

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15681

研究課題名(和文) オプトジェネティクスを用いた骨組織内骨細胞の光機械刺激と細胞張力測定

研究課題名(英文) The development of light-activatable proteins for inducing mechanical stimulation in the cells

研究代表者

吉田 卓史 (Yoshida, Takashi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：30455795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物の生体は様々な外界からの機械的刺激を受容して細胞内シグナルに変換する細胞が存在している。しかしこれらの細胞は深く組織の中に埋没しているため細胞の局所にかかる機械刺激の強度やそのシグナルがどのように細胞内、細胞間を伝わっていくのかは明らかとなっていない。我々は光遺伝学を利用することにより非接触的に機械刺激を加える方法の確立を目指した。複数の光応答性人工タンパク質を作成して青色の光照射を行った結果、細胞の一部でアクチンフィラメントの消失が見られた。しかしその効力は低く、更なる最適化が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vertebrates have the cells which receive the mechanical force from the outer world and translate to the intracellular signaling. However, it is not clear the strength of mechanical stimulation at the local area of the cell and how the signals transduce from cell to cell because these mechanosensory cells are often embedded in the hard tissues like bone. So, we developed the non-contact method to provide mechanical stress in the specified area of the cell by using visible light. We made some light-activatable protein pairs containing LOV domain (light accepting module) and actin-depolymerizing proteins. The expressing vectors of light-activatable proteins were transfected into the MC3T3-E1 cells. The irradiation of blue light to the cells has resulted in a decrease of the actin filament. As this effect is not so remarkably, the improvement of light-activatable proteins is needed.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：機械刺激 光遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

骨組織はミネラル成分の中で骨細胞同士が3次元的に結びついた網目状構造をとっている。骨細胞は神経細胞のように細胞突起(cell process)を伸ばし、骨細胞同士、骨細胞-骨芽細胞間で連結して細胞間ネットワークを形成して全体として機械刺激を感知するメカノセンサーネットワークとして機能している。骨細胞の持つ細胞突起には多くの機械刺激受容チャネル(MSチャネル)が発現して骨にかかる力学的負荷を感知し、骨リモデリングの引き金となっており、これまでにコンピュータシミュレーションにより骨細胞の細胞突起に15 pN以下の負荷がかかっていることが想定された。しかしながら実際にミネラル成分中の骨細胞の局所にかかる機械刺激の強度や、また加えられた機械刺激がどのように骨細胞内で伝わっていくのかはいまだに明らかになっていない。なぜなら硬いミネラル成分に守られた骨細胞特異的に機械刺激を加える方法がないためである。

一方、近年急速に発展してきている分野に「光遺伝学」がある。光遺伝学とは可視光領域の波長の光によりその構造を変化させることができるタンパク質を用いて細胞機能を制御する手法である。最も有名なものとしてchannel rhodopsinがある。これは光照射することによりイオンチャネルとして機能して細胞内にNaイオンを透過させ、細胞を脱分極させることが出来、神経機能の解析技術として広く利用されてきている。

しかしながら光遺伝学の応用は神経科学領域だけにとどまらない。例えば光照射による遺伝子発現の制御や、small Gタンパク質の活性を光で制御することで細胞の移動をコントロールする方法が報告されている。我々はこの光遺伝学的手法を用いれば、物理的な方法で刺激できない、ミネラルでできた硬組織に埋まった細胞にも、場所特異的に光照射により機械刺激を加えられるのではないかと考えた。具体的には細胞骨格の一つであるactinフィラメントに対して光照射を行い、その場所でactinフィラメントが切断されれば細胞に収縮力が発生すると考えた。これまでに光応答性タンパク質であるcryptochrome 2-Cibの2量体化システムを用いることによりactinフィラメントの再構成を行い、フィロポディア(糸状仮足)の増加を起させたことが報告されている<sup>(1)</sup>。そこでこの方法を参考にすることによりさらにactinフィラメントの切断を効率よく行うことが出来る手法の開発を行うこととした。

### 2. 研究の目的

今研究の目的は光照射を行うことにより時間的に任意のタイミングと位置で細胞内に機械刺激を加える方法の開発である。そのために最も重要なポイントは2つある。1つ目はactinフィラメントを効率よく切断するタンパク質の選定であり、2つ目は効率よく光

