

主論文の要旨

**Actin crosslinking by α -actinin averts viscous
dissipation of myosin force transmission in stress fibers**

ストレスファイバーにおけるアクチン線維間の
 α -アクチニンによる架橋はミオシン収縮力の
伝達過程で生じる粘性散逸を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
機能形態学講座 細胞生物学分野

(指導：宮田 卓樹 教授)

勝田 紘基

【緒言】

ストレスファイバー (Stress Fiber, 以下 SF) はアクチン線維及びミオシン、アクチン結合タンパク質から構成され、細胞の形態維持や遊走、分化、細胞分裂などにおいて重要な収縮力を生み出している。SF 内のミオシンによる収縮力は SF 端部の接着斑を介して細胞外マトリクスに伝達される。このとき発生する SF の基質に対する牽引力は細胞の接着力を強化するとともに、基質の硬度などの細胞外の機械的特性の感知 (メカノセンシング) に寄与している。感知された基質の機械的特性は細胞の遊走や分化に影響を与えることが既に報告されている。SF は粘性、弾性双方の機械的性質を有するが、粘弾性がミオシンの収縮力の伝達効率にどのように関与し、細胞のメカノセンシングなどの細胞機能に寄与しているかは明らかになっていない。本研究ではアクチン架橋タンパク質の一つである α -アクチニンによる架橋が SF の物性と力伝達に与える影響を解析した。併せて SF の物性変化が細胞の遊走に及ぼす影響についても検討した。

【方法】

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に shRNA を導入し、 α -アクチニンをノックダウンした細胞株 (以下 α -アクチニン KD 細胞) と non-target control 細胞株 (以下 non-target 細胞) を樹立した。SF のダイナミクスを観察するため、アクチン線維に結合する LifeAct-mCherry やミオシンと GFP のキメラである MYHIIA-GFP を細胞内に導入し、タイムラプス観察を行った。また、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) を用いて SF の弾性を測定した。細胞が細胞外基質に及ぼす力は牽引力顕微鏡法 (Traction Force Microscopy, TFM) により、細胞外基質の変位を計測することで測定した。以上の培養細胞実験で得られた結果をもとに α -アクチニンを模した架橋とミオシンを模した収縮力を取り入れ、SF を短いアクチン線維の集合体として表現した SF の 1 次元計算モデルを作成し、シミュレーション実験を行って実験結果との整合性を検討した。

さらに α -アクチニン KD 細胞における SF の維持機構を蛍光標識アクチンの取り込みやアクチン分子の光褪色後蛍光回復 (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) を用いて解析した。最後に α -アクチニンの細胞機能における役割を検討するために、細胞遊走に対する α -アクチニンノックダウンの影響を調べた。

【結果】

定量 PCR と Western blotting により α -アクチニンの発現量低下を確認した α -アクチニン KD 細胞でタイムラプス観察を行い、SF のダイナミクスへの影響を調べた。 α -アクチニン KD 細胞では non-target 細胞と比較してアクチン線維とミオシンの SF に沿った顕著な流れが観察され (図 1A)、両者の SF に沿った移動速度が有意に上昇していた (図 1B-D)。 α -アクチニンを介したアクチン線維の架橋が SF に沿ったアクチン線維の移動速度に与える影響を調べるため、 α -アクチニンからアクチン結合部分を欠損させ、アクチン線維を架橋できない dominant-negative 変異体を導入した。dominant-negative

変異体の発現量が多く、アクチン線維間の架橋がより強く阻害されている細胞ほどアクチン線維の流動速度が大きかったことから(図 1E)、架橋密度の低下により SF のアクチン線維が流動化することが示唆された。SF の弾性を AFM によって測定したところ、 α -アクチニン KD 細胞では SF の流動化とともに SF の弾性が低下していることも分かった(図 2A, B)。

