

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06217

研究課題名(和文) 高分解能分子イメージングによる分子構造変化からの細胞内力可視化解明

研究課題名(英文) Quantitative high-precision live-cell single-molecule imaging of focal adhesion molecules

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の発生する力は、周囲を取り巻く微小環境に伝わり、移動、形態変化、増殖など様々な細胞機能に大きな影響を与える。本研究では、力伝達の機序を一分子レベルで明らかにするため、力を発生するアクチン細胞骨格と細胞外基質を繋ぐ接着斑分子の細胞内分子イメージングを行った。蛍光単分子スペckル顕微鏡を用いて主要な接着斑分子ピンキュリンとタリンの細胞葉状仮足における単分子イメージングを行った結果、これらの分子が、細胞仮足で広く観察されるアクチン求心性流動と同速度・方向で流動することを明らかにした。さらに、アクチン流動の新しい働きとして、流動に起因する分子勾配配置機構を実験と数理モデルにより明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた細胞の中で生体分子の動態を計測する定量的な蛍光バイオイメージングは、様々な生命現象の解明に用いられている。本研究では、細胞仮足で広く観察されるアクチン求心性流動の定量イメージングを行った過程で、汎用されるアクチン結合プローブが、細胞仮足の後方に偏る局在ミスを示すことを見出した。さらに、細胞内流動に起因する分子勾配配置モデルを考案し、アクチン結合型蛍光プローブが、アクチン流動の影響を受けて不正確な分布を示すことを実験と数理モデル解析により初めて明らかにした。本成果は生命科学分野における重要な注意喚起であるとともに、細胞内流動によって分子が濃度勾配を作るメカニズムの理解につながる発見である。

研究成果の概要(英文)： At the cell leading edge, the retrograde actin flow, continuous centripetal movement of the actin network, is widely observed in adherent cells. During cell migration, linkage between the retrograde actin flow network and integrin-based focal adhesions is believed to promote cell protrusion. However, how focal adhesion molecules link to the actin network moving along the retrograde flow remains unclear. Single-Molecule Speckle (SiMS) microscopy is a powerful approach to directly monitor the mechanics linking actin dynamics and cell adhesion at the molecular level. By using SiMS, I revealed several focal adhesion components including Vinculin and Talin exhibit flow-associated motion along the retrograde actin flow in lamellipodia. Furthermore, I revealed an actin dynamics-based mechanism that causes possible errors in quantitative live-cell imaging. Our findings provide new insights into the physiological roles of the retrograde actin flow in cell migration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：1分子イメージング アクチン 細胞内流動 細胞接着 定量的イメージング 数理モデル 接着斑

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の発生する力は、周囲を取り巻く微小環境に伝わり、移動、形態変化、増殖、分化決定など様々な細胞機能に重要であることがわかってきている。しかし、実体のない力を非侵襲・リアルタイム・高解像度で捉える技術は確立しておらず、細胞内外における力伝達の分子レベルでの素過程は、ほとんど未知であった。

細胞内力発生の主要な場はアクチン細胞骨格であり、アクチン線維はミオシンモータータンパク質との相互作用、あるいは、線維端に単量体アクチンが重合してアクチン線維が伸長することにより、細胞内力を発生する。アクチン線維流動(レトログレードフロー)は、培養細胞において、細胞周縁から求心的にアクチン線維が移動する現象である。アクチン線維流動は、細胞内で極性を持った「力」を伴う点で興味深い、生体内における意義は未だよくわかっていない。私は蛍光単分子イメージングを用いた先行研究(Yamashiro *et al.*, *MBoC*, 2014、引用文献)により、細胞仮足内で絶え間なくおこるアクチン線維の求心性流動が、接着斑の有無に関わらず、仮足全体で接着分子と連結する可能性を見出した。しかし、流動するアクチンネットワークと接着分子がどのように連結するかについての詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、培養細胞で普遍的に見られるアクチン線維流動が細胞外マトリックス(Extracellular Matrix; ECM)に連結し、流動力を伝達する作用機序と、流動力の役割を明らかにすることを目的とした。細胞内分子イメージング法である単分子スペckル顕微鏡法により、力を発生するアクチン細胞骨格とECMを繋ぐ細胞-基質間接着分子(接着斑分子)の挙動を直接可視化し、力伝達の機序を一分子レベルで明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、細胞内分子イメージング法である蛍光単分子スペckル顕微鏡を主な手法とした。この手法では、蛍光標識した分子を極低濃度で培養細胞内に導入し、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、分子の移動速度、位置変化や会合・解離時間が定量できる。

