに重合反応は加速する (緑線)

B. アクチン重合速度の VCA 濃度依存性。青はモノマー、オレンジはダイマー状態での反応を示す。VCA はダイマー状態の方が、重合反応速度が上昇することがわかった。

続いて、これらの人工タンパク質を、すでに確立されているオプトジェネティクスツールと融合し、細胞内での局在を光で操作する実験系を構築した。具体的には、アクチン重合を活性化する人工タンパク質と SspB を融合したタンパク質を設計した。このタンパク質をコードしたプラスミドを哺乳動物培養細胞に導入し、細胞内でタンパク質を発現させた。それと同時に細胞膜上に iLID を発現させておき、青色光の照射によって SspB 融合人工タンパク質を細胞膜へリクルートするシステムを構築した。

SspB を融合した Arp2/3 活性化人工タンパク質と iLID、それぞれの発現量や発現量比の条件検討を進めた結果、照射によって膜直下でアクチン重合を生じさせることに成功した。さらに静止中の細胞に光を照射することで、ラメリポディアの形成を誘導することに成功した。しかし、Arp2/3 活性化人工タンパク質の発現によって、照射する前の段階から細胞質中のアクチン重合がある程度生じてしまうことが判明したため、用途に応じてツールの更なる最適化を行う必要があることがわかった。

続いて、これらのオプトジェネティクスツールを大腸菌で発現・精製し、精製したアクチン溶液とともに細胞サイズの油中液滴に封入した人工細胞を構築した。照射によって SspB を融合した Arp2/3 活性化人工タンパク質を液滴界面に局在させることに成功したが、アクチン重合活性については照射の前後で優位差が見られなかったことから、ツール及び人工細胞のデザインの更なる検討を引き続き行う。

なお、本研究を遂行する過程で得られた Arp2/3 活性化人工タンパク質を用いて、カエル卵抽出液中のアクチン重合活性を制御した研究を学術論文として報告した (Physical Review Research 2023)。また、本研究を提案する過程で得られたアイデアを含めた解説記事を報告した (Biophysics and Physicobiology 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyazaki Makito, Kosugi Takahiro	4. 巻 19
2. 論文標題 Uncovering the design principles of supramolecular assemblies through manipulation of the structures, dynamics, and functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v19.0031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Ryota, Miyazaki Makito, Maeda Yusuke T.	4. 巻 5
2. 論文標題 State transitions of a confined actomyosin system controlled through contractility and polymerization rate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physical Review Research	6. 最初と最後の頁 13208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevResearch.5.013208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Makito Miyazaki
2. 発表標題 Reconstitution of cytoskeletal structures and cell functions
3. 学会等名 IPR x RIKEN (BDR) Symposium 2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------