

特集：タンパク質構造機能相関再考

アクチン線維への物理ストレスに対抗するアクチンホメオスターシスと フォルミンファミリーによる急速線維回生機構

渡 邊 直 樹

機械刺激下の細胞内では、アクチン線維-単量体のホメオスターシスの崩れから、フォルミンファミリーによるアクチン重合核生成頻度が著明に亢進し、迅速な線維回生が起きることが最近明らかにされた。本稿では、フォルミンファミリーの特性とその物理刺激下での細胞内活性化機構を紹介するとともに、アクチン線維の力学的制御に関連すると考えられる線維のコンホメーション制御や、力学的なアクチン脱重合実験における最近の知見と比較することで、物理ストレスによるアクチン線維の安定化・不安定化の制御メカニズムについて考察する。

1. はじめに

多くの生命機能は、「形」となることで具現化する。それを実現するしくみがアクチン細胞骨格系である。アクチンは、受容体や細胞接着が誘導する細胞シグナルの効果器となり、細胞の移動や極性、組織構築など様々な生命機能の発現とともに動的に形を変換する。細胞内において重合・脱重合を迅速に繰り返しながら、パートナー分子と協調した多様な高次線維構造を形成しつつ、複雑に形態を変換させる。

われわれは、細胞内アクチン動態をリアルタイム観察する手法として、極低濃度に導入された蛍光分子を1分子ごとに可視化する蛍光単分子スペckル (single-molecule speckle: SiMS) 顕微鏡¹⁾を用いてきた。冷却 CCD カメラの低ノイズ (暗電流) 特性を生かし2秒程度までのゆったりした露光時間を用いることで、極低濃度で導入された蛍

光標識分子が細胞構造に結合した場合を選択的に単分子可視化する。細胞骨格は刻々と形を変化させるが、本法によって、分子レベルのアッセンブリーと崩壊は、構造全体の変換より速い時定数で起きることが明白にされてきた。

本稿では、機械刺激下の細胞内において新たに見いだされたアクチン重合端の動的な生成メカニズムを紹介するとともに、物理ストレスとアクチン重合・脱重合との関連について考察する。

2. フォルミンファミリーによる プロセシブなアクチン重合

細胞内アクチン線維は、盛んに重合・脱重合を繰り返しており、細胞の先端端に発達する葉状仮足での寿命は平均で30秒ほどである²⁾。最近、われわれはアクチンの単量体-線維のホメオスターシスがアクチン重合因子フォルミンファミリーの活性化にリンクすることを発見した³⁾。フォルミンファミリーは、細胞質分裂や細胞極性形成、アクチンストレス線維形成に必要なアクチン重合促進因子⁴⁾であり、ヒトでは約15個、シロイヌナズナでは約20個の遺伝子にコードされる^{5,6)}。これらは、C末端側にFH1-FH2ユニット構造を共有する。FH2ドメインは、リング状のホモ二量体を形成し、単量体アクチン (Gアクチン) からの重合核形成を加速する。更に、アクチン線維 (Fアクチン) の速い重合端 (barbed end: B端) に連続的に結合しながら

東北大学生命科学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3 東北大学理学部生物棟 505 号)

Regulation of actin dynamics under physical stress: rapid actin filament regeneration by formin homology proteins and F- and G-actin homeostasis

Naoki Watanabe (Laboratory of Single-Molecule Cell Biology, Tohoku University Graduate School of Life Sciences, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan)

ら、プロセッシブに線維を伸ばすユニークな性質^{7,8)}をもつことが、分子構造^{9,10)}とともに解かれてきた。また、FH1ドメインは、プロフィリン-アクチン複合体と結合することにより線維伸長速度を著明に加速し¹¹⁾、細胞内では毎秒720サブユニットものアクチン伸長速度を実現する⁸⁾。元来、アクチンは、Gアクチンが線維末端に衝突する自由拡散速度の限界で伸長する¹²⁾。裸のアクチンプラス端の伸長速度は、細胞内で毎秒66~81サブユニット¹³⁾と推測され、毎秒720サブユニットという伸長速度は、分子アッセムブリーの理論的限界を超えた驚くべき性質と言える。それを

