
フィラミン A 架橋アクチン系細胞骨格の細胞内動態と
その力学応答機能

(14580695)

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (1))
研究成果報告書

平成 16 年 5 月

研究代表者 伊藤 忠直
(京都大学大学院理学研究科生物物理学教室)

京 都 大 学 図 書



1040942174

附 属 図 書 館

はしがき

研究代表者：伊藤 忠直 (京都大学大学院 理学研究科 助教授)
研究分担者：川端 和重 (北海道大学大学院 理学研究科 教授)
研究分担者：大橋 一世 (千葉大学 理学部 教授)
研究分担者：山崎 昌一 (静岡大学 理学部 助教授)
(研究協力者：芳賀 永)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	1,900	0	1,900
平成 15 年度	1,700	0	1,700
総計	3,600	0	3,600

研究発表

ア 学会誌等

1. 伊藤 忠直

分子モーターは第二種の永久機関？

生物物理 44 巻 2 号 91 ページ 2004 年

イ 口頭発表

1. 伊藤忠直

アクチンフィラメントの浸透圧活性の熱力学 (2)

日本生物物理学会 40 回年会、2002 年 11 月 名古屋 (名古屋大学)

2. 伊藤忠直

アクチンフィラメントの浸透圧活性の熱力学 (3)

日本生物物理学会 41 回年会、2003 年 9 月 新潟 (新潟コンベンションセンター)

3. 佐野涼子、田中智樹、古池晶、伊藤忠直、大橋一世、山崎昌一

一分子のフィラミン A の力学特性とアクチン/フィラミン A ゲルの機能のメカニズム

日本生物物理学会 41 回年会、2003 年 9 月 新潟 (新潟コンベンションセンター)

4. 大森 由記子、芳賀 永、伊藤 忠直、大橋一世、Thomas P. Stosse、川端 和重

The Role of Actin-Binding Protein Filamin A in Cell Movement and Stress Fiber Formation

日本細胞生物学会 57 回年会、2004 年 5 月、大阪 (千里ライフサイエンスセンター)

フィラミン A 架橋アクチン系細胞骨格の細胞内動態
と

細胞の運動および力学応答機能との関連

川端 和重、芳賀 永、大橋一世、伊藤 忠直

1. はじめに

1.1 細胞運動と機構

細胞運動の基本要素となっているのは、進行方向に対する細胞前部の伸長と接着点の形成、および後部の収縮である。細胞は伸長と収縮を繰り返しイモムシのような運動を行う。

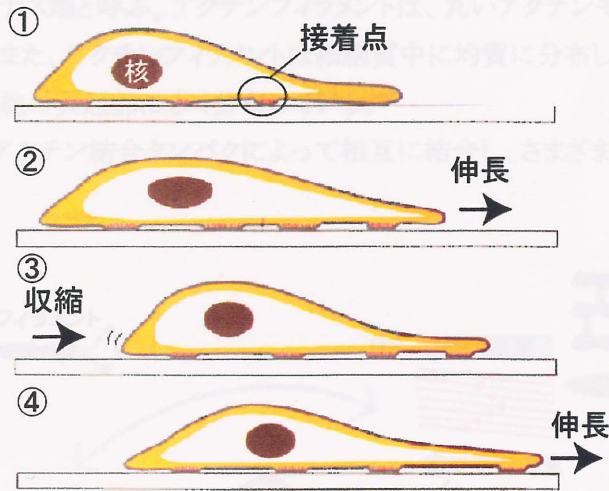


図 1

図1に示した絵は、細胞断面の模式図である。最初①の状態にある細胞の一部が右方向へ伸長し②の状態になる。伸長部分が基盤と接着点を形成し、細胞の反対部分では収縮が起こる③。このとき、細胞核も右方向へ移動する。再び、細胞の一部が右方向に伸長し、基盤と接着する④。この①～④の繰り返しによって、細胞全体が右に移動していく。

運動方向に対して細胞前部の伸長部分は仮足と(pseudopodium)呼ばれている。さらに、この仮足は、その形状によって神経細胞に見られる細長い突起状の糸状仮足(filopodium)や、繊維芽細胞に見られる薄い膜状の葉状仮足(lamellipodium)に分類される。仮足の先端は先端端と呼ばれ、繊維芽細胞の先端端付近では、活発な伸長や細胞膜の一部がめくれ上がりながら細胞後部に移動していくラフリング(ruffling)と呼ばれる現象が見られる。

1.2 細胞骨格

細胞運動のメカニズムを解明しようという試みは、主に細胞骨格タンパク(アクチンフィラメント、微小管、中間系フィラメント)の形態や機能に注目した分子生物学によって進められてきた。細胞骨格とは細胞質内に張り巡らされたたんぱく質の繊維で、細胞の形態を調節する働きがあると考えられている。分子生物学では、先端端内部でアクチンフィラメントの重合が活発であることや、収縮部でアクチンフィラメントの脱重合やアクチン-ミオシン相互作用が関与していることが、現在までの明らかにされている。また、GTP 結合タンパクの一種である Rac1 や RhoA の活性が、微小管の重合や脱重合に深く関与している

ことが報告されている。これらのアクチンフィラメントと微小管の重合や脱重合が結びつき、細胞の形態を変化させながら運動を主導していると考えられている。

1.3 アクチンフィラメントの高次構造の変化

アクチンフィラメントは、アクチンが重合してできた繊維で、3種類の細胞骨格の中でもっとも細い、直径5nmのフィラメントである。アクチンフィラメントには極性があり、アクチンモノマーが重合しやすい端をプラス端、反対側をマイナス端と呼ぶ。アクチンフィラメントは、丸いアクチンモノマーが重合して直線状の繊維を構築している。また、アクチンフィラメントは細胞質中に均質に分布しているわけではなく、細胞膜直下の表層付近や細胞の突起部に多く分布している。

アクチンフィラメントはアクチン結合タンパクによって相互に結合し、さまざまなネットワーク構造を構築することがわかっている。

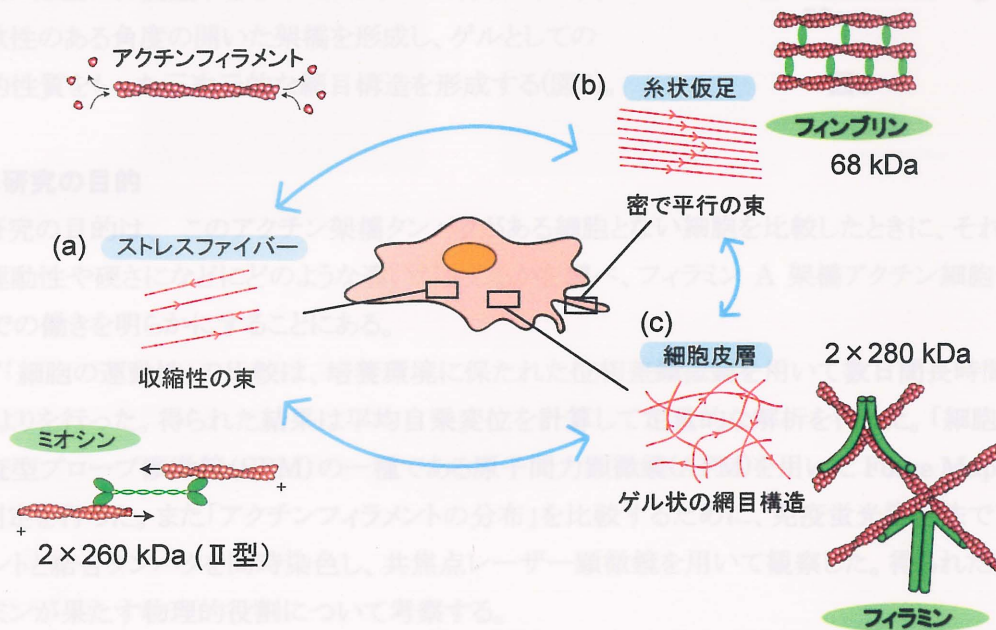


図2

図2に細胞内における結合タンパクによるアクチンフィラメントの主な高次構造を示した。細胞の場所や結合するタンパクによって、その構造が大きく異なっていることがわかる。(a)は極性が交互に並んでいる束状の構造である。アクチンフィラメントは、アクチン結合タンパクの一種であるII型ミオシンと結合し極性方向へすべり運動することがわかっている。極性が交互に並んでいるので、フィラメントの長さを変えずに、構造全体としては短くなる。このとき収縮力を発生するので、この束状の構造をストレスファイバー(stress fiber)と呼んでいる。(b)は極性のそろった束状の構造で、葉状仮足や突起状の糸状仮足内部に多く見られる。プラス端は細胞の外側に向かってそろっており、重合によりフィラメントの長さが伸長していく。このため細胞膜を外側に突出させ、先端の伸長を引き起こすと考えられている。(c)はアクチンフィラメントがゲル状の網目構造をつくっている。このネットワークは非常に動的な性質をもつこ

とや細胞膜に結合していることが知られている。このため、細胞膜の裏打ち構造として細胞表面の形を調節しているのではないかと考えられ、細胞皮層(cell cortex) と呼ばれている。以上のような、アクチンフィラメントのネットワーク構造が細胞運動や形態の維持に重要な働きをしていると考えられている。

1.4 アクチン架橋タンパクフィラミン

アクチンフィラメント結合タンパクの中で、フィラミンは広く存在するゲル形成タンパクであり、皮層の部分に多量に存在する。フィラミンは細胞タンパク量の1%あり、これは50個のアクチン単量体に対して約1個の割合になる。フィラミンは分子量280kDaでホモ二量体を形成しており、このホモ二量体の長さは、伸びた状態で約160nmである。フィラミンは互いに交差する2本のアクチンフィラメントの間に柔軟性のある角度の開いた架橋を形成し、ゲルとしての物理的性質をもった三次元的な網目構造を形成する(図3)。

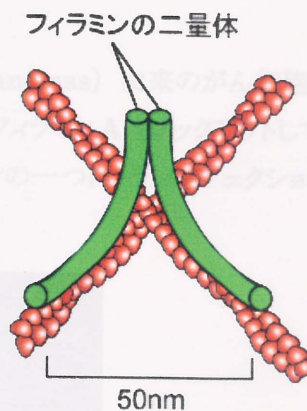


図3

1.5 本研究の目的

本研究の目的は、このアクチン架橋タンパクがある細胞とない細胞を比較したときに、それぞれの細胞の運動性や硬さになどどのような違いが生じるかを調べ、フィラミン A 架橋アクチン細胞骨格の *in vivo* での働きを明らかにすることにある。

まず「細胞の運動性」の比較は、培養環境に保たれた位相差顕微鏡を用いて数日間長時間観察することによりを行った。得られた結果は平均自乗変位を計算して定量的な解析を行った。「細胞の硬さ」では走査型プローブ顕微鏡 (SPM) の一種である原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた Force Mapping 法で硬さ測定を行った。また「アクチンフィラメントの分布」を比較するために、免疫蛍光染色法でアクチンフィラメントと結合タンパクを同時染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。得られた結果から、フィラミンが果たす物理的役割について考察する。

また、「基盤のかたさ」という物理的な要素にも着目した。細胞が接着している基盤を、ガラスのように硬い基盤と、アクリルアミドゲルやコラーゲンゲルといった柔らかい基盤にして同様の実験を行った。基盤のかたさという物理的要素が変わったときに、細胞の運動性やかたさに違いがあるのか明らかにするためである。

2. 材料と方法

2.1 試料

2.1.1 使用した細胞

今回使用した細胞は、ヒト悪性黒腫 (human malignant melanomas) 由来のがん細胞 2 種類である。一つは M2 細胞であり、これはアクチン架橋タンパクであるフィラミン A をノックアウトして発現をなくしたものである。もう一つは A7 細胞であり、これは M2 細胞ラインの一つにトランスフェクションによってフィラミン A の発現を戻したものである(図4)。

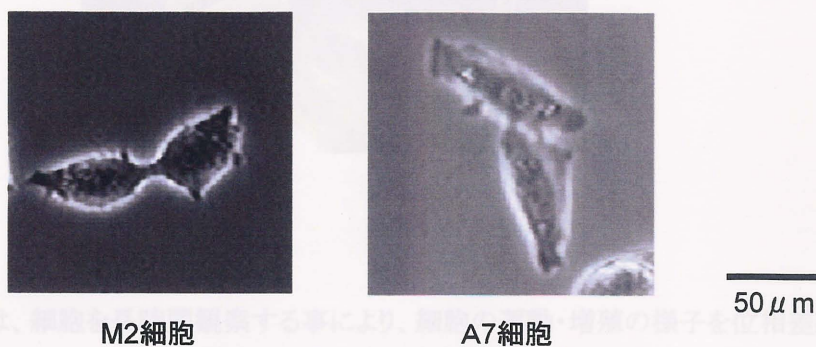


図 4

2.1.2 細胞培養用メディウム(基本培地)

