

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K03760

研究課題名(和文)細胞サイズ空間でのヘテロな細胞骨格群から生じる組織化と動態

研究課題名(英文) Dynamics and organization of heterogeneous cytoskeletal filaments in cell-sized droplets

研究代表者

羽鳥 晋由 (Hatori, Kuniyuki)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00283036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：典型的な真核細胞サイズの油中液滴空間がもつ拘束条件において、内包された中間径フィラメント(デスミン)がその集合過程でアクチン線維と協調して生み出すパターンや作用を明らかにした。加えて、デスミンとリン脂質層との選択的相互作用を見出した。蛍光顕微鏡下でのシングルデスミンフィラメントのイメージングを可能とし、今後のフィラメント間相互作用の詳細な調査が期待される。合わせて、アクチン線維とミオシンとの相互作用へのアクチン付加物による抑制効果を定量評価した。これらの成果を査読付き学術誌に4編の論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核細胞内には種々のタンパク質、核酸、脂質等を含み、それらが自発的に細胞小器官等の区画を生成したり、細胞構造や運動に秩序を与えている。この秩序を生み出す要因のひとつに、細胞骨格フィラメント間の相互作用がある。これまでは、個々のフィラメント要素の物性が主な調査対象であったが、本研究により、異種のフィラメント間で生じる弱い相互作用や物性の差を根拠にした秩序化の可能性が示され、細胞骨格由来の障害に対する知見や新たな組織材料の開発にひとつの指針を与える。

研究成果の概要(英文)：This study showed that distinctive patterns and organization of cytoskeletal filaments such as desmin intermediate filaments and actin filaments occurred via desmin assembly in water-in-oil droplets which provide a cell-sized shape constraint. In addition, selective interactions between desmin and a phospholipid layer were found. Using fluorescence microscopy, single desmin filaments could be clearly observed; thereby, the interaction between single filaments can be investigated hereafter. We also quantitatively evaluated the inhibitory effect of additive materials bound to actin on the motility of actin filaments interacting with myosin. These results (4 research articles) have been published in peer-reviewed journals.

研究分野：生物物理

キーワード：細胞骨格 モータータンパク質 自己組織化 中間径フィラメント 細胞サイズ空間 アクティブマタ
ー 液液相分離

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在までに種々のタンパク質の個々の構造や機能が詳細に明らかにされてきた。その一方、細胞内でのタンパク質の構成は多様で不均一でありながら、独自の運動や秩序維持が成立している。また、性質を異にする構成物を高密度で包含する環境での個々の要素の変調や協調性には不明な点が多い。本研究の問いは、どのような機序によって細胞内で自発的に構成要素の分配や配向のような組織化や細胞の形態変化が生じるのかである。

2. 研究の目的

細胞はすでに高度に複雑なシステムであり、組織化の全容を知ることは容易ではない。単純な要素を徐々に積み重ねる手法は、組織化に至る根源的な現象の理解を容易にする。本研究では人工的な再構成法を用い、異種の細胞骨格線維(アクチン線維, 中間径フィラメント)が混在する組み合わせ環境を細胞サイズの閉鎖空間に再現する。この2種類の細胞骨格は重合様式、剛性率、重合の可逆性などの性質が異なり、このヘテロな物性から生じる現象を明らかにし、組織形成の機序解明の手掛かりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

アクチンとデスミン(中間径フィラメントタンパク質)をウサギ骨格筋および鳥砂肝から超遠心分離法やカラムクロマトグラフィ法を用いて単離精製した。精製されたタンパク質を適切に蛍光標識した後、油中液滴内に封入し、蛍光顕微鏡下で線維形成や局在性などの形態を経時的に観察した。

油中水滴法は、リン脂質を分散させたミネラルオイルに少量の水溶液を加えた後、撹拌することで水溶液粒子の周りに脂質膜を形成させ、オイル内に数十マイクロメートル径の水溶液空間を形成させる方法である。水溶液中にデスミンやアクチン分子を存在させることで、この細胞サイズ空間での挙動を調べた。重合開始のトリガーは2価カチオンと塩化カリウムの添加とした。蛍光顕微鏡下で実時間観察するためにタンパク質に蛍光色素を直接結合させて標識した。デスミンの Cys324, アクチンの Cys374 を蛍光色素で選択的に標識できる。これらの細胞骨格タンパク質は重合することで蛍光像が明白となるので、線維形成過程において形状を確認した。デスミン、アクチンの重合の順序を変化させるなどの複数の条件を設定した。蛍光顕微鏡画像から、液滴中のタンパク質の分布やガラス上でのフィラメント長や蛍光強度分布等の解析には、独自に開発したソフトウェアを使用した。