エネルギーを吸収してactinフィラメントの切断を起こすトリガーとなる光モジュールの開発である。actinフィラメントはactin単量体が規則正しく方向性をもって並んだ重合体が2本らせん状に絡まった構造をしている。その直径は5-7 nmで、直線状の1次元構造から3次元の網目構造まで多彩な構造体を作っている。こうしたactinフィラメントは様々な補助タンパク質により制御されている。profilinはactin単量体に結合することによりactinフィラメントの伸長を加速させる。一方、actinフィラメントを分解・脱重合させる補助タンパク質も知られている。その中で我々はcofilinとGlia maturation factor beta (GMFB)に着目した。cofilinはcryptochrome 2-Cibの2量体化システムを用いたactin再構成を起こした論文でも使用されたタンパク質であり、actinフィラメントに結合して脱重合を促進させる。

また、GMFBはactin-related protein 2/3 (Arp2/3)複合体に結合することによりactinフィラメントの脱重合を引き起こすことが知られている。これらのタンパク質を光刺激によりactinフィラメントに局在化させることにより脱重合を起こせるのではないかと考えた。

光刺激受容モジュールには488 nmの青色光で活性化してその構造を変化させるLOV domainを使用することとし、これをactinフィラメントに局在させることにより、光刺激することでcofilinやGMFBをactinフィラメントに運び、脱重合を引き起こすこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞培養

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞株は10%FBS、30 unit/ml penicillin、30 µg/ml streptomycinを添加したMEM (WAKO)を用いて37℃、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度の雰囲気下で培養した。

#### (2)光刺激 actin 脱重合プラスミドの遺伝子導入

光刺激 actin 脱重合プラスミドは後述するように2種類のプラスミドから成立する。一つはactinに局在して光刺激に応答するモジュールを持つもの、もう一つはactinフィラメントを脱重合するタンパク質ドメインを持つものである。これらを同時に1つの細胞に発現させるためにエレクトロポレーション法を用いた。2種類のプラスミドをそれぞれ1 µgずつを使用し、neon transfection system (Thermo Fisher Scientific)を使用してMC3T3-E1細胞に導入した。導入後の細胞は10%FBS入りのMEM培地(抗生物質不含)で培養して2日後に使用した。

#### (3)共焦点顕微鏡観察と光刺激

遺伝子導入した細胞は観察の前日にガラスボトムディッシュに蒔き直しを行った。共焦点顕微鏡での観察時には培地をHBS buffer

に交換した。共焦点顕微鏡は TCS SP8 (Leica)を使用し、励起光は 488 nm と 552 nm のレーザー光を用い、それぞれ 493-557 nm、588-700 nm のバンド幅で蛍光像を取得した。

光刺激は 488 nm のレーザーを使用してレーザー強度 10% で 1 分間に 1 回、細胞全体をスキャンすることを 10 分間続けることにより行った。光刺激の前後で細胞イメージを取得して変化が生じたかどうかを評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 光刺激 actin 脱重合プラスミドのデザイン  
光刺激 actin 脱重合プラスミドは TULIPs と呼ばれる、2 つのドメインをそれぞれ持つ 2 種のタンパク質からなる光刺激システムを参考にした<sup>(2)</sup>。2 つのドメインとは 488 nm の光を吸収して構造変化を起こし、J と呼ばれるペプチド配列を放出する LOV ドメイン (LOVpep) と、Erbin の高親和性 PDZ ドメイン (ePDZb1) からなる。光刺激により放出された J は ePDZb1 により認識され結合することを利用して 2 つのタンパク質を 2 量体化させることが出来る。このシステムは変異の導入により 2 つのドメインの親和性を柔軟に変更することが出来る利点がある。この LOVpep ドメインを actin フィラメントに局在するタンパク質にタンデムに結合させることにより actin フィラメントに局在させることとした。actin に局在させるシグナル配列としては yeast の Abp140 由来の 17 アミノ酸からなる LifeAct と、rat actin-binding inositol 1,4,5-trisphosphate-3-kinase A 由来の 43 アミノ酸からなる F-tractin の 2 種類のうち 1 つを使用することとした。これら 2 種の配列はこれまでの報告で低分子量タンパク質ながら効率よく actin に局在できることが報告されている。また、こちらのタンパク質にはレポータータンパク質として GFP を結合した。

もう 1 つのタンパク質は ePDZb1 を持ち actin フィラメントを脱重合して分解する cofilin か GMFB をタンデムで結合し、レポータータンパク質として mCherry を結合することにより作成した。Cofilin については wild type では actin に結合する能力があることが知られているため、光刺激をせずとも actin に結合して脱重合を引き起こす心配がある。そのため既に報告<sup>(1)</sup>された 2 か所の変異 (S3A, S120A) を導入することにより actin フィラメントへの局在を抑制することとした。この 2 種類のプラスミドを 1 つの細胞に同時に強制発現させることにより 488 nm の光刺激で actin フィラメントの脱重合が引き起こせると考えた。

