

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06150

研究課題名(和文)高精度単分子イメージングによるアクチンダイナミクス-接着斑連関の生理的意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of physiological significance of actin dynamics-focal adhesion linkage by single-molecule imaging

研究代表者

山城 佐和子 (Yamashiro, Sawako)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は、接着構造を介して細胞の中の力を細胞外の構造に伝える。アクチン細胞骨格は、細胞内で力を発生しながら動くダイナミックな構造体である。接着装置は多様なタンパク質により構成されるが、動き続けるアクチン構造の動力を、どのように細胞外の構造に伝達するのかは不明であった。本研究では、米国リーハイ大学 Dimitrios Vavylonis 教授らと国際共同研究を行い、細胞内蛍光1分子顕微鏡と数理モデル解析により、架橋タンパク質が流動する線維と細胞の足場(基質)の間を繋ぐ過程で、流動力に引っ張られてタンパク質の一部がほどける(アンフォールドする)ことで、流動力を足場に伝達することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質の一部が引っ張られてほどけながら、異なるスピードで動く2つの細胞構造の間を繋ぎ、動力を伝達することを明らかにした。外力によってアンフォールドする分子の機能は近年注目を集めており、外力の衝撃を和らげる緩衝材となる働きと、外力による伸縮に依存して結合パートナーとの親和性を変化させることで外力を伝えるメカノセンサーとしての役割が主に提唱されている。本成果は上記の2つの役割とは異なり、外力によって引き延ばされる分子の性質が動力の伝達を促進する新しい役割を見出した。細胞内の多様な構造はダイナミックに動きまわっており、本研究結果と似た機構で動力を構造間で伝達している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Force transmission at integrin-based adhesions is important for cell migration and mechanosensing. Talin is an essential focal adhesion (FA) protein that links actin filaments (F-actin) to integrins. F-actin constantly moves on FAs, yet how Talin simultaneously maintains the connection to F-actin and transmit forces to integrins remains unclear. This study revealed a critical role of dynamic Talin unfolding in force transmission. Using single-molecule speckle (SIMS) microscopy and simulations, we showed evidence that molecular elasticity and stochastic coupling are necessary and sufficient to transmit the F-actin flow force to the substrate. This study offers a new mode of force transmission, in which dynamic molecular stretching bridges two cellular structures moving at different speeds.

研究分野：ライフサイエンス

キーワード：細胞接着 アクチン細胞骨格 蛍光1分子顕微鏡 定量生物学 メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

細胞-基質間接着(接着斑)形成と細胞仮足の伸展は、がん細胞の運動亢進や神経突起伸長に重要である。接着斑は接着分子インテグリンが多様なタンパク質と協働して細胞外基質とアクチン細胞骨格を連結する構造であり、細胞外の物理的性質を感知する重要な場である。アクチン細胞骨格は、重合またはモータータンパク質ミオシンとの相互作用により細胞内で力を発生するダイナミックな構造体である。接着斑では、アクチン線維の牽引力が、接着斑タンパク質とインテグリンを介して細胞外の足場(基質)に伝達される。

細胞生物学の分野では、アクチン線維は動かない静的な結合により接着斑に繋ぎ留められていると広く考えられている。一方、研究代表者らは細胞内蛍光アクチン1分子イメージングにより、接着斑に連結されているはずのアクチン線維が、求心性アクチン線維流動により絶えず細胞中心に向かって流動していることを、先行研究で明らかにした(Yamashiro et al., *MBoC*, 2014, 引用文献)。接着斑タンパク質はどのように、流動し続けるアクチン線維を細胞足場に連結し、流動力を伝達するのかは、既存の知識では説明できない未解明の課題として残っていた。

2. 研究の目的

細胞-基質間接着装置(接着斑)は多様なタンパク質により構成されるが、動き続けるアクチン構造の動力を、どのように細胞外の構造に伝達するのかは不明であった。本研究では、ダイナミックなアクチン細胞骨格を細胞足場に連結する機構の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