M2 細胞、A7 細胞に用いる基本培地として、2%の FBS(fetal bovine serum:ウシの胎児血清)と8%の NCS(newborn calf serum:新生子ウシ血清)を加えた MEM(Minimum Essential Mededium)を使用した。

2.1.3 基盤の種類とその作成

* ガラス基盤

ガラスシャーレにフィブロネクチン(最終濃度 0.05 mg/ml)をコーティングしたものをを用いた。

* アクリルアミドゲル基盤

アクリルアミドゲルがガラス表面に接着できるように、表面をバインドシランで処理した、ガラスシャーレ上にアクリルアミドゲル(質量%濃度 2%、架橋剤比率 0.0345)を作成し、その上に Sulfo-SANPAH 試薬を用いてフィブロネクチン(最終濃度 0.05 mg/ml)をコートした。

* コラーゲンゲル基盤

ガラスシャーレ上に、最終濃度 0.023%のコラーゲンゲル(Cell matrix Type I ·P)を作成した。

2.2 長時間観察

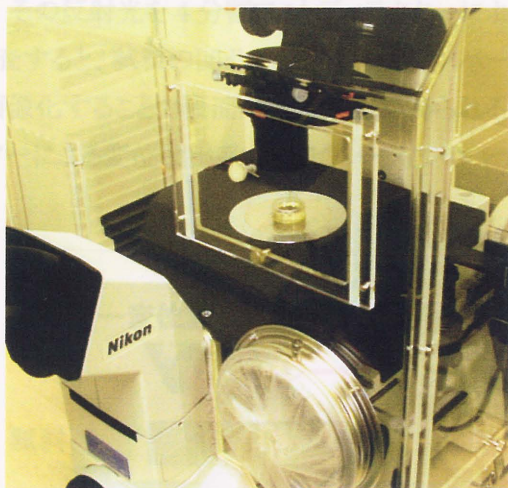


図 5

今回の実験では、細胞を長時間観察する事により、細胞の運動・増殖の様子を位相差顕微鏡で観察した(図5)。測定の際にはシャーレ内を CO_2 を含んだ新鮮なメEDIUMで満たし、同型のシャーレの縁にグリースを塗って上からふたをした。メEDIUMで満たすことによってシャーレ内は曇らなくなり、また雑菌等によるコンタミネーションを防ぐことができる。実験準備のできたシャーレは顕微鏡のステージにセットし、顕微鏡で見られる位相差像は CCD を用いてパソコンに画像を取り込んだ。C5985(浜松ホトニクス製)を用いて取り込む(パソコンは Macintosh を使用)際は、画像取得ソフトには NIH image を使用し、取り込んだ画像を自動でアベレージングするマクロ"cell average capture"を利用することにより、画像を 5 分に 1 枚取り込むよう設定した。また、TE2000E(Nikon 製)を用いて取り込む(パソコンは Windows を使用)際は、画像取得ソフトには Image-Pro Plus を使用し、同様の設定を行った。得られた画像を video editor で 1 つの動画にし、細胞が運動・増殖の様子を観察した。細胞のアクリルケースで顕微鏡全体を覆い温調で 37°C に保つことにより、生体内により近い環境で細胞を培養することができ、1 回あたり約 1 週間(細胞がコンフルエント状態になるまで)の観察が可能である。

2.3 走査型プローブ顕微鏡 (SPM)

2.3.1 原子間力顕微鏡 (AFM)

走査型プローブ顕微鏡の一種である原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope ; AFM)は試料と探針との間にはたらく原子間力を検出し、液中環境における測定も可能であるため、生体試料の表面構造を生きたまま得ることができる。AFM は数 nm オーダーの分解能を持ち、3 次元の形状を得ることが可能である。探針が直接試料上を走査するので、試料の力学的な情報を測定することが可能であるという特徴をあわせもっている。

2.3.2 AFM の動作原理

図6に AFM の動作原理が示してある。カンチレバーとよばれる板ばねの先についた探針を試料におしつけ、そのときのカンチレバーのたわみを検出し、試料表面の凹凸を測定する。カンチレバーの背面にレーザー光を当て、その反射光を4分割フォトディテクターによって検出している。この状態で探針を試料表面に沿って走査すると、試料の凹凸に応じてカンチレバーのたわみ量が増減し、反射光の位置が変化する。これを画像化することで表面の微細構造が得られる。装置は、カンチレバーによる力の検出系、フォトディテクターによる変位検出系、コンピュータとスキャナーによる制御系から構成されている。

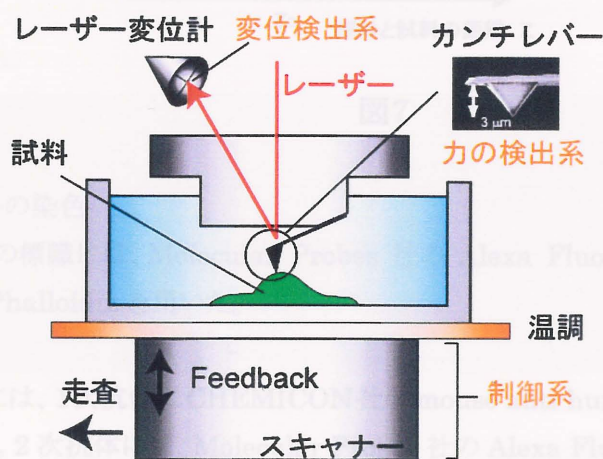


図6

2.3.3 Force Mapping 法による硬さ測定

Force Mapping 法は、フォースカーブとよばれる曲線を試料各部分で測定をして、弾性率の分布を調べる手法である。フォースカーブとは、カンチレバーの探針を試料表面の離れた位置から徐々に試料に近づけていって試料に押し込んだときの、探針に発生する応力の変化をカンチレバーのたわみ量から求め、位置と力の関係をプロットしたものである。典型的なフォースカーブの例を図7に示す。試料と探針間の距離を z 、探針にはたらく力を F としてプロットしてある。 $z = z_0$ は探針と試料が接触した点である。 $z > z_0$ では、試料と探針が接触しておらず、カンチレバーもたわまないのので $F=0$ である。 $z < z_0$ では、カンチレバーが試料に加えた応力と、試料の変形量（すなわち探針が試料にめり込んだ量）との関係が得られる。

弾性とは、外力によって変形を受けた物体がその変形を元に戻そうとする力を生じる性質である。もし試料が硬ければ応力の増加にともなう試料の変形量が小さく、カーブの立ち上がりが急になる。一方、試料が柔らかければ変形量が大きく、カーブの立ち上がりが緩やかになる。従って、フォースカーブを解析すれば、測定を行った点における弾性率がわかる。フォースカーブの解析には、二つの弾性体の接触を扱った単純なモデルである Hertz モデルを用いた。このモデルは、平板上の試料を AFM 探針のような硬い円錐型（または球形）の物体で押す場合に、物体が試料内部にのめり込んでいくに従って接触面積が増加し、試料にかかる応力が減少する

効果を考慮したものである。Force Mapping 法の特徴は、試料各点の定量的なヤング率を求めることができることである。

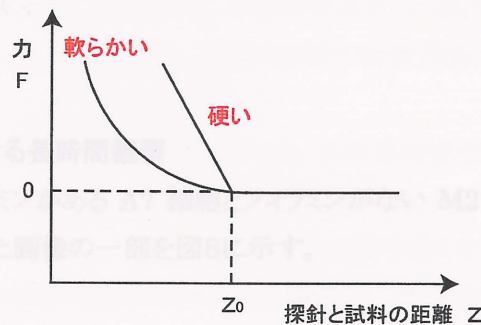


図7

2.4 免疫蛍光染色

1. アクチンフィラメントの染色

アクチンフィラメントの標識には、Molecular Probes 社の Alexa Fluor 488 Phalloidin または Alexa Fluor 546 Phalloidin を用いた。

2. フィラミンの染色

フィラミンAの標識には、1次抗体に CHEMICON 社の mouse anti-human filamin monoclonal antibody を用いた。2次抗体には、Molecular Probes 社の Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG(H+L)を用いた。

3. ミオシンIIAの染色

ミオシンIIAの標識には、1次抗体には CRP Inc 社の抗体を、2次抗体には Molecular Probes 社の Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(H+L)を用いた。

蛍光染色した試料は、共焦点レーザー走査型顕微鏡(Confocal Laser Scanning Microscope ; CLSM)を用いて観察した。

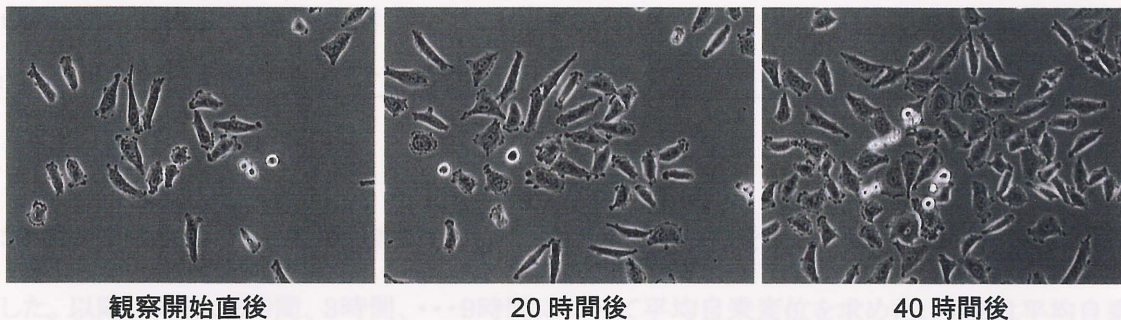
3. 結果と議論

3.1 長時間観察

3.1.1 ガラス基盤上における長時間観察

ガラス基盤上においてフィラミンがある A7 細胞とフィラミンがない M2 細胞を、位相差顕微鏡を用いて長時間観察を行って得られた画像の一部を図8に示す。

フィラミンあり(A7 細胞)



フィラミンなし(M2 細胞)



図8

運動の様子としては、A7 細胞は活発に仮足となる膜を出したり引っ込めたりしながら、重心運動をする様子が観察された。一方、M2 細胞は活発に膜を広げる様子はなく、ほとんど重心移動することなくその場で増殖してゆくような運動であった。

3.1.2 ガラス基盤上における運動の解析結果

フィラミンがある A7 細胞とフィラミンがない M2 細胞の間にある運動の違いを統計的に表すために、3.1.1 で得られた動画から平均自乗変位 ($\langle \rho^2 \rangle$) を求め、平均自乗変位と time interval との関係を考

察した。その解析方法を以下に示す。

あらかじめ得られた動画を 20 時間ごとに区切り、その区切られた動画をさらに time interval で1時間、2時間、3 時間のように1時間ごとに区切り、単位時間当たりにおける細胞の変位の 2 乗をそれぞれの time interval ごとに出した (下図参照)。今回の実験では無作為に 20 個の細胞を選び出し、その軌跡を追った。

もし細胞が同じ速度で直線的な運動を示すとすると、平均自乗変位は時間間隔の 2 乗に比例する。ブラウン運動のようなランダムな振る舞いを示すときは、time interval が限りなく 0 に近いときは、平均自乗変位は時間間隔の 2 乗に比例するが、time interval が大きくなると、時間間隔の 1 乗に比例する。今回の実験では平均自乗変位と time interval との関係から、細胞がどのような運動をするのかを調べた。

time interval(t,i)=1 時間のとき

$$\langle \rho_i^2 \rangle = \frac{\{(x_1-x_0)^2 + (y_1-y_0)^2\} + \{(x_2-x_1)^2 + (y_2-y_1)^2\} + \dots + \{(x_{19}-x_{18})^2 + (y_{19}-y_{18})^2\}}{19} \quad (1)$$

20 個の細胞全てについて $\langle \rho_i^2 \rangle$ を求め、 $\langle \rho_{t,i=1時間}^2 \rangle = \frac{\sum_{k=1}^{20} \langle \rho_k^2 \rangle}{20}$ を t,i が 1 時間の時の平均自乗変位とした。以降、同様に2時間、3時間、...9時間について平均自乗変位を求めた。今回は平均自乗変位の値そのものではなく、time interval に対し、 $\langle \rho_i^2 \rangle$ がどのようなべき指数 α を示すのかをまず調べ、運動の特徴を示した。