4. 研究成果

本研究目的に直接的に関係する成果(1), (2), (3)と間接的に関係する成果(4), (5)を得た。

(1) 細胞サイズ液滴内でのデスミンフィラメントの力学作用とアクチン線維との共局在

典型的な真核細胞は直径数十 μm の大きさをもち、この空間サイズに特有な物理的拘束を細胞質に与える。特に細胞質内の細胞骨格フィラメントは細胞の力学的強度や運動に關与する。一方で、細胞骨格フィラメント自体の物理的強度や動力学がこの空間において特有な効果をもつ可能性がある。例えば、細胞骨格のひとつであるアクチン線維(直径約 8 nm)は 18 μm の持続長を示し、その物性が細胞サイズ空間で束化やリング形成に寄与することが示されている。一方で、中間径フィラメントは、アクチン線維より直径が太い(約 10 nm)にも関わらず、持続長は 1 μm 以下であり、特有なネットワークを形成する。生細胞では、この二種のフィラメントの局在はそれぞれ固有であるが、状況に応じて互いに相互作用することも認められる。細胞空間サイズの拘束を受けながら性質を異にするフィラメントが交わることで生じる現象を還元的手法で明らかにすることを目的とした。

精製されたデスミン(中間径フィラメントタンパク質)とアクチンを油中液滴内に封入し、液滴の形状や内部でのタンパク質の分布を調べた。デスミンは低イオン条件下では、四量体を形成する。そしてイオン強度の増加に伴い四量体が側面会合し単位長フィラメント(ULF)となる。続いて、ULFが末端結合することでフィラメントが成長する。まずデスミン単体での液滴内での動態を観察した。四量体デスミンに 150 mM KCl, 2 mM MgCl₂となるように溶液を調製した直後に、リン脂質を含むミネラルオイルに加え、振動を与えて液滴を形成させた(デスミン集合開始から2分)。この過程で平均直径 20 μm の液滴が得られた。デスミンは空間中心部に集合する場合と空間周辺部へ集積する場合は観察され、周辺部への集積は、液滴の変形や液滴からのデスミン集合体の突出を引き起こした。この変形や突出の頻度は、封入したデスミン濃度の増加に伴い増加した。同条件下ではアクチン線維による液滴からの突出は確認できなかった。この結果は、今まで報告されておらず、中間径フィラメントの集合が細胞空間へ潜在的な力学作用を及ぼす

ことを示唆する。さらに、デスミンとアクチンを共存させた条件下で、液滴の変形頻度が単体に比べて2倍増加した一方で、液滴からの突出頻度は低下した。この結果は、この2種のフィラメントの協調作用を示す。

デスミンまたはアクチンのフィラメント成長過程の寄与を確認するため、デスミン4量体から集合開始させた場合と予めフィラメント形成させた場合とで比較した。液滴からの突出は、集合開始させた場合のみ観察され、液滴の変形頻度はフィラメントの場合には低下した。デスミンとアクチンを異なる蛍光波長の色素で標識したことにより、液滴内でのそれぞれの局在を確認できた。デスミン集合開始させた場合には、アクチンとデスミンは時間経過により共局在する傾向にあった。画像比較では平均0.74の相関値を示した。それに対して、成熟デスミンフィラメントの場合には、デスミンとアクチンとの分布の相関値は0.5に低下した。これはアクチンの重合過程には依存しなかった。本研究により、デスミン中間径フィラメントは、そのフィラメント形成過程で空間周囲に比較的強い力学作用をもつこと、そしてアクチン線維と協調的ネットワークを形成できることが明らかにされた。この成果の詳細は査読付き学術誌 *Cytoskeleton* に発表されている (Y. Miyasaka, K. Murakami, K. Ito, J. Kumaki, K. Makabe, K. Hatori, Condensed desmin and actin cytoskeletal communication in lipid droplets, *Cytoskeleton*. 76 (2019) 477-490. doi:10.1002/cm.21573)。