次に SF の流動化がミオシンの力の伝達に及ぼす影響を調べるため、細胞外基質に牽引力として伝わる力を TFM により測定した。その結果、細胞外基質に対する牽引力は non-target 細胞と比較して α -アクチニン KD 細胞で有意に低下していた(図 3A, B)。このとき、 α -アクチニン KD によってミオシンの活性(収縮力)は低下していなかった。ミオシン軽鎖の脱リン酸化を薬理的に阻害することでミオシンによる収縮力発生を高めると、non-target 細胞では細胞外に加えられた牽引力が増大したが、 α -アクチニン KD 細胞では有意な変化が生じなかった(図 3C)。これらの実験結果から α -アクチニンの発現量が低下した SF ではミオシンの発生する力を接着斑に効率的に伝達できなくなることが示唆された。 α -アクチニン KD 細胞における SF の流動化や収縮力の伝達効率への影響がアクチン線維の架橋密度の変化で生じうるか否かを物性学的に検討するために、SF を模した短いアクチン線維の集合体が α -アクチニン、ミオシンそれぞれに相当する架橋で結合された計算モデルを作製した。 α -アクチニンの架橋は結合、解離時に摩擦が発生し、ミオシンの架橋は収縮力を発生すると仮定した。本計算モデルによるシミュレーションにおいても実験結果と同様、アクチン線維間の架橋が少ないほど、SF の流動性が大きくなり(図 1H)、端部に加わる力が小さくなること(図 3D)が示された。

α -アクチニン KD 細胞において SF の流動化により構成タンパク質の流動速度が上昇していたが、SF は切断、崩壊することなく構造が維持されていた(図 1A)。そこで SF の生成速度が変化している可能性を考え、 α -アクチニン KD 細胞における SF の構造維持機構を調べた。アクチン重合部位の分布を、蛍光標識したアクチンの取り込みにより観察した(図 4A, B)。その結果、non-target 細胞では SF 端部の接着斑近傍に限局した蛍光標識アクチンの取り込みが見られた。一方、 α -アクチニン KD 細胞では SF 全体に蛍光標識アクチンが取り込まれていた。FRAP 実験において、 α -アクチニン KD 細胞では退色後の蛍光強度がより大きく回復しており、より多くの SF 内のアクチン分子が重合・脱重合に関与していることが示唆された(図 4C, D)。すなわち α -アクチニン KD 細胞では SF の全長にわたってアクチン分子の重合、脱重合が促進されることで SF の構造が維持されている可能性が示唆された。