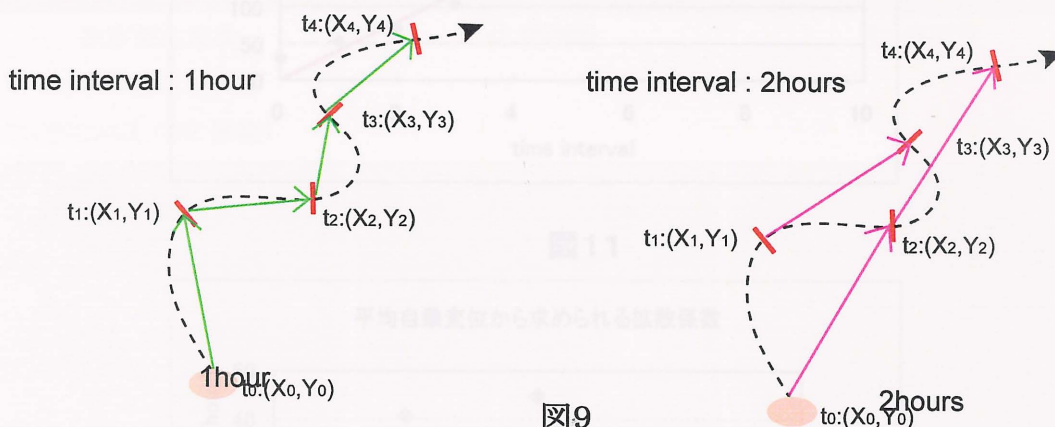


図9

二つの細胞において、ともに 0~20 時間、20~40 時間、40~60 時間における平均自乗変位 $\langle \rho_i^2 \rangle$ が time interval に対して示すべきべき指数 α を調べた。いずれの 6 つの場合においてもべき指数 α は図10に示すように $\alpha = 1$ を中心に分布していたことから、どちらの細胞も直線的な運動ではなく、ランダムな運動をしていることがわかる。

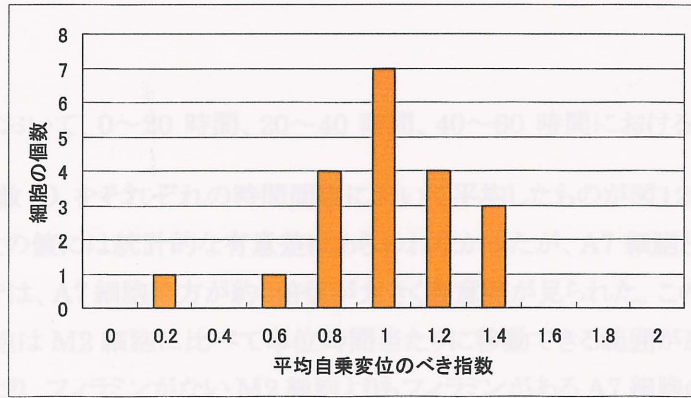


図10

ここでランダムな運動を示すブラウン運動についての平均自乗変位は $\langle \rho_i^2 \rangle$ は time interval を T と表すとき、 $\langle \rho_i^2 \rangle = 4DT$ と記述されることが知られている。定数 D を拡散係数とよぶ。この拡散係数を求めることでどちらの細胞がより速く運動しているかを定量的に示すことができる。図11に示すように、平均自乗変位-time interval でプロットしたグラフを、べき指数 α が 0.7~1.4 とランダム運動を示しているものだけ抽出し、それを $y=ax$ の一次関数でフィットし、その傾き a から拡散係数 D を求めた。

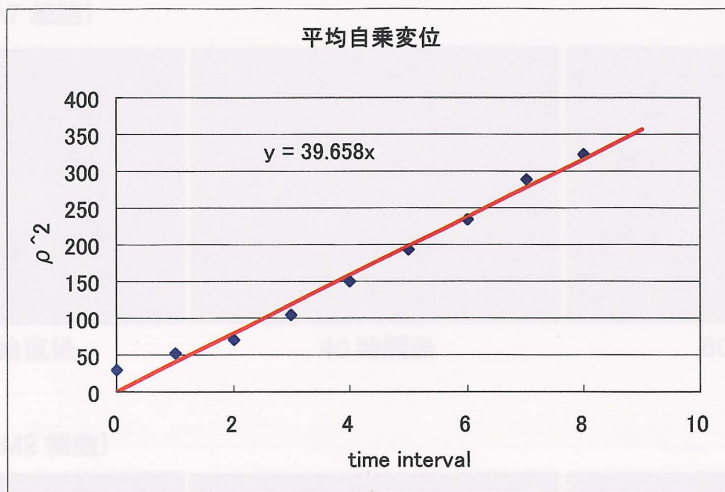


図11

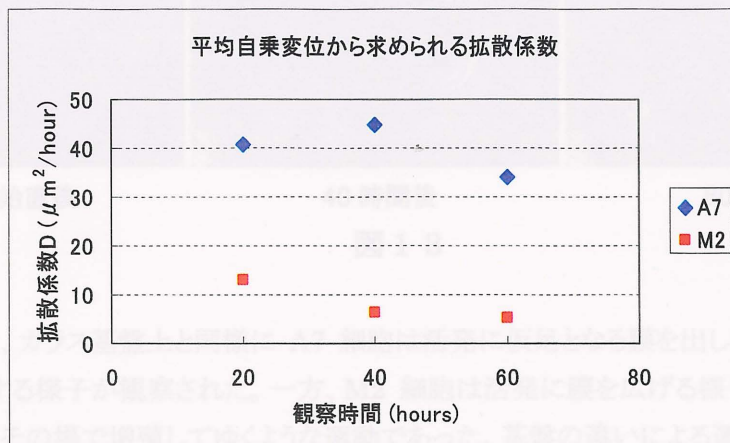


図12

それぞれの細胞において、0～20 時間、20～40 時間、40～60 時間における平均自乗変位 $\langle \rho_i^2 \rangle$ から求められた拡散係数 D をそれぞれの時間間隔において平均したものが図12に示してある。時間変化にともなう拡散係数の値には統計的な有意差はあらわれなかったが、A7 細胞と M2 細胞の間における拡散係数 D の値では、A7 細胞の方が約4倍値が大きく有意差が見られた。このことはランダム運動しているときに、A7 細胞は M2 細胞に比べて単位時間当たりに移動できる範囲が広いことを表している。

この解析の結果より、フィラミンがない M2 細胞よりもフィラミンがある A7 細胞の方が運動能が高いことを統計的に示せた。

3.1.3 アクリルアミドゲル基盤上における長時間観察

アクリルアミドゲル基盤上においてフィラミンがある A7 細胞とフィラミンがない M2 細胞を、位相差顕微鏡を用いて長時間観察を行って得られた画像の一部を図13に示す。

フィラミンあり(A7 細胞)



フィラミンなし(M2 細胞)



図 1 3

運動の様子は、ガラス基盤上と同様に A7 細胞は活発に仮足となる膜を出したり引っ込めたりしながら、重心運動をする様子が観察された。一方、M2 細胞は活発に膜を広げる様子はなく、ほとんど重心移動することなくその場で増殖してゆくような運動であった。基盤の違いによる運動の違いはないように思われる。

しかし本実験において、細胞が基盤に均一にはりついて運動する様子が観察できなかった。原因としては、アクリルアミドゲルへのフィブロネクチンのコーティングが均一にできていなかったということが考えられる。そのため、フィブロネクチンがきちんとコートされているある領域内では細胞は運動・増殖できなかつたものと考えられる。アクリルアミドゲル上での細胞の培養は、これまで試行錯誤をかさねてきてようやく長時間観察をできるところまで来た、という状況である。よって、細胞が均一にアクリルアミドゲル基盤にはりついた状態で再度ガラス基盤とゲル基盤上での運動の違いについて今後検討する必要がある。

3.1.4 増殖率の解析結果

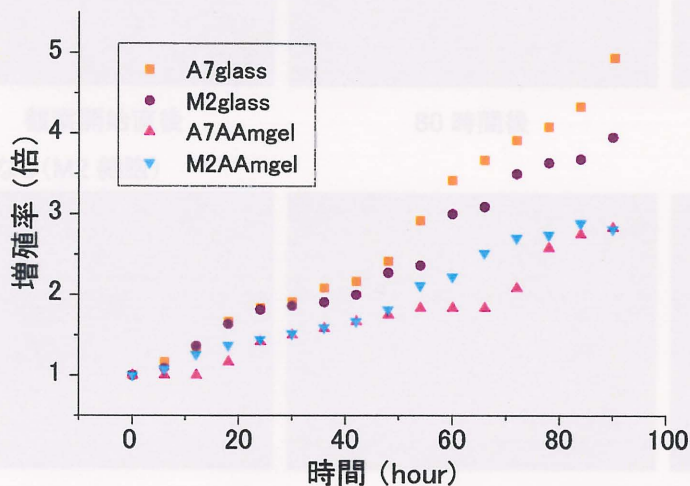


図14

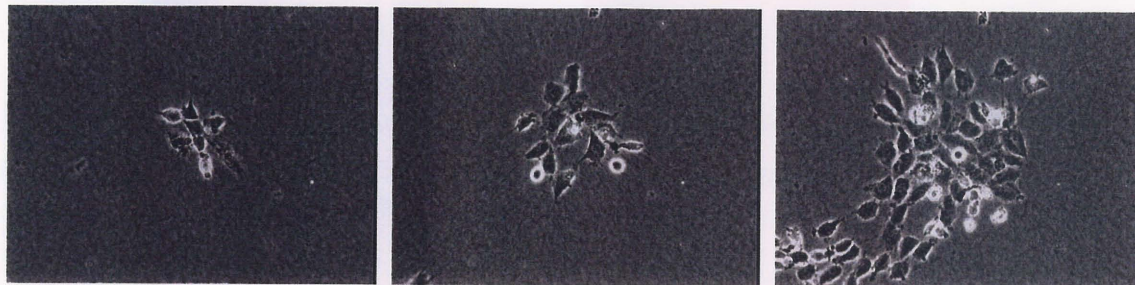
A7 細胞と M2 細胞のそれぞれ、ガラス基盤上とアクリルアミドゲル基盤上で行った長時間観察の動画から、細胞の増殖率について算出した結果を図14に示す。横軸が観察開始直後からの時間、縦軸は細胞の増殖率を示す。

ガラス基盤上、アクリルアミドゲル上(AAm)において、それぞれ A7 細胞と M2 細胞を比較してみると、同じ基盤上においてはほとんど差がなかった。この結果から、フィラミンの有無というのは細胞の増殖率には関与していないことが示唆される。

3.1.5 コラーゲンゲル基盤上における長時間観察

コラーゲンゲル基盤上においてフィラミンがあるA7細胞とフィラミンがないM2細胞を、位相差顕微鏡を用いて長時間観察を行って得られた画像の一部を図15に示す。

フィラミンあり(A7細胞)

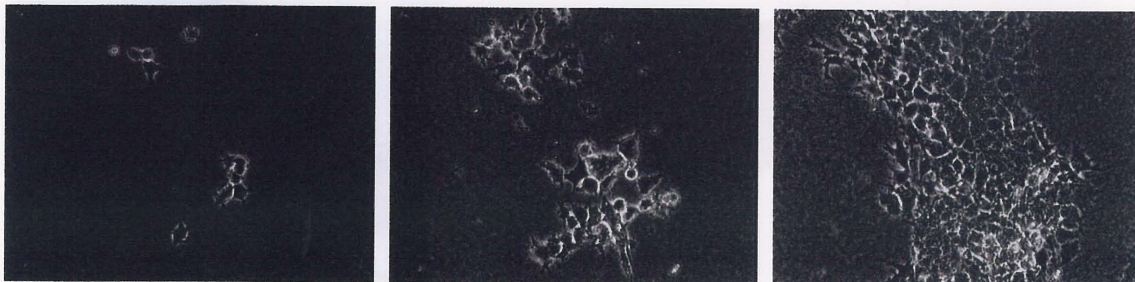


観察開始直後

80 時間後

160 時間後

フィラミンなし(M2細胞)



観察開始直後

80 時間後

160 時間後

図15

どちらの細胞もガラス基盤上るときと比べて、細胞一つあたりの面積が小さくなっていった。運動性に関しては、A7細胞ではガラス基盤上の運動の様子に比べて運動能が下がっていた。基盤にあるコラーゲン繊維を細胞同士で引っ張り合い、たぐりよせるようにして移動する細胞もいた。しかし、A7細胞のこの観察は2回行ったが1週間以上観察したもののコンフルエントに達することなくあまり増殖しなかった。M2細胞ではガラス上と同様に、ほとんど重心移動することなくその場で増殖してゆく様子だった。

3.2 AFMによる硬さ測定

3.2.1 ガラス基盤上における測定

ガラス基盤上でAFM測定を行い、走査によって得られた deflection 像(形状像)と Force Mapping 法によって得られた弾性像(硬さ像)を図16に示す。

