

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22370056

研究課題名（和文）

次世代電顕技術による細胞骨格とその制御タンパク質の空間特異性の研究

研究課題名（英文）

Spatial organization of cytoskeletal actin filaments and their regulatory proteins revealed by advanced methods in electron microscopy.

研究代表者

臼倉 治郎 (USUKURA JIRO)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授

研究者番号：30143415

研究成果の概要（和文）：アクチン線維の細胞内（特に核膜周囲）の空間構造を明らかにするため、クライオ電顕法、フリーズエッチング法、水中原子間力顕微鏡法など多様な方法を用いた。

アクチン線維は細胞内においてストレス線維を形成することは知られているが、ストレス線維を形成しないときも数本の束を形成することが多い。そして、免疫細胞化学的にはこれらの線維に沿って多くのミオシンIIが存在する。しかし、その構造は特定できないので、ミオシンは形成されないか、きわめて断片的な線維形成に留まっていると考えられる。一方、光学顕微鏡による live cell imaging で解析できなかったが、多くのアクチン線維やストレス線維が核膜表面に達していることが明確になった。また核膜表面は中間径線維（ビメンチン）で覆われており、核膜表面近傍ではアクチン線維に伴行するためアクチン線維の停止位置は確認できなかった。しかし、アクチン線維は核膜孔近傍より伸び出していると考えられる。また、アクチンの方向性は核膜に向かうものと、核膜から行くものが認められた。一方、ビメンチンは核膜孔形成タンパク質から伸びていると考えられる。核膜にはアクチン結合能を有する膜タンパク質であるネスプリン1が多量に存在することも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Current study aims to reveal the spatial organization of cytoskeletal actin filaments in the periphery of nuclear envelope. Cytoskeletal actin filaments in living cell have been investigated so far exclusively with fluorescent light microscopy. Therefore, observation was restricted on the stress fiber with relatively strong fluorescence and at ventral side of the cell. In order to detect real spatial structure of cytoskeleton, high voltage TEM (1000 KV), high resolution SEM and immuno-freeze etching technique were applied to unroofed whole cells.

Nuclear envelope was supplied with many cytoskeleton including intermediate filaments, actin filaments and microtubules. In particular, intermediate filaments, vimentin, extending from nuclear pore like a rosette formed complicated meshwork and covered the total surface. Many actin filaments were attached to nuclear envelope as well. Since S1 decoration showed both pointed and barbed ends clearly in the surface of nucleus, there seemed to be the terminations and origins of actin filaments on the nuclear envelope. Unfortunately, however, we were not able to trace entire actin filaments on the nuclear envelope, because all actin filaments were associated or covered with vimentin filaments on the surface of nucleus. Under careful observation of many electron micrographs, many actin filaments appeared to extend from nuclear pores. Indeed, Nesprin 1, actin binding protein, was detected in the periphery of nuclear pores. Actin filaments extending from nuclear envelope were bundled

gradually to form stress fibers. These are completely new concept on nuclear related actin filaments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：アクチン、空間構造、細胞骨格、核膜、電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

独自に開発した急速凍結フリーズエッチング法と細胞膜剥離法(unroofing)を併用し、膜細胞骨格の観察に成功した。さらにトモグラフィーとして 3D 解析することで膜骨格のドメイン構造を明らかにすることが出来た(J.Cell Biol. 2006)。また、免疫標識法と組み合わせることに成功し、**標的分子の局在をこれまで以上に正確に決めることが可能となった**(Nature Cell Biol 2008, Cell Struct Fun. 2008, Meth. Cell Biol. 2007)。これにより、アクチン線維制御タンパク質の空間配置(空間構造)を解析することにも成功した。このような研究法の開発と応用により、新たな**アクチン線維の空間構造**も発見した(2008 年米国細胞生物学会シンポジウム招待講演)。すなわち、アクチン線維には細胞膜に密着するタイプと細胞膜と所々で接触するものの膜面から 10~30nm ほど離れて存在し複雑な網目を形成するタイプ、および細胞接着間、あるいは細胞接着と核膜表面を結ぶいわゆるストレス線維である。このうちラメリポディア形成や運動に関与するアクチン線維は第二番目の複雑な網目を形成するタイプである。また、このタイプのアクチン線維は網目を形成しながら所々で斑点状に集合、離散し、膜面上をいくつかのドメインに分けている(下図 2)。ベ

