

令和元年6月10日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04775

研究課題名(和文)超高速・超解像1蛍光分子局在顕微鏡法による、接着斑の動的群島機構の解明

研究課題名(英文) Dynamic focal adhesion molecular islands as revealed by super-spatiotemporal-resolution single fluorescent-molecule localization microscopy

研究代表者

藤原 敬宏 (Fujiwara, Takahiro)

京都大学・高等研究院・特定准教授

研究者番号：80423060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：接着斑は、幹細胞の分化やガン細胞の浸潤にともなう細胞運動において、細胞の力発生の足場という極めて重要な役割を担うミクロンサイズの細胞膜機能ドメインである。我々の開発した超高速1蛍光分子追跡技術と、それを応用したPALM超解像観察を組み合わせ、「接着斑動的群島機構」、すなわち、(1)接着斑は、アクチン膜骨格の網目を足場として、拡散で構成分子が動的に交換する100ナノメートル程度の島を単位とし、それらが多数集まることで形成されている、(2)構成分子は、群島の隙間の網目を飛び移る拡散運動で出入りをおこなっている、ことを示した。この機構が接着斑全体の効率的な形成と分解を可能にしていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)我々が開発してきた超高速1蛍光分子追跡/PALM超解像技術は、コマーシャルの高感度カメラを利用した技術と比較して10倍以上高速であり、刻々と状態が変化する生細胞観察において、今後、さらに重要性が高まると期待される。

(2)本研究で注目した接着斑の他にも、ポドソーム、タイトジャンクション、アドヒューレンスジャンクション、シナプスなど、様々な細胞機能の制御を担う接着構造が存在する。本研究で得た「動的群島機構」の概念は、細胞接着の制御という基本的な極めて重要な課題に、「サブミリ秒-数分の時間スケール/1分子-ミクロンサイズの空間スケールにわたる」、「動的な」知見をもたらすものである。

研究成果の概要(英文)：Focal adhesion, or FA, is a micron-sized structure in the plasma membrane (PM), responsible for the movement of the cells involved in stem cell differentiation or in cancer cell invasion. Using an ultrafast camera system we developed, integrin molecules were found to undergo hop diffusion between actin-induced 110-nm-compartments in the bulk PM, once every ~25 ms. They also underwent hop diffusion in the FA region, where the compartment size was about half in area and the residency time within a compartment was ~1.5x longer. Simultaneous use of PALM revealed that integrin immobilization events predominantly occurred where the FA marker protein paxillin densities were high, namely, on the FA-protein islands. These results support the dynamic FA archipelago model, in which FA islands maintained by the actin meshwork are sparsely distributed, allowing the ready entrance-exiting of integrin through the channels between FA islands, which would facilitate rapid FA formation-disintegration.

研究分野：生物物理学

キーワード：接着斑 アクチン骨格 拡散運動 1分子計測 超解像

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

接着斑は、幹細胞の分化やガン細胞の浸潤にともなう細胞運動において、細胞の力発生の足場というきわめて重要な役割を担っているミクロンサイズの細胞膜機能ドメインである。本研究を開始する以前に、我々は、生細胞中の1分子観察により、主要な接着分子インテグリンが細胞膜上の拡散で接着斑領域に容易に出入りすること、また、接着斑中で短時間(時定数で1秒以下)の停留を頻繁に示すことを見出していた。また、接着斑構成分子パキシリンの超解像(PALM; photoactivated localization microscopy)観察により、接着斑は構成分子がびっしりと隙間なく並んだ構造ではなくて、構成分子の複合体からなる島が多数存在するという示唆を得ていた。これらの予備的な結果から、私は、「接着斑は、細胞質中、また、細胞膜上の拡散で常にダイナミックに構成分子が交換している島を単位とし、それが多数集まることによって形成されている」という作業仮説、すなわち「接着斑動的群島仮説」に至った。

2. 研究の目的

本研究は、上記の「接着斑動的群島仮説」の正否の検証を目指し、以下の3つを目的とした。

(1) 接着斑内のアクチン膜骨格構造の解明

(2) 接着斑の動的群島構造仮説の検証

(3) 群島メカノセンシング機構の解明

「動的群島機構」は、接着斑のみに限らず、ポドソーム、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、シナプスなどのさまざまな細胞接着を担う細胞膜機能ドメインでも利用されている可能性があり、細胞接着の制御という基本的できわめて重要な課題に、新たに「動的な」知見をもたらすことを期した。