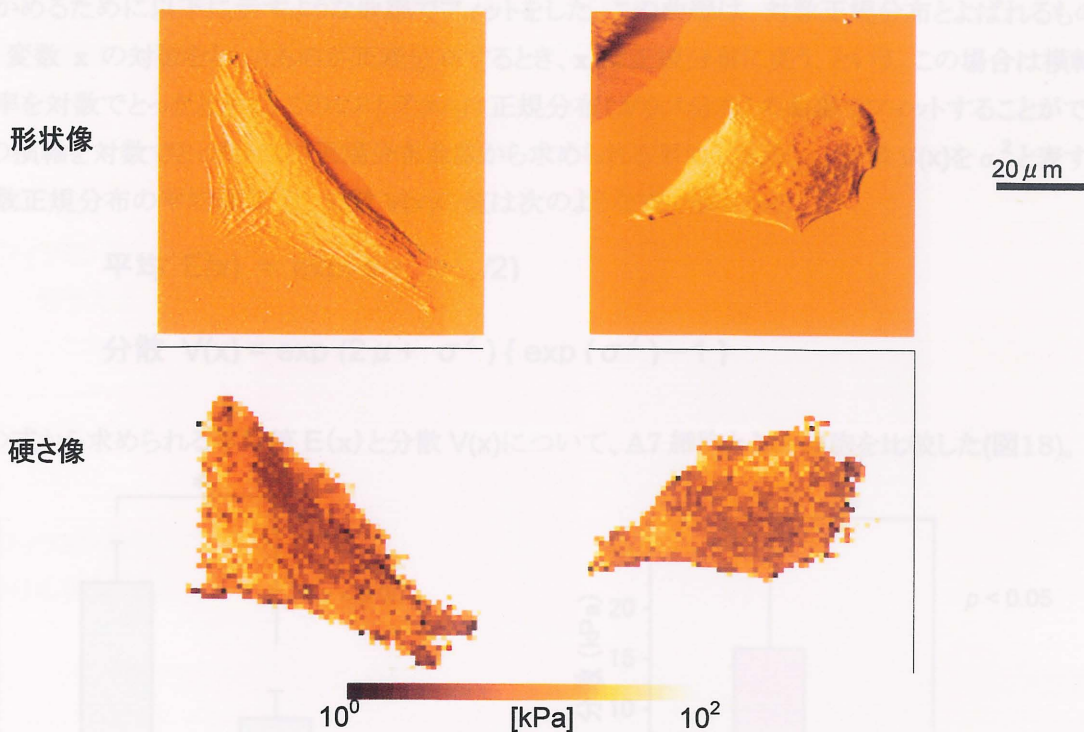


図16

それぞれの細胞において、上段図が形状像、下段図が硬さ像を表している。測定範囲は、A7細胞では μm^2 、M2細胞では μm^2 である。硬さ像は明るいところほど硬いことを表している。細胞の弾性は、全体に一樣ではなく、領域によって異なることがわかる。細胞の核付近は周囲に比べて柔らかい。

3.2.2 硬さ分布の解析

得られた硬さ像から各点における弾性率を抽出し、硬さ分布のヒストグラムを作成した(図17)。

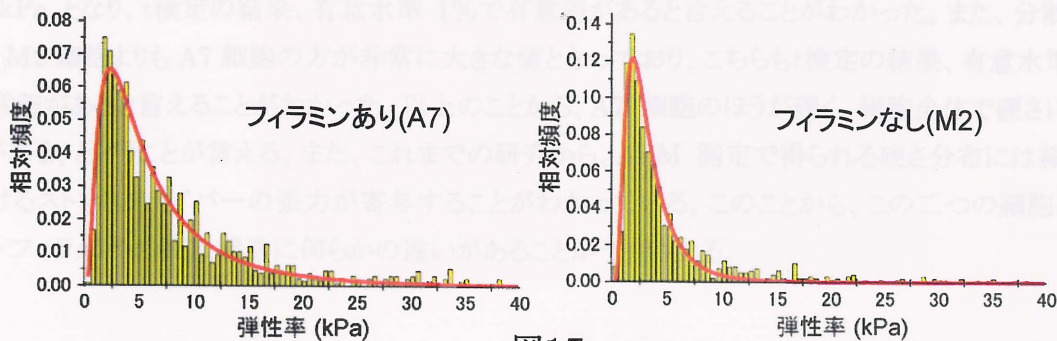


図17

横軸はフォースカーブ解析から得られた定量的な‘弾性率’、縦軸は各弾性率の頻度を細胞測定の点数で割った‘相対頻度’としている。どちらのグラフも、相対頻度のピークは 5kPa 以下の柔らかい領域に現れている。しかし、全体の分布としてはフィラミンがある A7 細胞の方が硬い領域にも現れており、A7 細胞の方が硬いことが予想される。そこでこの二つの分布に統計学的に有意な差があるかどうかを確認するために以下に示すような曲線でフィットをした。この曲線は、対数正規分布とよばれるものである。変数 x の対数をとったものが正規分布するとき、 x は正規分布に従う、という。この場合は横軸の弾性率を対数でとったときに、このヒストグラムは正規分布(ガウス分布)の曲線でフィットすることができる。この横軸を対数でとったときの正規分布曲線から求められる平均 $E(x)$ を μ 、分散 $V(x)$ を σ^2 と表すとき、対数正規分布の平均値 $E(x)$ と分散 $V(x)$ の値は次のような式で表される。

$$\text{平均 } E(x) = \exp(\mu + \sigma^2 / 2)$$

$$\text{分散 } V(x) = \exp(2\mu + \sigma^2) \{ \exp(\sigma^2) - 1 \}$$

この式から求められる平均値 $E(x)$ と分散 $V(x)$ について、A7 細胞と M2 細胞を比較した(図18)。

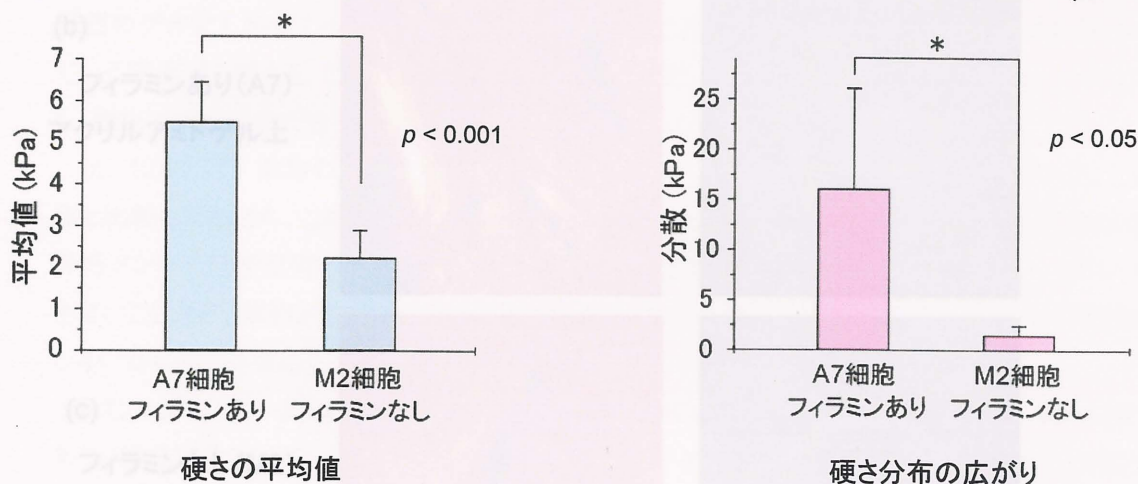


図 1 8

硬さ測定の試行回数は、A7 細胞で 4 回、M2 細胞で 5 回であり、それぞれにおいて曲線の平均値と分散の値を求め、平均をとったものが上図ある。硬さの平均値では、M2 細胞で 2.2kPa、A7 細胞では 5.5kPa となり、t検定の結果、有意水準 1%で有意差があると言えることがわかった。また、分散の値では、M2 細胞よりも A7 細胞の方が非常に大きな値となっており、こちらもt検定の結果、有意水準 5%で有意差があると言えることがわかった。以上のことから、A7 細胞のほうが硬く、細胞全体で硬さにばらつきがある、ということが言える。また、これまでの研究から、AFM 測定で得られる硬さ分布には細胞内におけるストレスファイバーの張力が寄与することがわかっている。このことから、この二つの細胞は、アクチンフィラメントの高次構造に何らかの違いがあることが予想される。

3.3 蛍光染色

3.3.1 AFM 形状像と蛍光染色像の比較

A7 細胞と M2 細胞において、アクチンフィラメントの高次構造に違いがあるかどうかを確かめるために、AFM を用いた細胞の deflection 像 (形状像) 測定の後直ちに、測定した同一の細胞を固定し、アクチンフィラメントとフィラミンを蛍光染色し観察した。この実験をそれぞれの細胞でガラス基盤上とアクリルアミドゲル基盤上において同様に行った。これらの結果を図19に示す。

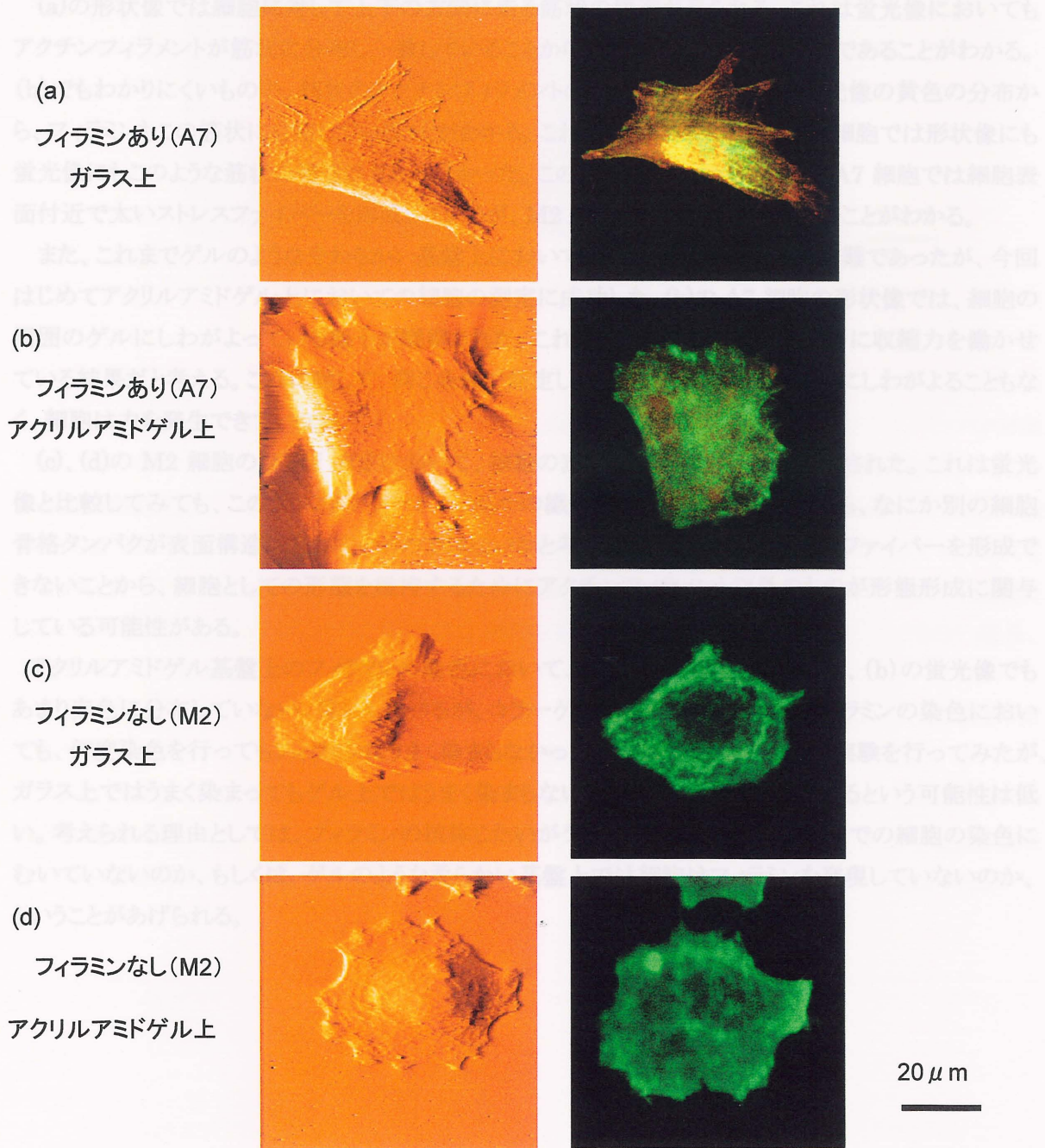


図 19

左列図がそれぞれ AFM 測定によって得られた形状像、右列図がそれぞれ蛍光染色によって得られた写真である。緑色はアクチンフィラメント、赤色はフィラミン A の分布を表しており、黄色はこの二つのタンパクが共局在していることを表す。(a)、(b)はフィラミンがある A7 細胞、(c)、(d)はフィラミンがない M2 細胞である。また、(a)、(c)はガラス基盤上、(b)、(d)はアクリルアミドゲル基盤上で測定したものである。

