

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570151

研究課題名(和文)

アクチンファイバーの構造変化は新しい力学刺激受容機構として働く

研究課題名(英文)

Actin filaments function as a tension sensor via tension dependent binding of cofilin to the filament

研究代表者

辰巳 仁史 (TATSUMI HITOSHI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20171720

研究成果の概要(和文)：

アクチン線維の回転方向ゆらぎの測定を行った。アクチン線維をガラス表面に変性ミオシンを介して結合する。このアクチン線維に蛍光粒子をつけた2ミクロン程度のビーズを着けてガラス表面から重力方向にぶら下げる。この蛍光粒子の位置の測定からビーズの回転を計測する。このようにして計測されたアクチン線維の回転方向のねじれゆらぎの振幅はアクチン線維がガラス表面から懸垂している場合には大きく、光ピンセットによりビーズを懸垂方向に引っ張り、アクチン線維に負荷を掛けると揺らぎは小さくなった。これは我々の予想を裏付けるものであった。

研究成果の概要(英文)：

When forces were applied to the filament, it was severed after the application of cofilin with a significantly larger delay in comparison with the control filaments suspended in solution. The binding rate of cofilin to an actin bundle was decreased when the bundle was tensed. These results demonstrate that tension in the actin filament prevents the binding of cofilin, resulting in a decrease in the effective severing activity of cofilin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：コフィリン、アクチン、一分子測定、ねじれ、光ピンセット、

1. 研究開始当初の背景

私達の体を構成するすべての細胞は、重力や外力のみならず体内の骨格筋や平滑筋の動きに起因する様々な機械的刺激に晒されている。細胞は機械刺激(あるいは力学刺激)を受容して細胞内の形態変化などさまざまな反応をしめす。生体膜や細胞骨格には内在ス

トレスが存在し、これらは細胞の成長、分裂、形態変化、運動に伴って変化して、細胞応答を修飾する。しかしその分子機構は全く未解明の状態である。その最大の理由は、機械刺激の感知機構、言い換えるとメカノセンサーの分子実体やその仕組みが不明な点にある。現在唯一明瞭なメカノセンサーは細胞表面の

膜にある機械受容チャネルのみである。我々は遺伝子が同定された機械受容チャネルMid1について、機能ドメインの分析の結果を発表した (Ozeki-Miyawaki, et al., Exp Cell Res. 2005)。またMid1の機能的ホモログを高等植物において発見し発表した (Nakagawa, et al., PNAS 2007)

一方で我々は細胞骨格や接着構造を対象にして研究を進めてきたが、細胞骨格 (ストレス線維: アクチン線維束) が力の伝達媒体として関与することを発見した (論文、2008年発表)。この時点で、力の伝達媒体であるアクチン自身が力学受容の装置として働いている可能性はあったが、科学的に検討することはできなかった。その後、科学研究費補助金基盤 (C) 一般「新しい力学刺激受容機構としてのアクチンファイバー」代表者辰巳仁史 (3550千円、H17-18) により、アクチン繊維が力学受容機構を内在していることを示すデータを得ることができた。この結果はチャネル以外に機械受容する実体が存在することをはっきり示すもので、大変重要なので、現在論文投稿中である。しかし、力学受容機構であるアクチン繊維がどのようなメカニズムで動作しているかは依然不明である。この分子的メカニズムの解明が本研究のテーマである。

機械受容チャネル以外で細胞の張力刺激に応答することが報告されているのは唯一接着関連蛋白質P130Casがある。アメリカコロンビア大学のSheetz博士の研究室の澤田博士の研究は、細胞接着斑の蛋白質群とP130Casの結合特性が張力付加で変化する可能性を間接的なデータから示唆している。一方、本研究は精製したアクチン分子自身に張力受容性があること、その分子メカニズムを解明することを目標とすることで大変独創的である。

2. 研究の目的

上記のように、アクチン線維が力学受容の分子的な実体として働いていることはこれまでの研究から示された。しかし、力学受容機構の本体がどのようなメカニズムで動作しているかは不明である。本研究では2つ実験を行い、現在最も有力な仮説を検討する。