(2) 共焦点顕微鏡による MC3T3-E1 での発現分布

(1) で作成した 2 種類のプラスミドを、エレクトロポレーション法により MC3T3-E1 細胞と HEK293 細胞に一過的に発現させ、その

局在を共焦点顕微鏡を用いて調べた。まずは単独で発現させたときの局在を調べてみた。その結果 MC3T3-E1 細胞を用いたところ actin に局在するはずの LOVpep タンパク質は用いた actin 局在化シグナルの違いにより少し違う局在を示した。局在化シグナルとして LifeAct を用いたときは、LOVpep タンパク質は主に細胞周囲と細胞下面のストレスファイバーと、細胞末端の葉状仮足 (ラメリポディア) に多く局在が見られた。細胞質にも幾ばくかの局在が見られたがストレスファイバーに比べると十分に少ないと思われた。細胞核での局在も見られなかった。また、actin 局在化シグナルとして F-tractin を使用したものでは細胞周囲と細胞下面のストレスファイバーでの強い局在が見られた。その反面ラメリポディアはそれほど顕著ではなかった。一方、actin フィラメントの脱重合を担う cofilin や GMFB を含んだタンパク質の局在は概ね細胞全体に満遍なく発現していることが明らかとなった。細胞質内のところどころには発現していなくて黒く抜けて見えるところもあったが、この構造体が何であるかは不明だった。

次にこれら 2 種類のプラスミドを同時に強制発現させた細胞でのそれぞれのタンパク質の局在を調べた。そうすると LOVpep を持つ actin フィラメントに局在するタンパク質は単独で発現させた時と同様、ストレスファイバーに多く局在していた。しかしながらストレスファイバーの観察された本数は単独で発現させた場合に比べて少なくなっていた。これに対して cofilin や GMFB を含んだタンパク質はすでに一部で actin フィラメント上に局在しており、LOVpep を持つタンパク質と共局在している部分が見受けられた。actin への局在は LOVpep を持つタンパク質と比べて少なく、多くは細胞質全体に広がっていた。

これらの結果より単独発現では当初の予定通り LOVpep を持つタンパク質は actin フィラメント上に局在させることが出来、cofilin や GMFB を含むタンパク質は局在することなく細胞質全体に拡散することが確認された。しかしながらこれら 2 種類のタンパク質を同時に発現させると cofilin と GMFB を含むタンパク質の局在が変化して actin フィラメント上に一部局在したことから、光刺激をしなくとも 2 種類のタンパク質が一部相互作用して 2 量体化してしまったと考えられる。これら MC3T3-E1 細胞の結果に対し、HEK293 細胞を用いた時には LOVpep タンパク質はほとんど細胞の外周に局在し、ストレスファイバーが確認できなかった。これらの結果より光刺激は MC3T3-E1 細胞のみを用いて行った。

(3) 光刺激による形態変化観察

2 種のタンパク質を共発現させると光刺激をする前に一部共局在していることが明らか

となったが、光刺激をすることにより、より共局在が進行して細胞骨格(actin フィラメント)が切断されるかを調べるために、488 nm のレーザー光を通常の観察に使用する強度よりも強い強度(10%)で細胞全体に 1 分間に 1 回の割合で照射し、これを 10 分間連続して光刺激とした。その後刺激前と比べて細胞骨格に変化が出たかを光刺激の前後の画像を比較することにより確認した。その結果、cofilin と GMFB を含むタンパク質の大きな局在の変化はほとんど見受けられなかった。その一方、actin フィラメント自体は少し変化が見られた。それは一部の actin フィラメントが薄くなった点と、細胞の一部で退縮が見られた点である。さらにはラメリポディアの一部で actin の再構成が生じた細胞も見られた。コントロールである LOVpep を含むタンパク質のみを発現させた細胞で光刺激を行った時には細胞の一部で少し退縮が見られたことから、共発現させた細胞で見られた細胞の退縮が、actin フィラメントの脱重合により生じたものか、細胞運動によるものであるか区別することは難しいと考える。しかし actin フィラメントが消失することはコントロール細胞では見られなかったことから、この現象は光刺激により actin フィラメントが脱重合した結果ではないかと考える。