(a)の形状像では細胞に対して上下の方向に走る筋状の構造が見られる。これは蛍光像においてもアクチンフィラメントが筋状に分布し一致していることからストレスファイバーの構造であることがわかる。(b)でもわかりにくいものの、筋状のアクチンフィラメントの構造が見える。また、蛍光像の黄色の分布から、フィラミンもこの筋状に分布していることがわかる。これに対して、(c)、(d)の M2 細胞では形状像にも蛍光像にもこのような筋状の構造は見られなかった。このことから、フィラミンがある A7 細胞では細胞表面付近で太いストレスファイバーを形成しているが、M2 細胞では形成できていないことがわかる。

また、これまでゲルのようなやわらかい基盤上において AFM 測定を行うことは困難であったが、今回はじめてアクリルアミドゲル上における細胞の測定に成功した。(b)の A7 細胞の形状像では、細胞の周囲のゲルにしわがよっている様子が観察された。これは、細胞が基盤であるゲルに収縮力を働かせている結果だと考える。これに対して、同じ条件で測定した(d)の M2 細胞ではゲルにしわがよることもなく、細胞は力を発生できていない。

(c)、(d)の M2 細胞の AFM 測定において、細胞の表面に繊維状の構造が観察された。これは蛍光像と比較してみても、このようなアクチンフィラメントの繊維構造は見られないことから、なにか別の細胞骨格タンパクが表面構造に表れているのではないかと考えている。アクチンストレスファイバーを形成できないことから、細胞としての形態を維持するためにアクチンフィラメント以外のものが形態形成に関与している可能性がある。

アクリルアミドゲル基盤上のフィラミンの染色において、ガラス上の染色と比較して、(b)の蛍光像でもあまり赤色に分布していない。後にも述べるが、コラーゲンゲル基盤上におけるフィラミンの染色においても、何度染色を行ってもフィラミンはうまく染まらなかった。新しい抗体を使用して実験を行ってみたが、ガラス上ではうまく染まってもゲル上ではうまく染まらないことから、抗体が弱っているという可能性は低い。考えられる理由としては、フィラミンの抗体じたいがゲルのような柔らかい基盤上での細胞の染色にむいていないのか、もしくは、ゲルのような柔らかい基盤上では細胞はフィラミンを発現していないのか、ということがあげられる。

3.3.2 ミオシン染色による結果

ストレスファイバーはミオシンが結合することで、収縮性の束を形成し、細胞は基盤に収縮力を発生できると考えられている。そこで、これらの二つの細胞におけるミオシンの分布を確かめるために、ガラス基盤上においてアクチンフィラメントとミオシンIIAを蛍光染色した。結果を以下に示す。

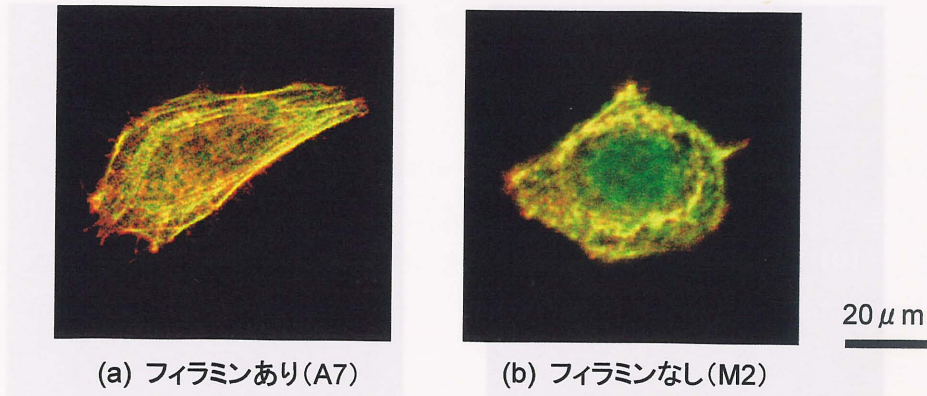


図20

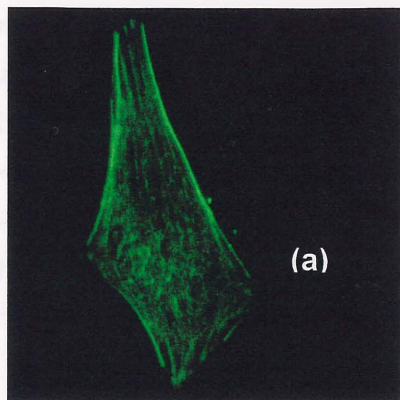
赤色がアクチンフィラメント、緑色がミオシンIIAの分布を表しており、黄色はこの二つのタンパクが共局在していることを表す。(a)のA7細胞ではアクチンフィラメントとミオシンが筋状に共局在していることから、収縮性の束であるストレスファイバーを形成できていることが確認された。これに対して、(b)のM2細胞ではアクチンフィラメントに結合するミオシンが存在し、アクチンフィラメントと共局在しているにもかかわらず、筋状の構造を形成できていないことがわかる。これらの結果は、3.3.1におけるゲル基盤によるしわの結果と一致している。M2細胞は収縮性の束であるストレスファイバーを形成できない結果、基盤に対して力を発生できないのであろう。

以上のことから言えることは、ミオシンが存在していてもフィラミンが発現していなければ、収縮性の束であるストレスファイバーを形成できない、ということである。

しかし、ミオシンにはIIAとIIBが存在し、今回はIIAの染色しか行っていない。これまでの報告で、細胞の種類によってミオシンIIAとIIBが発現している部位が異なり、細胞において果たす役割も異なっていることがわかっている。今後、ミオシンIIBの染色も行ってミオシンの分布について確かめる。

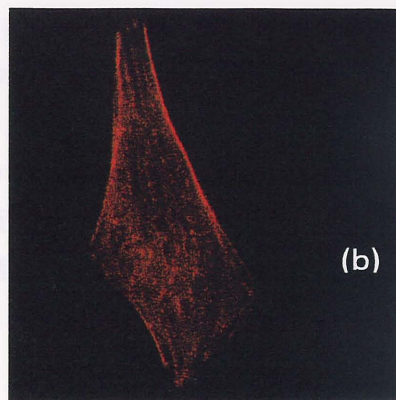
3.3.3 コラーゲンゲル基盤上における染色

より生体内の環境に近いコラーゲンゲル上での細胞はどのような形態をとり、アクチンフィラメントはどのような分布を示すのかを確かめるために、コラーゲンゲル基盤上においてアクチンフィラメントとフィラミンを蛍光染色し、観察を行った。結果を図21に示す。



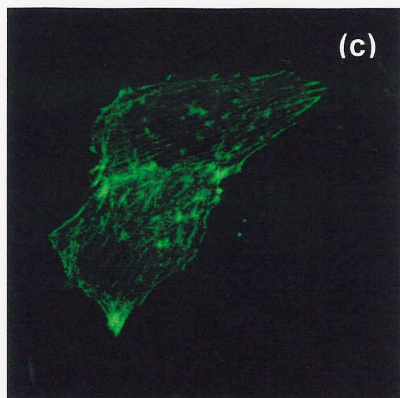
(a)

ガラス上 A7 アクチン



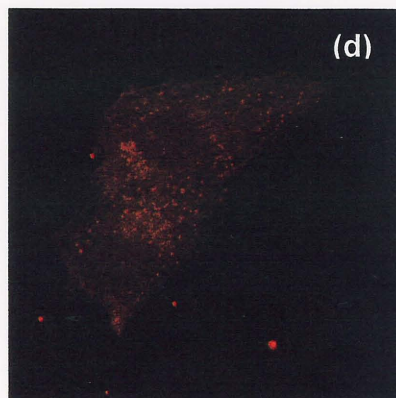
(b)

ガラス上 A7 フィラミン



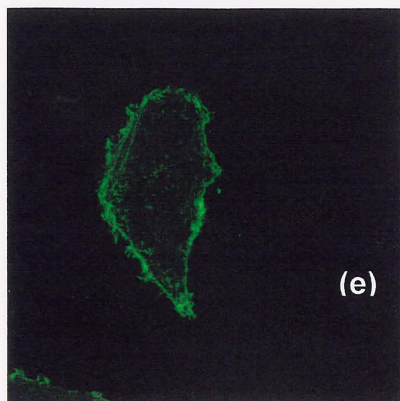
(c)

コラーゲンゲル上 A7



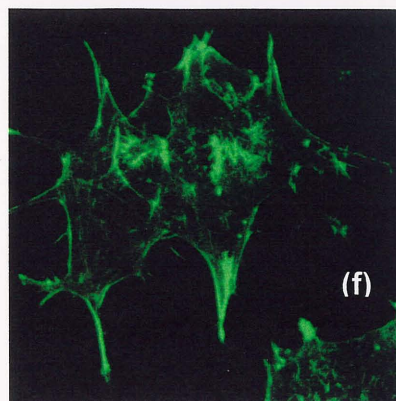
(d)

コラーゲンゲル上 A7



(e)

ガラス上 M2 アクチン



(f)

コラーゲンゲル上M2 アクチン

図 2 1

それぞれ緑色の写真がアクチンフィラメント、赤色の写真がフィラミンの分布を表している。(e)と(f)の M2 細胞を比較してみると、形が非常に違っていることがわかる。基盤がガラスのときは比較的丸っこい形をしている細胞が多いが、コラーゲンゲルのときはほとんど細胞としての形を保ってはいなく、仮足のようなものがギザギザに伸びている様子がわかる。アクチンフィラメントは細胞の輪郭に沿って、また仮足の先の方に集中的に分布していた。一方、(a)と(c)の A7 細胞を比較してみても、ガラス上に比べてコラーゲンゲル上では細胞が多少丸っこいものの、M2 細胞のように仮足があちこちに伸びているような様子は見られなかった。また、コラーゲンゲル上でもアクチンフィラメントの筋状の繊維であるストレスファイバーを確認することができた。

コラーゲンゲル上においてフィラミンがあるかないかという違いだけでここまで細胞の形が変わるのは不思議である。この M2 細胞のゲル上で見られる仮足は長時間観察の動画から予測しても、コラーゲンの配向に沿うかたちで伸びているのではないかと考えられる。フィラミンがないと接着しようとして伸ばした足をひっこめることが困難なのだろうか。

4. まとめ

- ・ 長時間観察から、フィラミンがあるA7細胞のほうがフィラミンのないM2細胞よりも運動能が高いことがわかった
 - ーガラス基盤上の観察によって得られた動画から平均自乗変位の解析により明らかにした
- ・ フィラミンがあるA7細胞の方が硬く、細胞全体で硬さに広い分布をもつことがわかった
 - ーガラス基盤上におけるAFM硬さ測定から得られた弾性率を、対数正規分布曲線でフィットすることにより、統計的な有意差を示した
- ・ A7細胞ではストレスファイバーが形成されているが、M2細胞は形成されていないことがわかった
 - ーAFM測定で得られた形状像と、アクチンフィラメントを蛍光染色した結果を比較し、ストレスファイバーの分布を確かめた
 - ーM2細胞にはアクチンフィラメントと結合してストレスファイバーを形成するミオシンが存在しているのにも関わらず、ストレスファイバーを形成できていなかった
- ・ フィラミンがあるA7細胞は基盤であるゲルに収縮力を発生していることがわかった
 - ーアクリルアミドゲル基盤上において、基盤であるゲルをひっぱりしわをよせているA7細胞のAFM形状測定に成功した

これらの結果から、ストレスファイバーを形成するためにはアクチンがフィラミンによってゲル化していることが重要だと考える。ストレスファイバーを形成するミオシンが存在していても、フィラミンによってアクチンがゲル化されアクチンフィラメントネットワークが安定していないと、ミオシンはアクチンフィラメントに結合できたとしても安定なストレスファイバーを形成できないのではないだろうか。

この蛍光染色で確認できるほどの太くて安定なストレスファイバーを形成できている結果、細胞はストレスファイバーを細胞全体に張りめぐらすことができ、このストレスファイバーの張力がA7細胞の硬さにあらわれている。この収縮性のストレスファイバーにより基盤に対して力を発生できる。その結果、細胞が重心移動をすることができると思う。

**“Le Chatelier principle”-governed
Response of
Actin Filaments to Osmotic Stress**

Tadanao Ito & Masahito Yamazaki

“Le Chatelier principle”-governed response of actin filaments to osmotic stress

Tadanao Ito^{*,†} Masahito Yamazaki[‡]

ABSTRACT

Actin filaments inhibit osmotic stress-driven water flow across a semi-permeable membrane in proportion to the filament concentration (T. Ito, K.S. Zaner and T. P. Stossel, *Biophys. J.*, **51**, 745 (1987)), and when the filaments are crosslinked by F-actin binding protein, filamin A, the flow is completely stopped (T. Ito, A. Suzuki and T. P. Stossel, *Biophys. J.*, **61**, 1301 (1992)). No conventional theory could account for these results. Here, we analyze them with formulating the entropy of the system under the osmotic stress, and show that the *Le Chatelier principle* governs such response of actin filaments to osmotic stress. That is, destroying equilibrium by osmotic stress triggers a process in the F-actin solution which tends to reduce the applied osmotic disturbance through an increase in the chemical potential of F-actin, and as a result it causes inhibitory effects on the osmotic stress-driven water flow. Such increase in the chemical potential may be attributed to a change in configuration energy of single actin filaments.

