

平成 30 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07045

研究課題名(和文) ミオシン依存的‘力’によるアクチン代謝調節機構の単分子イメージング解析

研究課題名(英文) The role of actomyosin contraction on actin filament stability revealed by using new easy-to-use Single-Molecule Speckle (eSiMS) microscopy.

研究代表者

山城 佐和子 (Sawako, Yamashiro)

京都大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：00624347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミオシンは細胞内でアクチン細胞骨格に収縮力をもたらす。近年、ミオシン収縮力がアクチン線維寿命を調節する可能性が示唆されているが、力がアクチン線維の安定化または寿命短縮のどちらに作用するか、相反する結果が報告されており不明瞭であった。本研究ではこの問題を検証するため、蛍光単分子スペックル顕微鏡法を用いてアクチン動態解析を行った。ミオシン阻害剤ブレビスタチン添加前後のアクチン線維寿命を明らかにするため、連続的な時系列データより秒単位での線維寿命解析を行った。その結果、培養細胞ではミオシン阻害により線維寿命が短縮したことから、ミオシン活性はアクチン線維を安定化することを高い確度をもって明らかにした。

研究成果の概要(英文)：How mechanical stress applied to the actin network modifies actin turnover has attracted considerable attention. Actomyosin exerts the major force on the actin network, which has been implicated in actin stability regulation. However, direct monitoring of immediate changes in F-actin stability upon alteration of actomyosin contraction has not been achieved. In this project, I reexamined myosin regulation of actin stability by using single-molecule speckle analysis of fluorescently labeled actin. I performed time-resolved analysis of the effect of blebbistatin on actin turnover. Blebbistatin enhanced actin disassembly in lamellipodia of fish keratocytes and lamellar of *Xenopus* XTC cells at an early stage of the inhibition, indicating that actomyosin contraction stabilizes cellular F-actin. These findings point to the power of direct viewing of molecular behavior in elucidating force regulation of actin filament turnover.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一分子イメージング 定量的イメージング メカノセンシング アクチン ミオシン

1. 研究開始当初の背景

アクチン細胞骨格は、速やかに崩壊・再編成される動的な構造体であり、その特性は、細胞の運動・分裂・形態制御など、基本的な生命現象で細胞骨格が機能を果たすために重要である。アクチンダイナミクスの主要な現象は、アクチン線維の形成(重合)、崩壊(脱重合)、安定化であり、細胞内では多様なアクチン制御因子により調節されている。さらに、細胞内で発生する‘力’がアクチンダイナミクスに影響することが明らかとなりつつあった。モータータンパク質ミオシンによる力発生はアクチン細胞骨格に収縮力・張力をもたらす、細胞骨格の機能遂行に重要である。2005年頃より、ミオシン依存の‘力’がアクチン線維寿命を調節する可能性が試験管内及び培養細胞を用いた実験系で示唆されている。しかし、力がアクチン安定化またはターンオーバー促進のどちらに作用するか、相反する結果が報告されていることから不明瞭であり、ミオシンによるアクチン線維代謝調節機構は未解明の点が多く残されていた。

2. 研究の目的

ミオシンは、i) 足場となるアクチン線維に直接働きかける様式と、ii) 細胞内圧変化を介して遠隔操作的に結合していないアクチン線維に働きかける様式でアクチンダイナミクスを調節している可能性がある。これらの可能性を検証し調節機構を明らかにするためには、ミオシン依存の力の変化を誘導できる実験系で、同一の細胞の経時的なアクチンダイナミクスの変化を詳細に解析することが有効なアプローチである。研究代表者はこれまで、細胞内蛍光単分子イメージングを格段に改良し、高精度の時空間分解能で単分子の振る舞いを捉える簡便・高効率な eSiMS 顕微鏡法 (easy, efficient and electroporation-based Single-Molecule Speckle Microscopy) を確立した (Yamashiro *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 2014; Yamashiro *et al.*, *Methods Cell Biol.*, 2015)。本研究では高解像度単分子イメージングを駆使して、ミオシン II ATPase 特異的阻害剤 blebbistatin のアクチンダイナミクスへの影響を直接可視化により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞内力の動態をリアルタイムで詳細に捉えることを目的として、作用点分子の挙動を単分子スペckル顕微鏡法により可視化解析した。この手法では、蛍光標識した分子を極低濃度で培養細胞内に導入し、タイムラプス解析を行う。細胞骨格や細胞内構造に会合した蛍光標識分子は自由拡散を止めて留まり、安定してシグナル(蛍光)を放出するため、斑点状のスペckルとして画像化される。このスペckルの動態を解析することで、分子の移動速度や会合・解離時間が定量できる。研究代表者は近年、eSiMS 顕微鏡法を開発した (Fig. 1A、 Yamashiro *et al.*, *Mol. Biol.*

