

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：22304

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590312

研究課題名(和文)細胞モデルを用いたミオシン1分子計測の試み：より生体に近い状態での解析を目指して

研究課題名(英文)Development of demembrated cell model suitable for analyzing myosin-sliding

## 研究代表者

石川 良樹 (ISHIKAWA, RYOKI)

群馬県立県民健康科学大学・看護学部・教授

研究者番号：20212863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン繊維は細胞内で種々のアクチン結合蛋白質と結合し、多様な高次構造を形成している。これらの高次構造上でのミオシンとの相互作用様式を探るために、脱膜モデルによるアクチンレール構築を試みた。神経細胞を培養したガラス基板を利用してフローチェンバーを作成し、ファロトキシン存在化で高濃度界面活性剤処理をして脱膜後、チェンバー内の溶液を数度入れかえてもアクチン構造が破壊されない事を確認した。蛍光標識ミオシンを外部から導入したところ、アクチン繊維への結合が確認できた。この系はアクチンの脱重合を阻害しながら脱膜しただけであり、生体に近いミオシン滑り運動解析に有望な系が確立できたと思われる。

研究成果の概要(英文)：We constructed a flow-chamber by using coverslip on which cultured cells had been grown, and cells were treated with surfactants in the presence of high concentration of rhodamine-phalloidin. After changing solutions several times, actin structures remained unchanged. Furthermore, introduction of FITC-labeled myosin II into flow-chamber revealed that it bound to actin structures. Because our system does not contain fixation process, it may be suitable for analyzing myosin-sliding on higher organizations of actin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アクチン ミオシン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、モーター部位が従来のミオシン (ミオシン II) と同じで、他の部分の構造が全く異なる種々のミオシンが見つかり、ほ乳類細胞ではミオシン I、ミオシン II、ミオシン V 等が発現することが判って来た。ミオシン II を含むこれらのミオシン系モーター蛋白質はアクチン細胞骨格をレールとして滑り運動を行い、細胞の遊走、収縮、分裂といった様々な運動の原動力となっている。

(2) アクチンとミオシンの相互作用解析は生物物理学の分野で大きく進展し、1 分子の挙動が予想・観察できるまでになっている。研究代表者もこの分野の研究者との共同研究により、ミオシン V がアクチン繊維上を移動するときの分子形態変化の直接観察 (Kodera et al. (2010) Nature 468, 72-76) や、その時の力発生計測 (Kubota et al (2010) Biochem. Biophys. Res. Commun. 400, 643-648) の発表を行っている。

(3) ところで、これらの研究の大部分は「裸のアクチン線維上」で解析がなされており、実際に細胞内で存在するであろうアクチン形態、すなわち多くのアクチン結合蛋白質を含む高次構造複合体上でのアクチン・ミオシン相互作用解析はほとんど行われてこなかった。

(4) 我々はミオシンの滑り運動が、「裸のアクチン線維」と「高次構造複合体」とでは異なるのではないかと疑問を持ち、その解答を得る第一歩として、精製蛋白質による再構成系の実験を開始した。種々のアクチン結合蛋白質を結合させたアクチンレールを構築し、ミオシン滑り運動解析を行ったところ、いくつかのアクチン結合蛋白質、例えば drebrin、tropomyosin、caldesmon、cofilin 等が結合しているアクチン繊維上でのミオシン滑り運動は、裸のアクチン繊維上の滑り運動とは異なることが明らかになった (Ishikawa et al (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 359, 498-401; Ishikawa et al (2009) 第 82 回日本薬理学会年会; Kubota et al (2010) Biochem. Biophys. Res. Commun. 400, 643-648)。これらのアクチン結合蛋白質は特定の細胞内アクチン高次構造複合体部位に局在しており、当初の予想どおり、細胞各所のアクチン側の高次構造様式によって、ミオシン 1 分子の運動様式が異なるという可能性が高まってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、アクチン高次構造の違いによるレール特性を明らかにし、高次複合体の細胞内機能を探る事を目的として、*in vitro*

