

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19877

研究課題名(和文)細胞骨格「微小管」がメカノトランスデューサーであることの実験および理論的検証

研究課題名(英文) Experimental and theoretical study of the cytoskeleton "microtubules" as mechanotransducers.

研究代表者

角五 彰 (Akira, Kakugo)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：10374224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「微小管は、細胞内で力学ストレスに対する変換器(メカノトランスデューサー)として機能するという」作業仮説を以下の取り組みを通して検証することを目的とする。力学ストレスにより変調される物質輸送のモータータンパク質種の依存性、微小管の微細構造変化との相関性、動力学計算によるメカニズムの考察を通して検証する。本研究成果は、1)細胞を取り巻く力学環境を研究対象としたバイオメカニクスやメカノバイオロジーなどの学術分野や、2)力学的なストレスが要因とされる外傷性脳損傷などの神経疾患分野、3)力学センサーなどの開発を目指すソフトマテリアルを含めた材料科学分野などへの波及効果も期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞活動において数多くの重要な役割を果たしている微小管には、力学的な情報を処理する機構も有するのではないか？というのが、近年、当該分野において議論の中心となっている。生理学的研究から幾つか傍証が示されているが、直接的な証拠はなく、微小管が力学ストレスに対するトランスデューサーとして機能するという仮説の検証は、大きな学術的インパクトが期待される。本研究成果は、1)細胞を取り巻く力学環境を研究対象としたバイオメカニクスやメカノバイオロジーなどの学術分野へ、2)力学的なストレスが要因とされる外傷性脳損傷などの神経疾患分野へ、3)力学センサーなどの開発を目指す材料科学分野などへの波及効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to verify the hypothesis that "microtubules can function as mechanotransducers of mechanical stress in cells" through the following tasks. First, we investigate the dependence of mechanical stress-modulated cargo transport on motor protein species, second, the correlation with the microstructure changes of microtubules, and third, the analysis of the mechanism by kinetic calculations. The results of this research are expected to have impacts on 1) academic fields such as biomechanics and mechanobiology, where the mechanical environment surrounding cells is the research target, 2) the field of neurological diseases such as traumatic brain injury, where mechanical stress is considered a factor, and 3) the field of materials science, including soft materials, where mechanical sensors and other devices are being developed.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：メカノレスポンス 微小管 力学応答 キネシン 輸送

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の分化、発生、疾患などにおいて、力学的なストレスが大きな影響をもたらすことが今日の生理学的研究から明らかとなってきている。力学的ストレスを感知する細胞内のセンサーとしては、イオンなどを透過するチャネル型と非チャネル型の存在が知られている。近年、細胞の形態形成や細胞内物質輸送などにおいて重要な役割を果たしている細胞骨格「微小管」の非チャネル型力学ストレスセンサーとしての機能に注目が集まっている『Are microtubules tension sensors?』<sup>1)</sup>。しかし、現在までのところ、力学ストレスが微小管の機能を変調するという直接的な証拠は得られてはいない。その理由として、力学ストレスを定量的に印可しながら微小管の生化学的機能を評価する装置が存在しないというのが大きな理由であると考えられる。このような背景のもと申請者らは細胞内環境を模倣しながら細胞骨格「微小管」の力学試験が可能な *in vitro* 系のマイクロ引張圧縮試験機を開発 (*Biomacromolecules* 2014、*Scientific Reports* 2015) するとともに、蛍光イメージング法と組み合わせて微小管一本の力学応答挙動を評価する顕微力学試験機を開発してきた (*Nature communications* 2016、*ACS Nano* 2019)。また、本システムを用い微小管に力学ストレスを印加しながら、モータータンパク質による物質輸送を評価する実験系も確立してきた。最近、モータータンパク質(ダイニン)による物質輸送を評価する過程で、微小管に力学ストレスが印加されると、その物質輸送が変調されるという現象を発見した(*Applied Bio Materials* 2020)。本研究は、得られたこの現象をさらに掘り下げることで「微小管が力学ストレスに対するトランスデューサーとして機能する」という知見を世界に先駆けて提唱できるのではないかと発想のもとで提案した。

### 2. 研究の目的

最近、細胞骨格である微小管に力学的なストレスが印加されるとモータータンパク質(ダイニン)を介した物質輸送が変調されるという現象を発見した (*ACS Applied Bio Materials* 2020)。本研究では、この現象をさらに掘り下げることで、細胞内で微小管が力学ストレスに対するトランスデューサーとして機能するという事実を世界に先駆けて実証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は「微小管は、力学的ストレスを感知し、モータータンパク質の運動性を変調できるトランスデューサーである。」という申請者らの作業仮説<sup>†</sup>に対し、力学ストレスにより変調される物質輸送が、課題 モータータンパク質の種類に依存するのか?、また、課題 微小管の微細構造変化とどう相関するのか?、課題 動力学計算で説明可能か? という課題を通して検証する。

### 4. 研究成果

課題 力学ストレスにより変調される物質輸送のモータータンパク質種の依存性

本課題では、力学ストレスに対する物質輸送の変調現象がモータータンパク質(ダイニン)に依存しない普遍的な現象であることを、ダイニンとは逆方向に物質輸送するモータータンパク質(キネシン)を用いて検証を行った(図1a)。伸縮可能なエラストマー基板に固定された微小管に、積み荷として発光性の量子ドットを複合化したキネシンを結合させる。アデノシン三リン酸(ATP)を添加することでキネシンの滑り運動を誘導し、量子ドットの発光軌跡を顕微観察することで物質輸送を評価した。物質輸送における力学ストレスの依存性は、開発済みの顕微力学試験機を用い、圧縮歪(0~50%)あるいは引張歪(0~10%)を印加することで系統的に評価した。物質輸送の評価は、移動距離/時間、平均移動速度/歪、平均移動距離/歪、停止・移動頻度/歪などの相関解析を用いて行った。その結果、キネシンによる物質輸送観察が可能であること、力学ストレスに対する変調機構はダイニンとは異なる可能性があることが明らかとなった(図1b)。

