

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750369

研究課題名(和文)合成小分子によるアクチンダイナミクスの可視化

研究課題名(英文) Novel method for live cell actin imaging based on small molecule fluorescent probe

研究代表者

上野 匡 (Ueno, Tasuku)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：60462660

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)：アクチンは細胞骨格の一種であり、様々な外的な刺激や発生のコンテキストに応答して、ネットワークが速やかに再編成される。これにより細胞極性形成や神経突起の伸長、細胞運動などの細胞のダイナミクスが支えられている。本研究課題では、さまざまな現象で多種多様な機能を果たすアクチンの動的挙動を可視化可能な合成小分子の蛍光プローブを開発することを目的に研究を推進した。具体的には、我々の研究室で偶発的に見出されたアクチン繊維を染める蛍光色素を元に、誘導体展開による構造活性相関研究や、プローブの動作原理の精査等を行うことで、蛍光プローブによる新規アクチン可視化手法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：The dynamic behavior of the actin cytoskeleton is a critical part of most cellular activities, e.g., membrane trafficking, cell movement and neurite extension. Therefore, visualization of actin cytoskeleton dynamics is essential to understand its roles in regulating cellular functions. In the present study, novel small molecule based fluorescence probe for F-actin visualization probes were successfully developed. The developed probe is simple to use, and has sufficiently high sensitivity and specificity for actin cytoskeleton. It is also showed that the probe was applicable for live cell fluorescence imaging method. This would be nice piece of work a potentially important to researchers interested in the biology associated with actin dynamics.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光プローブ アクチン イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格は、中間径フィラメント、微小管、そしてアクチンフィラメントという繊維状のタンパク質でできた網目状の構造物で、アクチンはその中でも最も細い。顆粒のアクチンタンパク質 (G-アクチン) が重合し糸状に連なった繊維は細胞の形態を決定しており、細胞質・細胞膜の流動と、細胞遊走や細胞分裂での収縮等の運動性に関与している。アクチン骨格の再構成は多様な生命現象に関与しており、このような重合や機能の多様性がどのようなメカニズムによって可能となるかを理解することは、生体における複雑な情報伝達を探求する上で非常に重要であり、生体内でアクチン動態の過程を視る技術の開発が望まれてきた。

2. 研究の目的

一般的に F-アクチンの可視化は、古典的には繊維状のアクチンと特異的に結合する Phalloidin (タマゴテングダケから単離された二環式のヘプタペプチド) に蛍光色素を結合させたプローブにより行われる。Phalloidin は、繊維をサイズの異なるアクチン繊維に同様に結合する性質を有するため、多様なアクチンフィラメントの形状を可視化することが可能であり、現在でも汎用されている。一方で、Phalloidin プローブは細胞膜の透過性に乏しいことから、アクチン骨格の染色には、固定化と膜透過処理が必要となるため、アクチン骨格が動的に変化する様子を捉えることができない。近年、アクチンダイナミクスを追う上で最も信頼性の高いプローブの一つとして広く用いられているプローブは、2008年に Wedlich-Soldner らにより報告された Lifeact である。このプローブは出芽酵母の Abp-140 中の 17 アミノ酸という短いペプチド鎖が F-アクチンに結合する性質を

利用したプローブで、C 末端を蛍光タンパク質標識した Lifeact-GFP、あるいは N 末端を FITC 標識した F-Lifeact などといった形で使用される。Lifeact はアクチンへの親和性が比較的低いため、重合・脱重合やアクチン結合性タンパク質のアクチンへの結合を阻害せず、生きた細胞においてアクチンダイナミクスを観察できる。一方で前者では遺伝子導入が、後者ではマイクロインジェクションが必要であることや、系や繊維によっては可視化できないことも報告されており、またアクチンの剛性を高めているのではないかという指摘もある。そこで本研究では、アクチン骨格を非侵襲的に可視化可能であり、個体や多検体に対し簡便に適用が広げられる小分子化合物によって新たな小分子蛍光プローブを開発することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

我々はこれまで小分子の特性を活かしたイメージング技術および情報伝達系の振動プローブの開発に携わっており、アクチン骨格再構成系におけるイノシトールリン脂質シグナル伝達様式の解明や蛍光プローブの開発研究などを行ってきた。そのようなプローブ研究の中で、我々は、他のプローブの開発過程において得られた合成中間体 (図 1) がアクチンを染めることを偶発的に発見した。

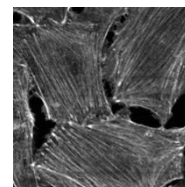
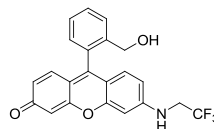