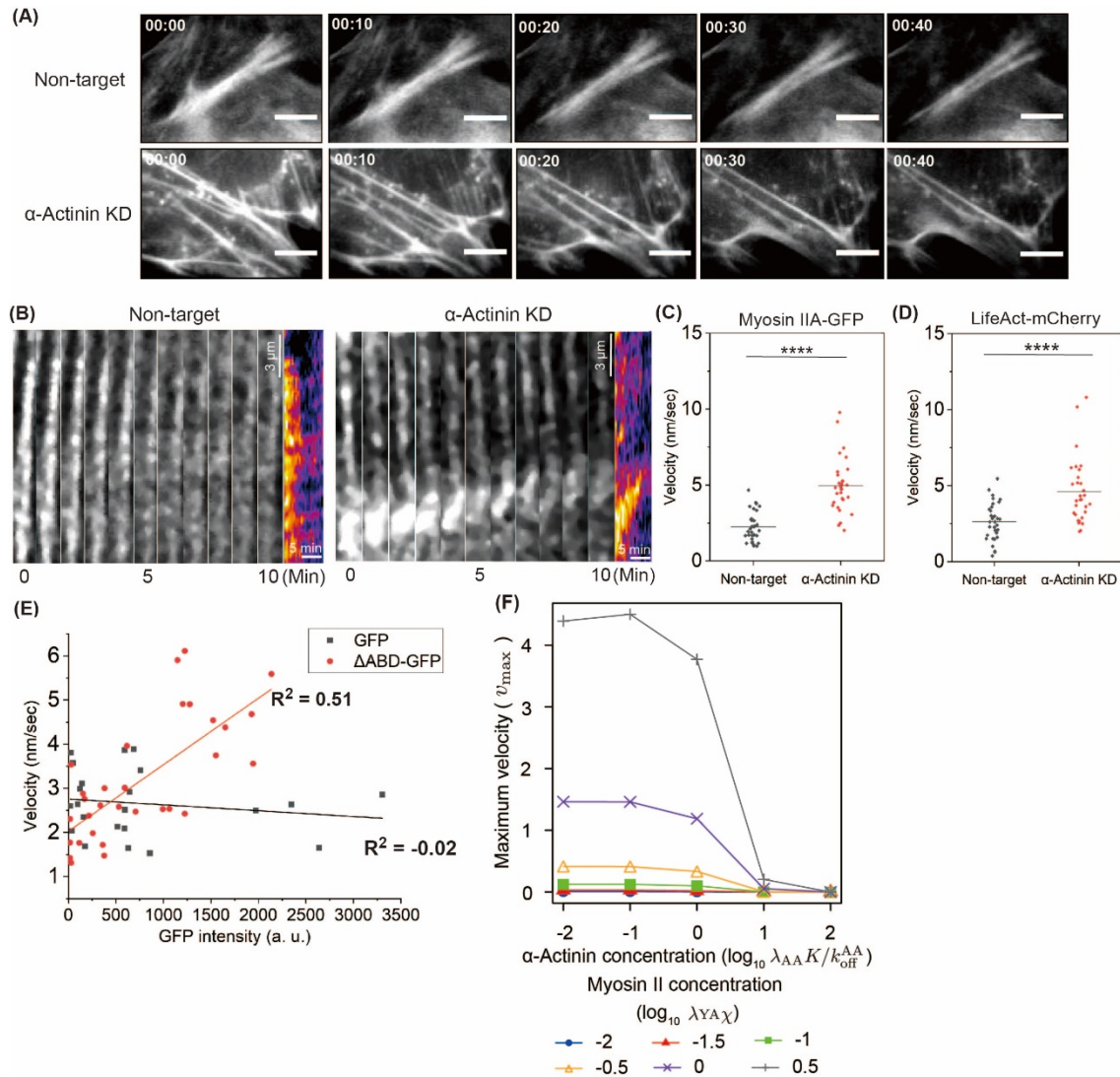
細胞レベルで細胞内外の機械的環境の影響を受ける細胞機能の 1 つに細胞遊走が挙げられる。先行研究で細胞の遊走速度が基質の硬度依存的に変化することが報告されている。そこで α -アクチニンの発現抑制が基質硬度依存的な細胞遊走に及ぼす影響をタイムラプス観察により解析した。その結果、 α -アクチニン KD 細胞では基質の硬さに応じた細胞の遊走速度の変化率(基質硬度に対する感受性)が低下していることを明らかにした(図 5A, B)。

【考察】

タイムラプスイメージングおよび TFM の結果から、 α -アクチニンによるアクチン線維の架橋が減少するとミオシン収縮力の伝達効率が低下することが明らかになった。さらに計算機シミュレーションの結果から、架橋密度の低下によるアクチン線維の流動化によって、速度依存的な粘性摩擦によるエネルギー損失が増大し(粘性散逸)、その分だけミオシンの収縮エネルギーが失われることが収縮力の伝達効率の低下の原因であると考えられた。先行研究において、アクチンとの結合がより安定化する α -アクチニンの変異体を導入した細胞では、細胞内の弾性が大きくなるという結果が示されている。本研究の結果はこの先行研究と一致しているのみならず、SF の物性が細胞内での収縮力伝達を調節する仕組みをより詳細に明らかにした。さらに細胞外基質の硬度に応じた遊走速度変化が α -アクチニン発現量低下に伴い減弱していたことから、 α -アクチニンが基質の硬度感知や基質の硬度に対する応答に関与している可能性が示唆された。本研究の成果は SF やアクチン線維のメカニクスを標的とする、創傷治癒の促進などの新しい治療法の開発に寄与することが期待される。

