

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670138

研究課題名(和文)細胞膜に結合したアクチン膜骨格の超解像可視化：方法開発と機能の解明

研究課題名(英文) Superresolution visualization of actin membrane skeleton bound to the plasma membrane: Methodology development and function unraveling

研究代表者

楠見 明弘 (Kusumi, Akihiro)

京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：50169992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、世界で初めて、アクチン線維と細胞膜が緊密に結合していること、それによってアクチン線維の網目が細胞膜をコンパートメント化していることを見出し、アクチン膜骨格と名付け、生物学的意義を明らかにしてきた。

しかし、アクチン膜骨格の生細胞での可視化には誰も成功していない。我々は最近EBP50分子が、細胞質からアクチン膜骨格と受容体の結合部位に頻りにリクルートされてくることを見出した。本研究の目的は、この現象を利用し、生細胞中でのアクチン膜骨格を可視化し、シグナル変換におけるアクチン膜骨格の機能解明を進めることである。

研究成果の概要(英文)：We previously found that many actin filaments are closely bound to the cytoplasmic surface of the plasma membrane, and that the meshwork of the actin filaments compartmentalizes the plasma membrane. We called such actin meshwork actin membrane skeleton and have tried to unravel its biological significance.

However, no one has succeeded in visualizing the actin membrane skeleton in living cells. Recently, we found that a cytoplasmic molecule EBP50 is often recruited from the cytoplasm to the binding sites between the actin membrane skeleton and several receptors. The objective of the present study is to visualize the actin membrane skeleton, using the EBP50 binding to the actin membrane skeleton, and then to advance the studies for clarifying the function of actin membrane skeleton in signal transduction in the plasma membrane.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：細胞生物物理 1分子計測・操作 メゾスコピック系 細胞骨格 細胞膜の動的構造

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、世界で初めて、アクチン線維と細胞膜が緊密に結合していること、それによってアクチン線維の網目が細胞膜をコンパートメント化していることを見出し、その生物学的意義を明らかにしてきた(1993年以降、5000回以上、引用されている)。このように、細胞膜と直接に結合しているアクチン線維をアクチン膜骨格と名付けた。これを出発点として、最近では、様々な文脈で、アクチン膜骨格が細胞膜分子の相互作用・局在・機能を制御していることが明らかにされつつある(例えば、Rao & Mayor, 2012, Cell)。

しかしながら、アクチン膜骨格(細胞質中のアクチン線維と区別して)の可視化は全く進んでいない。唯一の例外は、我々が急速凍結・ディープエッチ試料を電子線トモグラフィで3次元観察したものである(Morone et al. 2006, J. Cell Biol.)。しかし、これとて、細胞膜を細胞から引きはがすというアーチファクトを誘導しうる操作が入るため、また技術的に非常に難しいため、応用は広まっていない。このため、アクチンと細胞膜との相互作用とそれによる膜分子機能の制御という、いま、極めて重要な研究課題の推進に黄信号がともっている(Kusumi et al. 2012 Ann. Rev. CDB)。

しかし、本研究開始の少し前、我々の最近のパイロット研究で、生細胞中で、アクチン膜骨格だけを、細胞の至るところに存在する他のアクチン線維とは区別して、かつ超分解(20nm分解能)で可視化するという、今までは不可能であった観察が可能となる可能性が出てきた。

すなわち、我々は、「細胞膜上のチャネルや受容体などの膜タンパク質」と「アクチン線維」を繋ぐコネクターとして働くEBP50/NHERF1というタンパク質の挙動を1分子イメージングにより調べ、以下の著しい発見をした。EBP50の大きなプールは細胞質に存在し、コネクターとして働くときには、細胞質から細胞膜-アクチン膜骨格結合部へとリクルートされてくる。したがって、EBP50/NHERF1はアクチン膜骨格(+膜分子)だけに結合する。面白いことに、コネクターとしての滞在時間は、0.3秒程度であった。すなわち、EBP50は、細胞質と、コネクター部位(膜分子とアクチン膜骨格の結合部位)の間でシャトルする。EBP50/NHERF1は次々とコネクター部位へとリクルートされてきて、全体としては膜分子とアクチン膜骨格をダイナミックに結合させる。以前は、EBP50/NHERF1は安定に膜分子とアクチン線維とを結合させていると考えられていたので、これは、非常に大きな概念変換を迫る結果である。