*Cell*, 2014; Yamashiro *et al.*, *Methods Cell Biol.*, 2015)。eSiMS 顕微鏡法は以下の3点で優れている。i) 高い導入効率。エレクトロポレーション法により、ほぼ 100% の細胞に蛍光標識タンパク質を導入し単分子観察を行うことが可能。ii) 高精度の時空間分解能。数十ミリ秒単位の連続イメージングにより、光学顕微鏡の分解能限界(約 200 nm) 以下のナノメートルスケールで蛍光分子の変位を測定でき

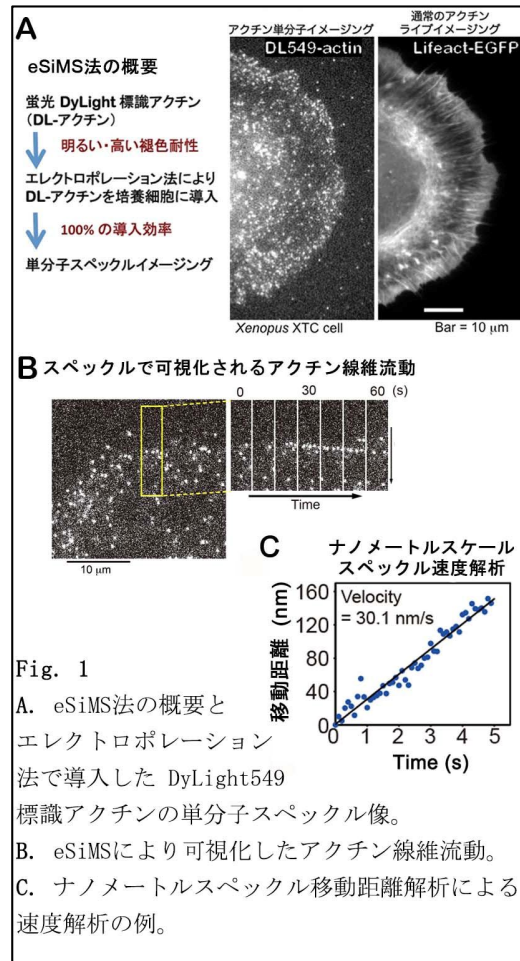


Fig. 1

A. eSiMS法の概要とエレクトロポレーション法で導入した DyLight549 標識アクチンの単分子スペckル像。  
 B. eSiMSにより可視化したアクチン線維流動。  
 C. ナノメートルスケール移動距離解析による速度解析の例。

る (Fig. 1C)。iii) 蛍光プローブの多色化。橙色蛍光である DyLight-550 に加えて、直蛍光の影響の少ない近赤外蛍光色素 CF680R も標識可能であり、多色蛍光スペckル解析が可能となるなど、応用の幅が広がっている。本手法の利点として、阻害剤添加などで素早く変化を誘導できる実験系で、同一細胞の経時的な分子ダイナミクスの変化を詳細に解析できることが挙げられる。本研究では、eSiMS でアクチンダイナミクスを可視化し、ミオシン II 阻害剤 blebbistatin 添加前後のアクチン線維寿命変化を、連続的な時系列データより秒単位で計測・比較を行った。実験には、魚類ケラトサイトのラメリポディアとツメガエル XTC 細胞ラメラ領域を対象に解析を対象とした。

4. 研究成果

本研究の主な研究成果は以下の3点である。(成果 1) ミオシン依存の張力がアクチン線維を安定化することを、細胞内において最

高精度の時空間分解能で明らかにした (*Mol. Biol. Cell* に論文投稿後、リバイス中)。

細胞運動の原動力は、アクチン重合が細胞膜を押し力とミオシンによる収縮力の2つに大別されてきた。近年、この2つの機構が相互にどのように影響するか、特にミオシンによってアクチン線維に掛かる張力が脱重合・重合サイクルに与える影響について注目されてきた。

ミオシン活性がアクチン線維の脱重合に与える影響については、*in vitro* ではアクチン束をミオシンで収縮させると脱重合が起こること (Reymann *et al.*, *Science*, 2012)、張力のかかったアクチンには主要なアクチン線維切断タンパク質であるコフィリンが結合しにくくなること (Hayakawa *et al.*, *J. Cell Biol.* 2011) が報告されている。細胞内においても、II型ミオシン特異的阻害剤 Blebbistatin により、収縮環のアクチン線維の脱重合が遅延する (Guha *et al.*, *Curr. Biol.* 2005) あるいは速くなる (Kondo *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011) といった相反する結果が報告されている。

