

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770146

研究課題名(和文)アクチン自己組織化によるアクチン細胞骨格の極性化機構の解明

研究課題名(英文)Self-assembly mechanism for rearrangement of actin cytoskeleton in cell polarization

研究代表者

木内 泰 (KIUCHI, TAI)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70443984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン細胞骨格の自己組織的な再構成は、細胞の極性形成に重要である。本研究では、機械刺激時におけるアクチン重合因子mDia1によるアクチン細胞骨格の再構成機構を調べた。蛍光単分子可視化法によって機械刺激時にmDia1が活性化し、アクチン線維の伸長を引き起こしていた。この活性化はアクチン脱重合因子コフィリンの不活性化によって抑えられた。そこでs-FDAP法によって単量体アクチン濃度を測定したところ、約10%上昇した。これらの結果は、機械刺激によるアクチン線維の崩壊、単量体アクチン濃度の上昇、mDia1の活性化、アクチン細胞骨格の再構築といったアクチン細胞骨格の自己組織化機構の存在を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The self-assembly mechanism for rearrangement of actin cytoskeleton plays important roles in cell polarization. In this study, I investigated the mechanosensitive rearrangement of actin cytoskeleton by an actin polymerization factor, mDia1. Fluorescence single-molecule speckle microscopy show that processive actin assembly by mDia1 is stimulated by microneedle micromanipulation. This mDia1 activation is suppressed by inactivation of an actin depolymerization factor, cofilin. s-FDAP analysis show that its cytoplasmic actin monomer concentration is increased by about 10% after the micromanipulation. These results suggest a self-assembly system including a micromanipulation-induced actin disassembly, an increase in the actin monomer concentration, processive actin assembly by mDia1 and the rearrangement of actin cytoskeleton.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング アクチン細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

細胞遊走時にはその進行方向に葉状仮足(ラメリポディア)や糸状仮足(フィロポディア)と呼ばれる膜突起がアクチン重合によって伸長し、アクチン細胞骨格の分布が極性化することで、細胞は移動していく。この極性化は、細胞性粘菌、好中球では前方の形質膜でのホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸(PIP3)の集積、線維芽細胞やケラトサイトではコフィリンやミオシンの活性化による後方での膜突起の退縮によって開始される。このように極性形成の起点は様々あるが、その形態変化は同じような形に到達し、細胞は移動していく。このことから移動性の細胞では、膜突起を前方に伸ばして、後方では退縮させるアクチン線維の自己組織化システムの存在が提唱されているが、その分子実態に関してはまだ知見が少ない。

細胞内でアクチン線維は、単量体アクチンが重合と脱重合を繰り返すことで維持される動的な構造である。そして単量体アクチン濃度の変動やアクチン重合、脱重合因子の活性変化によって容易にその構造を変化させる。さらに脱重合された単量体アクチンは細胞質でのATP-ADP交換反応によって再び重合に利用される。このように単量体アクチン濃度、アクチン重合、脱重合の変化は連動していることから、それぞれの因子の時空間的な関係はアクチン線維の自己組織化過程に多様性をもたらす。この多様な状態から秩序ある極性が形成される過程では、前方でのアクチン線維の集積により単量体アクチンやアクチン線維結合タンパク質がアクチン線維に結合し、それぞれの分子の濃度勾配が発生し、これがフィードバック経路となってさらにアクチン重合が促進され、極性が形成されることが予想される。このためアクチン線維の自己組織化による細胞骨格の極性化を研究するためには単量体アクチン濃度、アクチン重合、脱重合因子の活性変動を細胞の前後軸で測定する必要がある。

2. 研究の目的

細胞が前後軸を形成する時に前方でアクチン重合が盛んに起こり、アクチン細胞骨格は極性化する。この時、単量体アクチンやアクチン線維結合タンパク質はアクチン線維と結合するために細胞の前後軸で濃度勾配が形成され、極性化が促進されると予想されるが確かめられていない。最近申請者は単量体アクチン濃度の時間変動を測定する顕微鏡法(s-FDAP法)を世界で初めて開発し、アクチン重合による細胞伸展と単量体アクチン濃度の量的な関係を示した。本研究では、アクチン細胞骨格の動態をs-FDAP法に加えて蛍光単分子可視化法、蛍光退色後回復法で観察し、アクチン細胞骨格の自己組織化過程を明らかにする。