私はこれまで、蛍光単分子スペckル顕微鏡の原法を改良し、時空間分解能の大幅な向上、細胞深部での単分子トラッキング、単分子イメージングの多色化に成功した。私が開発したeSiMS顕微鏡(electroporation-based Single-Molecule Speckle Microscopy)は、現在細胞内で最も高精度に一分子動態を捕捉できる技術の一つであり、数十ミリ秒の時間分解能によるナノメートルスケールの分子トラッキング(± 8 nm 誤差)で生体分子の挙動を解析できる。本研究では、アクチン線維流動が観察される細胞周縁の葉状仮足において、接着斑分子の高精度1分子イメージングを行った。

また、本研究を進める過程で、予想していなかった研究成果として、定量バイオイメージングに汎用されるアクチン結合型プローブがアクチン線維流動の影響により細胞仮足の後方に偏る局在ミスを示すことを実験と数理モデルにより明らかにした本研究成果については、蛍光単分子イメージングによる定量解析に基づいた数理モデル解析を、Dimitrios Vavylonis 教授(リーハイ大学、アメリカ)の研究グループと共同して行った。

4. 研究成果

本研究の主な研究成果は以下の2点である。

(成果 1)

基底面の物理的性質は、細胞の増殖、分化、運動性などに影響を与えることが知られている。細胞表面の接着分子とアクチン線維のリンクは、細胞内外の情報伝達に重要な役割を担うと考えられている。本研究では初めに、主要な接着斑分子であるピンキュリンとタリンについて、蛍光単分子スペckル解析を行った。EGFP融合ピンキュリンまたはタリンを低発現させたアフリカツメガエル培養XTC細胞の葉状仮足(ラメリポディア)を観察した結果、ピンキュリンとタリンの分子動態は類似していた。ピンキュリン及びタリンは、ラメリポディア全体で急激的に流れているスペckルと静止するスペckルが観察された。ピンキュリン単分子のうち、約5割のスペckルが一定速度で細胞中心へと流動していた。一方約1割のスペckルは静止し、残りのスペckルには流動と静止の切り替えが起きているもの、またはその切り替えが頻繁に起きるものが存在した。

求心的に流動する接着斑分子とアクチン線維流動を比較するため、私が開発した eSiMS 顕微鏡を応用し、アクチンと接着斑分子の 2 波長蛍光単分子スペクル解析を行った。EGFP 融合ピンキュリンまたはタリンを低発現させた XTC 細胞に、CF-680R 近赤外蛍光標識アクチンをエレクトロポレーションによって導入した。接着斑分子とアクチン線維流動を比較するため、同一顕微鏡視野について各蛍光タンパク質を交互に撮影しながら、同時にタイムラプス観察した。