以上の結果から得られた知見を 3 つのドメインについてまとめた。1 つ目のドメインとして actin 局在化シグナルとして使用した 2 つのシグナル配列、LifeAct と F-tractin についてはともに actin への強い局在が確認された。しかしながら LifeAct のほうがよりラメリポディアへの局在が多いと思われた。2 つ目のドメインとして actin の脱重合タンパク質である cofilin と GMFB について比較すると cofilin の方が GMFB よりも actin フィラメントに対する効果が見受けられた。光刺激による脱重合の効果はあまり顕著には確認されなかったが、共発現させた細胞は細長い細胞が多く、また、ストレスファイバーがあまり観察されなかったことから cofilin を発現させた細胞では LOVpep ドメインを持つタンパク質との間で 2 量体化が進行しており、光刺激をするまでに actin フィラメントを脱重合しているのではないかと考えられる。一方、cofilin を含むタンパク質を発現した細胞で見られた光刺激によるラメリポディアでの actin 再構成は、cofilin が持つ作用の一つであるが、本研究の目的である actin フィラメントの脱重合だけを起こす目的には適さないため、今後再構成をさせない仕組みを導入する必要があると思われる。3 つ目のドメインは最も重要な TULIPs システムについてである。このシステムは LOVpep と ePDZb1 という 2 つのモジュールを別のタンパク質に結合することにより光刺激により 2 量体を形成させるものである。今回の研究ではこれらを含んだ 2 つのタンパク質を同時に共発現させた細胞では、光刺激をする前に共局在をし

ていたため 2 量体が形成されていると考えられる。この理由として LOVpep と ePDZb1 の 2 つのモジュール間の親和性が高かったために光刺激をするまでもなく結合したためと思われる。今後このモジュールの親和性を低下させることにより、光刺激をした時のみに 2 つのタンパク質が会合するように研究する必要がある。

光刺激により actin フィラメントの脱重合を起こして時空間的に選択性の高い機械刺激を細胞に起こす手法にはさらに効率的に光に応答するシステムの開発が必要になるが、この方法が確立されれば硬組織における機械刺激の果たす役割をより詳細に解析でき、将来的には骨粗鬆症などの治療薬の開発などに結び付くと考える。

#### 引用文献

- (1) Robert M Hughes and David S Lawrence. Optogenetic Engineering: Light-Directed Cell Motility. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10904-10907, 2014.
- (2) Devin Strickland, Yuan Lin, Elizabeth Wagner, C Matthew Hope, Josiah Zayner, Chloe Antoniou, Tobin R Sosnick, Eric L Weiss and Michael Glotzer. TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nature Methods* **9**, 379-384, 2012.

#### 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 1 件)

- (1) Yasushi Yabuki, kazuya Matsuo, Hisanao Izumi, Hidaka Haka, Takashi Yoshida, Minoru Wakamori, Akikazu Kakei, Kenji Sakimura, Takaichi Fukuda. Pharmacological properties of SAK3, a novel T-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel. *Neuropharmacology* **117**, 1-13, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.011.

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) Kaori Takahashi, Takashi Yoshida and Minoru Wakamori. The regulatory function of Wnt5a, secreted from periodontal ligament cells loaded with mechanical stimuli, in axonal elongation of peripheral nerves. 第 60 回日本神経化学学会大会 2017 年
- (2) 高橋 かわり、吉田 卓史、若森 実 機械刺激依存的な歯根膜由来 Wnt5a による三叉神経突起伸長作用 第 68 回日本薬理学会北部会 2017 年
- (3) 高橋 かわり、吉田 卓史、若森 実 機械刺激を受けた歯根膜細胞が産生する

- Wnt5a の神経突起伸長効果 第 59 回歯  
科基礎医学会学術大会 2017 年
- (4) 吉田 卓史 歯根膜による機械刺激受容  
と神経制御 新世代の生物有機化学  
2017 2017 年
  - (5) 吉田 卓史、高橋 かおり、若森 実 機  
械刺激を受けた歯根膜による神経分化誘  
導機構の解明 第 90 回日本薬理学会年  
会 2017 年
  - (6) 高橋 かおり、吉田 卓史、若森 実 機  
械刺激を負荷した歯根膜細胞による神経  
分化誘導機構の解明 第 58 回歯科基礎  
医学会学術大会 2016 年
  - (7) Kaori Takahashi, Takashi Yoshida and  
Minoru Wakamori The role of the  
periodontal ligament cells in neuronal  
differentiation induced by mechanical  
stimuli. Oral Neuroscience 2016, 2016
  - (8) 吉田 卓史 オプトジェネティクスを用  
いた機械刺激法の開発 新世代の生物有  
機化学研究会 2015 2015 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 卓史 (Takashi Yoshida)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：30455795

### (2) 連携研究者

若森 実 (Minoru Wakamori)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：50222401