3. 研究の方法

s-FDAP法は照射する光の波長に応じて消光と光活性化を繰り返すことができる蛍光タンパク質Dronpaを用いる。図1に示すように細胞に発現させたDronpa融合アクチンを完全に消光させた後に細胞質中の小さい領域のDronpa-アクチンを光活性化させ、その後のDronpa-アクチンの拡散による蛍光強度の減衰を測定し、単量体アクチン濃度を拡散成分として評価する。そして細胞全体の消光と小さい領域の光活性化を連続的に繰り返すことで、拡散成分の時間変動を測定する。さらに渡邊直樹教授(東北大・院・生命)が開発した蛍光単分子可視化によって、アクチン線維に結合しているアクチン重合、脱重合因子の動態観察と組み合わせることで、アクチン線維の動的状態を時空間的に解析することが可能になる。また蛍光退色後回復法を二色の蛍光タンパク質(GFPとmCherry)を用いて行った。GFP融合アクチンを蛍光退色させ、その後の蛍光回復からアクチン線維のターンオーバーを測定し、mCherry融合アクチンを用いて蛍光退色させた領域のアクチン線維の量をモニターした。この3つの顕微鏡法を組み合わせ、機械刺激を加えた時のアクチン細胞骨格の再構成過程やラメリポディアでのアクチン線維の重合・脱重合過程を観察した。

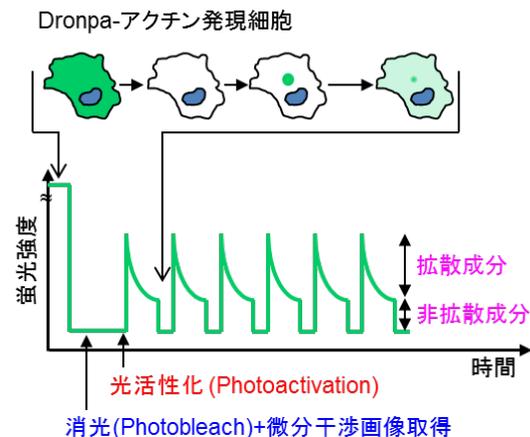


図1. 単量体アクチン濃度変動測定法 (Sequential Fluorescence Decay after Photoactivation: s-FDAP)

4. 研究成果

(1) 細胞は、機械刺激によってアクチン細胞骨格を再構成することが知られている。この刺激時に蛍光単分子可視化法でアクチン重合因子であるmDiaの動きを観察した結果、mDiaが活性化し、アクチン線維の重合核形成・伸長反応が盛んに起きていることが明らかとなった。リン酸化シグナルやカルシウムシグナルを阻害する様々な薬剤で処理してもこのmDiaの活性化は阻害されなかった。しかし、アクチン脱重合因子であるコフィリンの活性阻害によって抑えられた。単量体アクチン濃度の上昇はmDiaを活性化させる因子

の一つであることから、機械刺激によって単量体アクチン濃度が上昇することが予想された。この機械刺激時における単量体アクチン濃度の変化を高い精度で検出するために s-FDAP 法を改良した。機械刺激による細胞の体積の変化は、蛍光タンパク質 mPlum でモニターした。また Dronpa の光活性化後の減衰を 0.1 秒刻みで測定し、さらに光活性化した場所の総アクチン量もモニターした。この結果、単量体アクチン濃度を数%の変化でも検出できるようになった。この改良 s-FDAP 法によって機械刺激時に単量体アクチン濃度が約 10% 上昇することが明らかとなり、mDia の活性化機構に単量体アクチン濃度の上昇が関与していることが示唆された(図 2)。この成果は機械刺激時のアクチン細胞骨格の再構成における新規メカニズムを示しており、Nature Cell Biology (2013) に報告した。