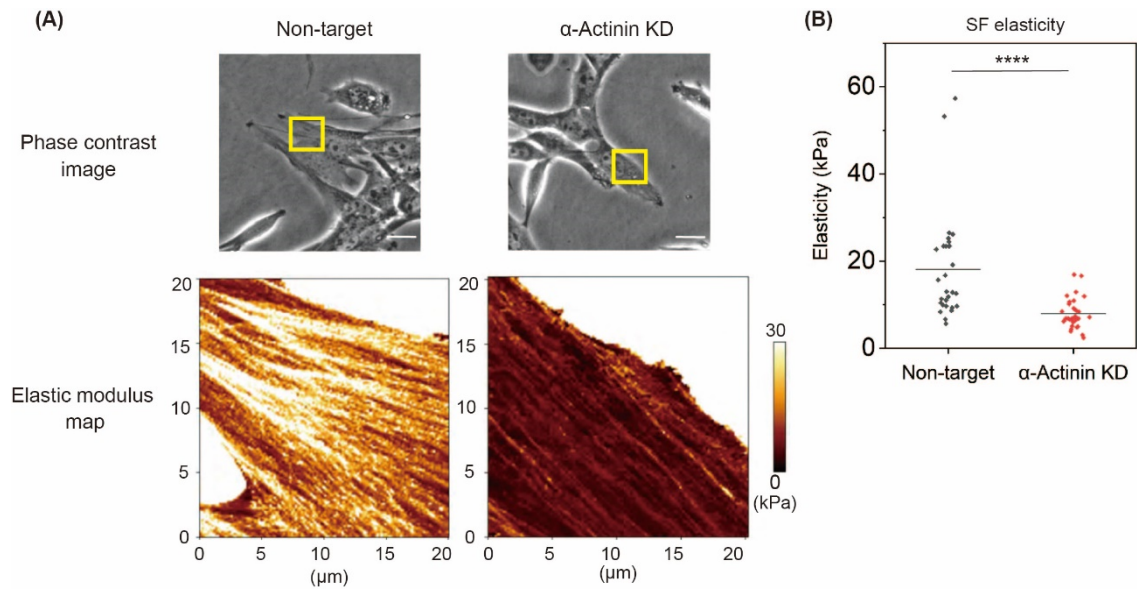
【結論】

本研究はアクチン線維間を架橋する α -アクチニンは SF の粘弾性の構成要素であり、 α -アクチニンの発現量低下は弾性の低下のみではなく、粘性の低下とそれによる SF の流動性を促進することで粘性散逸の増大を招き、ミオシン収縮力の伝達を減弱する可能性を示した。さらに SF の物性が細胞の基質硬度の感知や遊走などの細胞機能に関与することを示した。



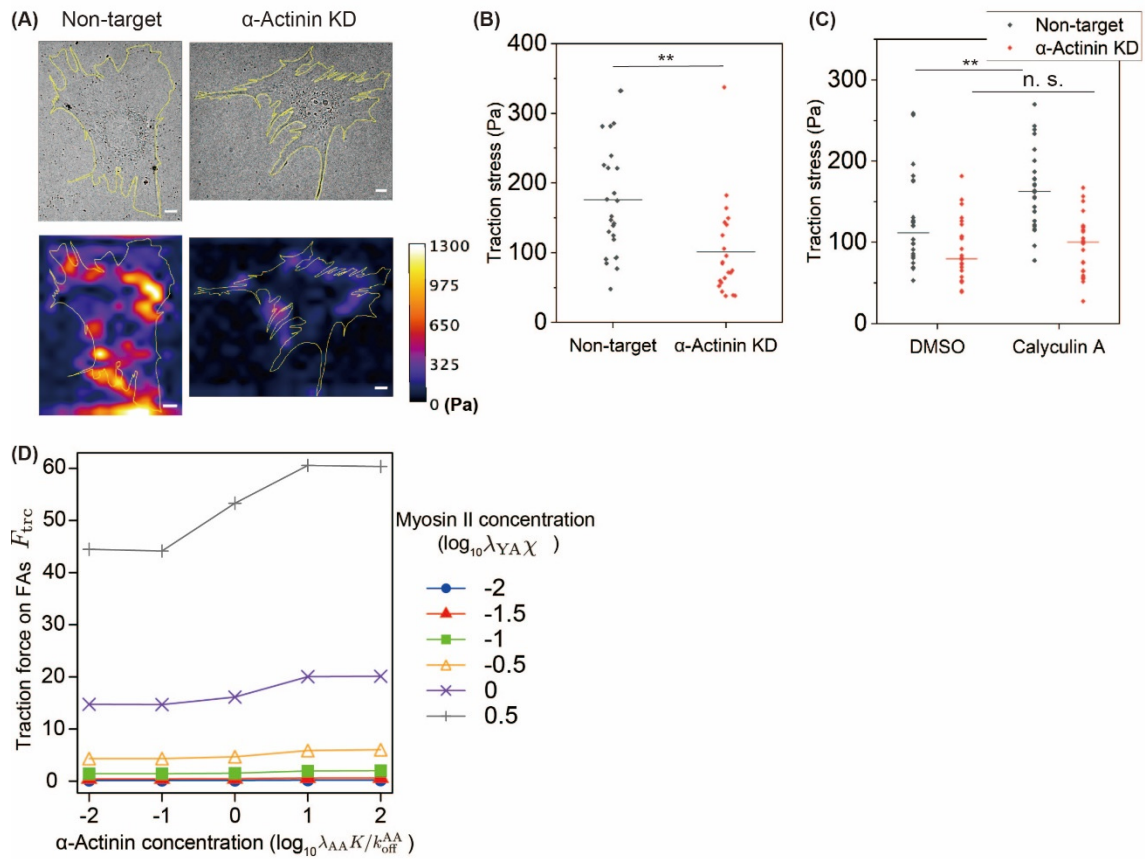
1 SFs are fluidized by inhibiting α -actinin crosslinks.