3. 研究の方法

第一の実験: コフィリンによるアクチン繊維の脱重合作用が張力により制御されているメカニズムとして以下の2つの仮説が考えられる。1) 張力によるアクチン繊維の構造変化がコフィリンのアクチン繊維への結合を

制御している。2) 張力の有無にかかわらずコフィリンはアクチン繊維に結合し、アクチン繊維の張力はそれに結合したコフィリンの酵素活性を調節している。これらの仮説を検討するために、以下の実験を行う。

伸び縮み可能なシリコン膜に細胞やアクチン繊維を装着し、アクチン繊維を引っ張った状態あるいは緩めた状態で保持し、そこに外部から蛍光ラベルしたコフィリンを投与して、張力依存的にコフィリンのアクチン繊維への結合が起こることを調べる。予備的な実験結果は1) の仮説を支持するものであった (後述)。これら一連の実験からアクチン繊維に与える張力を減少すると、コフィリンの結合サイトがあらわれて、コフィリンの結合が促進することを示す。

第二の実験: コフィリンのアクチン繊維への結合を制御しているアクチン繊維の構造変化の実態を生物物理学的な実験で検討する。Gアクチンが数珠つなぎになったものがアクチン繊維である。現在考えられる最も有力な仮説は、張力をアクチン繊維に負荷すると、アクチン繊維を構成しているGアクチン分子間の運動の自由度を下げる。その結果、アクチン繊維の軸の周りの回転が抑制されて、その結果コフィリンの結合サイトがファイバーの外部に露出しなくなるというものである。

この仮説を検討するために、アクチンフィラメントにガラスビーズを取り付け、このアクチンフィラメントをカバーガラスに接着することで、カバーガラスからアクチンフィラメントのついたガラスビーズをぶら下げる実験系を構成する。ガラスの比重は水より大きいためにアクチン繊維に張力が負荷される。この実験系にコフィリンを投与して、コフィリンのアクチン繊維への結合によりガラスビーズの回転が生じること、そしてアクチン繊維の切断が生じるかを検討する。回転とともに切断が起きるならば上記の仮説が支持されたことになる。これらの実験により、力学受容機構の本体がどのようなメカニズムで働くかを明らかにする。

4. 研究成果

我々がこれまで実施した実験からコフィリンはアクチン線維にかかる力学的な負荷に依存してアクチン線維の切断を引き起こすことを推測されている。この現象の分子メカニズムを解明するために、平成 21 年度の研究では、アクチン線維への蛍光標識コフィリンの結合度の測定を行った。アクチン線維への蛍光標識コフィリンの結合度の測定を行った。ガラス表面を変性ミオシン分子でコートしておく。ここにローダミンラベルしたアクチン線維を投与するとアクチン線維はガ

ラス面に結合しアクチン繊維のネットワークを形成する。このアクチン繊維のネットワークは例えるならば蜘蛛の巣のような動態をする。そこでこのネットワークをガラスピペットで引っ掻くことで蜘蛛の巣の線維が掻き集められるようにアクチン繊維束が形成される。このアクチン線維束の先端にはガラスピペットの先端が接着しており、線維の反体側の端はガラス面に結合しているため、ガラスピペットをマイクロマニピュレータにより移動することで、アクチン線維束を伸展することができる。このアクチン線維束を全反射近接場光照明し、蛍光分子アレクサで標識したコフィリンを投与すると、コフィリンがアクチン線維束への結合の様子を観察することができる。この結合の頻度を分析するとアクチン線維束が形成されたときの長さ（おそらく自然長）で大きな力学負荷を受けていない場合にはコフィリンの結合の頻度が高く、逆に、ガラスピペットを用いてアクチン線維束を伸展するとコフィリンのアクチン線維束への結合頻度が低下した。このことから、張力依存的なコフィリンの結合の確率の変化が、アクチン線維のコフィリンによる張力依存的な切断の分子的な仕組みであると推定された。このことから、張力依存的なコフィリンの結合の確率の変化が、張力依存的なアクチン線維のコフィリンによる切断の分子的な仕組みであると推定された。