再構成系での解析を継続すると共に、ミオシンのレールとして、より生体に近い状態のアクチンレールを構築し、その上でのミオシン 1 分子運動解析に適した系の開発を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) アクチン結合蛋白質が未固定の「生きた」アクチン繊維構造に及ぼす影響: Cy3 蛍光標識アクチン、Cy5 蛍光標識アクチン、ピオチン化アクチン、非標識アクチンを共重合させたアクチン繊維を作成し、アビジンを介してガラス表面に固定する。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を測定することで、未固定のアクチン繊維内部におけるアクチン分子間の相対的距離を感知できる。裸のアクチン繊維と、トロポミオシン、drebrin を結合させたアクチン繊維の比較を行った。

(2) 細胞からのフィロポディア様構造単離と滑り運動観察: グリオーマ/ニューロblastoma のハイブリッドである Ng108-15 細胞を、8 u/ml ローダミンファロイジン存在化、1% Triton-X100、もしくは 1% NP40 で脱膜処理する。細胞を集め 18G シリンジに数回通した後、8000rpm 1 分の遠心で核を取り除き、12000rpm 10 分の遠心で沈殿した画分を得る。これを高濃度コロジオン処理したカバーガラスに固定してフローチェンバーを作成し、蛍光ビーズ標識 HMM を作用させる、ミオシンを固定したフローチェンバーを作成し、精製物を作用させる、という二つの手法で滑り運動の観察を試みた。

(3) 細胞モデル構築によるミオシン滑り運動解析の試み: Ng108-15 細胞をポリリジンコートしたカバーガラス上で培養し、両面テープをスペーサーとしてスライドガラス上にフローチェンバーを作成する。これに 8 u/ml ローダミンファロイジン存在化、1% Triton-X100、もしくは 1% NP40 で 20 分脱膜処理する。界面活性剤を洗い流した後、蛍光標識ミオシンを外部から導入した。

## 4. 研究成果

(1) アクチン結合蛋白質が未固定の「生きた」アクチン繊維構造に及ぼす影響: 裸のアクチン繊維における FRET 効率はおよそ 20~30% 程度であり、これに飽和レベルのトロポミオシン、drebrin を結合させると効率がそれぞれ 1.5 倍、2 倍程度上昇するという結果が得られた。これは、トロポミオシン及び drebrin が結合することで、アクチン繊維内の分子間距離が縮まったことを示唆している。ただしアクチン繊維は 2 重らせん構造なので、縦方向に縮んだのか、横方向に縮んだのかは不明のままである。いずれにしろ、未固定のアクチンにおいて、アクチン結合蛋白質

白質がアクチン構造を調節していることが明らかになった。

(2) 細胞からのフィロポディア様構造単離と滑り運動観察：フィロポディア様構造物をガラス上に固定し、フローチェンバーを作成するところまでは成功した(図1)。しかし、



図1：基盤上に固定した、Ng108-15細胞から単離したフィロポディア様構造

蛍光ビーズ標識HMMを種々の条件で作用させたが、ビーズは構造物に結合しなかった。また、ミオシンをガラス上に固定したいいわゆる *in vitro* motility assay 法を用いて、構造物をチェンバーに流し込んだが、こちらもがガラス表面への結合は観察できなかった。アクチンとミオシンの結合を阻害するなんらかの因子がこの構造物に付着している可能性があり、この手法はアクチンミオシン滑り運動解析には適さないものと思われる。

(3) 細胞モデル構築によるミオシン滑り運動解析の試み：研究の方法の項で述べた手法により、溶液を入れかえられるフローチェンバーの作成に成功した。図2は、外液を3回及び4回置き換えた細胞モデルのアクチン像である。アクチン構造が微妙に変わっている場所もあるが、破壊は見られない。