1. INTRODUCTION

Cells regulate their volumes under osmotic stress across cell membrane primarily by adjusting membrane permeability to water and ions. Actin filament networks, which invest

the periphery of many eukaryotic cells and contribute to cell rigidity, may also play a role in the reaction of cells to osmotic stress, because networks of synthetic polymers are well-analyzed to react to osmotic stress with changing their configurations to equilibrate the imbalance of osmolarity (Flory [1], Tanaka [2], Ito et al. [3]).

We previously demonstrated that actin filaments (F-actin) retarded osmotically-driven water flow across a semi-permeable membrane (Ito et al. [4,5]). Two types of inhibitory effects were observed. One, evident in uncrosslinked F-actin solutions, was proportional to the F-actin concentration but was independent of the polymer length. The second type was operative in networks of actin filaments crosslinked by Filamin A, which is a high molecular weight homodimer that promotes the perpendicular branching of F-actin, thereby immobilizing individual actin filaments. In those networks, water flow completely stopped in the setting of the same osmotic stress that only slowed flow in uncrosslinked F-actin solution of the same actin concentration >0.5 mg/ml. Although those results were very clear experimentally, we had little understanding of *why* and *how* actin filaments respond to osmotic stress in such manner as described above. We were therefore interested in elucidating mechanism of the osmotic behavior of F-actin, and report in this paper the results of thermodynamic analysis on the mechanism, which we have studied by formulating entropy of the system under the osmotic stress.

2. RESULTS

A. Formulating entropy of osmometer system

Figure 1

Fig. 1(a) is the schematic representation of the experimental system by Ito et al. [4,5]. The system is composed of two subsystem, i.e., the F-actin solution in the osmometer vessel as the "body" (I in Fig. 1(a)), and the outside solution as the "medium" (II in Fig. 1(a)). The F-actin solution is separated from the outside by a high molecular weight cut-off semi-permeable membrane (M). In the experiments, the whole system ("body" and "medium") is in equilibrium initially under ~ 20 cmH₂O of hydrostatic pressure, P_h , given by 20 mg/ml of membrane-impermeable dextran (~ 40 kD) included in the F-actin solution in I. Then, the equilibrium is destroyed by the addition of the same dextran to the outside solution in II, which makes the imbalance of osmolarity between I and II. We represent this imbalance of osmolarity with the osmotic stress P_f , defined by:

$$P_f = P_h - RT\Delta C \quad (1)$$

where ΔC is concentration difference of the dextran between I and II. The P_f values are changed by varying a concentration of the dextran in II. The equilibrium disruption induces water flow from I to II, which is quantitatively measurable from the meniscus change in the capillary. The system reaches a stationary state within 10 min, accompanied by stationary

water flow, J_w . Finally, the whole system attains a new equilibrium state where water flow ceases at $P_f = 0$.

In Fig.1(b), we illustrated thermodynamic states which the system should take during the process described above. The whole system (I as the “body” plus II as the “medium” in Fig. 1(a)) is regarded as a thermally isolated closed system with a constant volume. S^t and E^t are the total entropy and internal energy of the whole system. The continuous line represents S^t in equilibrium, which is a function of E^t in isolated closed system with a constant volume. The point b corresponds to the non-equilibrium state under consideration. At the point, the “body” is not in equilibrium with the “medium”, and the total entropy differs from its equilibrium value $S^t(E^t)$ for the same value of the total energy E^t by some amount $\Delta S^t < 0$. The point a is the final equilibrium state which the system reaches spontaneously along the vertical line ba , accompanied by the water flow from the inside to outside of the osmometer. In this case, the segment ba corresponds to $-\Delta S^t$. The point c is defined as the crossing point between the continuous line of equilibrium and the line parallel to E^t axis through the point b . As discussed below, the horizontal segment cb corresponds to the minimum work W_{\min} , which is required to bring the whole system to the point b from some equilibrium state.

We can evaluate the total entropy ΔS^t , according to Landau and Lifshitz [6]. Let us

assume that the whole system is initially in equilibrium, and then moves to a non-equilibrium state at the point b in Fig. 1(b) through a work, W , on the “body” done by an “external source” which is thermally isolated from both of the “medium” and “body”. In the process, the “body” also receives some amount of energy ΔQ from the “medium”, and increases its internal energy by ΔE^i . From the first law of thermodynamics,

$$W = \Delta E^i - \Delta Q. \quad (2)$$

In the present case, the “body” is F-actin solution in the osmometer vessel and the “medium” is the outside solution. We may perform thermodynamic analysis of the system under the condition that pressure (P^i), temperature (T^i) and volume (V^i) of the F-actin solution are constant during the whole process, and also $T^i = T^o = T$ where T^o is temperature of the outside solution. In this case, ΔE^i and ΔQ are:

$$\Delta E^i = \Delta(T^i S^i - P^i V^i + \mu_w^i n_w^i + \mu_f n_f) = T \Delta S^i + \mu_w^i \Delta n_w^i + n_w^i \Delta \mu_w^i + n_f \Delta \mu_f \quad (3)$$

$$\Delta Q = -T^o \Delta S^o - \mu_w^o \Delta n_w^o = -T \Delta S^o + \mu_w^o \Delta n_w^o \quad (4)$$

where μ_w and μ_f are the chemical potentials of water and F-actin, respectively, n_w and n_f are their numbers of molecules, S^i the entropy of the F-actin solution, and suffix i and o represent the inside and outside of the osmometer. The whole system of F-actin solution (i.e., the “body”) plus outside solution (i.e., the “medium”) can be regarded as a thermally

isolated closed system. The law of increase of entropy shows that $\Delta S^i + \Delta S^o \geq 0$, because the entropy of thermally isolated source of work (i.e., the “external source”) does not vary.

Thus, from Eq. 2-4,

$$\begin{aligned}
 W &= \Delta E^i - \Delta Q \\
 &= T(\Delta S^i + \Delta S^o) + (\mu_w^i - \mu_w^o)\Delta n_w^i + n_f[1 + (n_w^i / n_f)(\Delta\mu_w^i / \Delta\mu_f)]\Delta\mu_f \quad (5)
 \end{aligned}$$

$$W \geq W_{\min} = \Delta\mu_w\Delta n_w^i + n_f[1 + (n_w^i / n_f)(\Delta\mu_w^i / \Delta\mu_f)]\Delta\mu_f \quad (6)$$

where $\Delta\mu_w = \mu_w^i - \mu_w^o$. This W_{\min} corresponds to the segment *cb* in Fig. 1(b). As evident in the figure,

$$\Delta S^t = -(1/T)W_{\min} = -(1/T)\{\Delta\mu_w\Delta n_w^i + n_f[1 + (n_w^i / n_f)(\Delta\mu_w^i / \Delta\mu_f)]\Delta\mu_f\} \quad (7)$$

For an infinitesimal change in the state of the “body”,

$$dS^t = -(1/T)\{\Delta\mu_w dn_w^i + n_f[1 + (n_w^i / n_f)(d\mu_w^i / d\mu_f)]d\mu_f\} \quad (8)$$

It should be noted here that the condition $(\Delta S^i + \Delta S^o) = 0$ does not necessarily means that the F-actin solution (i.e., the “body”) is in equilibrium at every instant during the process, and this situation is reflected in the second term of Eq. 8. The internal equilibrium condition of the “body” is obtained by setting this second term as zero, which leads to Gibbs-Duhem

relation.

B. Effects of F-actin on stationary water flow

Figure 2

In Fig. 2, we summarize the results of experiments by Ito et al. [4,5] of the stationary water flow J_w from F-actin solutions at various intensities of osmotic stress P_f . As evident in the figures, the following relation holds between J_w and P_f .

$$J_w \propto (1 - \varepsilon)P_f \quad (9)$$

$$\varepsilon \propto C_f \quad (10)$$

where C_f is weight concentration of F-actin. ε in Eq. 9 was independent of filament length, varied by reacting reacting actin filaments with the actin severing protein gelsolin. Thus, interfilament interactions may not account for the effects of F-actin on J_w . Nonfilamentous actin (G-actin) or dextran used in the experiments had no effect on water flow at any concentration used (≤ 10 mg/ml for G-actin, ≤ 20 mg/ml for the dextran).

As J_w is proportional to the difference in the chemical potential of the water between the inside (μ_w^i) and outside (μ_w^o) of the osmometer, the following relation is derived from Eq. 9 (Kachalsky and Curran [7]),

$$\Delta\mu_w = \mu_w^i - \mu_w^o = \bar{V}_w(1 - \varepsilon)P_f \quad (11)$$

where \bar{V}_w is partial molar volume of water. Eq. 11 means that the retardation of the osmotic stress-induced water flow is due to a decrease in the chemical potential difference of water caused by the presence of F-actin. This raises a question; why does F-actin cause this decrease? Let us ask this question to the entropy formula of Eq. 8, where we introduce the following signs, i.e., $x \equiv n_w^i$, $y \equiv \mu_f$, and

$$X \equiv -\partial S^t / \partial x = (1/T)\Delta\mu_w \quad (12)$$

$$Y \equiv -\partial S^t / \partial y = n_f [1 + n_w^i / n_f (d\mu_w^i / d\mu_f)]$$

According to Eq. 8, $Y = 0$ is the condition of internal equilibrium of the F-actin solution itself, and $X = 0$ and $Y = 0$ is a necessary condition for equilibrium of the whole system. Under the equilibrium of the whole system, S^t has its *maximum value*, and so the following conditions should be satisfied (Landau & Lifshitz [6]):

$$(\partial X / \partial x)_y > 0, (\partial Y / \partial y)_x > 0, (\partial X / \partial x)_y (\partial Y / \partial y)_x - (\partial X / \partial y)_x^2 > 0 \quad (13)$$

$$(\partial X / \partial x)_{Y=0} \equiv (\partial X / \partial x)_y - (\partial X / \partial y)_x^2 / (\partial Y / \partial y)_x > 0 \quad (14)$$

Thus,

$$(\partial X / \partial x)_y > (\partial X / \partial x)_{Y=0} > 0 \quad (15)$$

$$|(\partial X / \partial x)_y \Delta x| > |(\partial X / \partial x)_{Y=0} \Delta x| \quad (16)$$

Here, let us destroy equilibrium between the F-actin and outside solutions by breaking

osmotic balance between them. The whole system goes to a non-equilibrium state at b in Fig.

1(a). The quantity $x = n_w^i$ will be deviated from the equilibrium value by $\Delta x = \Delta n_w^i$.

$y \equiv \mu_f$ is not directly affected by it in this case, and the condition $X = 0$ no longer satisfied.

Then the change in X at the instant of breakage of the equilibrium is

$$(\Delta X)_y = (\partial X / \partial x)_y \Delta x = (1/T)(\partial \Delta \mu_w / \partial n_w^i)_y \Delta n_w^i \quad (17)$$

The change in x at constant y leads to a violation of the condition $Y = 0$, i.e. of internal equilibrium of the F-actin solution. When the internal equilibrium is again restored,

$X \equiv \Delta X$ will be

$$(\Delta X)_{Y=0} = (\partial X / \partial x)_{Y=0} \Delta x = (1/T)(\partial \Delta \mu_w / \partial n_w^i)_{Y=0} \Delta n_w^i \quad (18)$$

$\Delta \mu_w$ in Eq. 17-18 is the deviation from its equilibrium values at c . We may approximate this to the deviation from at a , because in the present experiments the point b is not far from the equilibrium line, and so difference in temperatures between a and c should be so small¹ that we may regard each value of the individual chemical potentials to be the same at either equilibrium state under the same pressure². Thus, from Eq. 16,

$$|(\Delta X)_y| > |(\Delta X)_{Y=0}| \quad (19)$$

$$|(\partial \Delta \mu_w / \partial n_w^i)_y \Delta n_w^i| > |(\partial \Delta \mu_w / \partial n_w^i)_{Y=0} \Delta n_w^i| \quad (20)$$

$$|\bar{V}_w P_f| = |(\Delta \mu_w)_y| > |(\Delta \mu_w)_{Y=0}| \quad (21)$$

where P_f is the applied osmotic stress to break the osmotic balance. $|(\Delta \mu_w)_y|$ in Eq. 21 is the

difference of water chemical potential in the F-actin solution from that of the outside solution just after the breakage of the osmotic balance, and $|(\Delta\mu_w)_{Y=0}|$ is the difference after restoring the internal equilibrium of F-actin solution. This result agrees with what so-called *Le Chatelier principle indicates, that is, an external interaction that disturbs the equilibrium triggers a process in the body which tends to reduce the effects of this interaction.* In the present case, the disturbance by the osmotic stress triggers a process that varies the chemical potential of water in the F-actin solution to reduce its effect (Eq. 11).

