

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 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：24770056

研究課題名(和文)革新的単分子スペckル解析によるアクチン繊維流動の可視化解明

研究課題名(英文)Quantitative analysis of the retrograde actin flow by a new single-molecule speckle microscopy

研究代表者

山城 佐和子 (Yamashiro, Sawako)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00624347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛍光試薬DyLight標識アクチンを用いた新単分子スペckル顕微鏡法を開発した。新法では計測の時空間分解能を大幅に改良することに成功した。特に、近年開発されたスペckルトラッキングソフトウェア(SpeckleTracker J)を応用し、約±8 nm 誤差範囲内の超解像度でアクチン分子の細胞内位置決定が可能になった。さらに、細胞 基質間接着(接着斑)周辺のアクチン流動をサブミクロンスケールで解析し、接着斑前方でアクチン線維は接着斑に集まるように速いスピードで流動することを見出した。この現象は、接着斑が周りのアクチンネットワークに作用し自身の方向に流動を変化させることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Focal adhesion dynamics and protrusion of the leading edge are critical for cancer cell migration and wound healing of epithelial cells. The interaction between the actin flows and the focal adhesions (FAs) has been proposed to enhance the membrane protrusion. However, how FAs influence local retrograde flow is not fully understood. In this study, we developed a new fluorescence single-molecule speckle (SiMS) microscopy for actin, which enables in vivo nanometer-scale displacement analysis with a low localization error of 8.5 nm. Interestingly, the actin flow in front of mature FAs is fast and biased toward FAs, suggesting that FAs attract the flow in front. The results of this study provide a novel concept on the relationship between FAs and the local actin flows: The interaction of FAs with the actin network might be more complex than a passive stick-slip interaction as previously suggested. Instead, FAs may be actively engaged in pulling and remodeling the local actin network.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：単分子スペckル法 一分子イメージング アクチン 細胞運動 計測生物学

1. 研究開始当初の背景

アクチンは、すべての真核細胞に存在する必須の細胞骨格タンパク質である。細胞内ではアクチン細胞骨格は速やかに崩壊・再編成される動的な構造体であり、細胞の形態制御、細胞質分裂、細胞運動など多くの細胞現象において動的または安定した“骨組み”として働く。細胞内でアクチンダイナミクスを可視化するには、単分子スペckル解析(図1)が強力な手法である。しかし、従来の単分子スペckル法では、以下の問題が懸案となっていた。

(1) プロープに用いる EGFP-actin がアクチン重合因子フォルミンと共働しない可能性が指摘されている。(2) 実験に経験が必要であるため、初学者には難しい。EGFP-actin を発現プラスミドにより細胞内に発現させるため、単分子イメージングに適した発現量の細胞を見つけることが困難である。(3) 単分子スペckルは蛍光が微弱であり、時空間分解能には限界がある。また、解析には焦点が合った鮮明な画像が必要であるため、厚みのある試料の観察は非常に困難である。一方、実際には細胞と細胞内のアクチン細胞骨格は3次元構造として存在するため、単分子スペckル解析の空間解像度を3次元に発展させることは必須の課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、従来のアクチン単分子スペckル解析における上記の問題を改良し、多様なアクチン細胞骨格構造におけるアクチン動態を、高い時空間分解能で可視解析する手法を開発することを目的とした。さらに、新手法を用いて、細胞内仮足に広く観察されているアクチン線維流動の詳細な動態と役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

アクチン線維の挙動をモニターするには単分子スペckル解析を用いた。この手法では、蛍光標識したアクチン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。アクチン線維に重合した蛍光アクチンサブユニットは、自由拡散を止めて繊維内に留まり、安定してシグナル(蛍光)を放出するため、斑点状のスペckルとして画像化される(図1)。

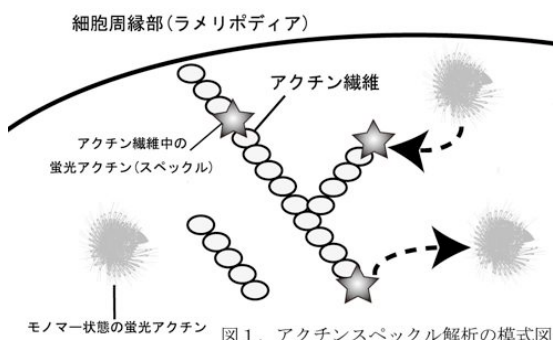


図1. アクチンスペckル解析の模式図

さらに、このスペckルの動態を数十秒~数分間解析することで、アクチンスペckルを共重合したアクチン線維の移動速度及び線維寿命分布が定量できる。

本研究では、格段に改良した単分子スペckル法を開発した(Yamashiro et al., MBoC, 2014)。新単分子スペckル法で用いる蛍光標識アクチンがフォルミンと共働するかどうかについて、全反射顕微鏡を用いて生化学的性質を詳細に明らかにした。次に、繊維芽細胞及び上皮細胞のアクチン線維流動を観察した。これらの細胞にエレクトロポレーション法により蛍光アクチンプロープを導入し、落射型蛍光顕微鏡により単分子イメージングを行った後、共同研究グループによって開発されたスペckルトラッキングソフトウェア Speckle TrackerJ を用いて解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、まず、時空間分解能が大きく向上したアクチン単分子スペckル法の改良に成功した。新手法では、蛍光アクチンは、近年開発・市販されている蛍光標識試薬 DyLight-549 (Thermo Fisher 社)でリジン残基を標識したアクチンを用いる。DyLight-549 アクチン(以下 DL549 アクチン)を用いる利点を以下に挙げる。