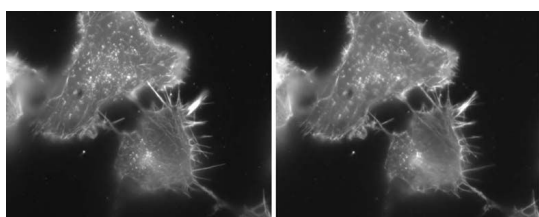


図2：1% NP40で作成した、Ng108-15細胞脱膜モデルの蛍光アクチン像。左はモデル作成後3回外液を入れかえたもの、右はさらにもう1回外液を入れかえたもの

次に、この系に蛍光標識ミオシンを作用させたところ、蛍光ミオシンはアクチンと共局在を示した(図3)。この系は、アクチンの脱重合をファロトキシンで抑制しながら脱膜しただけなので、生体に近い状態でのアクチンミオシン滑り運動解析に適しているものと思われる。また、外部から自由に薬物やタンパク質を導入できるので、アクチン構造に関連した生理作用の解析にも広く利用できるものと思われる。

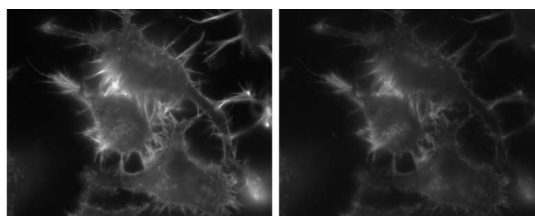


図3：1% Triton-X100で作成した脱膜モデルに蛍光ミオシンを導入したときの、蛍光アクチン像(左)と蛍光ミオシン像(右)

## 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 2件)

(1) Ito N, Shibuguchi N, Ishikawa R, Tanaka S, Tokita Y, Nakajima-Shimada J, Hosaka K. (2013) Identification of alkylbenzene sulfonate surfactants leaching from an acrylonitrile butadiene rubber as novel inhibitors of calcineurin activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 77, 954-960 査読有  
DOI: 10.1271/bbb.120902

(2) Wang HW, Nakamura A, Yoshiyama S, Ishikawa R, Cai N, Ye L.-H., Takano-Ohmuro H, Kohama K. (2012) Down-regulation of myosin light chain kinase expression in vascular smooth muscle cells accelerates cell proliferation: Requirement of its actin-binding domain for reversion to normal rates. *J Pharmacol Sci* 119, 91-96 査読有  
DOI:10.1254/jphs.11213C

〔学会発表〕(計 6件)

(1) Ishikawa R (2014) Properties of the sliding of myosin on actin filaments decorated with various kinds of actin binding proteins. 6<sup>th</sup> Special Conference of the International Society for Neurochemistry “Dynamic Changes of Nanostructure in the Brain in the Health and Disease- Cutting Edge of the Technical Innovation” Tokyo

(2) Monma I, Kobayashi K, Ishikawa R, Honda H. (2014) Modulation of monomer configurations of actin filaments by actin-binding proteins. 第52回日本生物物理学会年会 札幌

(3) 保坂公平、石川良樹、時田佳治、嶋田淳子、田中進、カルシニューリン活性の新規阻害剤としてのアルキルベンゼンスルホン酸の

同定 第 86 回日本生化学会大会 横浜

(4) 中村彰男、松本篤、王洪輝、謝策、吉山伸司、河原田律子、高頸、石川良樹、小濱一弘 (2013) 血管平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼのアクチン連関による新しい機能 第 86 回日本薬理学会年会 福岡

(5) 大室弘美、王洪輝、中村彰男、吉山伸司、石川良樹、Na Cai、叶麗虹、小濱一弘 (2013) 血管平滑筋・細胞核に存在するアクチンとミオシン軽鎖キナーゼ：細胞増殖への関与 第 86 回日本薬理学会年会 福岡

(6) 田邊和也、山崎博幸、石川良樹、齋藤太郎、浅田朋子、白尾智明、久永眞一(2012) Drebrin の Cdk によるリン酸化と神経細胞成熟化における役割 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 良樹 (ISHIKAWA RYOKI)  
群馬県立県民健康科学大学・看護学部・教授  
研究者番号：20212863

### (2) 研究分担者

中村 彰男 (NAKAMURA AKIO)  
群馬大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：30282388

本多 元 (HOMDA HAJIME)  
長岡技術科学大学・工学部・准教授  
研究者番号：20192742