本研究では、蛍光単分子スペckル顕微鏡を主な手法とした。この手法では、蛍光標識タンパク質を極低濃度で発現する細胞を対象に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、明るい点状のスペ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、分子の位置変化や会合・解離時間を定量できる。本研究では、培養細胞を用いて、主要な接着斑タンパク質であるタリン(talin)とピンキュリン(vinculin)の細胞内蛍光1分子イメージングを行った。接着斑タンパク質の1分子可視化・高精度定量計測データに基づいてタリンによる流動力伝達機構の統計解析を行った。さらに、米国リーハイ大学物理学のDimitrios Vavylonis教授の研究グループとの国際共同研究により、タリン分子構造変化の流動力伝達への影響を数理モデル解析により明らかにした。

4. 研究成果

本研究では、主に接着斑タンパク質タリンの細胞内蛍光1分子動態を明らかにした。タリンはインテグリン結合部位とアクチン結合部位を持ち、インテグリンとアクチン線維を直接架橋する。また、タリンのインテグリン結合部位とアクチン結合部位の間には、 α ヘリックスの束からなる構造(サブドメイン)が連なったタリンロッドドメイン(talin rod domain)が存在し、引っ張られると α ヘリックスがアンフォールドして伸び、離すとリフォールドすることがわかっている。

培養細胞内でタリンを1分子ごとに観察すると、ほとんどのタリン分子は、基質に連結して止まっているが、アクチン線維に結

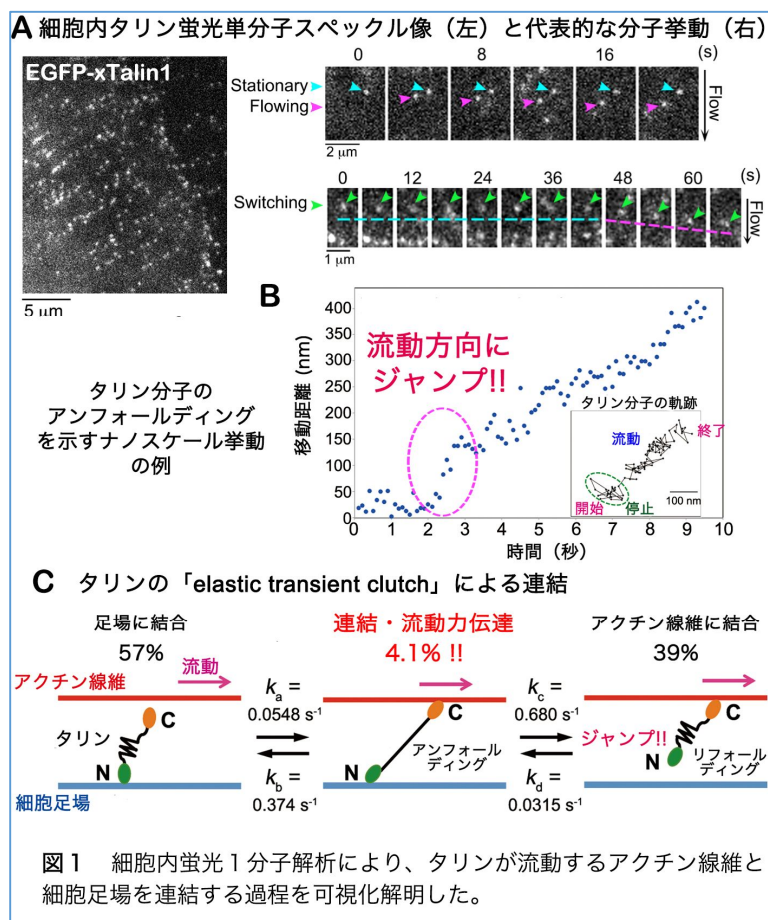


図1 細胞内蛍光1分子解析により、タリンが流動するアクチン線維と細胞足場を連結する過程を可視化解明した。

合して流動しているかの2種類のふるまいに大別できることがわかった(図1A)。

次に、より高い時空間解像度で分子挙動を捕捉するため、10 フレーム/秒でタリン分子をイメージングした後、ガウシアンフィッティングを応用したスペckル中心位置測定によりナノスケール分子トラッキング解析を行った。その結果、細胞内流動によって移動するアクチン線維とインテグリンの間を連結するタイミングで、タリン分子のナノスケール構造変化 (~140 nm) を示す分子挙動を捉えることに成功した(図1B)。さらに、1分子動態の統計解析により、タリンが一過的にアクチン線維とインテグリンを連結する機構 (elastic transient clutch) の連結・解離キネティクスを明らかにした(図1C)。その結果、わずか4%程度のタリン分子が、流動するアクチン線維と基質を、平均約 1.5 秒のあいだ進展しながら一過的に連結する過程を可視化説明した(図1)。