Wilson ら (Wilson *et al.*, *Nature*, 2010) は、移動性細胞である魚類上皮ケラトサイトにおいて、ミオシンの集積する細胞後部ではアクチンが脱重合側に傾いていること、細胞膜透過処理後にATPを添加するとII型ミオシン依存的にアクチンが脱重合することから、ミオシンがアクチン脱重合を促進すると提唱した。しかし、Wilson らは、アクチン線維を可視化するプローブとして生細胞内で局在ミスを示す蛍光ファロイジンを用いており (研究成果 2 に後述) 解析に影響している可能性がある。このように、細胞内でミオシン収縮力がアクチン脱重合に与える影響については、未解明である。

本研究では、運動する細胞において、II型ミオシンによる収縮力がアクチン脱重合に与える影響を明らかにすることを目的とした。魚類ケラトサイトのラメリポディアを観察対象として (Fig. 2A)、蛍光標識アクチンを用いた単分子スペckル法により細胞内アクチン動態を可視化し、II型ミオシン特異的阻害剤 Blebbistatin が引き起こすアクチン線維寿命の変化を明らかにした。ケラトサイトのラメリポディアのアクチン線維寿命を解析した結果、Regression 解析からアクチン線維の半減期は  $12.3 \pm 3.3$  秒であり、Lifetime 解析では平均寿命は20.0秒であった。また、38% が寿命10秒以内のアクチン線維であり、アクチンが盛んにターンオーバーしていることがわかった。

Blebbistatin 添加前と、添加後90-180秒でアクチン線維寿命を Regression 解析により比較したところ、5細胞中4細胞でアクチン線維の半減期が20-33%短縮した (Fig. 2B)。未処理のコントロール細胞では変化がみられなかった。これらの結果から、ケラトサイトのラメリポディアにおいて、II型ミオシン活

性はアクチン線維の安定化に寄与していることがわかった。XTC 細胞ラメラ領域においても同様に、Blebbistatin 添加後3分以内にアクチン線維脱重合が促進された。

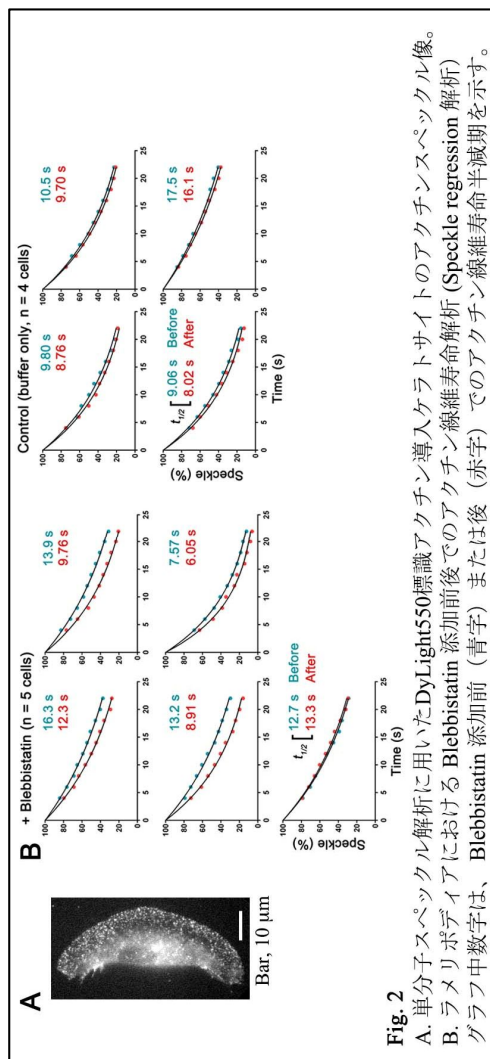


Fig. 2  
A. 単分子スペckル解析に用いたDyLight550標識アクチン導入ケラトサイトのアクチンスペckル像。  
B. ラメリポディアにおける Blebbistatin 添加前後でのアクチン線維寿命解析 (Speckle regression 解析) グラフ。青文字は、Blebbistatin 添加前 (赤字) または後 (赤字) のアクチン線維寿命半減期を示す。

従って、本研究では直接アクチン重合・脱重合を可視化する単分子スペckル法を用いることで、先行研究より厳密なアクチン動態の解析を行うことに成功し、II型ミオシンの収縮力がアクチン線維を安定化することを高い確度をもって明らかにした。

(成果 2) Convection-induced biased distribution model によるアクチン結合型プローブの局在ミスとその機構を明らかにした (*Biophys. J.* に論文投稿後、リバイス中)。本研究過程において、アクチン線維リアルタイム可視化に広く用いられるアクチン結合型蛍光プローブである Lifeact とファロイジンが、実際の生細胞内アクチン分布と異なりラメリポディア後方へ勾配する局在ミスを見出した。さらにその機構として、求心性アクチンフローによる convection-induced-biased distribution model を提唱し、培養細胞を用いた実験と数理モデル解析を用いて検証した。本研究成果は、ライブイメージング定量解析に頻用される標的結合型蛍光プローブが、細胞内ダイナミクスの影響を強く受けて局在