可能とするメカニズムとして、FH1ドメインが複数のプロフィリン-アクチン複合体と結合し、B端周辺にGアクチンを増やす局所集積メカニズム¹⁴⁾が提唱されている。

3. 細胞の物理ストレスに対抗するフォルミンとアクチンホメオスタシス

細胞に物理ストレスが加わると、カルシウムイオンの上昇や接着分子のリン酸化、RhoファミリーGTPアーゼなど細胞内シグナルの活性化が誘発される。われわれは、細胞に機械刺激を与えると、mDialを含むフォルミンファミ

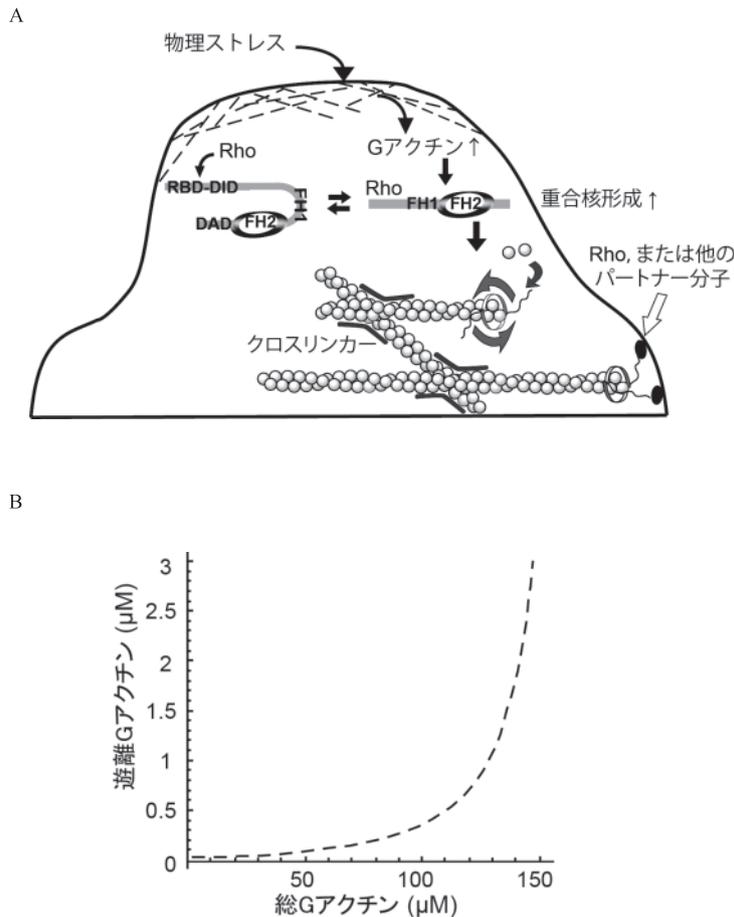


図1 物理ストレスによるフォルミンファミリー mDial の急性アクチン線維再生機構の模式図と G アクチンの総量と遊離量の関係

(A) 細胞が物理ストレスを受けると、なんらかの機序によりアクチンの脱重合が亢進し、G アクチン量が増える。(B) に示すように、総 G アクチンが多い領域では、10~20% の増加が遊離 G アクチンを顕著に増加させる³⁾。一方、mDial の自己抑制的な分子内結合は、低分子量 G タンパク質 Rho によってある確率で解除される³⁵⁾。FH2 ドメインは、遊離 G アクチン濃度の 3 乗に比例して、アクチン重合核を形成するため、わずかな G アクチン量の上昇に反応して、盛んにアクチン重合を行うと考えられる³⁾。また、フォルミンファミリーは、B 端に結合したまま、プロセッシブにアクチンを重合するが、その際 F アクチンのロングピッチらせんに沿って回転する²⁷⁾。Rho などによって細胞膜などに固着された状態で、mDial がプロセッシブにアクチンを重合し続けた場合、ロングピッチらせんをゆるめるトルクが線維にかかる可能性がある。

リーが10秒以内に活性化し、盛んにアクチンを重合することをSiMS顕微鏡によって捉えた(図1A)³⁾。阻害薬を用いた実験から、カルシウムイオンやタンパク質リン酸化が働かなくても、この機構は活性化することが判明した。mDialの場合、Rhoが必要であるが、Rho結合ドメインのないFH1-FH2領域だけでも反応する。また、異なる制御ドメインをもつ複数のフォルミンファミリーが反応することから、なんらかのグローバルな活性化機構の存在が示唆された。