コフィリンがアクチン線維に結合するとアクチン線維のねじれピッチが変化することが電子顕微鏡の観察から知られている。一方で溶液中のアクチン線維のねじれの大きさは揺らいでおり、張力はこのねじれのゆらぎを変化させる可能性があり、張力によるねじれの揺らぎへの影響が最終的にはコフィリンのアクチン線維への結合をコントロールしているかもしれない。この予想を検討するために、平成 22 年度の研究では、アクチン線維の回転方向ゆらぎの測定を行った。アクチン線維の回転方向のねじれゆらぎの大きさは弛緩時には大きく、光ピンセットにより負荷を掛けた場合には回転の揺らぎは小さくなった。これは上記の予想を裏付けるものであった。

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 件)

1. Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T, Tanaka M, Tatsumi H, Taya S, Tsuboi D, Kuroda K, Kaneko N, Sawamoto K, Miyamoto R, Jijiwa M, Murakumo Y, Sokabe M, Seki T, Kaibuchi K and Takahashi M. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein

girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63: 774-787, 2009. (査読有)

2. Machiyama H, Tatsumi H and Sokabe M. Structural Changes in the Cytoplasmic Domain of the Mechanosensitive Channel MscS During Opening. *Biophysical Journal* 97: 1048-1057, 2009 (査読有)
3. Furuichi T, Tatsumi H and Sokabe M. Mechano-sensitive channels regulate the stomatal aperture in *Vicia faba*. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 758-762, 2008. (査読有)
4. Hiroaki Hirata^{1,2}, Hitoshi Tatsumi³, and Masahiro Sokabe^{1,2,3,*} Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner. *J. Cell Science* 121, 2795-2804, 2008 (査読有)
5. Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H and Sokabe M. Cytoplasmic calcium increases in response to changes in the gravity vector in hypocotyls and petioles of Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol* 146: 505-514, 2008. (査読有)
6. Hayakawa K, Tatsumi H and Sokabe M. Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels. *J Cell Sci* 121: 496-503, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 早川、辰巳、曾我部 **Cofilin modulates torsional fluctuations of actin filaments** 生物物理学会年会 2010 年 9 月 22 日 仙台
2. 辰巳、早川、曾我部、生物物理学会年会 **Actin as a mechanosensor** 生物物理学会年会 2009 年 10 月 31 日 徳島 2009 年

[図書] (計 8 件)

1. 植物も重力を感じる：その仕組みとは？辰巳仁史「宇宙環境利用に関する公募地上研究制度」成果を報告書 財団法人日本宇宙フォーラム 出版予定
2. 近接場光のセンシング*イメージング技術への応用 —最新のバイオ 化学 デバイス分野への展開— 辰巳仁史 (分担) 2010 p.181-194 シーエムシー出版
3. Nanotechnology in mechanobiology: mechanical manipulation of cells and organelle while monitoring intracellular signaling Hitoshi Tatsumi¹, Kimihide Hayakawa², Masahiro Sokabe^{1, 2} Book title: Mechanosensing Biology Editor: Masaki Noda Springer 2010 p.3-19

4. 辰巳仁史 近接場光の顕微鏡観察への応用と生命科学への貢献 光技術コンタクト 日本オプトメカトロニクス協会 (JOEM) 2009年 11月号 574-581

5. Hirata H, Tatsumi H and Sokabe M. Zyxin emerges as a key player in the mechanotransduction at cell adhesive structures. *Commun Integr Biol* 1: 192-195, 2008.

6. 接着構造と細胞骨格を用いた細胞移動 第3巻「動物の「動き」の秘密にせまる」辰巳仁史 共立出版 2009年 p. 130-152

7. Mini-Review Critical consideration on the relationship between auxin transport and calcium transients in gravity perception of Arabidopsis seedlings Masatsugu Toyota, 1, † Takuya Furuichi, 1, 2 Hitoshi Tatsumi 1 and Masahiro Sokabe 1, 3, 4, * volume 3 | issue 8 Pages: 521 - 524 August 2008 Plant Signaling & Behavior

8. 細胞科学における光測定の展開：近接場光、光ピンセットを用いた細胞の力応答の研究の紹介 辰巳仁史、早川公英、曾我部正博 *Otol Jpn* 18(1):173-177 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者 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

(2) 研究分担者 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

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