(2) 細胞サイズ液滴内でのデスミンのリン脂質膜との選択的相互作用

油中液滴内でのデスミン集積が液滴界面のリン脂質の種類に依存するかどうかを調査した。デスミン集合条件は、液滴の変形や突出が発生しないデスミン濃度 0.1 mg/mL とイオン濃度 25 mM KCl に設定した。デスミンはローダミンマレイミドにより蛍光標識させた。リン脂質、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (DOPS) の3種類を試験した。それぞれをミネラルオイルに溶解させ、そこへデスミン溶液を加えて油中液滴を形成させた。デスミン集合開始10分後ですでに、液滴界面のDOPEおよびDOPS層にデスミンの集積が認められた。一方で、DOPC層液滴内で、デスミンは均一に分布する傾向がみられた。DOPSは3種の中で唯一負電荷の脂質であるにもかかわらず、DOPEと同様なデスミン集積を示したことは、この集積が静電相互作用のみに支配されていないことを示す。成熟フィラメント形態のデスミンの封入では、DOPE層で集積したが、DOPS層液滴内では均一分布を示した。デスミンの形態によりリン脂質への作用が変化することを意味する。さらに、リポソームを包含する液滴内で、DOPEリポソームにデスミンは集積し、DOPCリポソームではなかった。このことは液滴内リン脂質層のみならず、リポソームの凸面状のDOPE二重層膜表面にもデスミンが集積できることを示唆する。本研究により、デスミン中間径フィラメントがその形態とリン脂質種に依存して膜表面での作用が制御される可能性が明らかにされた。この成果の詳細は査読付き学術誌 *BBCRC* に発表されている (K. Murakami, M. Sato, Y. Miyasaka, K. Hatori, Selective association of desmin intermediate filaments with a phospholipid layer in droplets, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 555 (2021) 109-114. doi:10.1016/j.bbrc.2021.03.131)。

(3) シングルデスミンフィラメントの可視化と二価カチオンの伸長への効果

成果(1)と(2)では、デスミン像はネットワーク状のあいまいな蛍光像をとって得られていた。デスミンフィラメントとアクチン線維やリン脂質膜との相互作用の詳細な機序を知るために、1本のフィラメントを蛍光イメージングできる条件を探索した。AZDye488 マレイミドにより精製デスミンを標識し、20%の標識デスミンを含む0.1 mg/mLのデスミン溶液を、KClとMg²⁺、Ca²⁺、Sr²⁺の各2価カチオンの添加により開始させた。観察時に50倍に希釈した。37度で1時間のインキュベーションにより、1 μm程のフィラメントを1本1本分離して観察することができた。3時間のインキュベーションでは、長さ10 μm以上のフィラメントを含む平均長2 μmのフィラメント群を確認した。24時間ではフィラメントが絡まり合うネットワークが頻発した。デスミンフィラメントの成長(ULF末端結合)はいずれの2価カチオンでも促進された。そしてKClを含まない場合と100 mM KClの場合にはネットワーク形成も増加することがわかった。超解像顕微鏡法によりネットワーク中のフィラメント間の会合を可視化できることを示した。さらに2価カチオン存在下で成長させたフィラメントの蛍光強度が非存在下に比べて3倍高いことを見出した。本研究により、中間径フィラメントに集合における2価カチオンの効果がシングルフィラメントレベルで明らかになり、今後アクチン線維との1対1相互作用の調査が可能となる。この成果の詳細はプリプリントとし発表されている (M. Sato, T. Ishizaka, J. Hotta, K. Hatori, Fluorescence microscopic imaging of single desmin intermediate filaments elongated by the presence of divalent cations in vitro. Available at SSRN: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4055302>)。

(4) ポリマーを結合させたアクチン線維の運動能力試験

細胞骨格を構成するひとつであるアクチン線維は、細胞動態に重要な役割をもつ。中間径フィラメントとは異なり、ミオシンモータータンパク質と作用することで能動的な運動を発生させ、細胞内秩序に貢献する。中間径フィラメントとアクチン線維との相互作用を考える上で、アクチ

ン線維表面に位置する物質やタンパク質が、アクチンとミオシンの相互作用にどのように影響するのは重要である。アクチン分子に種々のサイズのポリエチレングリコール (PEG) マレイミドを結合させ、*in vitro* 運動試験法により運動能のサイズ依存性を調査した。PEG 分子量 2000 までは、線維中のアクチンすべてに PEG を付加しても、ミオシン分子上での運動速度と運動する線維割合は、通常と同等であった。分子量 5000 では、線維中 20%含有量で著しく運動する線維割合が減少し、60%以上の含有量では運動を示さなかった。一方で、PEG アクチン含有量の増加に伴って、ミオシン ATPase 分解量が減少したが、PEG 分子量による違いがなかった。これは PEG 分子量 2000 付加では運動性が維持されながら、ATP 消費量が低いことを意味する。本研究により、アクチン線維周辺部での付加物質の大きさに依存した運動性や酵素活性の変調が明らかにされた。この成果の詳細は査読付き学術誌 *Macromolecular Bioscience* に発表されている (Y. Sunada, K. Hatori, Polymer carrying ability of actin filaments interacting with myosin motors in a biological motility system *in vitro*, *Macromol. Biosci.* 2100471 (2022) 2100471. doi:10.1002/mabi.202100471)。