この機械刺激によるmDialのアクチン重合頻度の増加は、アクチン線維の崩壊の程度と強く相関する。また、s-FDAP法¹⁵⁾の精度を改良することで、物理刺激を加えた細胞において単量体アクチンが速やかに増加することも確認した。更に、LIMキナーゼの過剰発現によってアクチン脱重合因子コフィリンを阻害すると、mDialの機械刺激への応答は消失する。細胞内でGアクチンは、隔離タンパク質であるサイモシンβ4ファミリーやプロフィリンによって緩衝され、遊離Gアクチンは低濃度に保たれているが、計算上、総Gアクチン濃度の10~20%の上昇が遊離Gアクチン濃度を2倍以上増加させるレンジがあることがわかる(図1B)³⁾。in vitroでは、mDialによるアクチン重合核形成の頻度は、遊離Gアクチン濃度の3乗に比例する¹⁶⁾。これらの知見を合わせ、アクチン線維崩壊がフォルミンファミリーによるアクチン重合核形成頻度を一過性にサージさせ、線維を迅速回生する、新規のメカノトランスダクション(機械的シグナル伝達)機構の存在を証明した³⁾。

4. 物理ストレスによるアクチン線維崩壊機構

上述したように、アクチンの線維-単量体のホメオスタシスの動的な役割、すなわち、単量体アクチンの放出から線維が急速に回生される機構が明らかになった。SiMS顕微鏡による直接可視化なしに、10秒程度で誘発され、100秒以内に消失するこのような一過性のアクチン重合機構は、明らかにされなかったであろう。

物理ストレスがいかにアクチン線維を崩壊させるかは十分わかっていない。コフィリンのコファクターAIP1(actin-interacting protein 1)が、細胞表層の変形に反応して、2割ほどアクチン線維への会合量(単分子スペックルの密度)が増えることがSiMS顕微鏡で観察されている³⁾。AIP1は、コフィリンと協調してアクチン線維の切断・崩壊を促進するが、コフィリンに切断されたアクチン線維のB端に特異的に結合する¹⁷⁾。実際、コフィリンの活性を阻害するとAIP1の細胞内アクチン線維への結合が減少する¹⁸⁾。よって、SiMS顕微鏡でみられたAIP1のアクチン線維への結合増加は、おそらくコフィリンによるアクチン脱重合の亢進を示している。

物理的な力は、アクチン線維の安定性に影響する。例えば、アクチン線維にかかる張力が直接コフィリンの結合を阻害し、コフィリンによる線維切断の頻度を落とす¹⁹⁾。近年、ミオシンの力の働きも注目されているが、異なる結論が紹介されている。例えば、細胞分裂時においては、ミオシンIIの阻害は、アクチン線維を安定化させる^{20,21)}、あるいは不安定にする²²⁾という逆の効果が報告されている。ケラトサイト²³⁾や培養心筋細胞²⁴⁾ではミオシンの収縮力がアクチン脱重合を促進するという報告がある。ただし、多くの例でミオシンの収縮力が減弱した瞬間の初期の変化は捉えきれず、“生き残った”アクチン線維の性質を観察している可能性も考えられる。

in vitroでは、アクチン線維ネットワークを顕微鏡下で観察しつつ、ミオシン、特に逆行性ミオシンVIを加えて収縮させると、アクチン線維が凝集した後、崩壊することが可視化された²⁵⁾。しかし、個々の線維にどのような力がかかっているかは不明である。最近、原子間力顕微鏡のカンチレバーにGアクチンをくっつけ、ガラス面に付着したFアクチン端を吊り上げる実験が紹介された²⁶⁾。約20pNの引っ張り力がGアクチンの線維端への結合力を最大にするという興味深い所見が報告されている。この論文では、張力が酵母アクチンの113番目のリシンと195番目のグルタミン酸のストランド間での相互作用を促進し、線維を安定化することが提唱されている。これらの知見から、線維にかかる力はアクチン線維の安定化、もしくは不安定化を誘発し、フォルミンファミリーによる重合核形成を促進するしくみを担っている可能性は十分あるが、力学的な細胞内アクチン脱重合誘発のしくみの解明には、より厳密な検証が望まれる。

