

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26560208  
研究課題名(和文) ストレスファイバーの3次元分子構造の解明  
  
研究課題名(英文) 3D microstructure of actin stress fibers  
  
研究代表者  
出口 真次 (Deguchi, Shinji)  
  
大阪大学・基礎工学研究科・教授  
  
研究者番号：30379713  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ストレスファイバー(SF)は非筋細胞内に現れる繊維状のタンパク質複合体である。SFは個々の細胞レベルでの炎症促進応答沈静化機能など多様なはたらきがあるが、その3次元の分子構造はいまだ定かでなく、そのはたらきの根源には不明な点が多い。本研究では細胞からSFを単離してその微細構造を調べた。特にSFと焦点接着斑の境界部に特徴的な構造を認め、その構造形成における非筋-アクチニンの役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Stress fibers (SFs) are filamentous protein complexes present within nonmuscle cells. SFs have been implicated in various cellular functions including control of pro-inflammatory signaling, but as their 3D microstructure remains unclear, the molecular/physical mechanisms underlying the diverse functions remain to be elucidated. Here we isolated functional SFs to reveal a specific microstructure associated with nonmuscle alpha-actinin at the boundary between the individual SFs and focal adhesions that are located at the termini of the SFs.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：ストレスファイバー 焦点接着斑 非筋-アクチニン

### 1. 研究開始当初の背景

ストレスファイバー (Stress fiber、以降 SF と略記) は非筋細胞 (分裂能を保持したあらゆる哺乳類細胞) に現れうる、線維状タンパク質複合体である。SF は古くから知られるように細胞の移動を促す収縮力の発生を担うとともに、最近では非筋細胞の「力学環境への適応」という機能に本質的な役割を果たすことが明らかにされている (出口、細胞工学 2012 年 9 月号、学研メディカル社)。動脈硬化における慢性炎症への密接な関与も示唆されており (Hahn, Schwartz, Nature Reviews Mol. Cell Biol. 10, 53-62, 2009)、その生物学的・医学的重要性から注目が集まっている。このように (昨今とりわけ分子生物学的) 関連研究が競われている状況において、未だ SF の構造を明らかにした研究はない。個々の細胞の力学的・適応的機能を左右し、ひいては我々の健康に影響を及ぼす SF の分子構造が不明のままである理由として、SF の構造が外乱に反応して常に変動するために実体が捉えづらく、容易には通常の構造生物学の手法を適用できないことが挙げられる。研究代表者の出口はこれまでに SF をその機能 (具体的には、収縮能を左右するミオシン調節軽鎖のリン酸化) を維持したまま細胞から単離し (Deguchi et al., J Cell. Biochem. 113, 824-832, 2012 など)、機械工学と生化学の技術を組み合わせた手法により発生収縮力を明らかにしてきた。また、SF の機械的特性計測に成功した研究 (Deguchi et al., J. Biomech. 39, 2603-2610, 2006) も行ってきた。最近では、生来不安定な SF の (巨視的レベルでの) 形態を再現性よく統一するマイクロパターンニング技術の開発に成功している (出口、他、特願 2012-109957)。そこでこれまで培った独自技術を武器に SF の分子的・力学的構造の解明に取り組む。

### 2. 研究の目的

我々の体を構成する多くの細胞の形態や動きは、細胞膜の裏打ち構造であるストレスファイバー (SF) によって決定される。しかし SF の分子構造を含め、その振る舞いの動作原理はほとんど分かっていない。本研究では、これまでに申請者が開発した独自の技術 (SF の分子局在を人為的に操作し、さらに細胞内環境に近い条件で単離する技術) により、SF の 3 次元構造の解明を目指す。そこから初めて浮き彫りにされる SF の動作原理の理解は、生体を構成する多くの細胞種の機能に直結するため、将来的には医療や創薬の基礎的知見として役立つと期待される。

SF および焦点接着斑 (focal adhesions) は、膜貫通型細胞外基質受容体の integrin を含むタンパク質複合体である。その境界部細胞質側では talin を介して actin と結合している。焦点接着斑は、SF 内の actin と相互作用する nonmuscle myosin II の収縮活性に依存して結合タンパク質やそのリン酸化状態が変化し、

