

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 5月 1日現在

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2004～2008

課題番号：16GS0308

研究課題名（和文） 機械受容チャネルを核としたメカノバイオロジーの創成

研究課題名（英文） Creation of Mechanobiology Based on Mechanosensitive Channels

研究代表者

曾我部 正博 (SOKABE MASAHIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10093428

研究成果の概要（和文）：細胞の機械刺激受容・応答能は生命現象を支える根幹機能であるが、その分子機構は全く未解明であった。本研究では、①変異体を用いた実験とシミュレーションにより、機械刺激受容チャネルである細菌 Msc の張力感知部位を同定し、活性化過程における膜脂質との相互作用・張力感知とチャネル開閉の連関の詳細を明らかにした。②細胞骨格であるストレス繊維が、チャネルや接着斑と分子複合体を形成し機械刺激の伝達・収斂といった役割を担うこと、さらに、それ自体が機械刺激感知のセンサーであること、を見出した。③応用研究として新規機械刺激受容チャネルブロッカーの探索を行い、心臓の不整脈治療薬の候補を見出した。

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	84,200,000	25,260,000	109,460,000
2005年度	84,000,000	25,200,000	109,200,000
2006年度	76,100,000	22,830,000	98,930,000
2007年度	70,100,000	21,030,000	91,130,000
2008年度	68,400,000	20,520,000	88,920,000
総計	382,800,000	114,840,000	497,640,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理学

キーワード：メカノバイオロジー、細菌 SA チャネル、メカノセンサー、細胞骨格、チャネルブロッカー、蜘蛛毒、接着斑、心房細動

## 1. 研究開始当初の背景

私達の体を構成する細胞は、重力のみならず体内の骨格筋や内臓平滑筋の動きに起因する様々な機械的刺激にさらされている。一方で、あらゆる細胞はこれらの機械刺激を感じて応答する。筋肉や骨の維持に機械刺激が不可欠なことはよく知られている。また、血管は血流や血圧を

感知して自らの口径を変えることで適切な血圧や血流を維持している。一方で過剰な機械刺激（高血圧）は動脈硬化、不整脈や心不全などの深刻な病態を誘発する。また、細胞の成長、分裂、形態変化、運動に伴って細胞内に多様な力が発生して細胞機能を調節している。

研究代表者である曾我部は1991年に、電極

内の微小(パッチ)膜の張力を定量的に測定する手法を開発して機械受容(Mechano Sensitive, MS)チャンネルが張力で活性化することを初めて証明した。その後、分子生物学を導入して世界初の真核生物・MSチャンネル遺伝子の同定に成功した(1999)。また最近では、心筋MSチャンネルSAKCA遺伝子の同定(2003)、細菌MSチャンネルの機械感知部位の同定(2004)などの先導的成果を挙げている。このような経過の中で、細胞の機械刺激感知能(細胞力覚)が広範な生命現象に関わる基本機能であることを確信するに至った。一方で、循環器学、整形学、宇宙医学、スポーツ医、バイオメカニクス、あるいは生理学、細胞生物学、発生学などの多くの分野には細胞力覚が通底しているにも関わらず、力覚研究が未成熟なために通底意識が低く、相互交流もなされていなかった。

## 2. 研究の目的

細胞の機械刺激受容・応答能は生命を支える根幹的な機能であり、基礎生物学だけではなく、臨床医学や宇宙医学の発展に欠かせない極めて重要な研究対象である。にもかかわらず、そのメカニズムの大半は謎である。その最大の理由は、細胞の機械刺激受容体(メカノセンサー)の実体と作動機構が未知なことにある。本研究では最近明らかになった代表的メカノセンサーであるMSチャンネルを核にして、1) MSチャンネル活性化(開閉)機構の解明、2) 機械受容における細胞応答に至るシグナル機構における細胞骨格の役割解明、および、3) 新規MSチャンネル・ブロッカーの探索と応用、を中心に研究を進める。さらに、4) 機械受容チャンネル以外の新規メカノセンサーや有望な新規課題を積極的に探索して、広範な生命現象にかかわる“メカノバイオロジー”という新学問領域創成の基盤確立を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 機械刺激に対する細胞の応答を理解するためには、メカノセンサーの実体を同定し、その作動機構を知ることが肝要である。そのために、その高次構造(閉状態)が判明している細菌のMSチャンネル、MscLとMscSを研究対象に選び、メカノセンサーであるMSチャンネルの活性化(開閉)機構の解明を目指した。MscLとMscSは、いずれも膜の伸展(張力)により活性化(開口)するので、その活性化開始の素因を脂質との相互作用に限定し解析できる利点がある。