5. フォルミンによるらせん回転重合と線維安定性への影響の可能性

アクチンの物理的制御には、張力だけが働くのであろうか？ われわれは、単分子蛍光偏光観察を用い、フォルミンファミリーがアクチンを重合する際、線維のロングピッチらせんに沿って回転することを見いだした²⁷⁾。様々な条件下で、約36nmで半回転する線維構造に忠実に沿う動きが観察された。

細胞内において、例えば、出芽酵母のBni1pや分裂酵母For3pは、芽の先端や成長端に結合したままプロセシブに線維を重合し、アクチンケーブルを後方へ連続的に伸ばす。これらの分子は、細胞端でRhoやBud6pやTealpと複合体を形成する。RhoのCAAXモチーフの脂質修飾などを通じて、mDialも含めたこれらのフォルミンファミリーは部分的に細胞膜にアンカーされていると考えられる。アクチンをプロセシブに重合しながらもフォルミンファミリーの自由な回転が阻まれることがあれば、ロング

ピッチらせんが緩む方向に力が発生することが予想される(図1A)。

アクチンの脱重合因子コフィリンが結合した線維は、ロングピッチらせんが逆にきつくなる。アクチンは、重合する際にサブドメイン1-2が3-4に対して回転し、分子の平坦化が起きる^{28,29)}(Odaらの論文²⁸⁾では、フォルミンとアクチンとの共結晶構造と、Fアクチンの構造が詳細に比較されているので参考にされたい)。このとき、主に各ストランド内でのサブユニット間の結合が再構成され、広範な相互作用がつけられる。興味深いことに、コフィリンが結合したFアクチンの高解像構造では、この分子の平坦化が巻き戻され、異なる向きにねじれ、サブドメイン2の位置が大きくシフトする³⁰⁾。これらの所見は、Fアクチンの柔軟性を表すとともに、重合・脱重合における分子やポリマー構造の変換の役割を解く重要な鍵を提示している。

上述したように、フォルミンファミリーが細胞構造にアンカーされながら伸ばす線維はねじれが緩む方向にトルクがかかる可能性があり、アクチン線維のコンホメーションへの影響や安定性にどのように寄与するか興味深い。物理ストレスに対抗してフォルミンファミリーは迅速にアクチン線維を再生するが、回転重合も動員して線維の安定性に影響を与えている可能性があり、興味もたれる。

なお、溶液中では、mDia1が重合するFアクチンは、長い区間にわたり立体構造に影響を受けることが、アクチンのCys-374に結合した標識の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)³¹⁾、蛍光異方性³²⁾、電子スピン共鳴³³⁾の変化から報告されている。ただし、これらは溶液中での観察であり、アクチンやmDia1は特に構造に固定されていない条件下で行われており、らせん回転による制御とは異なるものかもしれない。

6. おわりに

本稿では、アクチン細胞骨格への物理作用とそれに対抗するフォルミンファミリーを介したアクチン線維回生のしくみを中心に解説した。それ以外にも、われわれは、柔軟に形態を変える葉状仮足での速いアクチン線維回転について、SiMS顕微鏡を用い、研究を続けてきた。その過程で、コフィリンやAIP1が関与する脱重合機構が葉状仮足の中で盛んに線維を切断することを、分子キネティクス¹⁸⁾、数理モデル化³⁴⁾によって示してきた。得られた所見から、アクチンのむしろB端近くに線維の切断や崩壊が高頻度で起きている可能性が示唆されている^{2,34)}。

細胞内アクチン線維は、会合分子と協調しつつ様々な巨大高次構造を形成するが、仮足の方向転換や機械刺激への応答の際には、迅速に崩壊し、組換わることが要求される。迅速さを維持しつつ、秩序あるネットワークづくりをアクチン線維重合・脱重合機構がいかに両立させているの

かについては、SiMS顕微鏡によるリアルタイム可視化と、*in vitro*での再構成、詳細な構造解析を組み合わせることで、より多くのことが解明されることを期待している。その知見は、種々のアクチン構造の細胞内でのすみ分けのしくみの解明にも役立つであろう。