ミスを示す新規の機構を明らかにした。  
(成果3)単分子スペckルイメージングに  
適用可能な近赤外蛍光 CF680R 標識プローブの  
開発 (Yamashiro and Watanabe, *Sensors*, 2017)。  
蛍光単分子イメージングはシグナルが非常  
に微弱であるため、細胞内観察においては自  
家蛍光の軽減が課題であった。そこで、自家  
蛍光の影響の少ない近赤外蛍光 CF680R 標識  
アクチンプローブを開発した。このプローブ  
を用いて 3.5-4 μm 厚みのある培養上皮細胞  
の細胞接着装置 (アドヘレンスジャンクシ  
ョン) のアクチン単分子可視化に成功し、アク  
チン線維寿命を明らかにした。近赤外蛍光ア  
クチンを用いることで、三次元的に展開する  
アクチン構造 (例: アドヘレンスジャン  
クション、分裂細胞収縮環) におけるミ  
オシン依存的なアクチン線維寿命調節機構の  
解析に応用することができる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Mizuno H, Tanaka K, Yamashiro S, Narita A, Watanabe N., "Helical rotation of mDial generates actin filaments resistant to cofilin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

Yamashiro S, Watanabe N. An infrared actin probe for deep-cell electroporation-based Single-Molecule Speckle (eSiMS) microscopy. *Sensors* 17, E1545 (2017).

Yamashiro S, Watanabe N. Overview of Single-Molecule Speckle (eSiMS) microscopy and its electroporation-based version with efficient labeling and improved spatiotemporal resolution. *Sensors* 17, E1585 (2017).

Ryan GL, Holtz D, Yamashiro S, Taniguchi D, Watanabe N, Vavylonis D. Cell protrusion and retraction driven by fluctuations in actin polymerization: A two-dimensional model. *Cytoskeleton* 74, 190-503 (2017).

Ono K, Obinata T, Yamashiro S, Liu Z, Ono S. UNC-87 isoforms, *C. elegans* calponin-related proteins, interact with both actin and myosin and regulate actomyosin contractility. *Mol. Biol. Cell* 26, 1687-1698 (2015).

Yamashiro S, Watanabe N. An easy-to-use single-molecule speckle microscopy enabling nanometer-scale flow and wide-range lifetime measurement of cellular actin filaments. *Methods Cell Biol.* 125, 43-59 (2015).

[学会発表] (計 7 件)

山城佐和子、田中聡一郎、谷口大相、Dimitrios Vavylonis, 渡邊直樹、"単分子可視化によるミオシン依存的アクチン脱重合の再検証とアクチンプローブの落と

し穴: 生細胞における局在ミス" 第69  
回日本細胞生物学会大会、平成29年6月  
13-15日、仙台

Yamashiro S, Tanaka S, Watanabe N. "The role of actomyosin contraction on actin filament stability revealed by using new easy-to-use Single-Molecule Speckle (eSiMS) microscopy." The joint meeting of the 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology and the 87<sup>th</sup> meeting of the Zoological Society of Japan, 平成28年11月14-19日、沖縄

山城佐和子、田中聡一郎、渡邊直樹、"ナノスケール単分子スペckル解析により明らかにする細胞仮足が「つかみ取る」しくみ" 第68回日本細胞生物学会第11回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会、平成28年6月15-17日、京都

山城佐和子、田中聡一郎、渡邊直樹、"The role of actomyosin contraction on actin filament turnover revealed by using new easy-to-use Single-Molecule Speckle (eSiMS) microscopy." 第89回日本薬理学会年会、平成28年3月9-11日、横浜

Yamashiro S, Kuroda R, Watanabe N. "Role of the grabbing retrograde actin flow around focal adhesions visualized by new easy-to-use single-molecule speckle (eSiMS) microscopy." アメリカ細胞生物学会年会、平成27年12月12-16日、アメリカ、サンディエゴ

Yamashiro S, Kuroda R, Watanabe N. "Coupling between focal adhesions and actin retrograde flow visualized by new easy-to-use single-molecule speckle (eSiMS) microscopy." 新学術領域「上皮管腔組織形成」第2回国際シンポジウム、平成27年8月22-23日、札幌

木内泰、山城佐和子、渡邊直樹、「細胞骨格や接着斑で形成される細胞内微細構造の多重染色超解像イメージング」第67回日本細胞生物学会大会、平成27年6月30日-7月2日、東京

[図書] (計 1 件)

山城佐和子、渡邊直樹: 細胞骨格 (アクチン系): 生体の科学 (特集: 細胞シグナル操作法) (2015) 第66巻 第5号、医学書院 pp504-505

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 佐和子 (YAMASHIRO, Sawako)

京都大学・大学院生命科学研究所・講師

研究者番号: 00624347