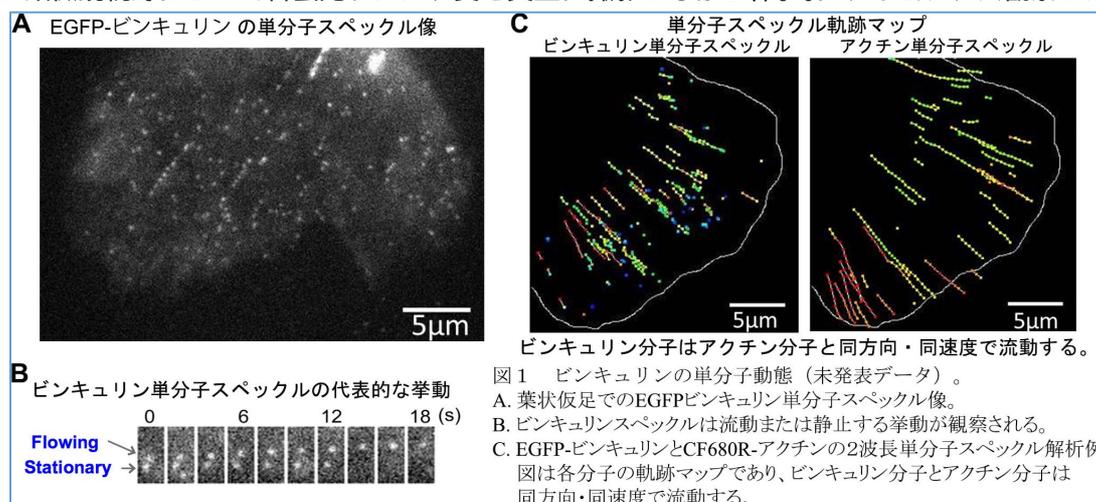


図1 ピンキュリンの単分子動態 (未発表データ)。
 A. 葉状仮足でのEGFPピンキュリン単分子スペクル像。
 B. ピンキュリンスペクルは流動または静止する挙動が観察される。
 C. EGFP-ピンキュリンとCF680R-アクチンの2波長単分子スペクル解析例。
 図は各分子の軌跡マップであり、ピンキュリン分子とアクチン分子は同方向・同速度で流動する。

各スペクルの軌跡から、接着斑分子 (ピンキュリン、及び、タリン) とアクチンは同方向に流動していることがわかった。さらに、流動する接着斑分子と近傍に存在するアクチンスペクルの速度比較を行った。その結果、接着斑分子はアクチン線維流動とほぼ同速度で流動していることがわかった (図1)。これらの結果から、主要な接着斑分子であるピンキュリンとタリンが、ラメリポディアのアクチンネットワークに会合していることが強く示唆された。

接着斑分子ピンキュリンは、アクチン、タリン、パキシリン、PIP2 など、10 以上の結合パートナーが報告されている。また、アクチン線維と結合して細胞内張力感知に関与することが示唆されている。本研究では、ピンキュリンのアクチンネットワーク連結機構を明らかにするためピンキュリン部分機能欠損変異体 (アクチン結合欠損、タリン結合欠損など) の EGFP 融合タンパク質について蛍光単分子スペクル解析を行い、各変異体について流動する挙動の変化を定量解析した。その結果、ピンキュリンは主にタリンを介してラメリポディアのアクチンネットワークに連結しており、ピンキュリン C 末端側アクチン結合ドメインによるアクチン線維結合が結合を増強していることが明らかとなった。

これらの成果について、現在、学術論文を投稿準備中である。

(成果 2)

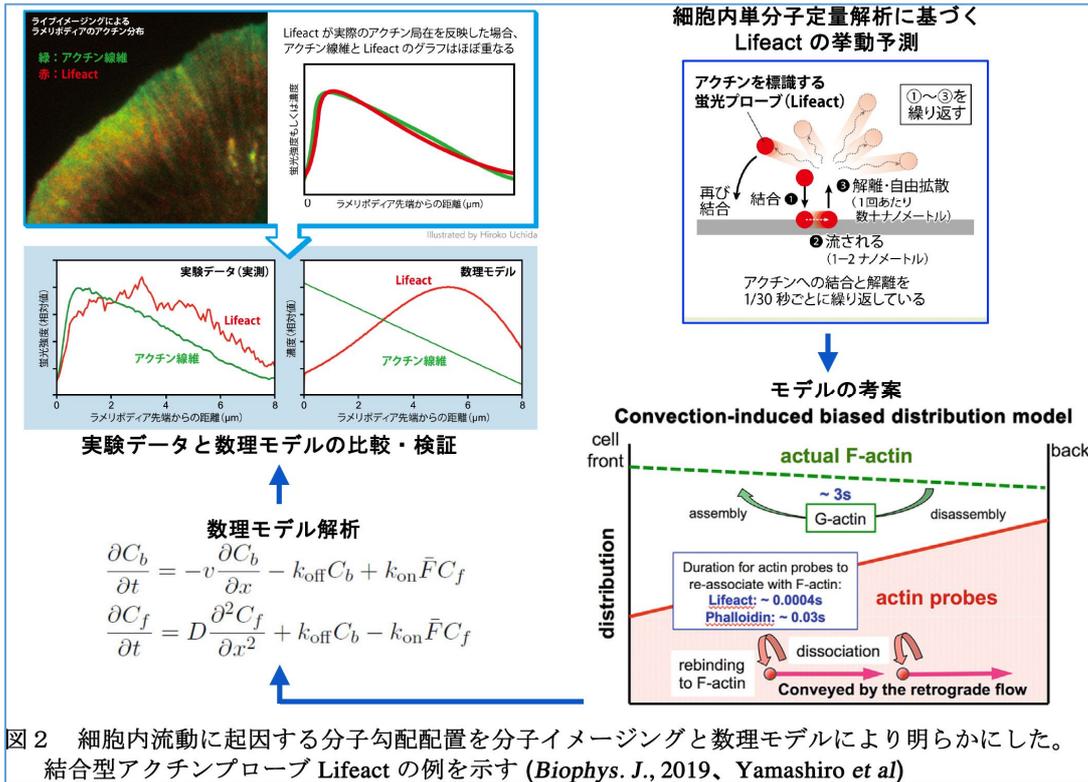
本研究を進める過程で、予想していなかった研究成果として、定量バイオイメージングに汎用されるアクチン結合型プローブがアクチン線維流動の影響により細胞仮足の後方に偏る局在ミスを示すことを見出した。