上記の通り、アクチン膜骨格の生細胞での可視化には誰も成功していない。しかし、前の段落で述べたように、EBP50/NHERF-1

分子が、細胞質からアクチン膜骨格と受容体の結合部位に頻りにリクルートされてくるので、これを利用して、アクチン膜骨格の可視化を目指すことにした。

## 2. 研究の目的

上記のように、研究開始の少し前に、われわれは、EBP50分子が、細胞質からアクチン膜骨格と受容体の結合部位に頻りにリクルートされてくることを見出していた。

本研究では、これを利用して、まずアクチン膜骨格の可視化を目指すことを目的とした。

さらに、EBP50/NHERF-1が結合したアクチン線維のシグナル変換への関与を解明し、アクチン膜骨格 細胞膜結合部位の中でも、シグナル変換のホットスポットとなっている部位を同定することを目指した。

これらによって、シグナル変換におけるアクチン膜骨格の機能解明を進めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

EBP50/NHERF-1の挙動を、細胞膜内側表面で長時間1分子追跡すると(時間分解能4ミリ秒)(1)EBP50/NHERF-1は細胞質から膜分子に結合し、(2)その分子とともに膜内を拡散運動した後(平均~0.1秒間)(3)アクチン膜骨格に結合して一時静止することが分かった(~0.3秒間。詳しくは、EBP50は、アクチン線維上に多数結合しているERMタンパク質に結合したと考えられる)。(4)その後、EBP50は、細胞質に戻ることを示唆していた。

これらは、EBP50を1分子追跡して、細胞膜上で静止した部位を同定し、その部位をマッピングすることで、アクチン膜骨格が可視化できることを示唆していた。

さらに、この方法では、リガンド刺激後に受容体を作るシグナル複合体が、アクチン線維に結合してシグナル変換を行っているホットスポットが検出することを目指した。

アクチン膜骨格の可視化のためには、EBP50/NHERF-1の各分子が、膜・アクチンコネクターとして安定に結合しているのではなく、細胞質から、新たに、次々とEBP50がリクルートされてくることが重要である。この方法では、次々とやってくる20万個を超えるEBP50の静止部位を1分子ずつ次々と決める(これらのEBP50は、0.4秒後には、はずれて細胞質に戻る)。この部分の考え方は、超解像PALMと似ている。PALMでは、各画面で蛍光分子を活性化させるが、本方法では、細胞質からEBP50が次々に供給されるのである。1分子の位置決め精度は20nmであり、この分解能での、アクチン膜骨格の画像化を目指す。細胞質からの、自然な、いつも起

こっている分子リクルートと、1分子イメージングから、構造をもとめるというアイデアはユニークで、本研究で強く推進した。

#### 4. 研究成果

(1)まず、生細胞中で、EBP50/NHERF-1の1分子が、細胞質から細胞膜の細胞質側表面へとリクルートされ、さらに、その付近で拡散した後、アクチン膜骨格に結合して静止する過程、さらに、細胞質からアクチン膜骨格へと直接に結合してくる過程が観察された。拡散運動した後に静止する分子のシグナル強度は、静止前後で変化しない分子が多かった。すなわち、このような挙動を示す分子でも、エバネセント光場の中で、細胞膜からの距離が静止前後で変化しないものが、多かったということである。このようなEBP50/NHERF-1分子は、細胞膜の細胞質側表面上で拡散運動したあと、細胞膜の細胞質側表面に結合しているアクチン膜骨格、あるいは、細胞膜からの距離が10ナノメートル以内にあるアクチン膜骨格に結合したものと考えられた。