- (A) Time-lapse images of LifeAct-mCherry in non-target (control) and α -actinin KD cells. Elapsed time is shown as h:min. Scale bars; 10 μ m.
- (B) Representative time-lapse fluorescence images and kymographs of myosin IIA-GFP on SFs in α -actinin KD and non-target cells. Scale bars of distance; 3 μ m. Scale bars of time in kymographs; 5 min.
- (C) (D) Velocities of myosin IIA-GFP (C) and LifeAct-mCherry (D) along SFs in non-target and α -actinin KD cells. The velocity was quantified from time lapse measurements longer than 5 min. Horizontal bars represent means. **** $p < 0.0001$; Welch's t-test (N = 30-35 SFs in 10-12 cells).
- (E) The velocity of LifeAct-mCherry along SFs was plotted against the fluorescence intensity of GFP for each cell expressing Δ ABD-GFP (a GFP-tagged, deleted form of α -actinin lacking the actin binding domain) (N = 31 cells) or GFP (N = 22 cells). The velocity value of each dot represents the averaged velocity of LifeAct-mCherry along 3 SFs. Regression lines of linear fitting and Spearman's correlation coefficients (R^2) are also shown.
- (F) Averaged maximum velocity of actin filaments along a SF is plotted against the α -actinin concentration in the SF under different myosin II concentrations.