図 1 アクチン骨格への結合がみられた Rhodol 系蛍光色素の構造と色素を適用した生細胞の共焦点蛍光顕微鏡像。

この分子では、既報の天然物構造を構造基盤とした小分子プローブとは異なり、

非常に単純な構造ながらアクチンへの結合性が達成されている。本プローブは現時点でも、**① 遺伝子導入の必要がなく、細胞膜透過性が高いため、細胞や組織にプローブを散布するだけでイメージングが可能**であるといった利点があり、また**② 有機小分子であるため構造改変によりプローブの改良や機能化が期待できる**などといった視点から、実用性の高いプローブへと発展しうると考え、これを基盤に研究を進展させることとした。

4. 研究成果

本研究では、プローブの構造展開を行い、アクチンとの結合に関して、構造活性相関の精査、アクチン繊維の重合・脱離過程に対する影響の精査、生細胞イメージングの応用に関して重点的に研究を進め、以下の成果を得た。

見出されていた蛍光色素がどのような結合様式でアクチン繊維を染色するのには興味深く、まずは蛍光プローブの構造活性相関に関して精査を行った。具体的には、図1に示した分子の構造を元に、誘導体を系統的にデザイン・合成し、プローブとアクチンの親和性の精査などを行った。細胞系にプローブを適用することでも、一般的に汎用されているアクチン染色試薬 *phalloidin* との比較を行うことにより、どのような形状の繊維が染まっているのかを、共焦点顕微鏡像を取得しながら、精査を進めた。その結果、ロドール骨格を保持した誘導体のみならず、キサンテン環9位の芳香環2'位を誘導体化したものは、親和性に差が生じるものの、多くの誘導体でアクチン繊維への親和性が維持されるが、負の電荷を有するカルボキシル基を導入すると、親和性が完全に失われることが明らかとなった。また、どのような誘導体化を行った場合

でも、アクチンへの親和性の変化は生じるが、繊維の染色パターンは、*phalloidin* とよく一致していることも明らかとなった。

誘導体化の例として図2に、 CH_2OH 基を他の官能基に変換した場合の染色像の変化を示したが、Me基ではもとのプローブと同じく明瞭なアクチン繊維の染色像を与えたが、 COOMe 基に変換した誘導体では生細胞染色像ではアクチン以外の細胞内小器官へも分散した蛍光像が得られた一方で、固定細胞では明瞭な像が得られた(図2)。負電荷を持つプローブの場合は、細胞膜透過性の低さから生細胞の染色では細胞内からプローブ蛍光が観測されず、また固定細胞でもアクチンの像は得られなかった。別途 *in vitro* 系でアクチンに対する親和性を算出も行った結果、蛍光像の結果を反映し、 COOMe 誘導体で若干の親和性の低下がみられ、 COO^- 誘導体では、繊維に対する親和性が消失していることが確かめられた。

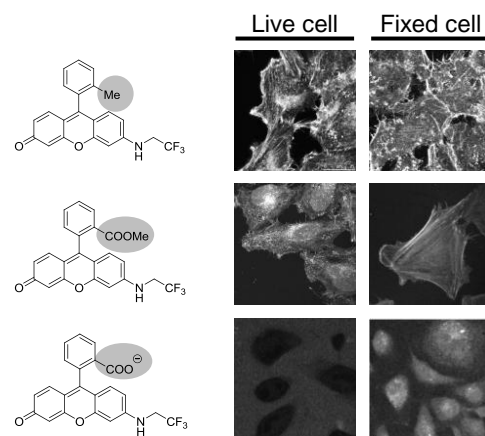


図2. キサンテン環9位芳香環の誘導体化による共焦点蛍光顕微鏡像の変化。

また、ロドール骨格を大胆に他の色素母核へと変換した化合物についても設計・合成した。いずれも親和性の低さや細胞内での細胞内小器官や内膜系への局在の影響によって、生細胞においてはアクチン繊維の明瞭な染色像を与えることはなかったが、図

3に示したように、固定化処理を行った細胞では、像のコントラストは低いものの、いずれの化合物もアクチン繊維様の染色像を与える非常に興味深い結果であった。他の誘導体の結果も加味すると、 $\text{ArNHCH}_2\text{CF}_3$ という構造がアクチン結合に重要であることがわかる。また、親和性に加えて、細胞膜透過性、細胞内分布の向上といった観点からプローブの機能性に関して、他の官能基の寄与がみとめられた。