実験的には、これらのチャンネルに点突然変異を導入し電気生理学的測定を行った。すなわち、膜張力を変えながらパッチクランプ法でアッセイすることで、膜張力の感知部位等を決定し活性化機構の分子モデル(仮説)を構築した。さらに、この仮説を分子動力学(MD)シミュレーションにより検証した。つまり、張力感知部位であるアミノ酸残基と膜脂質分子との間の相互作用を詳細

に解析するとともに、活性化過程におけるチャンネル構造の遷移を追跡した。また、無細胞タンパク質発現系を利用して、常時、開状態にあるMscL変異体を作製し、電子顕微鏡による一分子構造解析を行い、閉状態にあるチャンネル分子と比較した。

(2) より高次の細胞においては、MSチャンネルのみならず、ともに分子複合体を形成する接着斑・細胞骨格(ストレス繊維)の働きにも焦点を当て、解析を進めた。具体的には、血管内皮細胞や繊維芽細胞を材料に、細胞に機械的/薬理的に伸展・弛緩刺激(持続あるいは周期的)を与え、ストレス繊維と接着斑の動態を可視化し、それらの応答機構を解析した。また細胞膜を可透過性にしたセミインタクト細胞モデルとin-vitro再構成系を構築し、ナノ操作とイメージングを組み合わせ分子物理的機構を調べた。

(3) 現在MSチャンネル特異的なブロッカーは蜘蛛毒由来のペプチドGsMTx-4しか知られていない。その作用機序の解明や将来の臨床応用を目指してGsMTx-4の部分構造を模擬したペプチドを合成し電気生理学的な測定を行い、より簡単な構造のブロッカーの開発を目指した。また心房細動が誘発できる灌流心モデルの確立を目指し、既存の薬物のスクリーニングも行った。

## 4. 研究成果

(1) 膜面に接する疎水性アミノ酸を親水性アミノ酸に置換して伸展感受性に欠陥が生じるアミノ酸を同定する実験から、MscLに加えMscSの膜張力感知部位を見出した(図1)。

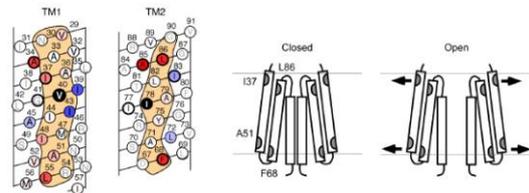


図1(左)MscS突然変異体のパッチクランプと低浸透圧ショック実験のデータを基に作成したTM1とTM2の $\alpha$ -ヘリックス領域のネットダイアグラム。膜貫通部位の両末端に赤色のアミノ酸残基が多く分布しているのが分かる。中央部には青色のアミノ酸残基が分布しており、この部位は張力が加わった時、陽圧を受けているものと思われる。肌色は脂質膜と接していると思われる領域。(右)膜貫通部位でのチャンネルの閉状態(closed)と開状態(open)の仮説の模式図。

すなわち、感知部位は脂質膜外葉のグリセロール基近傍にあるアミノ酸群であり、細胞膜が伸展したときに膜内張力が集中する油水界面の近傍であった。この感知部位の位置は、構造が全く違うMscLとMscSにおいてこのような共通であり、膜伸展により、これらのアミノ酸が膜中の脂質に引っ張られて硬い膜貫通部位全体が膜面方

向に引き倒されることでゲートが開くことが予想された。実際に、常時開状態にある MscL 変異体分子を作製し電子顕微鏡による一分子構造解析を行い、この予想と一致する結果が得られている(図 2)。

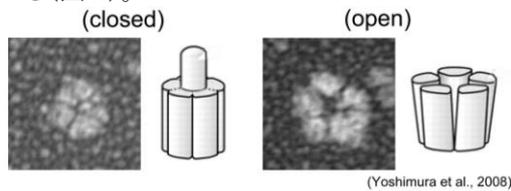


図 2 野生型 (closed、閉状態あると考えられる) と常時開口型 (open) の MscL チャンネルの電子顕微鏡による一分子構造解析像とモデル図

また、実験的なアプローチに加えて、MD 計算による分子構造並びに分子・原子間の相互作用のモデルのシミュレーションを行った。計算の結果、MscL の周囲の膜面に張力を加えると膜貫通領域を傾けながら開口部位の間隙を広げていく様子が見られた(図 3)。