さらに本研究では、アクチン線維流動力によりタリンが引っ張られ、バネ様の性質をもつ

タリンロッドドメインがアンフォールドすることが連結に必要ではないかと考え、検証した。タリン発現抑制細胞に、タリンロッドドメイン欠失変異体、または、他分子の弾性ドメインとタリンロッドドメインを置換したキメラ変異体を発現させ、流動するアクチン構造と基質との連結

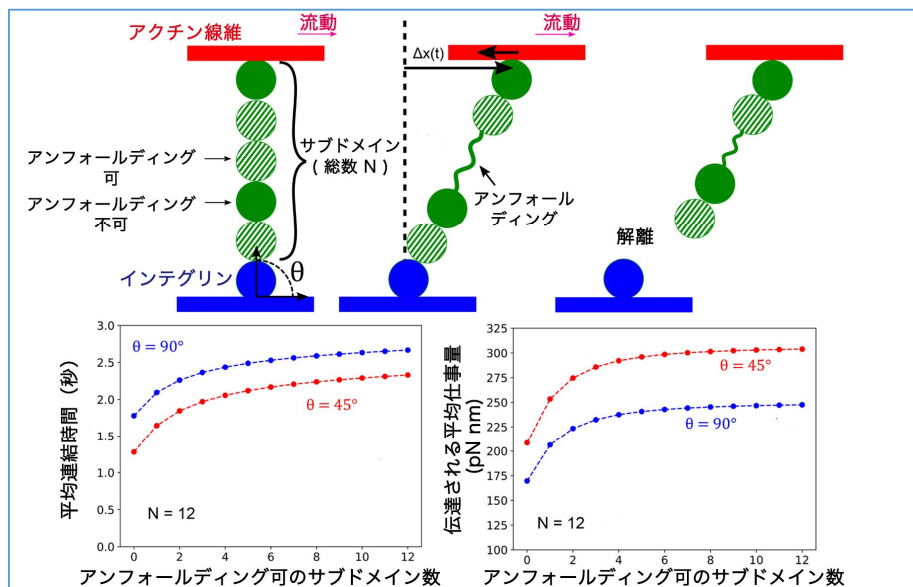


図2 数理モデル解析により、タリン分子にアンフォールドできるサブドメインが一つでもあると、連結時間が長くなり流動力の伝達が増大することを明らかにした。

結の程度を調べた。その結果、バネ様のドメインとアクチン結合部位の両方が連結に必要であることがわかった。

次に数理モデル解析により、タリン分子イメージングによる計測値をパラメータとして用い、タリンロッドドメインのアンフォールディングの効果調べた。その結果、流動するアクチン線維と基質を連結するタリン分子に、アンフォールドできるサブドメインが一つでもあると、連結時間が長くなり流動力の伝達が増大することを明らかにした(図2)。

以上の結果より本研究では、異なるスピードで動く2つの構造をタンパク質が連結し、タンパク質の一部が解ける(アンフォールドする)ことで、力を伝達する仕組みを明らかにした。すなわち、ごく一部のタリン分子が、確率的に起こる結合により流動するアクチン線維と基質の間を連結し、連結したタリンは流動力に引っ張られてほどける(メカニカル・アンフォールディング)ことでアクチン線維と基質の間の連結を持続し、流動力を基質に伝達することを明らかにした。

外力によってアンフォールドする分子の機能は近年注目を集めており、外力の衝撃を和らげる緩衝材となる働き (force buffer) と、外力による伸縮に依存して結合パートナーとの親和性を変化させることで外力を伝えるメカノセンサーとしての役割が主に提唱されている。本研究では、上記の2つの役割とは異なり、外力によって引き延ばされる分子の性質が動力の伝達を促進する新しい役割を見出した。細胞内の多様な構造はダイナミックに動きまわっており、本研究で見出したタリンの elastic transient clutch に似た機構で、架橋タンパク質は動力を構造間で伝達している可能性がある。