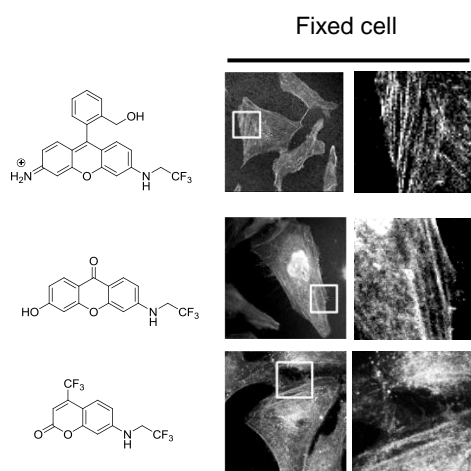


図3 色素の基本骨格を変更したアクチンプローブ誘導体と固定細胞で共用点蛍光顕微鏡像。

別途 *in vitro* で行った単離したアクチンを用いた試験結果では、プローブは繊維であるF-アクチンにのみ選択的に結合しており、単量体であるG-アクチンにはまったく結合していないことも明らかとなっている。これに加えて、種々のアクチン結合分子との競合追い出し実験の結果から、プローブのアクチン繊維との結合サイトは、Phalloidinと同じであることが強く示唆されている。本研究で見出されているプローブは、phalloidinのような複雑な構造を有する多環式大環状ペプチド誘導体と比較して極めて単純な構造であり、アクチンタンパク質との相互作用可能な官能基の数も少ない。それにもかかわらず、アクチン

の結合サイトを共有し、また高い選択性を発揮できているのは、極めて興味深い結果であった。

従来見出されているアクチン結合性の小分子は、アクチン繊維の重合・脱重合を阻害する分子であるため、本研究で開発したプローブに関しても、アクチン繊維の重合・脱重合への阻害作用に関して精査を行った。*in vitro*では、ピレン標識アクチン重合アッセイを行った結果、イメージングに用いるような低濃度の範囲では、アクチンの重合を阻害しないものの、高濃度のプローブ分子存在下では、アクチン重合速度に低下がみられた。これまでの結果を合わせて考えると、VASPなどのアクチン結合性タンパク質のように、低濃度では繊維軸索に、高濃度領域ではアクチンの成長端にプローブが結合している可能性が示唆された。

続いて、プローブを生細胞へのロードした状態でアクチン繊維の動的な挙動が可視化可能かについて検討を行った。*in vitro*におけるピレン結合アクチン重合テストの結果と同様に、やはり高濃度では毒性やアクチン繊維の動的な挙動を阻害する様子が観察されたが、適切な濃度に保つことで、アクチンの挙動が観測可能であった。更に、細胞の運動性を指標にアクチンの動的挙動への影響の定量を試みた結果、やはり、高濃度に負荷した条件では、細胞の運動性への阻害が視られたが、イメージングに用いる標準的な濃度で細胞へプローブをロードした場合には、運動性への阻害効果はみられなかった。今後、更なる詳細な解析を進めていく予定である。

以上を纏めると、本研究では偶発的に見出されたアクチン結合性を示す蛍光色素を元に、誘導体展開から構造活性相関研究を行うことで、色素のアクチン繊維に対する相互作用様式の解明を行った。この結果に加

え、アクチン結合性を示す天然物との競合実験により、見出された分子が古典的にアクチン繊維への結合分子であることが知られている phalloidin と結合サイトを共有していることを見出した。開発したプローブ群は、細胞外へロードするだけで、速やかに細胞膜を透過し、アクチン繊維を染色可能である。高濃度領域では、アクチン動態への阻害作用によると思われる細胞毒性が観測されたが、適切に濃度を調整することで、アクチン繊維を十分に高いコントラストで染色可能であることも確かめられた。本研究で確立されたアクチン染色方は、従来法と異なり、遺伝子導入など煩雑な操作を必要とせず、生きた細胞にプローブを付与するだけで高いコントラストでアクチン繊維を染色可能であり、また、生きた細胞におけるアクチンの動的な挙動も観測可能であることから、今後、アクチンダイナミクスの可視化による生命科学の発展に寄与することが期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

野村悠介, 上野匡, 浅沼大祐, 浦野泰照, 小分子プローブによるアクチンの可視化, 2015. 3. 25-28. 日本薬学会第 135 回年会, 神戸学院大学 (兵庫県)

野村悠介, 上野匡, 浅沼大祐, 浦野泰照, 小分子蛍光プローブによるアクチンフィラメントの可視化, 2015. 6. 27. 第 15 回東京大学生命科学シンポジウム, 東京大学 (東京)

上野匡, 野村悠介, 浅沼大介, 浦野泰照, アクチン繊維に高い親和性を有する新規低分子化合物, 2015. 7. 17-18. 生体機能関連科学部会若手の会 第 27 回サマースクール 神戸セミナーハウス (兵庫県)

上野匡, アクチン骨格の制御・可視化による細胞機能の理解, 2016. 6. 10-11. 第 9 回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム, 東北大学 (宮城)

上野匡, 生細胞におけるアクチン骨格の制御・可視化による機能の理解, 2017. 2. 11, 第一回公開シンポジウム「数理シグナル」学術領域の創出, 東京大学医科学研究所 (東京)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 匡 (Ueno Tasuku)
東京大学大学院薬学系研究科・助教
研究者番号: 60462660

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()