ーターインテグリンがこれらの斑点部に必ずしも局在しないので、フォーカルコンタクトとは異なり、そこに集合離散するアクチン線維もストレス線維とは違う機能を持つものと考えられる。実際、走行距離もストレス線維とは異なり数ミクロンと短い。このような斑点状の集合は必ずしも膜の細胞質側表面にのみ現れるのではなく、細胞質内にも存在する(下図 3)。したがって、破骨細胞で観察される podosome(Cell Tissue Res 2008)とは異なる。海外においてアマーバーの細胞質内に規則正しい斑点状のアクチンの集積が報告されていたが(Ultramicroscopy 2006)、どの細胞にも不規則ではあるが普遍的に存在し、それがアクチン線維の交差により生じることを高分解能で示したのは我々が初めてである。細胞質内では核周辺から遠ざかるに従い、この斑点状の集合からなる網目の構造が異なることも判明しており、オルガネラの位置決定などに大きな影響を及ぼすものと考えている。そこで、本研究では後述の具体的計画にしたがい、膜表面から細胞質へと展開する細胞骨格の空間構造とそれらを制御するタンパク質の空間特異性、およびオルガネラの空間配置との関係を明らかにする。

2. 研究の目的

細胞骨格とその制御タンパク質の空間的位置関係（空間構造）とそれらの空間的特異性を細胞膜裏打ちから細胞質内に至るまで、新しい標本作製技術（次世代電顕技術）を用いて構成タンパク質を同定しながら明らかにする。これまでの研究から膜裏打ち構造（膜細胞骨格）の主成分であるアクチン線維網には空間特異性があり、かつそれらを制御する Rac、Rho、cdc42 やその effector タンパク質（N-WASP, VASP, IQGAP1 など）にも空間特異性があることが分かった (in preparation)。タンパク質相互の認識は分子構造に依存すると考えられているが、接触による分子認識に至るまでの空間的配置においてすでに特異性が認められる訳で、これら制御系タンパク質の空間特異性が如何に形成され如何に制御されているかを明確にする。

3. 研究の方法

本研究の目標はアクチン線維を主体とする細胞骨格について、膜の裏打ちから細胞質への展開を空間構造として捉え、その空間特異性を捉えることである。このために電子顕微鏡を用いて細胞骨格を 3D 可視化する。そこで新しい細胞膜剥離法、免疫標識法、急速凍結法を前処理とする新規氷包埋法、フリーズエッチング法、SEM 法を駆使する。

4. 研究成果

細胞膜直下と同様に細胞質にも多くのアクチン線維が存在するだろうと誰もが予想していた。しかし、蛍光顕微鏡ではストレス線維以外は薄明に光るだけであり、その一本一本を解像できないため、G アクチンとして存在するのか線維を形成しているかは不明であった。そこで、我々は可溶性の細胞質を除去後全載標本として、超高压電子顕微鏡で観察する方法を開発した。これにより、多くのアクチン線維が細胞内に存在し、それらが複雑に交差し、細胞質を多数のドメインに分け

ていることが明らかとなった（図 1）。

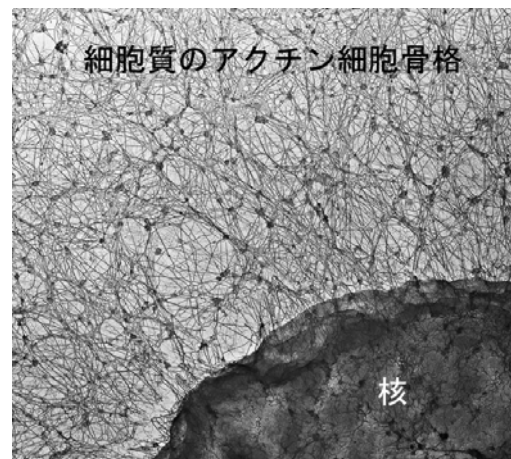


図 1 超高压電子顕微鏡による細胞質内のアクチン細胞骨格

一方、細胞内の多くのアクチン線維はストレス線維を含めて、核膜に付着していることも解明された（図 2）。ミオシン S1 の修飾により、アクチン線維の方向性を調べたところ、核膜上には **pointed end**, **barbed end** の両方が存在することがわかった。また、核は多数の中間径線維（ビメンチンと同定した）で密に覆われていた。特に核膜表面ではアクチン線維と伴行するため、アクチン線維がどのように核膜に付着するか、あるいは伸張するかを確認できなかった。