本研究成果は、国際学術誌 *Nature Communications* に発表した (2023 年)。この発表論文は、京大プレスリリースにおいても公開した。また、国際学会であるアメリカ物理学会大会 (American Physical Society March Meeting, 2023 年) と国際研究集会 The EMBO/COB Workshop Satellite Meeting “New Approaches for the Properties of Bio-materials” (2023 年) を含む、国内外の学会や研究集会において招待講演を行い、研究成果を報告した。さらに、本研究成果に関連して、米国リーハイ大学 Dimitrios Vavylonis 教授の研究グループと共著論文を発表した (Holz et al., *eLife*, 2022 年)。

<引用文献>

Yamashiro S, Mizuno H, Smith MB, Ryan GL, Kiuchi T, Vavylonis D, Watanabe N. A new single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales. *Mol. Biol. Cell* 2014, 25: 1010–1024.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Holz Danielle, Hall Aaron R, Usukura Eiji, Yamashiro Sawako, Watanabe Naoki, Vavylonis Dimitrios	4. 巻 11
2. 論文標題 A mechanism with severing near barbed ends and annealing explains structure and dynamics of dendritic actin networks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e69031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.69031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamashiro Sawako, Rutkowski David M., Lynch Kelli Ann, Liu Ying, Vavylonis Dimitrios, Watanabe Naoki	4. 巻 14
2. 論文標題 Force transmission by retrograde actin flow-induced dynamic molecular stretching of Talin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 8468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-44018-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 6件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山城佐和子、野村実里、渡邊直樹
2. 発表標題 ずり応力が引き起こす細胞膜分子勾配形成の蛍光1分子イメージング解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山城佐和子
2. 発表標題 細胞内蛍光単分子イメージングによるアクチン線維流動力伝達機構の解明
3. 学会等名 第11回分子モーター討論会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山城佐和子
2. 発表標題 蛍光単分子イメージングで明らかにする流動力伝達の仕組み
3. 学会等名 定量生物の会第10回年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sawako Yamashiro, David M. Rutkowski, Kelli Ann Lynch, Ying Liu, Dimitrios Vavylonis, Naoki Watanabe
2. 発表標題 Force Transmission via dynamic stretching of Talin as revealed by live-cell single-molecule imaging
3. 学会等名 American Physical Society March Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山城佐和子；劉穎；渡邊直樹
2. 発表標題 アクチン線維流動と接着斑分子ダイナミクスの定量的単分子イメージング解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山城佐和子；劉穎；渡邊直樹
2. 発表標題 高精度単分子イメージングによるアクチン繊維流動－接着斑連関の可視化解明
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山城佐和子、David M. Rutkowski、Kelli Ann Lynch、Dimitrios Vavylonis、渡邊直樹
2. 発表標題 Talin の elastic transient clutch による力伝達機構
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会シンポジウム、奈良
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山城佐和子
2. 発表標題 New insights into the retrograde actin flow associated motion of Talin visualized by single-molecule microscopy
3. 学会等名 The EMB0/COB Workshop Satellite Meeting “New Approaches for the Properties of Bio-materials”、岡崎（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山城佐和子、David M. Rutkowski、Kelli Ann Lynch、Ying Liu、Dimitrios Vavylonis、渡邊直樹
2. 発表標題 蛍光単分子イメージングで明らかにする細胞内力伝達機構
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会シンポジウム、名古屋（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山城佐和子、渡邊直樹
2. 発表標題 細胞内蛍光単分子イメージングで明らかにする流動力伝達の仕組み 学会等名
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会シンポジウム、神戸（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 劉穎、山城佐和子、渡邊直樹
2. 発表標題 Live-cell fluorescence single-molecule speckle (SiMS) microscopy analysis of Vinculin-Talin and actin network
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会、奈良
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 劉穎、山城佐和子、渡邊直樹
2. 発表標題 Vinculin-talin complexes flow over mature focal adhesions as revealed by fluorescence single-molecule speckle (SiMS) microscopy
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会、神戸
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yating Yang、山城佐和子、渡邊直樹
2. 発表標題 Quantitative analysis of paxillin dynamics measured by live-cell fluorescence single-molecule speckle (SiMS) microscopy
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会、奈良
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	リーハイ大学			