(5) アクチン線維とミオシンとの相互作用に対する塩基性タンパク質の効果

細胞内には種々のタンパク質が存在し、特異的または非特異的にタンパク質間で相互作用する。一般的に特異的で強い相互作用は、生理機能に直結するために積極的に調査が進められている。その一方で、静電作用のような非特異的相互作用は、細胞内で広く存在すると考えられるが、その作用がもたらす意義ははっきりしていない。そのような弱く可逆的な相互作用は、細胞骨格の組織化に寄与しているかもしれない。塩基性タンパク質のリゾチームがアクチン線維に静電的に結合することが報告されているが、この結合がアクチン線維のミオシンとの相互作用にどのように影響するかはわかっていない。ミオシン結合ガラス表面上でのアクチン線維運動の観察において、溶液中のリゾチーム濃度の増加に伴い速度が低下した。リゾチームを除くことで可逆的に速度は回復した。速度と同様に、アクチン活性化ミオシン ATPase 活性も低下した。共沈降実験によりリゾチームはアクチンだけでなくミオシンにも結合することがわかった。さらにヒストンやラクトフェリンといった塩基性タンパク質も速度を低下させた。本研究により、アクチン線維へ静電的に非特異的に結合するタンパク質が存在し、アクチンとミオシンの相互作用を変調する可能性が明らかにされた。この成果の詳細は査読付き学術誌 *International Journal of Biological Macromolecules* に発表されている (M. Okami, Y. Sunada, K. Hatori, Lysozyme-induced suppression of enzymatic and motile activities of actin-myosin: Impact of basic proteins, *Int. J. Biol. Macromol.* 163 (2020) 1147-1153. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.040.)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okami Masaki, Sunada Yuma, Hatori Kuniyuki	4. 巻 163
2. 論文標題 Lysozyme-induced suppression of enzymatic and motile activities of actin-myosin: Impact of basic proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 1147 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Keigo, Sato Masashi, Miyasaka Yoshiya, Hatori Kuniyuki	4. 巻 555
2. 論文標題 Selective association of desmin intermediate filaments with a phospholipid layer in droplets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 109 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyasaka Yoshiya, Murakami Keigo, Ito Koji, Kumaki Jiro, Makabe Koki, Hatori Kuniyuki	4. 巻 76
2. 論文標題 Condensed desmin and actin cytoskeletal communication in lipid droplets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytoskeleton	6. 最初と最後の頁 477 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cm.21573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sunada Yuma, Hatori Kuniyuki	4. 巻 0
2. 論文標題 Polymer Carrying Ability of Actin Filaments Interacting with Myosin Motors in a Biological Motility System In Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2100471 ~ 2100471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202100471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Masashi、Ishizaka Takumi、Hotta Jun-ichi、Hatori Kuniyuki	4. 巻 0
2. 論文標題 Fluorescence Microscopic Imaging of Single Desmin Intermediate Filaments Elongated by the Presence of Divalent Cations in Vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 SSRN Electronic Journal	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2139/ssrn.4055302	査読の有無 無
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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Sato, M., Murakami, K., Hatori, K.
2. 発表標題 Visualization of single desmin filaments by fluorescence microscopy in vitro
3. 学会等名 58th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上慧伍, 羽鳥晋由
2. 発表標題 リン脂質膜液滴内でのデスミン中間径フィラメントの局在性
3. 学会等名 2020年度生物物理学学会北海道支部・東北支部合同例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Okami, M., Hatori, K.
2. 発表標題 Inhibitory effect of lysozyme on the motility of actomyosin
3. 学会等名 57th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito, K., Hatori, K.
2. 発表標題 Polymerization of actin molecules in the presence of inorganic polyphosphate
3. 学会等名 57th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyasaka, Y., Murakami, K., Hatori, K.
2. 発表標題 Deformations of droplets containing desmin and actin caused by their assembly
3. 学会等名 57th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤雅思, 羽鳥晋由
2. 発表標題 二価カチオン存在下でのデスミン中間径フィラメントの蛍光顕微鏡法による可視化
3. 学会等名 2021年度生物物理学会北海道支部・東北支部合同例会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

羽鳥研究室 http://khatori.yz.yamagata-u.ac.jp
--

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
---------	---------