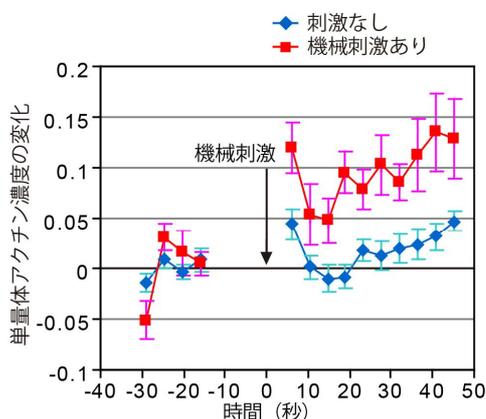


図 2：機械刺激に応じた単量体アクチン濃度の時間変化

(2) ラメリポディアでは、アクチン線維は絶えず重合と脱重合を繰り返す極めて動的な構造である。このような動的な構造がどのようにして維持されているのかを理解するために、ラメリポディアでのアクチン線維のターンオーバーが顕微鏡イメージングによって観察されてきた。しかし、蛍光退色後回復法と蛍光単分子可視化法で得られた結果が異なっていた。蛍光退色後回復法では、ラメリポディアの先端でアクチン線維は重合し、後方で脱重合することが観察された。しかし蛍光単分子可視化法では、ラメリポディア全体でアクチン線維は重合と脱重合が起きていることが観察された。そこで、二色の蛍光タンパク質 (GFP と mCherry) を用いて蛍光退色後回復法を行った。GFP 融合アクチンは蛍光退色し、その後の回復からアクチン線維のターンオーバーを観察し、mCherry 融合アクチンでラメリポディアでのアクチン線維の量の変化をモニターした。その結果、これまで GFP 融合アクチンだけの蛍光退色後回復法では観察できなかったラメリポディア全体でのアクチン線維のターンオーバーが観察された(図 3)。この結果は、蛍光単分子可視化法による観察結果と矛盾がなかった。この成果によってラメリポディアでのア

クチン線維のターンオーバーの実体が明確になり、Biophysical journal(2013) と Development, Growth & Differentiation (2013) に報告した。

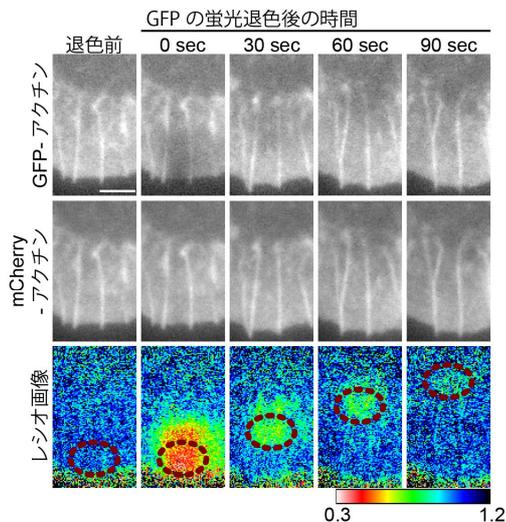


図 3：2色の蛍光を使った蛍光退色後回復法によるラメリポディアでのアクチン線維のターンオーバーの観察

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 6 件)

Yamashiro S, Mizuno H, Smith MB, Ryan GL, Kiuchi T, Vavylonis D, Watanabe N, New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales., *Molecular biology of the cell*, 査読有, vol. 25, 2014, 1010-1024, DOI: 10.1091/mbc.E13-03-0162

Watanabe N, Yamashiro S, Vavylonis D, Kiuchi T, Molecular viewing of actin polymerizing actions and beyond: combination analysis of single-molecule speckle microscopy with modeling, FRAP and s-FDAP (sequential fluorescence decay after photoactivation)., *Development, Growth & Differentiation*, 査読有, vol. 55, 2013, 508-514, DOI: 10.1111/dgd.12060

Saito A, Miyajima K, Akatsuka J, Kondo H, Mashiko T, Kiuchi T, Ohashi K, Mizuno K, CaMKII β -mediated LIM-kinase activation plays a crucial role in BDNF-induced neuritogenesis., *Genes to Cells*, 査読有, vol. 18, 2013, 533-543, DOI: 10.1111/gtc.12054

渡邊直樹, 木内泰, 蛍光単分子可視化と他の分子動態解析法の融合による細胞内アクチン重合機構の解明, *顕微鏡*, 査読有, 第 48 巻 第 2 号, 2013 年, 84 - 89

Higashida C, Kiuchi T, Akiba Y, Mizuno H, Maruoka M, Narumiya S, Mizuno K,

Watanabe N, F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins., *Nature Cell Biology*, 査読有, vol. 15, 2013, 395-405, DOI: 10.1038/ncb2693

Smith MB, Kiuchi T, Watanabe N, Vavylonis D, Distributed actin turnover in the lamellipodium and FRAP kinetics., *Biophysical Journal*, 査読有, vol. 104, 2013, 247-257, DOI: 10.1016/j.bpj.2012.11.3819

〔学会発表〕(計 0件)

〔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
特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木内 泰 (KIUCHI, TAI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：70443984

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：