文 献

- 1) Watanabe, N. & Mitchison, T.J. (2002) *Science*, **295**, 1083–1086.
- 2) Watanabe, N. (2010) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **86**, 62–83.
- 3) Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K., & Watanabe, N. (2013) *Nat. Cell Biol.*, **15**, 395–405.
- 4) Goode, B.L. & Eck, M.J. (2007) *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 593–627.
- 5) Blanchoin, L. & Staiger, C.J. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 201–206.
- 6) Higgs, H.N. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 342–353.
- 7) Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., & Zigmund, S.H. (2003) *Biochemistry*, **42**, 486–496.
- 8) Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., & Watanabe, N. (2004) *Science*, **303**, 2007–2010.
- 9) Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., & Rosen, M.K. (2005) *Nature*, **433**, 488–494.
- 10) Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I.R., Kuhlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M.A., & Wittinghofer, A. (2004) *Mol. Cell*, **13**, 511–522.
- 11) Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., & Pollard, T.D. (2006) *Cell*, **124**, 423–435.
- 12) Drenckhahn, D. & Pollard, T.D. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 12754–12758.
- 13) Miyoshi, T., Tsuji, T., Higashida, C., Hertzog, M., Fujita, A., Narumiya, S., Scita, G., & Watanabe, N. (2006) *J. Cell Biol.*, **175**, 947–955.
- 14) Vavylonis, D., Kovar, D.R., O’Shaughnessy, B., & Pollard, T.D. (2006) *Mol. Cell*, **21**, 455–466.
- 15) Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., & Mizuno, K. (2011) *J. Cell Biol.*, **193**, 365–380.
- 16) Li, F. & Higgs, H.N. (2003) *Curr. Biol.*, **13**, 1335–1340.
- 17) Okada, K., Blanchoin, L., Abe, H., Chen, H., Pollard, T.D., & Bamburg, J.R. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 43011–43016.
- 18) Tsuji, T., Miyoshi, T., Higashida, C., Narumiya, S., & Watanabe, N. (2009) *PLoS ONE*, **4**, e4921.
- 19) Hayakawa, K., Tatsumi, H., & Sokabe, M. (2011) *J. Cell Biol.*, **195**, 721–727.
- 20) Murthy, K. & Wadsworth, P. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 724–731.
- 21) Guha, M., Zhou, M., & Wang, Y.L. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 732–736.
- 22) Kondo, T., Hamao, K., Kamijo, K., Kimura, H., Morita, M., Takahashi, M., & Hosoya, H. (2011) *Biochem. J.*, **435**, 569–576.
- 23) Wilson, C.A., Tsuchida, M.A., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Applegate, K.T., Yam, P.T., Ji, L., Keren, K., Danuser, G., & Theriot, J.A. (2010) *Nature*, **465**, 373–377.
- 24) Skwarek-Maruszewska, A., Hotulainen, P., Mattila, P.K., & Lappalainen, P. (2009) *J. Cell Sci.*, **122**, 2119–2126.

- 25) Reymann, A.C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.L., Guerin, C., Cao, W., Chin, H.F., De La Cruz, E.M., Thery, M., & Blanchoin, L. (2012) *Science*, **336**, 1310–1314.
 - 26) Lee, C.Y., Lou, J., Wen, K.K., McKane, M., Eskin, S.G., Ono, S., Chien, S., Rubenstein, P.A., Zhu, C., & McIntire, L.V. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5022–5027.
 - 27) Mizuno, H., Higashida, C., Yuan, Y., Ishizaki, T., Narumiya, S., & Watanabe, N. (2011) *Science*, **331**, 80–83.
 - 28) Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y., & Narita, A. (2009) *Nature*, **457**, 441–445.
 - 29) Fujii, T., Iwane, A.H., Yanagida, T., & Namba, K. (2010) *Nature*, **467**, 724–728.
 - 30) Galkin, V.E., Orlova, A., Kudryashov, D.S., Solodukhin, A., Reisler, E., Schroder, G.F., & Egelman, E.H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20568–20572.
 - 31) Bugyi, B., Papp, G., Hild, G., Lorinczy, D., Nevalainen, E.M., Lappalainen, P., Somogyi, B., & Nyitrai, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 10727–10736.
 - 32) Papp, G., Bugyi, B., Ujfalusi, Z., Barko, S., Hild, G., Somogyi, B., & Nyitrai, M. (2006) *Biophys. J.*, **91**, 2564–2572.
 - 33) Kupa, T., Grof, P., Nyitrai, M., & Belagyi, J. (2009) *Biophys. J.*, **96**, 2901–2911.
 - 34) Miyoshi, T. & Watanabe, N. (2013) *Cytoskeleton (Hoboken)*, **70**, 179–190.
 - 35) Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 136–143.
-