定量的な蛍光バイオイメージングは、細胞が生きた状態における生体分子の時空間的情報を得るアプローチであり、生命科学の様々な分野で広く行われている。細胞内で生体分子を観察するには、目的の生体分子に結合する標的結合型蛍光プローブを細胞内に導入し、可視化する手法がよく用いられる。目的の分子の動態を的確に解析するためには、蛍光プローブは、生体分子の細胞内局在を正確に反映する必要がある。

アクチン細胞骨格は速やかに崩壊・再編成されるダイナミックな構造体であり、細胞の移動や形態制御、分裂など、様々な細胞現象で中心的な役割を果たす。アクチンのライブイメージングには、Lifeact という 2008 年に紹介された比較的新しいアクチン標識プローブが汎用されている。Lifeact は酵母の Abp140 タンパク質に由来する 17 アミノ酸のアクチン結合ペプチドで、蛍光標識して細胞内に導入した場合、1/30 秒程度の非常に速いスピードでアクチン線維に結合・解離を繰り返す。このような性質から Lifeact は、細胞内のアクチンダイナミクスに影響を与えずに、均等にアクチン構造を標識する理想的なプローブであると考えられていた。

本研究では、生細胞における Lifeact の局在を、実際のアクチン局在と比較した。その結果、細胞の伸展部にあるラメリポディアにおいて、実際のアクチン局在と Lifeact は一致せず、Lifeact が後方に偏る局在ミスを示すことに気がついた。また、Lifeact に加えて、アクチン線維に特異的に結合するファロイジンについても、同様の局在ミスが観察された。ラメリポディアは高密度のアクチン線維網目状構造を持ち、内部のアクチン構造は、求心性アクチン線維流動により、絶え間なく細胞辺縁から中心に向かって流動している。私は、流動するアクチン構造は、たとえわずかな結合時間であっても、アクチン結合プローブをラメリポディアの後方に集積させる効果があると考えた。そこで、流動に起因する分子勾配配置モデル (convection-induced gradient distribution model) を作り、偏微分方程式を用いた数理モデル解析による検証を行った (図2)。その結果、Lifeact のように非常に結合・解離の速いプローブでも、アクチン線維流動はアクチン結合プローブの分布に非常に強く影響することが証明された。

本研究成果は、定量イメージングにおいて汎用される「標的結合型蛍光プローブ」が、細胞内流動の影響を受けて不正確な分布を示すことを初めて明らかにした。蛍光プローブが、標的分子の動態を反映するかどうかは、定量イメージングで得られるデータの信頼性の要であり、標的結合型プローブの使用に際して、十分な注意を払う必要があることを生命科学の分野で広く注意喚起する研究である。また本研究成果は、細胞内流動によって分子が濃度勾配を作るメカニズムの理解につながる発見である。



本研究成果は、2019年に *Biophysical Journal* 誌で発表した。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 ASCB (America Society for Cell Biology) のミニシンポジウムに採択され、口頭発表を行った (2018年12月)。本研究成果に関連して、英文総説2報 (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2020) を発表した。