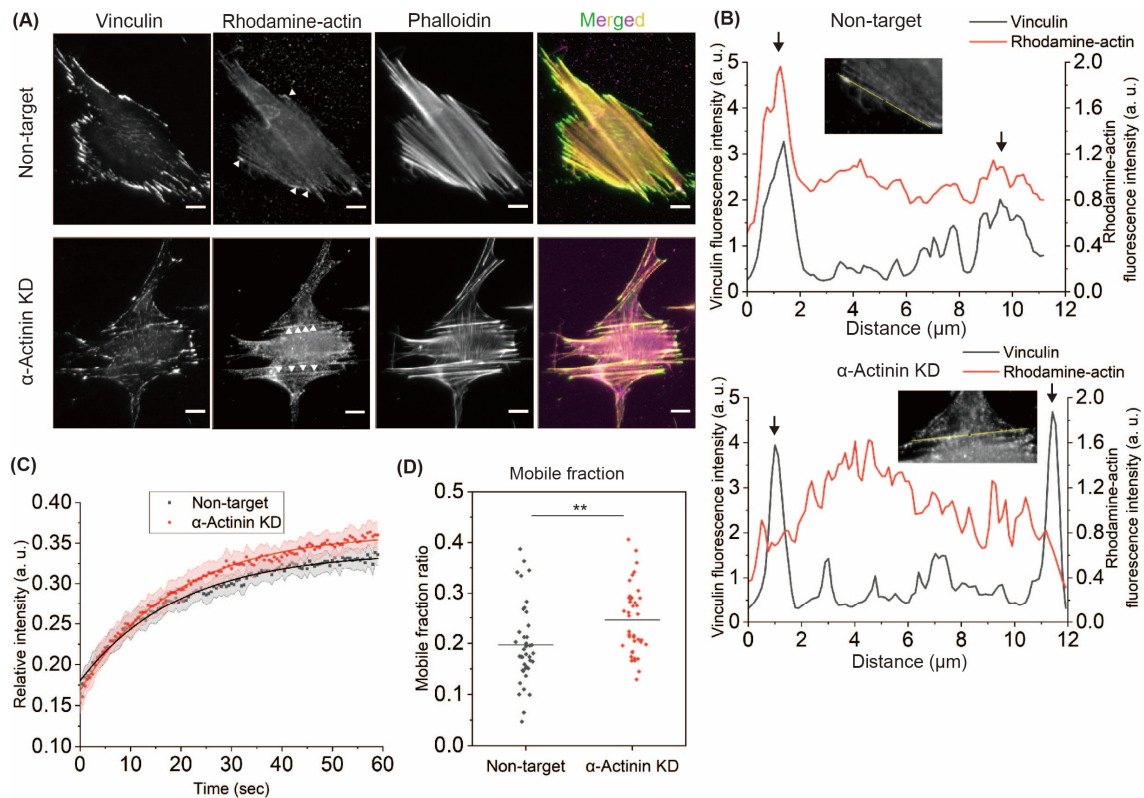
☒ 2 Fluidized SFs are less elastic.

- (A) Phase contrast images of non-target and α -actinin KD cells, and elastic modulus maps of the boxed regions in the phase contrast images. The elastic modulus at each point in $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ area (128×128 points) was derived from a force-indentation curve obtained at that point. Scale bars in phase contrast images; $20\ \mu\text{m}$.
- (B) Elastic moduli of SFs in α -actinin KD cells and non-target (control) cells. Horizontal bars represent means. **** $p < 0.0001$; unpaired Student's t -test ($N = 30$ cells).



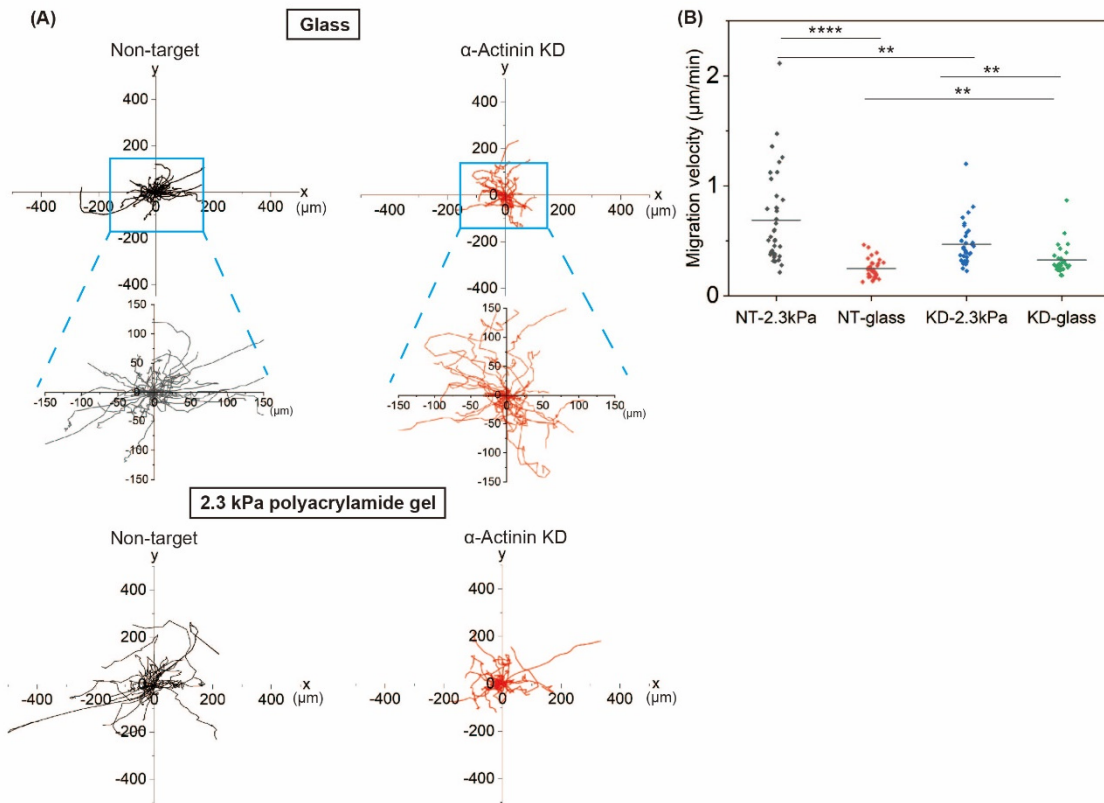
3 Myosin II-generated force is dissipated in fluidized SFs.