(2)さらに、拡散していたEBP50/NHERF-1分子が静止して、再度拡散しはじめのような場合が頻繁に見いだされた。それで、1分子観察において、短時間静止したときにも、静止を捉えることができるソフトウェアを開発し、さらに、そこで用いるパラメータセットに工夫を加えた。その結果、さらに短い静止(一時停留)でも捉えられるようになった。

(3)(1)(2)の結果は、EBP50/NHERF-1分子の多くは、細胞膜に結合して拡散し、静止時にも、細胞膜上にありながら、細胞膜上のアクチン膜骨格に結合しているものと考えられた。

(4)以上の結果から、EBP50/NHERF-1分子が静止する位置にあるアクチン膜骨格は、細胞膜の内側表面に極めて近く存在していることが結論された。また、これらの静止位置をプロットすることにより、細胞膜に結合しているアクチン線維が推定できた。しかし、これらの静止位置の数は、膜骨格の全体像を得るには不十分であった。

(5)一方、Lifeact-GFPで同定されるベータサル面近くを走るアクチン線維束には、EBP50/NHERF-1分子が頻繁に静止することが見いだされた。すなわち、これらのストレスファイバーと思われる線維束は、細胞膜の内側表面にほぼ結合していることが証明できた。

(6)同時にこれらの線維束には、FAKなどのシグナル分子が多数、しかも数十秒以上にわたって結合することが、これらの分子の1分子観察によって見いだされた。すなわち、ベータサル面近くを走るストレスファイバー様のアクチン線維束には、他の細胞膜とアク

チンの両方に結合するようなシグナル分子が存在し、このような線維束の一部が、細胞膜のシグナル変換の重要なプラットフォームである可能性が示された。

(7)EBP50/NHERF-1が次々とやってきては一時静止するようなホットスポットが、細胞膜の内側表面に多数有ることが示された。しかし、EBP50/NHERF-1と結合すると考えられている細胞膜上のチャンネルや受容体を多数にわたって調べたが、どの分子もホットスポットにはリクルートされなかった。受容体をリガンドで刺激しても、リクルートは見られなかった。しかし、一方で、様々な受容体刺激後にホットスポット周辺で新しくアクチン重合が誘導されることが見いだされた。今後は、このようなアクチン重合のシグナル変換における機能を解明することが重要である。

#### 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3件)

N. Komura, K. G. N. Suzuki, H. Ando, M. Konishi, M. Koikeda, A. Imamura, R. Chadda, T. K. Fujiwara, H. Tsuboi, R. Sheng, W. Cho, K. Furukawa, K. Furukawa, Y. Yamauchi, H. Ishida, A. Kusumi, and M. Kiso, Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor, *Nature Chemical Biology*, 査読有、2016 (in press)  
DOI: 10.1038/NCHEMBIO.2059

T. K. Fujiwara, K. Iwasawa, Z. Kalay, T. A. Tsunoyama, Y. Watanabe, Y. M. Umemura, H. Murakoshi, K. G. N. Suzuki, Y. L. Nemoto, N. Morone, and A. Kusumi, Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane, *Molecular Biology of the Cell*, 査読有、2016 (in press)  
DOI:10.1091/mbc.E15-04-0186

N. Hiramoto-Yamaki, K. A. Tanaka, K. G. Suzuki, K. M. Hirose, M. S. Miyahara, Z. Kalay, K. Tanaka, R. S. Kasai, A. Kusumi, and T. K. Fujiwara, Ultrafast diffusion of a fluorescent cholesterol analog in compartmentalized plasma membranes, *Traffic*, 査読有、Vol.15、Issue 6、2014、pp.583-612  
DOI:10.1111/tra.12163

[学会発表](計20件)