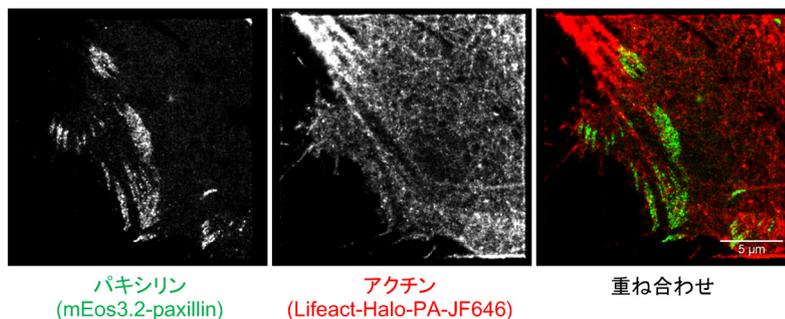
3. 研究の方法

我々がこれまで開発してきた、生細胞中の1蛍光分子を時間分解能100マイクロ秒(複数の蛍光分子で標識した場合は最高22マイクロ秒)で追跡できる高感度高速カメラシステムと、それをPALMに応用した、空間分解能50nmの生細胞超解像蛍光画像を秒単位で取得する技術を組み合わせ、群島構造の超解像観察と、拡散で出入りする構成分子の高速1分子観察を同時におこない、「接着斑動的群島仮説」を検証した。さらに、1分子観察/超解像観察の3次元化をすすめる、接着斑の立体構造、および、構成分子のリクルート機構について、従来の2次元観察のみでは得られない新たな知見を得ることを目指した。

4. 研究成果

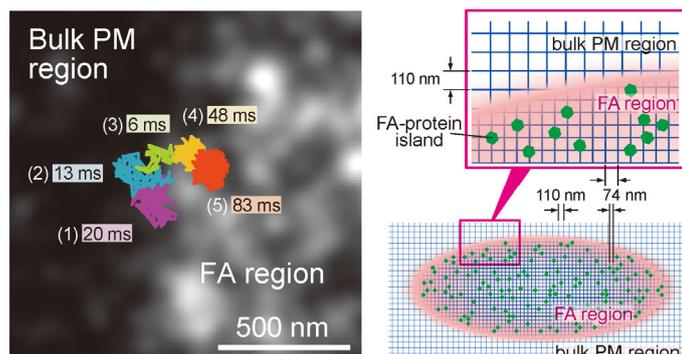
(1) 接着斑内のアクチン骨格構造の超解像観察

新規のPALM用蛍光色素(PA-JF646)を結合したアクチン線維マーカー(Lifeact-Halo)による接着斑近傍のアクチン骨格構造(ストレスファイバー終端、膜骨格の網目構造)標識方法を確立し、接着斑マーカー分子mEos3.2-パキシリンとの2色同時生細胞超解像観察をおこなった。ストレスファイバー終端の接着斑と接する領域には、接着斑外のアクチン膜骨格と同様な網目構造が存在することが示唆された。