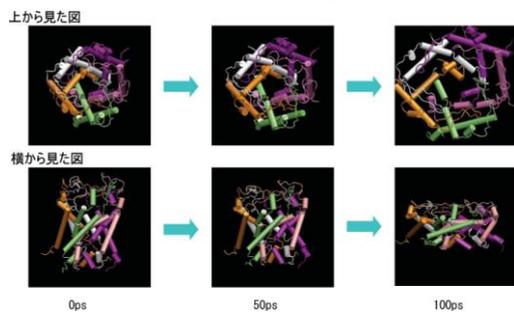


図 3 MscL が細胞膜を引っ張ることによって開口する様子

さらに、張力感知アミノ酸である F78 が脂質と特異的に強く結合し、張力増加に伴い F78 を含む膜貫通ヘリックス(TM1)が膜面方向に倒されながらチャンネルが開く様子がシミュレートでき(図 4)、その開口プロセスに関する詳細な知見を得た。

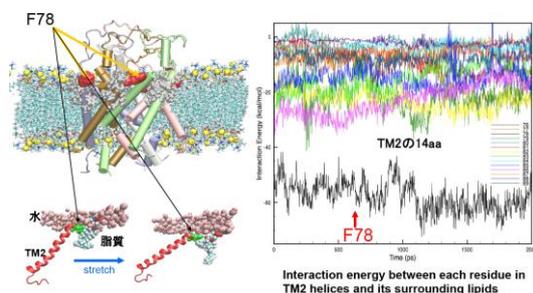


図 4 膜 2 回貫通型サブユニットのホモ 5 量体からなる MscL を脂質二重膜に埋め込んだ全原子モデルの分子動力学シミュレーション。F78・脂質間相互作用が最も安定。膜伸展で F78(左下の緑色)が脂質に引っ張られて、堅い TM1、2 ヘルックスが引き倒されることによってゲートが開く

(2) 高次生物細胞の MS チャンネルは、細菌の MS チャンネルとは異なり、チャンネル単独で脂質二重膜内に埋め込み張力を負荷しても活性化させることは難しい。この場合、MS チャンネルは細胞内では他のアクセサリ分子と相互作用して機械刺激感知機能を獲得すると考えられていた。細胞の接着部位は、細胞骨格であるストレス繊維が繋がり、機械刺激がストレス繊維を通じて伝わり収縮することから、我々は、「MS チャンネル単独ではなく、接着斑・細胞骨格(ストレス繊維)とともに分子複合体を形成し、一つのユニットのメカノセンサーとして機能する」という仮説をたてた。実際に、顕微鏡操作により細胞内のストレス繊維に張力を負荷すると、そのストレス繊維の端に繋がった接着斑のごく近傍で局所的な  $Ca^{2+}$  の細胞内流入が観察された(図 5 左)。これは、ミリ秒オーダーのとても速い反応であることから、MS チャンネルは、接着斑・細胞骨格(ストレス繊維)とともに分子複合体を形成し、機械刺激がストレス繊維を伝わり、複合体の中の MS チャンネルを活性化していると考えられた(図 5)。

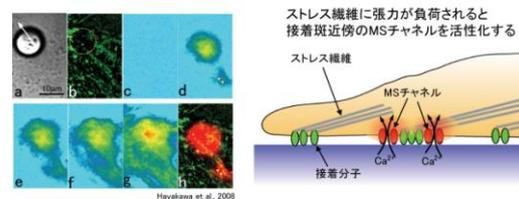


図 5 (左)ビーズ[a]を通してストレス繊維に張力を負荷するとビーズ直下に加え、右下方向に離れた接着斑の近傍で  $Ca^{2+}$  流入が見られた[d]。(右)MS チャンネル・ストレス繊維・接着斑構造から成るメカノセンサーのモデル図。

MS チャンネル・接着斑・ストレス繊維から成る分子複合体が一つのユニットのメカノセンサーとして機能する、という仕組みを我々は世界に先駆けて明らかにした。さらに、上記の研究過程において、細胞骨格(ストレス繊維)や接着斑構造が、そのユニットの中で機械刺激の伝達・収縮といった付随機能のみならず、ベクトル成分を持つ刺激の情報を感知するメカノセンサー・リアクターとして機能することを見出した。ストレス繊維に関しては、具体的には、A. 生細胞内でストレス繊維にかかる張力を弱め弛緩すると繊維は崩壊すること、B. セミインタクト細胞内でアクチン線維の脱重合因子コフィリンが弛緩したストレス繊維に選択的に結合して切断すること、C. *in-vitro* 再構成したアクチン線維において、レーザーピンセットでナノ操作して張力を発生させながらコフィリンを添加すると、脱重合が遅延すること(図 6)、という結果を得た。以上の結果から、アクチン繊維からなるストレス繊維は、それ自体が機