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6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamashiro Sawako, Watanabe Naoki	4. 巻 41
2. 論文標題 Quantitative high-precision imaging of myosin-dependent filamentous actin dynamics.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Muscle Research and Cell Motility	6. 最初と最後の頁 163-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10974-019-09541-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koseki Kazuma, Taniguchi Daisuke, Yamashiro Sawako, Mizuno Hiroaki, Vavylonis Dimitrios, Watanabe Naoki	4. 巻 24
2. 論文標題 Lamellipodium tip actin barbed ends serve as a force sensor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 705 ~ 718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamashiro Sawako, Taniguchi Daisuke, Tanaka Soichiro, Kiuchi Tai, Vavylonis Dimitrios, Watanabe Naoki	4. 巻 116
2. 論文標題 Convection-Induced Biased Distribution of Actin Probes in Live Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 142 ~ 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2018.11.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamashiro Sawako, Tanaka Soichiro, McMillen Laura M., Taniguchi Daisuke, Vavylonis Dimitrios, Watanabe Naoki	4. 巻 29
2. 論文標題 Myosin-dependent actin stabilization as revealed by single-molecule imaging of actin turnover	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1941 ~ 1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E18-01-0061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Naoki, Tohyama Kiyoshi, Yamashiro Sawako	4. 巻 506
2. 論文標題 Mechanostress resistance involving formin homology proteins: G- and F-actin homeostasis-driven filament nucleation and helical polymerization-mediated actin polymer stabilization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 323 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Hiroaki, Tanaka Kotaro, Yamashiro Sawako, Narita Akihiro, Watanabe Naoki	4. 巻 115
2. 論文標題 Helical rotation of the diaphanous-related formin mDia1 generates actin filaments resistant to cofilin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E5000 ~ E5007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1803415115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 2件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 山城佐和子、劉穎、渡邊直樹
2. 発表標題 単分子イメージングによるアクチン線維流動-接着斑分子連結機構の可視化解明
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会・第71回日本細胞生物学会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城佐和子
2. 発表標題 Myosin-dependent actin stabilization as revealed by single-molecule speckle (SiMS) analysis of actin turnover.
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashiro S, Taniguchi D, Tanaka S, Kiuchi T, Vavylonis D, Watanabe N.
2. 発表標題 Retrograde flow-induced biased distribution of actin probes in live cells.
3. 学会等名 第11回豊田理研(国際)ワークショップ(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashiro S, Liu Y, Watanabe N.
2. 発表標題 Coupling between actin retrograde flow and focal adhesion molecules visualized by single-molecule speckle microscopy.
3. 学会等名 American Society for Cell Biology / EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城佐和子、劉穎、渡邊直樹
2. 発表標題 アクチン線維流動力はどのように細胞外に伝わるか
3. 学会等名 2020年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城佐和子、田中聡一郎、Laura M McMillen、谷口大相、Dimitrios Vavylonis、渡邊直樹
2. 発表標題 Myosin-dependent actin stabilization as revealed by single-molecule speckle (SiMS) analysis of actin turnover
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山城佐和子、小寺文子、渡邊直樹
2. 発表標題 Near-infrared actin probes for deep-cell single-molecule speckle (SiMS) microscopy
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山城佐和子、谷口大相、田中聡一郎、木内泰、Dimitrios Vavylonis、渡邊直樹
2. 発表標題 Retrograde flow-induced biased distribution of actin probes in live cells
3. 学会等名 2018 ASCB/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山城佐和子
2. 発表標題 Myosin-dependent actin stabilization as revealed by single-molecule speckle (SiMS) analysis of actin turnover
3. 学会等名 The 16th International Membrane Research Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sawako Yamashiro, Ying Liu, Dimitrios Vavylonis, Naoki Watanabe
2. 発表標題 New insights into the role of the retrograde F-actin flow revealed by quantitative high-precision live-cell single-molecule imaging.
3. 学会等名 第72回細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sawako Yamashiro, Ying Liu, Naoki Watanabe
2. 発表標題 Retrograde actin flow-associated motions of focal adhesion molecules visualized by single-molecule speckle (SiMS) microscopy
3. 学会等名 American Society for Cell Biology/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sawako Yamashiro, Ying Liu, Dimitrios Vavylonis, Naoki Watanabe
2. 発表標題 New insights into the retrograde F-actin flow associated motions of focal adhesion molecules visualized by single-molecule speckle (SiMS) microscopy
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2020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		