ひいては細胞の増殖・自死・分化に関わるシグナル伝達を調節する。昨今、この境界部の分子構造の解明を目指した研究が進められている。例えば、Waterman グループは固定試料について 3 次元での超解像蛍光顕微鏡観察を行い、幾つかのタンパク質が焦点接着斑の z 方向 (細胞膜側から細胞質側へ向かう方向) に沿ってどのように分布しているのかを示した。また Hersen・Bershadsky グループは生細胞について超解像観察を行い、個々の焦点接着斑がさらに細いサブフィラメントから形成されていることを示した。Medalia グループはクライオ電子顕微鏡を用いて、焦点接着斑の上方に actin から成る層があることを示した。しかしこの手法では分子特異的な観察が難しく、actin 以外のタンパク質が具体的にどのように構造形成に関与しているのか定かでない。このように多くの研究が行われているが、SF と焦点接着斑の境界部に存在し、nonmuscle myosin II 依存的な構造成熟化に関与することが知られる nonmuscle  $\alpha$ -actinin (actin 架橋タンパク質) が焦点接着斑の構造形成に果たす役割ははっきりとは分かっていない。そこで本研究では、蛍光顕微鏡と原子間力顕微鏡 (atomic force microscopy, AFM) を併用し、SF そのもの、および SF と焦点接着斑の境界部の微細構造に果たす nonmuscle  $\alpha$ -actinin の役割を調べる。

### 3. 研究の方法

胚性血管平滑筋細胞株 A7r5 細胞を用いて実験を行った。この細胞が発現する  $\alpha$ -actinin に注目し、その分子種を mRNA レベルで調べたところ、 $\alpha$ -actinin-1 と  $\alpha$ -actinin-4 の発現が見られた (Fig. 1)。前者は従来の非筋型の  $\alpha$ -actinin であり、actin への結合に対して  $\text{Ca}^{2+}$  感受性があるが、後者にはそれが無いのが特徴である。これらの  $\alpha$ -actinin あるいはもうひとつの焦点接着斑結合タンパク質である vinculin のそれぞれを A7r5 細胞に安定発現した株を作製し、上記背景で記した既に発表済みの方法を用いて、ミオシン調節軽鎖のリン酸化を維持したまま細胞膜を溶解して、SF および焦点接着斑を  $\text{K}^{+}$  でイオン強度を 100mM に調整した緩衝溶液内で単離して剥き出しにし、化学固定を行った。さらに蛍光

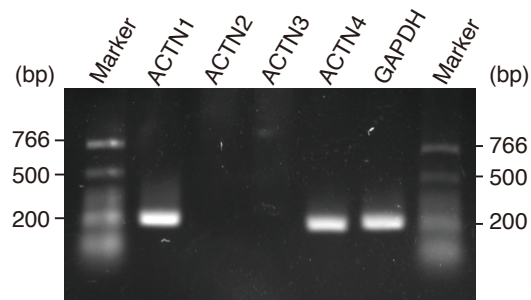


Fig. 1 Expression of  $\alpha$ -actinin isoforms in A7r5 cells.

ファロイジンを用いて F-actin の標識を行い、AFM 用の測定試料とした。この試料について AFM のタッピングモードで形状測定を行い、同時に蛍光顕微鏡観察を行って actin filament および  $\alpha$ -actinin あるいは vinculin のいずれかの局在を調べた。

#### 4. 研究成果

観察の結果、細胞外基質に近い側に vinculin の薄い層があり、その上に SF へとつながる actin filament から成る層が存在することがわかった。ここまでは過去の報告と一致しているが、今回は新たに  $\alpha$ -actinin-1 に注目したところ、actin 層の厚みが増す、つまり太さが 7nm 程度の個々の actin filament が積み重なる場所において局所的に  $\alpha$ -actinin-1 の蛍光強度の増加が見られた。つまり  $\alpha$ -actinin-1 は焦点接着斑の actin 構造を多層化するために利用されることが示唆された (Fig. 2)。これは過去の AFM を用いた焦点接着斑の分子構造に関する研究でも明らかにされていなかった新しい知見である一方、焦点接着斑の動態と力学を説明するために提唱されているクラッチモデルを支持するものである。

なお、 $\alpha$ -actinin-4 は SF に沿って発現するものの、焦点接着斑との局在はほとんど見られなかった。また AFM を用いて SF あるいはその末端の接着部の形態を調べても、 $\alpha$ -actinin-4 がアクチンの多層化に明確に関与していることを示す画像は得られなかった。

以上の通り、特に注目した nonmuscle  $\alpha$ -actinin について、その分子種による役割の違いを明示したうえで、SF および焦点接着斑との境界部の分子構造を作るときに分布についてナノメートルスケールで明らかにすることができた。現在は力学的観点に基づいてこのナノ構造の特性について検討を行っており、それが完了次第論文として投稿する予定である。

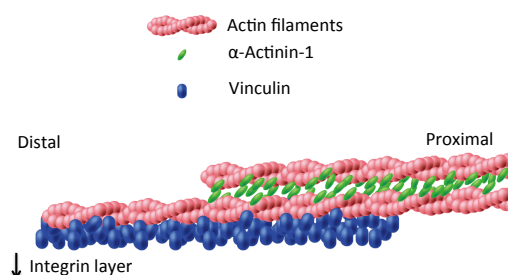


Fig. 2 Model for the mechanical architecture of focal adhesions.