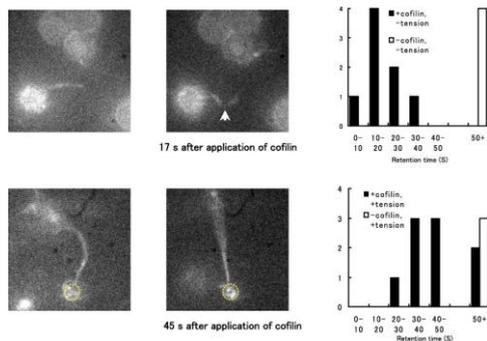


図 6 張力 -、コフィリン - 依存的なアクチン繊維の切断。(上) 張力がないとコフィリン添加後、平均 17 秒で繊維は切断された。(下) 張力が付加された状態では、平均 34 秒後に切断されるまでの時間が延びた。

機械刺激を感知しその動態を変化させるメカノセンサー・リアクターであると考えられた (図 7)。

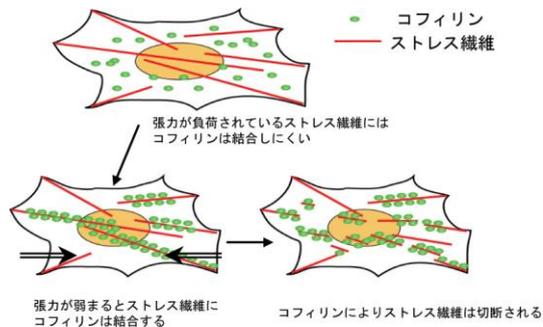


図 7 アクチン繊維からなる細胞骨格が機械刺激を感知する仕組みのモデル図

接着斑に関しては、細胞内でストレス繊維をその両端で結合し、そのストレス繊維の収縮力で常時引っ張られている。細胞を弛緩させるとストレス繊維の消失とともに、連結していた接着斑は徐々に消失する (接着斑の一部であるインテグリンが細胞内に取り込まれる)。一方、細胞を伸展してストレス線維に張力を与えると接着斑が徐々に成長するとともにストレス繊維も成長し太くなる。すなわち、接着斑もまた機械刺激の変化に応じて自らの動態を変化させるメカノセンサー・リアクターである。このキーになる分子として *zyxin* を同定した。*zyxin* は、伸展刺激で接着斑に集積し、弛緩刺激で拡散する極めて有用な力覚のモニター分子であり、その結合蛋白分子あるいはその分子複合体が細胞におけるメカノセンサーとして機能していた。

(3) MS チャンネル特異的なブロッカーである蜘蛛毒由来ペプチド GsMTx-4 の部分構造を模擬

したペプチドを合成し、心筋 MS チャンネル SAKCA を材料に、抑制効果を評価した。その結果、数種のペプチドに関して効果を有することが確認できた。その抑制効果の作用機序の解析を GsMTx-4 と比較しながら行ったところ、MS チャンネルのポアをブロックするのではなく、ゲーティング機構を修飾して抑制することが分かった。一方、MS チャンネルのブロッカーの臨床応用を目指して、心房細動が誘発できる灌流心モデルを確立し、薬剤評価・スクリーニングを行った。前述の合成ペプチドの心房細動の抑制効果を調べたが、残念ながら効果はなかった。これは、それらのペプチドの抑制効果がスクリーニングに用いた SAKCA チャンネルに選択的であり、おそらく心房細動に関わると考えられる別の MS チャンネル (心筋細胞には少なくとも 5 種類の MS チャンネルが発現している) には抑制効果は弱いと考えられた。そこで、開発した還流心モデルを使って、より広範な MS チャンネルに対して抑制効果を持つブロッカー探索を目的に、これまでの心房細動に関する疫学調査を参考に有望な既存薬物のスクリーニングを行った。その結果、ある種のスタチンが心房細動を急性に抑制することを見いだした。

#### 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 6 7 件)

- ① Machiyama H, Tatsumi H, Sokabe M. Structural changes in the cytoplasmic domain of the mechanosensitive channel MscS during opening. *Biophys J* (査読有), 97:1048-1057 (2009).
- ② Fujiu K, Nakayama Y, Yanagisawa A, Sokabe M, Yoshimura K. Chlamydomonas PPR2 encodes a voltage-dependent calcium channel required for the flagellar waveform conversion. *Curr Biol* (査読有), 19:133-139 (2009).
- ③ Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. Mechanical Forces Facilitate Actin Polymerization at Focal Adhesions in a Zyxin-Dependent Manner. *J Cell Sci* (査読有), 121: 2795-2804 (2008).
- ④ Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Stress fiber acts as a force-transmitting and -focusing structure to activate MS channels in endothelial cells. *J Cell Sci* (査読有), 121:496-503 (2008).
- ⑤ Nomura T, Sokabe M, Yoshimura K. Interaction between the cytoplasmic and transmembrane domains of the mechanosensitive channel, MscS.