楠見 明弘, Single-molecule tracking revealed organizing principles of the

plasma membrane for signal transduction, Cold Spring Harbor Asia Conferences "New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms", 2015年12月9日、蘇州(中国)

楠見 明弘、Single-molecule tracking revealed organizing principles of the plasma membrane for its signal transduction function, Super Resolution Symposium, 2015年11月27日、バンガロール(インド)

楠見 明弘、Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, International Symposium on Frontiers in Bioimaging, 2015年10月26日、台北(台湾)

楠見 明弘、Single-molecule view of mechanisms and functions of membrane compartmentalization, Mechanisms and functions of membrane compartmentalization, 2015年9月6日、ミュンスター(ドイツ)

楠見 明弘、Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction: tracking single molecules in living cells, Brazilian Physical Society Meeting 2015 XXXVIII ENFMC, 2015年5月26日、フォス・ド・イグアス(ブラジル)

楠見 明弘、過渡的ホモダイマーの衝撃: GPCRとGPIアンカー型受容体の両方に見られるシグナルとドメイン形成の基本ユニット、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会/第92回日本生理学会大会、2015年3月21日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

楠見 明弘、Plasma membrane domain mechanisms for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, 2014 Symposium in Chemical Biology, 2014年11月27日、ローザンヌ(スイス)

楠見 明弘、Basic unit rafts for raft formation and function as revealed by single-molecule tracking, Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cell Biology, 2014年10月22日、ソウル(韓国)

楠見明弘、宮原愛美、藤原敬宏、神経細胞膜にある分子種選択性2次元拡散障壁、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、国立京都国際会館(京都府京都市)

楠見 明弘、Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking, ComBio 2014, 2014年10月1日、キャンベラ(オーストラリア)

楠見明弘、宮原愛美、藤原敬宏、神経細胞軸索の細胞膜にある2次元拡散障壁は分子選択性フィルターである、第52回日本生物物理学会年会、2014年9月25日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

楠見 明弘、シナプスとイニシャルセグメント領域における細胞膜分子の異常な拡散挙動: 1分子追跡による解明、第37回日本神経科学学会大会、2014年9月12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

楠見 明弘、Unit raft mechanism for signal transduction revealed by single-molecule tracking, Biomembrane Days 2014, 2014年9月2日、ベルリン(ドイツ)

楠見 明弘、Tracking single fluorescent molecules at work in living cells: Revealing organizing principles of the plasma membrane for signal transduction, 2014 HeKKSaGOn Summer School, 2014年9月1日、カールスルーエ(ドイツ)

楠見 明弘、Tracking single molecules at work in the plasma membrane of living cells, First Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, 2014年8月29日、スプリット(クロアチア)

楠見 明弘、細胞膜メゾドメインのシグナル機構: 1分子追跡による解明、第6回薬学の未来を考える京都シンポジウム「イメージング技術が切り開く創薬・病態研究の未来」、2014年8月2日、京都大学(京都府京都市)

楠見 明弘、3つの細胞膜階層メゾ構造が担うシグナル変換: 1分子追跡・操作の楽しみ、科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業 ERATO「村田脂質活性構造プロジェクト」報告会、2014年7月24日、大阪大学(大阪府豊中市)

楠見 明弘、Membrane mechanisms as revealed by single-molecule tracking in living cells, The Biennial British Biophysical Society Conference, 2014年7月10日、コヴェントリー(イギリス)

楠見 明弘、Membrane mechanisms: Concerted action of membrane domains for signal transduction in the plasma membrane、8th IUPAP International Conference on Biological Physics、2014年6月20日、北京(中国)

楠見 明弘、Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction: Three-tiered hierarchical meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking、Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses、2014年4月22日、沖縄科学技術大学院大学(沖縄県国頭郡)

〔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.nanobio.frontier.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

楠見 明弘 (KUSUMI, Akihiro)  
京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・教授  
研究者番号： 50169992

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者