- (A) Phase contrast (upper panels) and traction stress (lower panels) images of α -actinin KD and non-target C2C12 cells on fibronectin-coated 16.3 kPa polyacrylamide gel substrates. Yellow lines indicate outlines of cells. The heatmap scale of traction stress is common between non-target and α -actinin KD cells. Scale bars; 10 μ m.
- (B) Traction stress exerted by non-target (N = 25) and α -actinin KD (N = 22) cells. Horizontal bars represent means. **p < 0.01; unpaired Student's t-test.
- (C) Traction stress exerted by α -actinin KD and non-target cells treated with either calyculin A (1 nM) or vehicle (DMSO). Traction stress was measured 10 min after calyculin A or DMSO was added. Horizontal bars represent means. n.s. no significant difference, **p < 0.01; unpaired Student's t-test (N = 24-28 cells each).
- (D) Traction force acting on FAs at the ends of a SF was simulated in our mathematical model and plotted against the α -actinin concentration in the SF under different myosin II concentrations.



4 Actin turnover is accelerated in fluidized SFs.

- (A) Non-target (control) and α -actinin KD C2C12 cells were stained for vinculin and F-actin (with phalloidin) after rhodamine-actin incorporation in the actin polymerization assay. Scale bars; 10 μ m.
- (B) Line profiles of fluorescence intensities of vinculin (black) and rhodamine-actin (red) along SFs in non-target (control) and α -actinin KD cells. The left and right scales are for vinculin and rhodamine-actin intensities, respectively. Fluorescence intensities were measured along SFs indicated by yellow lines in the inset images of rhodamine-actin. Arrows show high fluorescence intensities of vinculin at FAs.
- (C) Time-dependent changes of fluorescence intensities of GFP-actin in photobleached regions on SFs in non-target (black) and α -actinin KD (red) cells. Data are shown as mean \pm SEM. Regression curves fitted with FRAP fitting equation are also shown. (N = 40 SFs from 15-17 cells).
- (D) Mobile fraction of GFP-actin FRAP on SFs in non-target and α -actinin KD cells. Horizontal bars represent means. n.s. no significant difference, ** $p < 0.01$; unpaired Student's t-test (N = 38-40 SFs from 15-17 cells).



☒ 5 Role of α -actinin in rigidity-dependent regulation of cell migration speed.

- (A) Rose plots depicting migration trajectories of individual non-target and α -actinin KD cells for 240 min on fibronectin-coated glass (upper panels) or 2.3 kPa polyacrylamide gel (lower panels) substrates (N = 31-34 cells). Magnified views of the cell trajectories on glass are also shown.
- (B) The migration velocity of non-target and α -actinin KD cells on fibronectin-coated glass and 2.3 kPa polyacrylamide gel substrates. Horizontal bars represent means. **p < 0.01, ****p < 0.0001; Welch's t-test (N = 31-38 cells).