This osmotic stress-triggered decrease in the chemical potential of water in the F-actin solution may relate to an increase in the chemical potential of F-actin as follows. The water flow in Fig. 3 is stationary flow from the F-actin solution in which the internal equilibrium is established, but equilibrium with the outside is not (i.e., $Y = 0, X \neq 0$). The condition $Y = 0$ leads to:

$$n_w^i d\mu_w^i + n_f d\mu_f = 0 \quad (22)$$

so that

$$n_w^i \Delta\mu_w^i + n_f \Delta\mu_f = 0, \quad (23)^3$$

where $\Delta\mu_w^i$ and $\Delta\mu_f$ are the deviations of the chemical potentials of water and F-actin in the F-actin solution from those at the whole equilibrium state (i.e., $X = 0, Y = 0$), respectively.

According to Eq. 21 and 23, we may describe the difference of the chemical potential of water between the inside and outside of the osmometer at the stationary state, $(\Delta\mu_w)_{Y=0}$ as:

$$(\Delta\mu_w)_{Y=0} = \bar{V}_w P_f + \Delta\mu_w^i = \bar{V}_w (1 - [n_f] \Delta\mu_f / P_f) P_f = \bar{V}_w (1 - \varepsilon) P_f \quad (24)$$

where

$$0 < \varepsilon = [n_f] \Delta\mu_f / P_f < 1, \quad (25)$$

and $[n_f]$ is the concentration of F-actin. Eq. 24-25 indicate that the decrease in water chemical potential at the stationary state relates directly to an increase in F-actin chemical potential. Hence, it may be reasonable to consider that the increase in the F-actin chemical potential is triggered by the osmotic stress at first, and as a consequence of it the chemical potential of water decreases at the stationary state.

$\Delta\mu_f / P_f$ in Eq. 25 is expected to be constant at the stationary state, because near the equilibrium a linear relationship between $\Delta\mu_f$ and P_f may hold, and furthermore, $\Delta\mu_f$ should be independent of F-actin concentration, because no filament-filament interaction contributes to it, as discussed in the next section (see Eq. 26). In addition, the chemical potential of F-actin is proportional to, and the filament number is inversely proportional to the filament length. Thus, ε in Eq. 24 is linearly proportional to mass concentration of F-actin, as shown experimentally in Fig. 3 (b).

C. Mechanism of chemical potential change

From the discussion above, it is clear *why* the actin filaments change their chemical potential in response to osmotic stress, but still unclear *how* the filament can change it at constant T without any change in the direct interactions with the solvent. We shall address this question next.

The applied osmotic stress brings the F-actin solution into a non-equilibrium state under constant temperature and volume, and the chemical potential of F-actin will be deviated from its value in the equilibrium of whole system by $\Delta\mu_f$. In this case, $\Delta\mu_f$ is a function of the deviation of energy of the F-actin solution, ΔE . Such ΔE should be solely due to a change in configuration energy of the single filaments, because the osmotic stress varies neither interaction between the actin filaments, nor between the filament and solvent. In addition, such a change in the configuration of the single filaments as induced by the osmotic stress is expected not to alter interfilament interactions significantly. These results allow us to assume a Boltzmann distribution of the single filaments on their configuration energy. Thus, $E = \sum \varepsilon_k \exp(\mu_f - \varepsilon_k) / kT$, where ε_k is an eigen value of configuration energy, and $E = n_f \langle \varepsilon \rangle$ and $\Delta E = n_f \Delta \langle \varepsilon \rangle$, where $\langle \varepsilon \rangle$ and $\Delta \langle \varepsilon \rangle$ are the average configuration energy per single filaments in the equilibrium of whole system and its deviation in the non-equilibrium state under consideration, respectively. In this case, $\Delta\mu_f$ is

represented by:

$$\Delta\mu_f = (\partial\mu_f / \partial E)_{V,T} \Delta E = (kT / E)_{V,T} \Delta E = kT(\Delta \langle \varepsilon \rangle / \langle \varepsilon \rangle). \quad (26)$$

where $(\partial\mu_f / \partial E)_{V,T} = (kT / E)_{V,T}$, derived from E of the above Boltzmann distribution. Eq. 26 indicates that *the change in the chemical potential $\Delta\mu_f$ is solely due to a change in the average configuration energy of the filament, independently of its concentration.*

According to the analysis by Engelmann et al. [8, 9] of the variations in crossover spacing in actin filaments observed in electron micrographs, a random deviation of $\sim 10^\circ$ (rms) exists in the angular position of the nearest neighbors of each subunit of actin filament. This result indicates that the position of the individual subunit molecules in the filament could be thermally fluctuated with changing the filament configuration. Such thermally-activated change in the configuration may make it possible to vary the chemical potential under the osmotic stress by the way as described above.

D. Process of chemical potential decrease of water by F-actin

Figure 3

As discussed above, destroying the equilibrium through disturbance by osmotic stress activates a process that increases the chemical potential of F-actin so as to reduce the applied disturbance. Fig. 3 represents a plausible scheme of that process. At the equilibrium state I, the F-actin solution is in equilibrium with the outside solution. Destroying the equilibrium

by osmotic stress P_f causes the system to change into the non-equilibrium state II, followed by an increase in the chemical potential of F-actin, $\Delta\mu_f$ (step 1). In the following step (step 2), the F-actin solution spontaneously goes to the stationary state III, at which the solution is equilibrated with itself, but not with the outside (i.e., $X \neq 0, Y = 0$). Then it proceeds to the final equilibrium state IV (i.e. $X = 0, Y = 0$), accompanied by water flow to the outside solution (step 3).

We may assess the conditions under which the above process can proceed, by evaluating entropy production of the F-actin in the individual steps. At state I, the chemical potential of water in the F-actin solution does not differ from that of the outside solution as the “medium”, but at state II it differs from that by $\bar{V}_w P_f$. Hence, some work⁴ (W') must be done on the F-actin solution in step 1. This work corresponds to the work to transport n_w^i moles of water across their chemical potential difference of $\bar{V}_w P_f$, and it should be larger than the work, w to transport them reversibly:

$$w = n_w^i \bar{V}_w \int_0^{P_f} dP_f = n_w^i \bar{V}_w P_f \quad (27)$$

In this case, the entropy production of the F-actin solution ($\Delta_i S$) in step I is positive under the same condition given by Eq. 25, i.e., $[n_f] \Delta\mu_f < P_f$;

$$\begin{aligned} T\Delta_i S &= T\Delta S - \Delta Q = W' - (\Delta E - T\Delta S) = W' - n_f \Delta\mu_f \\ &> \bar{V}_w n_w^i (P_f - [n_f] \Delta\mu_f) > 0 \end{aligned} \quad (28)$$

Therefore, the increase in the chemical potential of F-actin less than $P_f/[n_f]$ may occur with transition from state I to state II, satisfying the condition in Eq. 25.

In step 2, the F-actin solution in the non-equilibrium state II (i.e., $X \neq 0, Y \neq 0$) goes to the stationary state III (i.e., $X \neq 0, Y = 0$), in which the solution is equilibrated with itself through a change in the chemical potential of water, $\Delta\mu_w^i$. As the chemical potential of water is assumed not to vary in step 1, this change in the chemical potential in step 1 should be equal to the deviation of the chemical potential in the stationary state III from that in the equilibrium of whole system, and so the same relation as Eq. 23 (i.e., the Gibbs-Duhem relation) holds between $\Delta\mu_w^i$ and $\Delta\mu_f$. Thus,

$$T\Delta_i S = T\Delta S - \Delta Q = T\Delta S - \Delta E = -n_w^i \Delta\mu_w^i = n_f \Delta\mu_f > 0 \quad (29)$$

Therefore, the process in step 2 may spontaneously proceed, and the chemical potential of water gets equal to the stationary value at state III, as required.

Consequently, the scheme in Fig. 3 accounts for how the chemical potential of water is decreased by the presence of F-actin, without any contradiction to the analytical results in the previous sections.

E. Effects of crosslinking of actin filaments on water flow

Figure 4

If the stationary water flow at state III in Fig. 3 is energetically unfavorable, no water

flow should be induced, i.e. $\varepsilon = 1$ in Eq. 9. This might be the case of F-actin networks crosslinked by filamin A. In those networks, water flow completely stopped in the setting of the same osmotic stress that only slowed flow in uncrosslinked F-actin solution of the same actin concentration >0.5 mg/ml, as shown in Fig. 4(a) (Ito et al. [5]).

The crosslinking by filamin A makes the individual actin filaments immobile in the solution. Consequently, if water flow occurs with stability of the network structure being kept, it would separate the network into two phases, one of which is “filaments in water” with the chemical potential of μ_f and the other “filaments exposed to air” with the chemical potential of μ_f' of different value. In this case, the entropy production $\Delta_i S$ accompanied by the water flow Δn_w is represented by:

$$\Delta_i S = -(1/T)(\Delta\mu_w \Delta n_w + \Delta\mu_f' \Delta n_f') = -(1/T)(\Delta\mu_w - \bar{V}_w [n_f] \Delta\mu_f') \Delta n_w \quad (30)$$

where $\Delta n_f'$ is an increase in the number of the filaments exposed to air which is caused by Δn_w , and $\Delta\mu_f' = \mu_f' - \mu_f$. The condition required to have such water flow is $\Delta_i S > 0$, and combination of it with Eq. 21 gives a condition that:

$$\Delta\mu_f' < \Delta\mu_w / \bar{V}_w [n_f] < P_f / [n_f] \quad (31)$$

Let us estimate the numerical values of both sides of Eq. 31 under the conditions of $P_f = 20$ cmH₂O and 2 mg/ml actin filaments with a length of 1 μm . $P_f / [n_f]$ in the right hand is directly calculated $\sim 2.4 \times 10^{-17}$ J/single filament. $\Delta\mu_f'$ in the left hand is evaluated as

follows. The hydrophilic surface of the filaments with a radius of 4 nm exposed to air may be covered with a thin capillary water layer with a radius approximately the same as F-actin, i.e., ~ 4 nm. In this case, surface tension of the water layer, the coefficient of which is 7×10^{-2} N/m, adds to the filaments an extra energy of $\sim 2.4 \times 10^{-15}$ J/single filaments, ~ 100 times larger than that of $P_f / [n_f]$. Consequently, so long as the crosslinked network structure is thermodynamically stable under the osmotic stress, no water flow could be induced, that is, the condition that $X = 0$ and $Y = 0$ must hold under the osmotic stress in this case. This condition may be attainable by counterbalance of the osmotic stress with a change in the chemical potential of F-actin, i.e. $P_f = [n_f] \Delta\mu_f$. That could be actually fulfilled in the networks of actin filaments crosslinked by filamin A, and as the result no water flow is observed from the networks, as shown in Fig. 4(a).

It is worth noting that, in such a case, massive energy is stored in the network structure under a moderate condition. The free energy stored per single actin subunits of the network, which is calculated from $\Delta\mu_f / 360$ in the case of $1 \mu\text{m}$ F-actin, is 6×10^{-13} erg under the above condition. This is almost equivalent to the free energy stored by single ATP molecules. As a result, the F-actin network under the osmotic stress should be at meta-stable state. So, the network structures will be broken, if intensity of the osmotic stress exceeds some critical value. In fact, in 2 mg/ml F-actin network crosslinked by filamin A at a molar ratio to actin

subunit of 1:340, an emergent water flow with “infinite” rate was observed at the osmotic stress of 40 cmH₂O, presumably resulting from collapse of the network structure by the osmotic stress, though no water flow was induced at the osmotic stress less than that (Fig. 4(b)).

3. DISCUSSION

A. Le Chatelier principle-governed F-actin response to osmotic stress

The second law of thermodynamics-ruled *Le Chatelier principle*, which is formulated as “an external interaction that disturbs the equilibrium triggers a process in the body which tends to reduce the effects of this interaction”, has been well recognized in the response of thermodynamic system to various interactions that disturb its equilibrium. In this report, we have shown that the *Le Chatelier principle* governs such response of actin filaments to osmotic stress as shown in Fig. 2. Fig. 3 displays the plausible scheme of the process that is activated in F-actin solution by osmotic stress. We may realize what the *Le Chatelier principle* demands in step 2 of the process, as follows. From state II to state IV, two alternative paths are possible through two different stationary states, one of which is the stationary state with $\Delta\mu_f > 0$ and $\mu_w = \mu_w^i - \bar{V}_w[n_f]\Delta\mu_f$ (state III in the figure), the other is that with $\Delta\mu_f = 0$ and $\mu_w = \mu_w^i$. The system should undergo the same free energy change of $-n_f\Delta\mu_f$ along either path to lead to the individual stationary states. In this case, the factor

that determines which path to take is which path can satisfy the demand of the *Le Chatelier principle*. As the result, the preferred path is the one that passes through the stationary state with a smaller chemical potential difference of water (i.e. state III), resulting in reduction of the applied disturbance by osmotic stress in accordance with the *Le Chatelier principle*.

