

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Japan Agency for Medical Research and Development (PRIME)

研究開発課題名： (日本語) アクチン線維がメカノセンサーとして働くメカニズムの解明
(英語) Analysis of the molecular process of mechano sensing in a single actin filament

研究開発担当者 (日本語) 金沢工業大学 教授 辰巳仁史
所属 役職 氏名： (英語) Kanazawa Institute of Technology Professor Hitoshi Tatsumi

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）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機械的刺激を受容してさまざまな応答を示す。こうした力学刺激は細胞膜や細胞骨格の変形と張力の変化をもたらす。特にアクチンストレス線維はこのような外力だけでなく、それ自身の収縮と弛緩によってアクチン線維の張力を変化させる。こうした張力の変化は、細胞の増殖、分化、運動などの基本的機能を調節し、生命の維持に重要であることが知られている。しかし、膜や細胞骨格の張力変化がどのようにして細胞応答を調節しているかは、よく分かっていない。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とメカノセンサーが細胞の構造や機能に影響をあたえる仕組みの多くが不明な点にある。

我々はアクチン線維がメカノセンサーとして働きうることを実験的に示してきた。球状のタンパク質分子である G アクチン（線維内ではアクチンプロトマーと呼ぶ）を試験管の中で“重合”させると、数 μm から数十 μm のアクチン線維ができる。アクチン線維の片方の端を大きなビーズ、別の端に数 μm の小さいビーズを付け、光ピンセットでトラップして小さいビーズを操作することで、アクチン線維がピンと張った状態にできる。トラップを外せばアクチン線維が緩んだ状態にすることもできる。

ここでアクチン線維切断因子（タンパク質分子）コフィリンの入った溶液中でアクチン線維を引っ張り、あるいは緩めると、引張時には、コフィリンがいるのに切断されず、緩んだとき（“負”の張力変化）によりコフィリンによる切断が生じた。ここからアクチン線維は張力上昇を感知して、コフィリンによる切断を阻害することが分かった。この結果はアクチン線維がメカノセンサーであることを明瞭に示す大変重要な知見となった（Hayakawa et al., 2011 JBC）。アクチン線維束を引っ張った状態、あるいは緩めた（張力が減少した）状態で保持し、線維束へのコフィリンの結合を分析したところ、緩んだアクチン線維束にコフィリンが高頻度で結合した。このことから、アクチン線維が緩むとコフィリンの結合サイトが現れてコフィリンの結合が促進することが示唆された。

コフィリンのアクチン線維への結合は一分子イメージング法による我々の研究（Hayakawa et al., 2014 PNAS）から、複数個のコフィリンがクラスターを形成してアクチン線維に結合し、その部分でアクチン線維が長軸の周りにねじれていることが分かっている。そこからクラスター状にねじれたアクチン線維にコフィリンが結合しやすいと推定されている。

コフィリンのアクチン線維への結合実験と統計力学に基づくモデル分析から、アクチン線維の上にねじれのクラスターが自発的に形成されて、そこにコフィリンが結合することでクラスターが形成されることが明らかになった。これらを総合すると、最も有力なアクチン線維力学センサーの動作メカニズムは“張力が発生していないアクチン線維にはねじれのクラスターが自発的に形成される。そして張力発生するとねじれのクラスター形成を抑制する”である。本研究では、張力あり張力なしの時のアクチン線維のねじれのクラスター形成を一分子イメージングで解析し、上記仮説を検証する。本年度はこの目的を達成するために必要な実験装置の基本部分を導入した。具体的には研究装置の土台となる徐震台、顕微鏡装置の本体部分の導入を行った。また、観察対象であるアクチン線維の重合条件と蛍光ラベルの方法の検討を行った。

（英文） The cells which make up our bodies are continually exposed to various mechanical stimuli, such as, muscle contraction, ongoing blood flow, blood pressure, distension of visceral organs, etc., which initiate a wide range of cellular responses. These responses include Ca^{2+} mobilization, protein phosphorylation, rearrangement of

the cytoskeleton, transcriptional regulation, apoptotic cell death, and cell differentiation. Mechanical forces are sensed by mechanosensors that presumably undergo change in their enzymatic activity or interaction with signaling molecules in response to forces. However, the particular molecular entities and the underlying biophysical mechanisms of these mechanosensing molecules are largely unknown except for the mechanosensitive (MS) channels.

A recent our in vitro study (Hayakawa et al., 2011, JBC) revealed that the actin filament itself functions as a mechanosensor. One end of a single actin filament was tethered to a myosin-coated bead fixed on a coverslip, while the other end was tethered to a small myosin coated bead manipulated with optical tweezers so as to tense the filament. When the filament was tensed (~30 pN), it was severed by cofilin with a larger delay compared with the filament when it was not tensed, or was not severed within the observation period (ca. 30 sec). Additionally, the binding of cofilin to the bundles of actin filaments was imaged with fluorescein labeled cofilin, which showed that the rate of the binding of cofilin to the actin bundles decreased when the bundles were tensed. Approximately 2 pN of force is sufficient to decrease the apparent severing activity of cofilin, which is comparable to the force generated by a single myosin head.

To conduct the analysis of molecular process of mechano sensing in a single actin filament we have constructed a basic part of newly designed microscope, which consist of polarized light TIRFM imaging unit and high speed imaging cameras.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. Nomura, K., K. Hayakawa, H. Tatsumi, and S. Ono. Actin-interacting Protein 1 Promotes Disassembly of Actin-depolymerizing Factor/Cofilin-bound Actin Filaments in a pH-dependent Manner. *The Journal of biological chemistry*. 2016. 291:5146-5156. DOI 10.1074/jbc.M115.713495
2. 辰巳仁史、知りたいものは“状態”ではないか？中山人間科学振興財団 25 周年記念報告集 “ 25 年の歩み “ p. 115–116 2016 年出版 出版：中山書店

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

頭発表：

1. “植物の機械刺激受容カルシウムチャネルの重力応答における役割の検討” 中野正貴、古市卓也、曾我部正博、飯田秀利、辰巳仁史 International Symposium on Living in Space 2017 DATE & TIME: 9th March, 2017 PLACE: Hitotsubashi Hall (Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo)

101-8439)国内 Tadaaki Mano (Gifu University of Medical Science) Special Speaker:Tamaki Saito (Tsukuba University)

2. 超解像度顕微鏡によるコフィリン分子のアクチン線維への協同的結合の可視化と分析 辰巳 仁史 H. Tatsumi
9/27 2016 生化学会年会 仙台 セッションテーマ 65: フォーラム3F08 超解像度顕微鏡による生化学の近未来的視点
3. 物細胞の重力反応とその分子機構の推定 辰巳 仁史 日本宇宙生物科学会第30回大会 日時 2016/10/14 場所 愛知医科大学
4. Increase in the Cytoplasmic Free Calcium Ion Concentration in Response to Changes in the Gravity Vector in Arabidopsis Seedlings Hitoshi Tatsumi*, Masataka Nakano, Masatsugu Toyota, Hidetoshi Iida, Masahiro Sokabe, Takuya Furuichi AMS2016 11th Asian microgravity symposium, Sapporo Japan. October 27 Hokkaido University

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1.
 - 大人のためのもういちど小中学校
 - (通算)第21回 10月19 (土) 14時~15時30分
 - 金沢工業大学12号館アントレプレナーズラボ
 - テーマ「地球のくれた贈り物”重力」
 - 講師 辰巳 仁史 教授 (金沢工大 応用バイオ学科)
 - 受講料無料・申込み不要 参加者約20名 (金沢市、野々市市一般市民の皆様)

(4) 特許出願

なし