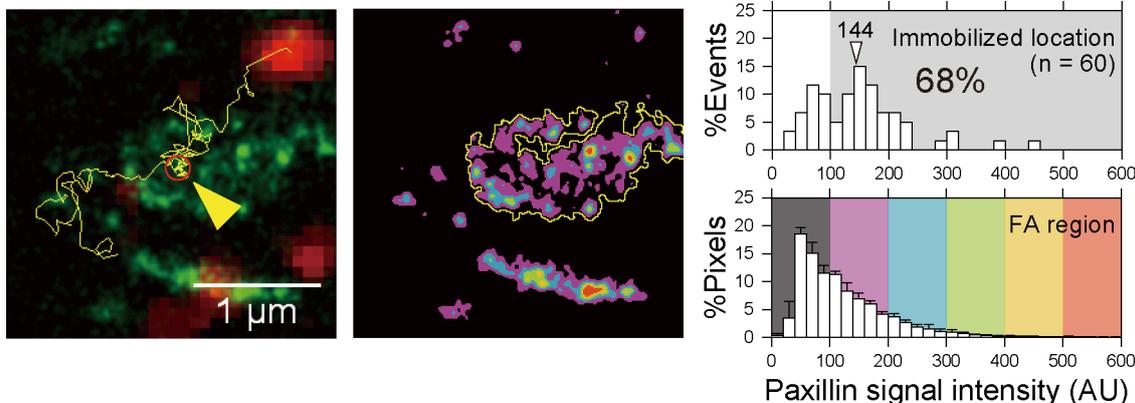


(2) 群島を超解像観察で可視化しながら、高速1分子運動追跡

群島構造を超解像観察(mEos3.2-パキシリン)で可視化しながら、接着斑の主要な接着分子インテグリンの時間分解能167マイクロ秒(6,000 Hz)高速1分子運動追跡をおこなった。接着斑外のインテグリン分子は、直径平均110nmのアクチン膜骨格の網目の間を約25ミリ秒に1回飛び移る拡散運動(ホップ拡散)を示すが、接着斑内に入っても、ホップ拡散を継続することが示された(下図左)。ただし、接着斑内の網目は、接着斑外に比べて直径で2/3程度、面積で1/2程度と小さいこと、また、網目あたりの滞在時間は約1.5倍長いこと、が明らかになった(下図右)(投稿準備中)。

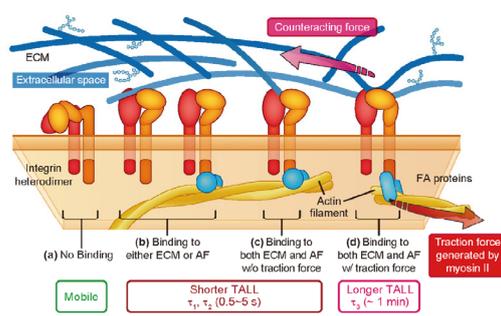
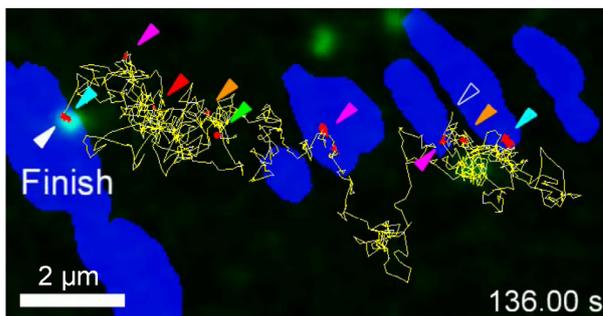
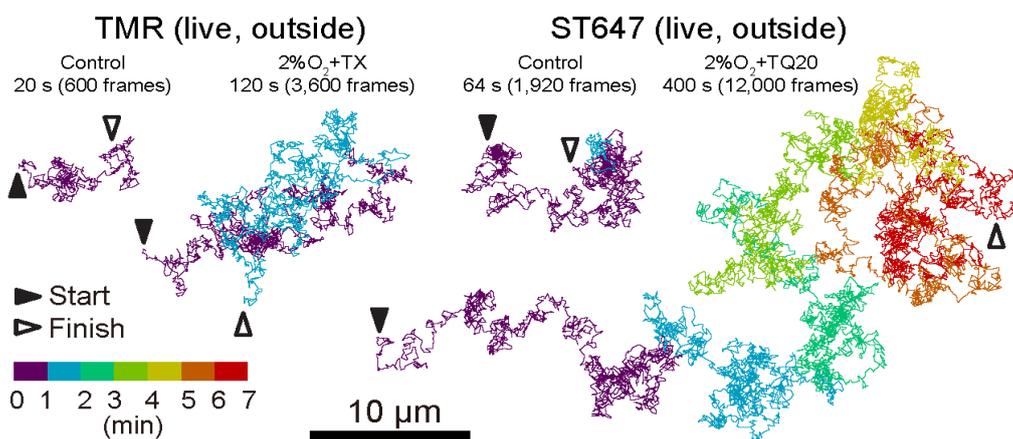


また、時間分解能 4 ミリ秒 (250 Hz) でのインテグリン分子の 1 分子運動追跡 (この時間分解能では) により、インテグリン分子は接着斑内で 1 秒以上の長時間の停留 (標識にもちいた蛍光色素が褪色するまで) に加えて、1 秒以下の短時間の停留を頻繁に示すことが分かった (下図左; 黄色矢頭は、約 0.2 秒の停留を示す)。これらの停留が起きた場所 (n = 60) での、超解像観察で可視化した群島構造マーカー分子パキシリンのシグナル強度 (下図中; 中央値を 100 として規格化) を調べた結果、2/3 以上 (68%) の停留が中央値の 100 より大きい場所で起こっていたことから (下図右)、インテグリン分子の停留は、群島構造上で起こりやすいことが明らかになった (投稿準備中)。