B. Mechanism of F-actin response to osmotic stress

As shown by Eq. 26, actin filaments vary their chemical potential in response to osmotic stress with changing their configuration energy $\langle \varepsilon \rangle$. According to a Fourier transformation analysis by Kas et al. [10] of single filament dynamics of fluorescent-labeled F-actin in extremely dilute solution, undulation of the filaments is not a simple free bending motion, but is the one restricted by tensions, especially in the filaments longer than $\sim 1 \mu\text{m}$. These results indicate that the single filaments in solution may take various configurations of different energies. Hence, the average energy $\langle \varepsilon \rangle$ may vary under the osmotic stress with changes in the configuration that the actin filaments take as average. As the result the chemical potential of F-actin may also vary, according to Eq. 26.

On the other hand, polymers with rubber elasticity could not change their chemical potentials at constant T, because their average energy depends only on T, and so $\Delta \langle \varepsilon \rangle = 0$ in Eq. 26. Also, monomeric proteins like G-actin may not change its chemical potential, because their conformation is so stable that they may not vary it under the osmotic stress, i.e,

$\Delta < \epsilon > = 0$. So, Eq. 26 explain why only filamentous actin but neither non-filamentous G-actin nor dextran is osmotically active against the osmotic stress.

C. Biopolymer networks

Polymer networks respond to osmotic stress so as to equilibrate osmotic imbalance between the inside and outside of the network. In a network of polymer with rubber elasticity, a change in *the configuration entropy* of the network strands is dominant in that equilibration, so that a large change in the volume of the networks occurs in response to the osmotic stress (Flory [1], Ito et al. [3]). On the other hand, in the network of F-actin filaments a change in *the configuration energy* of the network strands is dominant as discussed in this report, so that the equilibration can be established without any significant change in the volume of the networks (Fig. 4(a)). Such a response to osmotic stress as F-actin displays may be characteristic of networks of biopolymers made of subunit proteins. In fact, we observed that networks of an intermediate filament of vimentin respond to the osmotic stress in a similar way to F-actin (data not shown). This type of response of biopolymer networks may have certain physiological implications. Cells of mammalian organisms may be constantly subjected to fluctuation in osmotic pressure that is the cause of cell swelling or shrinkage, and these biopolymer networks in the periphery of the cells could constitute a relatively strong buffer against such fluctuations to avoid any significant change in the volume of cell.

ACNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by a grant-in-aid for General Science Research C from the Ministry of Education, Science, and Culture, Japan.

FOOTNOTES

*Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto University, Kyoto 606-8052, Japan (E-mail: i54167@sakura.kudpc.kyoto-u.ac.jp), ‡Department of Physics, Faculty of Science, Shizuoka University, Shizuoka, 422-8529, Japan (E-mail: spmyama@ipc.shizuoka.ac.jp)

† To whom correspondence should be addressed.

¹The slope of S' vs E' curve in Fig. 1(b) represents the inverse of temperature at the point, and so temperature difference between the two close points is negligible.

²No chemical potential change occurs along a reversible process under constant P and T.

³Eq. 23 is derived under the assumption that n_w^i is constant, since the deviation of n_w^i from its equilibrium value is negligibly small (i.e., ~5%) in the present case.

⁴The source of this work should be free energy decrease of the outside solution as the “medium”, which results from dissolution of the dextran to make the osmotic imbalance.

REFERENCES

[1] P. J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry* (Cornell University Press, Ithaca, New York

1953), Chapter VIII

[2] T. Tanaka, *Sci. Am.* **244**, 124 (1981)

[3] T. Ito, M. Yamazaki, and S. Ohnishi, *Biophys. J.* **56**, 707 (1989)

[4] T. Ito, K. S. Zaner, and T. P. Stossel, *Biophys. J.* **51**, 745 (1987)

[5] T. Ito, A. Suzuki, and T. P. Stossel, *Biophys. J.* **61**, 1301 (1992)

[6] L. D. Landau and E. M. Lifshitz, *Statistical Physics*, 3rd Ed, Part 1 (Butterworth Heinemann, Oxford, 1980), Section 20

[7] A. Katchalsky and P. F. Curran, *Nonequilibrium Thermodynamics in Biophysics*, (Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 1975), Chapter 10

[8] E. H. Egelman and D. J. DeRosier, *Acta Cryst.* **A38**, 796 (1982)

[9] E. H. Egelman and D. J. DeRosier, *Biophys. J.* **63**, 1299 (1992)

[10] J. Kas, H. Strey, J. X. Tang, D. Finger, R. Ezzell, E. Sackman, and P. A. Janmey, *Biophys. J.* **70**, 609 (1996).

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. (a) Schematic representation of the experiment system by Ito et al. ([4,5]). I: sample solution ("body", ~1.5 ml) in osmometer vessel with a capillary of 1.3×10^{-2} cm-diameter. II: outside buffer solution ("medium", ~500ml). M: molecular weight cut-off semipermeable membrane. P_h is equilibrium hydrostatic pressure. Dextran: membrane-impermeable dextran added to II to make the osmotic stress. **(b)** Entropy, S_t of the system in (A) as a function of the energy, E_t . The continuous line represents the equilibrium entropy. The *ba* segment of the vertical hatched line corresponds to the difference of entropy ΔS_t between the non-equilibrium state under consideration (*b*) and the final equilibrium state (*a*). The *bc* segment of the horizontal hatched line corresponds to the minimum work, W_{\min} done on the "body" by external source to bring the system to *b*. See the text for detail.

FIG. 2. (a) Dependence of osmotic stress-induced water flow on F-actin concentrations. The water flows J_w of various concentrations of F-actin are plotted against the osmotic stress, P_f . The concentrations are 0 mg/ml (\circ), 1.0 mg/ml (\bullet), 2.0 mg/ml (\square), and 3.3 mg/ml (\blacksquare). **(b)** Dependence of ε , derived from the slope of P_f versus J_w , on different F-actin concentrations. From the data of Ito et al. [4,5].

FIG. 3. Plausible scheme of the process that is activated in F-actin solution to decrease chemical potential of water. μ_w is the chemical potential of water in the F-actin solution in the state indicated above and $\Delta\mu_f$ deviation of the chemical potential of F-actin from that in the whole equilibrium. P_f is osmotic stress applied to the system to destroy the initial equilibrium. Δn_w^i is a change in moles of water in the F-actin solution in the individual steps. See the text for detail.

FIG. 4. (a) Concentration dependence of ε of F-actin networks crosslinked by filamin A at a molar ratio of 1:340. From the data of Ito et al. [5]. **(b)** Abrupt change in meniscus observed in 2mg/ml F-actin network in (a) at the osmotic stress of 40 cmH₂O. The F-actin network was subjected to the osmotic stress at $t = 0$.

Fig. 1

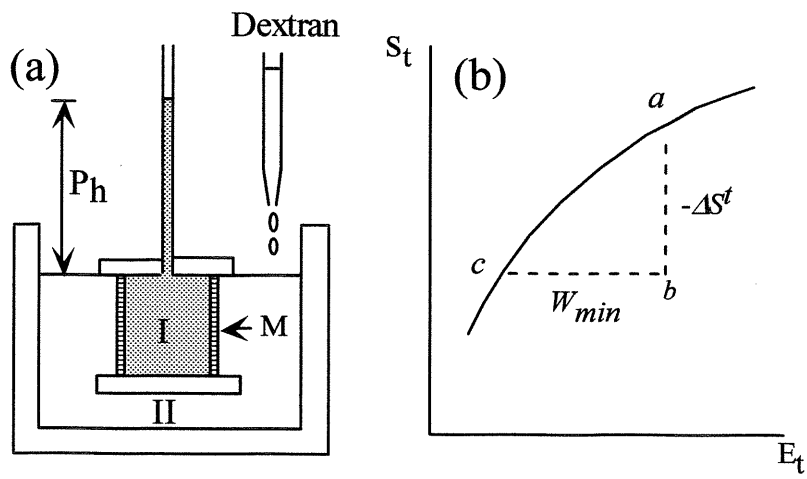


Fig. 2

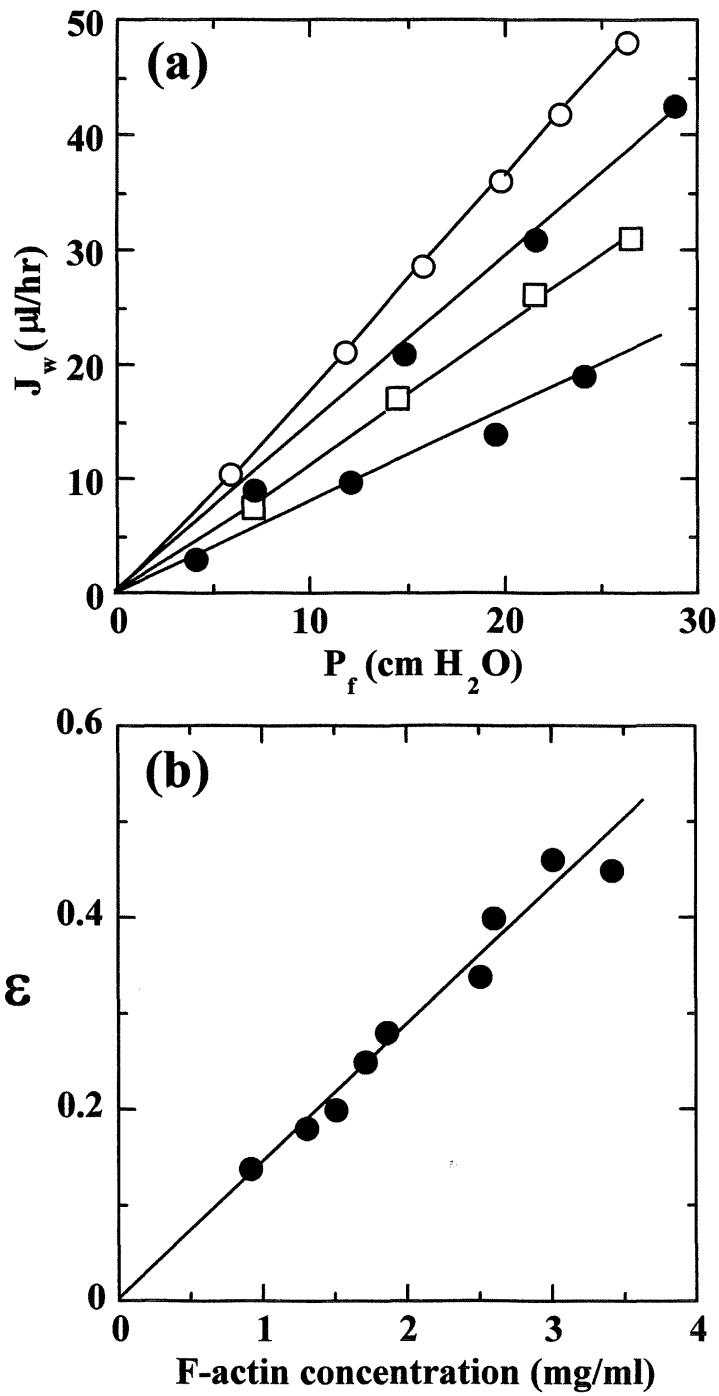


Fig. 3

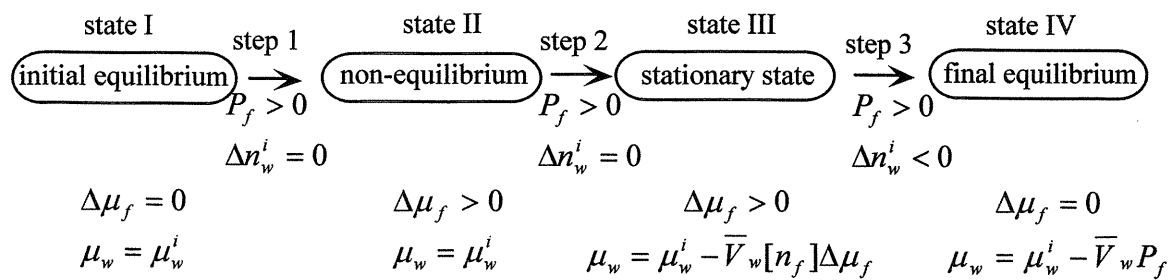


Fig. 4