#### 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 Deguchi, S., Saito, A.C., Matsui, T.S., Huang, W.J., Sato, M., The opposite mechano-response of paxillin

phosphorylation between subcellular and whole-cell levels is explained by a minimal model of cell-substrate adhesions. Journal of Biomechanical Science and Engineering, in press.

doi: 10.1299/jbse.16-00670

- ② Deguchi, S., Hotta, J., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Viscoelastic and optical properties of four different PDMS polymers. Journal of Micromechanics and Microengineering, 25, 097002, 2015. doi: 10.1088/0960-1317/25/9/097002
- ③ Yokoyama, S., Kamei, Y., Matsui, T.S., Deguchi, S., Low-power laser processing-based approach to plasma lithography for cell micropatterning. Journal of Bioanalysis and Biomedicine, 7(3), 81–86, 2015. doi: 10.4172/1948-593X.1000128
- ④ Deguchi, S., Kudo, S., Matsui, T.S., Huang, W., Sato, M., Piezoelectric actuator-based cell microstretch device with real-time imaging capability. AIP Advances, 5(6), 067110, 2015. doi: 10.1063/1.4922220
- ⑤ Saito, A.C., Matsui, T.S., Ohishi, T., Sato, M., Deguchi, S., Contact guidance of smooth muscle cells is associated with tension-mediated adhesion maturation. Experimental Cell Research, 327(1), 1–11, 2014. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.05.002
- ⑥ Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S., Microcontact peeling as a new method for cell micropatterning. PLOS ONE, 9(7), e102735, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0102735

[学会発表] (計 13 件)

- ① Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Araki, T., Ohishi, T.: An alternative method for traction force microscopy. International Symposium on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
- ② Matsui T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Biophysical properties of single actin stress fibers isolated from cultured smooth muscle cells. International Symposium on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
- ③ Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S.: Development of a new technique for cell micropatterning. International Symposium

- on Mechanobiology, Okayama, May 20-23, 2014.
- ④ Yokoyama, S., Matsui, T.S., Deguchi, S.: A novel cell micropatterning technique to circumvent direct adsorption of proteins to PDMS. The 4th Japan–Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.
- ⑤ Matsui, T.S., Sato, M., Deguchi, S.: Load-dependent contractile force generation of actin stress fibers. The 4th Japan–Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.
- ⑥ Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Araki, T., Ohishi, T.: Force balance in mesenchymal cells revealed by new traction force microscopy. The 4th Japan–Switzerland Workshop on Biomechanics, Shima, Sep 1-4, 2014.
- ⑦ Deguchi, S.: Active biophysical properties of cells and subcellular components. 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Nov 9-12, 2014.
- ⑧ Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S.: Force microscopy developed for screening studies on cultured cells. The 62nd NIBB Conference, Force in Development, Okazaki, Nov 17-19, 2014.
- ⑨ Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Kato, K., Araki, T., Ohishi, T., Kuragano, M., Takahashi, M.: Role of nonmuscle myosin regulatory light chain phosphorylation in contractile force generation. 15th International Congress of Biorheology, Seoul, May 24-28, 2015.
- ⑩ Deguchi, S., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Kato, K.: Roles of nonmuscle myosin II in contractile force generation. 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics. Sapporo, Sep 16-19, 2015.
- ⑪ Matsui, T.S., Deguchi, S.: Revealing the dynamics and molecular regulation of actomyosin bundles. 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics. Sapporo, Sep 16-19, 2015.
- ⑫ Araki, T., Yokoyama, S., Matsui, T.S., Ohishi, T., Kato, K., Deguchi, S.: The effect of substrate curvature on myosin-based frictional slip and elongation of focal adhesions. 2015 BMES Annual Meeting. Tampa Convention Center, Oct 7–10, 2015.
- ⑬ Deguchi, S., Matsui, T.S.: Characterizing the biophysical properties of individual actin stress fibers. 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Nov 23-25, 2015.
- [図書] (計 2 件)
- ① Kaunas, R., Deguchi, S., Cyclic stretch-induced reorganization of stress fibers in endothelial cells. In Vascular Engineering. Eds: Tanishita, K., Yamamoto, K., Springer, 99-110, 2016.
- ② 出口真次, 松井翼, 佐藤正明, Dojin Bioscience シリーズ・メカノバイオロジー. 細胞が力を感じ応答する仕組み. 第 2 章 細胞における力の発生と維持機構. 17-33, 2015.
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- [その他]  
大阪大学・出口研究室ホームページ  
<http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
出口 真次 (DEGUCHI, Shinji)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授  
研究者番号：30379713
- (2) 研究分担者  
上野裕則 (UENO, Hironori)  
愛知教育大学・教育学部・准教授  
研究者番号：70518240
- (3) 連携研究者  
松井翼 (MATSUI, Tsubasa)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・講師  
研究者番号：50638707
- (4) 研究協力者  
今村道博 (IMAMURA, Michihiro)  
国立精神・神経医療研究センター神経研究所・遺伝子疾患治療研究部 室長  
研究者番号：80221787