(3) インテグリンの長時間 1 分子運動追跡

1 分子低酸素条件と生細胞に優しい化学物質の添加を組み合わせ、光退色を大幅に抑制する方法を開発し、1 蛍光分子追跡時間を従来の最高 40 倍 (10 秒を 400 秒) に改善した (下図上段)。(2)の方法では、光退色による観察時間の限界で数秒までの停留しか検出できないうので、開発した方法で、インテグリン分子の数分間にわたるビデオレート (30 Hz) 1 分子追跡をおこなった (下図下段左)。その結果、接着斑内での一時停留時間は、秒以下-数秒-数 10 秒の成分が存在し、大きなばらつきがあることが明らかになった。インテグリンの変異体をもちいた実験により、数秒の停留を示すインテグリンはアクチン骨格もしくは細胞外マトリックス (ECM) の一方と結合していること、数 10 秒の停留を示すインテグリンは、両方に結合していることが示唆された (下図下段右)。また、接着斑内の場所によって停留時間が異なり、アクチン骨格と ECM の間にかかる張力が最も高いとされている部位 (接着斑の中心から細胞端方向に向かって、接着斑の端まで 2/3 の距離に相当する部位) で、数 10 秒の長時間の停留がもっとも高頻度で起こることが明らかになった (Tsunoyama et al., Nat. Chem. Biol. 2018)。



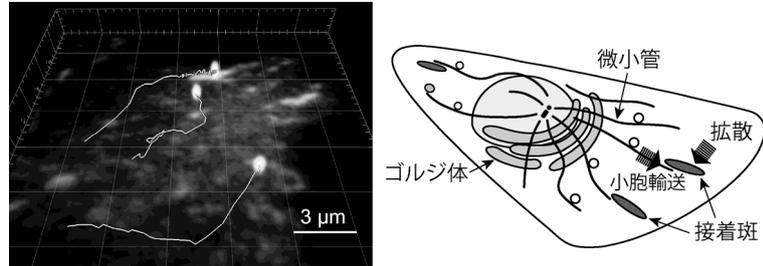
(4) 群島構造の定量解析

接着斑構成分子パキシリンノックアウト MEF 細胞に、mEos3.2-パキシリンを安定発現させた。野生型 MEF における内在性のパキシリンと同程度の mEos3.2-パキシリンを発現したクローン株を得て、生細胞超解像観察をおこなった。クラスター解析により群島構造の定量解析をおこなった結果、一つの島のサイズは直径 50-150 nm 程度であることが分かった。

(5) インテグリン分子の 3 次元長時間追跡

本研究課題で購入した Z ピエゾステージを顕微鏡システムに設置し、非点収差法による 3 次元追跡光学系の高位置精度 Z キャリブレーションを完了した。mEos3.2-パキシリンをマーカーとして接着斑を超解像観察しながら、インテグリン分子の 3 次元タイムラプス

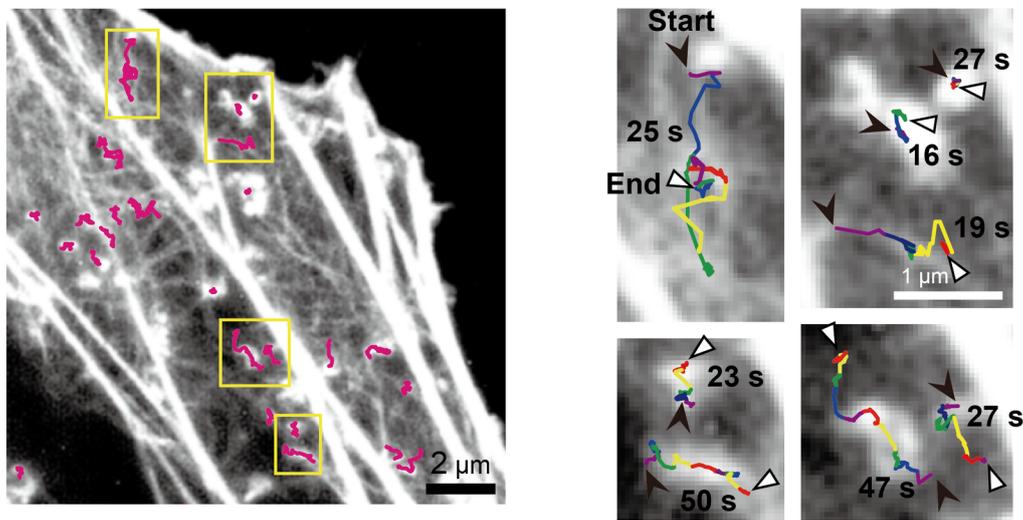
1 分子追跡 (4 Hz/5 分間) をおこなった。接着斑構成膜貫通分子の接着斑近傍へのリクルート機構として、細胞膜上の拡散による出入りだけでなく、細胞内の方向性小胞輸送による濃縮が関与している可能性が示唆された。