- Biophys J* (査読有), 94:1638-45 (2008).
- ⑥ Yoshimura K, Usukura J, Sokabe M Gating-associated conformational changes in the mechanosensitive channel, MscL. *PNAS* (査読有), 105:4033-4038 (2008).
- ⑦ Nomura T, Yoshimura K, Sokabe M Lipid-protein interaction of the MscS mechanosensitive channel examined by scanning mutagenesis. *Biophys J* (査読有), 91:2874-81 (2006).

[学会発表] (計 181 件)

- ① Sokabe M Role of cytoskeleton in mechanotransduction. Gordon Research Conference: Cellular Osmoregulation & Mechanotransduction., Jul 5-10, 2009, Biddeford, ME USA, (invited).
- ② Sokabe M Molecular Biophysics of mechanosensitive ion channels. Symposium on Single molecules Physiology of ion channel and motor proteins, IUPS Congress 2009, Jul 27-Aug 1, 2009, Kyoto, Japan, (organizer).
- ③ Sokabe M Nanobiology of cell mechanotransduction. First World Congress of International Academy of Nanomedicine (IANM), Jun 11-14, 2009, Sanya, Hainan, China (invited).
- ④ Sokabe M. Molecular dynamics simulations on the mechanosensitive ion channel., Computational Biology and Robotics 2009, Apr 8-13, 2009, Phuket, Thailand (invited).
- ⑤ Sokabe M. Biophysics of cell mechanosensor at work: structure function of an MS channel protein. 5th Structural Biology & Functional Genomics and 1st Biological Physics International Conference, Dec.9-11, 2008, Singapore (invited).
- ⑥ Sokabe M. Molecular and cellular biophysics of mechanotransduction. National Symposium on "Biophysics in Medicine and Biology". Ann Meeting of Ind Biophys Soc. Nov 15-17, 2007, Chandigar, India (invited).
- ⑦ Sokabe M. Overview. Molecular physiology of mechanosignaling in the cell. Symposium on "Comparative aspects of mechanobiology" 7th ICCPB, Aug 12-16, 2007, Salvador, Brazil (Organizer, invited).
- ⑧ Sokabe M. Plenary Lecture,

Nanobiology of mechanotransduction in cells: basics and applications. World Congr Bio Eng 2007, July 9-11, 2007, Bangkok, Thailand (invited).

[図書] (計 16 件)

- ① Tatsumi H, Hayakawa K, Sokabe M. Nanotechnology in mechanobiology: mechanical manipulation of cells and organelle while monitoring intracellular signaling. "Mechanosensing Biology" (Ed.Noda M), Springer (in press).2010
- ② Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. Biophysical mechanisms of tension-dependent formation of stress fibers from actin meshwork. In "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels, Volume IV" ed. Wada H. World Scientific Publishing, pp72-81 (2007)
- ③ 曾我部正博、機械刺激受容チャネル、In 「生物物理学ハンドブック」、石渡他編、朝倉書店、東京、pp276-278 (2007).
- ④ Sokabe M. Analysis of micro- and nano-mechanisms in the activation of cell mechanosensors. In "Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels: Introduction of The Project" (ed. Wada H), Sanko Printing, pp29-34 (2005).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：細胞培養方法  
 発明者：曾我部正博・古家喜四夫・田崎剛・鶴田仁志・福田始弘  
 権利者：名古屋大学・株式会社ク ラレ  
 種類：特許  
 番号：特願 2008-026385  
 出願年月日：2008年2月6日  
 国内外の別：国内

名称：細胞培養方法  
 発明者：曾我部正博・古家喜四夫・田崎剛・鶴田仁志・福田始弘  
 権利者：名古屋大学・株式会社ク ラレ  
 種類：特許  
 番号：PCT/JP2009/051991  
 出願年月日：2009年2月5日  
 国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曾我部 正博 (SOKABE MASAHIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10093428

### (2) 研究分担者

辰巳 仁史 (TATSUMI HITOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20171720

### (3) 連携研究者

成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

授

研究者番号：40252233

吉村 建二郎 (YOSHIMURA KENJIRO)

筑波大学・大学院生命環境科学科・教授

研究者番号：10230806