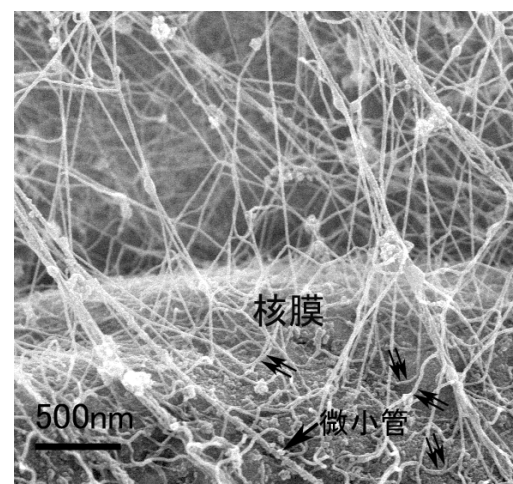


図 2 核膜表面の高分解能 SEM 像。アクチン線維、中間径線維、微小管と核膜の相互の空間構造を示している。

ビメンチンは核膜孔を形成するタンパク質からロゼット様に伸び出していた。また、核膜孔相互を結んでいた。アクチン

線維と結合能力があるネスプリン 1 も核膜に豊富に存在することが免疫標識電顕法で明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Tanaka N, Usukura J, Kusunoki M, Saito Y, Sasaki K, Tanji T, Muto S, Arai S. Development of an environmental high-voltage electron microscope for reaction science. **Microscopy**. 62 205-215 2013 査読有り
2. Hosono Y, Usukura J, Yamaguchi T. Yanagisawa K, Suzuki M, Takahashi T. MYBPH inhibits NM IIA assembly via direct interaction with NMHC IIA and reduces cell motility. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 428:173-178 2012 査読有り
3. Usukura J, Yoshimura A, Minakata S, Youn D, Ahn J, Cho SJ Use of the unroofing technique for atomic force microscopic imaging of the intra-cellular cytoskeleton under aqueous conditions. **J. Electron Microsc.** 61 321-326 2012 査読有り
4. Suzuki A, Hori T, Nishino T, Usukura J, Miyagi A, Morikawa K, Fukagawa T. Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins. **J. Cell Biol.** 193 125-140, 2011. 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

1. Usukura J, Minakata S Spatial structure of peri-nuclear actin cytoskeleton The 14th International Membrane Research Forum, Kyoto, Japan, March 15-17, 2013 (invited lecture)
2. Usukura J, Minakata S Spatial organization of actin and intermediate filaments on the nuclear envelope The American Society for Cell Biology December 15-19 2012 Moscone Center San Francisco, CA, USA
3. Usukura J, Minakata S Spatial structure of actin cytoskeletons around the nuclear envelope The 4th EMBO meeting September 22-25 2012 Nice Acropolis France
4. Usukura J, Minakata S Spatial structure of cytoplasmic actin filaments with special reference to the association with nuclear envelope Microscopy & Microanalysis July 29-August 2 2012 Phoenix Convention Center Arizona USA
5. Usukura J, Minakata S Spatial structure of actin cytoskeletons associated with nuclear membrane The American Society for Cell Biology December 3-7 2011 Colorado Convention Center Denver, USA
6. Usukura J Spatial structure and specificity of cytoskeletal actin filaments in pigment

epithelial cells ARVO International Society for Ocular Cell Biology Conference September 7-10, 2011

Vancouver Marriott Pinnacle Downtown Hotel, Vancouver Canada (invited lecture)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.numse.nagoya-u.ac.jp/bio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼倉治郎 (USUKURA JIRO)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授
研究者番号：30143415

(2) 研究分担者

鈴木 元 (SUZUKI MOTOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80236017

(3) 連携研究者

()

研究者番号：