課題 力学ストレスに対する微小管の微細構造変化と物質輸送との相関解析

本課題では、力学ストレスに対する物質輸送(キネシン)の変調現象と微小管の微細構造変化との相関を、開発済みのマイクロ引張圧縮試験機 (*Nature communications* 2016) と高速原子間力顕微鏡 (AFM) (*Scientific Reports* 2017) イメージ

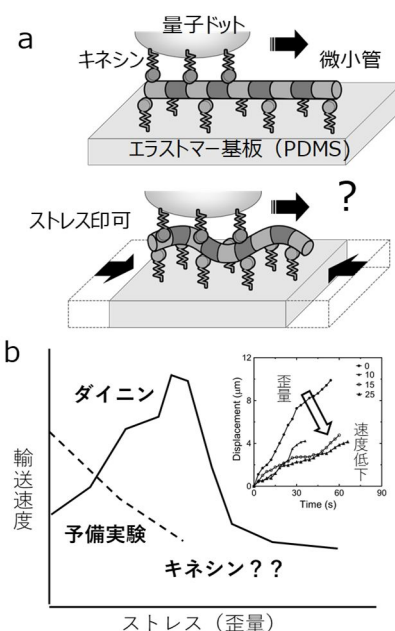


図1.キネシンによる物質輸送評価の概念図 (a)と予備実験結果 (b)。ダイニンとは異なる変調現象が予想される。

ング技術を用いて評価した。得られたイメージング画像から、微小管を構成するチューブリンや、チューブリンの重合体であるプロトフィラメントなどの構造に関する解析を、さらに物質輸送速度、運動直進性、プロフィラメントの追従性などの解析を行うことで、課題では得られない微視的な情報を得ることができた。さらに、力学ストレスにより変形した微小管上でキネシンの1分子観察が可能であることを明らかにした(図2)。

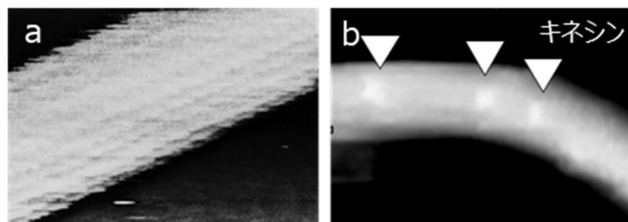


図2. 微小管の高速 AFM イメージング (a) とキネシンによる物質輸送の AFM イメージング (b) の予備実験結果。

#### 課題 動力学計算を用いた力学ストレスと物質輸送との相関解析

本課題では、力学ストレスが印可された際の微小管の構造的変化と、それに伴うモータータンパク質との親和性の変化を「GROMACS」を用いた全原子動力学計算で解析することで、物質輸送変調機構の理論的な考察を行った。全原子動力学計算の対象としては、微小管を構成するヘテロ二量体 ( $\alpha$ -Tubulin/ $\beta$ -Tubulin) とキネシン (kinesin-1) の複合体とした。力学ストレスに対する微小管の構造的変化は、ヘテロ二量体(重心位置)に仮想的な圧縮あるいは引張ストレスを印加することで評価した。またキネシンやヘテロ二量体と結合するヌクレオチド(ATP/GTP)の影響についても検討した。その結果、ヘテロ二量体とキネシン複合体をシミュレーター環境で構築し、実装可能であることが確認された(図3)。課題 - で得られる実験結果を総括し、本研究課題の作業仮説に対する明確な解を得るとともに、微小管がトランスデューサーであるという結論を導いた。



図3. GROMACS 上で構築したのヘテロ二量体とキネシンの複合体。

細胞活動において数多くの重要な役割を果たしている微小管には、力学的な情報を処理する機構も有するのではないかと、近年、当該分野において議論の中心となっている。生理学的研究から幾つか傍証が示されているが、直接的な証拠はなく、「微小管が力学ストレスに対するトランスデューサーとして機能する」という仮説の検証は、大きな学術的インパクトが期待される本研究成果は、1)細胞を取り巻く力学環境を研究対象としたバイオメカニクスやメカノバイオロジーなどの学術分野への波及効果、2)力学的なストレスが要因とされる外傷性脳損傷(TBI)などの神経疾患分野への波及効果、3)力学センサーなどの開発を目指すソフトマテリアルを含めた材料科学分野などへの波及効果も期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nasrin Syeda Rubaiya, Ganser Christian, Nishikawa Seiji, Kabir Arif Md. Rashedul, Sada Kazuki, Yamashita Takefumi, Ikeguchi Mitsunori, Uchihashi Takayuki, Hess Henry, Kakugo Akira	4. 巻 7
2. 論文標題 Deformation of microtubules regulates translocation dynamics of kinesin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abf2211	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Kakugo
2. 発表標題 Microtubules function as mechanosensor to regulate intracellular transport
3. 学会等名 EMBO   EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Syeda Rubaiya Nasrin, Farhana Afroze, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 11
3. 書名 Methods in Molecular Biology, Microtubules-Methods and Protocols	

1. 著者名 Syeda Rubaiya Nasrin, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 11
3. 書名 Methods in Molecular Biology, Microtubules-Methods and Protocols	

〔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
---------	---------