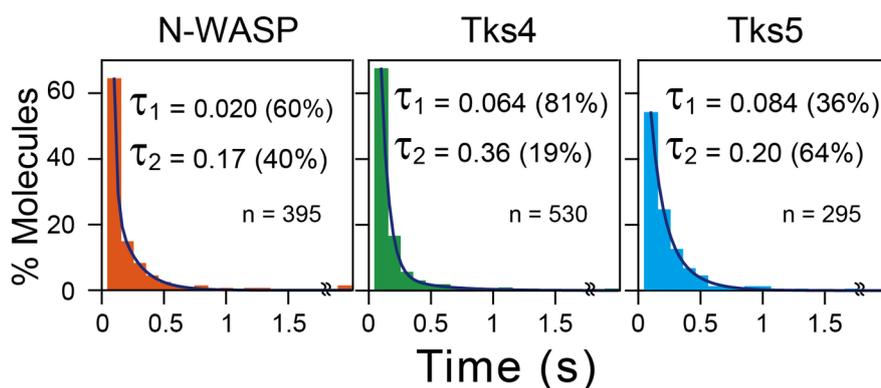
(左) 細胞膜上の拡散に加えて、輸送小胞でリクルートされる過程が存在することが示唆された。図の例では 6-30 秒間の小胞の運動を軌跡で示す。(右) インテグリン分子の接着斑リクルート経路モデル。

(6) 接着斑以外の細胞膜機能ドメイン (ポドソーム様アクチンノード) での、構成分子の出入りの 1 分子観察

生細胞超解像観察 (Olympus SD-OSR による Lifeact-mGFP 観察) により、アクチン膜骨格の網目の結節点に、接着構造ポドソームの構成分子が局在する直径 300 nm 程度のアクチンノードが存在し、その構造中ではアクチン重合/脱重合が激しく起こっている可能性、アクチンの網目を再編成しながら細胞膜上を徐々に移動している可能性が示唆された (下図上段)。ポドソーム構成分子 N-WASP、Tks4、Tks5 の 1 分子運動とアクチンノードの同時観察により、アクチンノード上での滞在時間はどの分子も時定数で 0.4 秒以下と、構造内外で動的な分子交換が起こっていた (下図下段) (Shirai et al., PLoS ONE 2017)。すなわち、「動的群島機構」は接着斑だけでなく、ポドソーム前駆体の構造維持と機能にも利用されている可能性が高い。



Residency time in the actin-pl-cluster



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① T.A. Tsunoyama, Y. Watanabe, J. Goto, K. Naito, R.S. Kasai, K.G.N. Suzuki, T.K. Fujiwara, and A. Kusumi. Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. Nat. Chem. Biol. 査読有 14, 2018, 497-506
DOI: 10.1038/s41589-018-0032-5
- ② Y.M. Shirai, T.A. Tsunoyama, N. Hiramoto-Yamaki, K.M. Hirosawa, A.C.E. Shibata, K. Kondo, A. Tsurumune, F. Ishidate, A. Kusumi, and T.K. Fujiwara. Cortical actin nodes: Their dynamics and recruitment of podosomal proteins as revealed by super-resolution and single-molecule microscopy. PLoS ONE 査読有 12, 2017, e0188778
DOI: 10.1371/journal.pone.0188778

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takahiro Fujiwara. Ultrafast single fluorescent-molecule imaging reveals hop diffusion within focal adhesion: actin-induced compartmentalization of the channels between the focal-adhesion-protein islands. Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Single Biomolecules, Cold Spring Harbor, USA (国際学会) 2018 年
- ② Takahiro Fujiwara. Revealing mesoscopic organization and function of the plasma membrane by developing high-speed single-molecule microscopy. Bangalore Microscopy Course 2017, Bangalore, India (招待講演)(国際学会) 2017 年
- ③ Takahiro Fujiwara. Mesoscopic organization and function of the plasma membrane: an ultrafast single-molecule imaging study. The 2016 Gordon Research Conference on Single Molecule Approaches to Biology, Single-Molecule Microscopy: Life at a Higher Resolution, Hon Kong, China (招待講演)(国際学会) 2016 年

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：楠見 明弘

ローマ字氏名：Akihiro Kusumi

研究協力者氏名：角山 貴昭

ローマ字氏名：Takaaki Tsunoyama

研究協力者氏名：白居 祐希

ローマ字氏名：Yuki Shirai

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。