(1) 高い蛍光強度。DL549 アクチンは励起光を減光フィルタにより大幅に減光した場合でも単分子スペckルとして観察され、ライブイメージングによるアクチン繊維流動

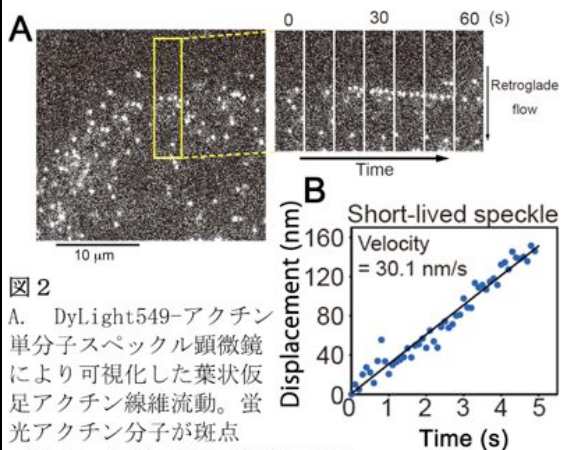


図2
A. DyLight549-アクチン単分子スペckル顕微鏡により可視化した葉状仮足アクチン線維流動。蛍光アクチン分子が斑点(スペckル)状に可視化できる。

B. アクチン線維流動ナノメートルスケール移動距離解析による速度測定の例。

の観察が可能である(図2A)。(2) 卓越した退色耐性。励起光を減光した条件で13分間連続照射した場合でも、光退色率は20-25%程度に抑えられた(図3)。タイムラプス解析を行った場合は、退色の影響をほとんど受けずに、長時間(1時間以上)連続してアクチン動態を捉えることが出来る。これは、従来の GFP-アクチンによるスペckル解析の退色耐性を遥かに上回る。(3) 橙色の蛍光色素であり GFP 等の緑色蛍光よりも自家蛍光の影響を受けにくい。これらの特性から、DL549

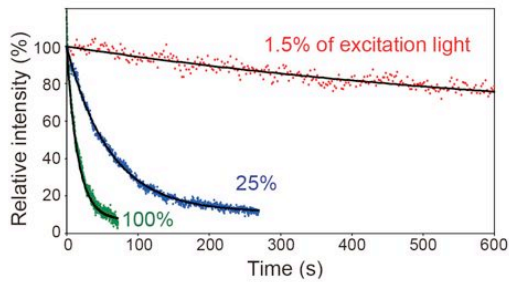


図3 細胞に導入したDyLight549標識アクチンは水銀ランプ励起光を連続照射しても褪色は低く、蛍光を安定して維持する。

アクチンは細胞内での解析に適しており、数十ミリ秒から1~2時間まで高い時間分解能でアクチン動態を解析出来る。さらに、新手法では、ガウシアンフィッティングアルゴリズムを応用することにより、ナノスケール移動距離でアクチン流動の速度計測が可能になった(図2B)。

次に、DL549 アクチンがアクチン重合因子フォルミンと共働するかどうか、全反射蛍光顕微鏡化でアクチン重合を直接観察することにより検討した。脊椎動物には15種類のフォルミン分子種が存在するが、そのうちの3種について検討した。その結果、主要なフォルミン分子種であるmDia1及びmDia2とDL549アクチンは共働するが、FMNL2とは共働できないことが分かった(右表)。従って、アクチンプローブのフォルミンファミリーとの共働性は改善したもの、更なるプローブの改良が必要である。

さらに、自家蛍光の影響の少ない近赤外蛍光アクチンプローブ(CF680R標識アクチン)の開発に成功しており、スペックル解析の3次元空間への応用を進めている。材料は2次元培養アフリカツメガエルXTC細胞、A6上皮細胞とMDCK哺乳類上皮細胞を用いた。私達のグループで確立したエレクトロポレーション法により、これらの培養細胞では、ほぼ100%の細胞に蛍光アクチンプローブを導入し高効率で単分子観察を行うことが可能となり、非常に簡便な実験法の確立に成功した。

次に、新・アクチン単分子スペックル解析を用いて、細胞-基質間接着(接着斑、Focal adhesion)周辺でのアクチン線維流動を詳細に解析した。まず、本解析を行った背景を以下に述べる。接着斑形成と細胞仮足の伸展は、がん細胞の運動能亢進や上皮の創傷治癒に重要である。細胞は、これらの構造でアクチン細胞骨格の発生する力を利用するが、力を非侵襲的に捉えることは難しく、「力」動態は不明な点が多い。一方、培養細胞では古くからアクチン線維流動が観察されてきた。アクチン線維流動は、培養神経細胞の成長円錐、上皮細胞、繊維芽細胞等で細胞の周縁から中央に向かってアクチン線維が流動する現象(retrograde flow)として観察される。流動

Conditions	Elongation rate	
	Barbed-end (subunit/s)	OG _{CF680R} -actin
1 μ M actin only	9.86 \pm 1.4 (n = 8)	
1 μ M actin + 3 μ M profilin	10.3 \pm 2.1 (n = 25)	9.05 \pm 1.7 (n = 25)
mDia1 (FH1FH2) + profilin	61.9 \pm 9.7 (n = 7)	68.3 \pm 11 (n = 8)
mDia2 (FH1FH2) + profilin	84.8 \pm 22 (n = 8)	32.8 \pm 4.5 (n = 13)
FMNL2 (FH1FH2) + profilin	25.0 \pm 5.3 (n = 5)	16.5 \pm 3.8 (n = 4)

Conditions	Incorporation rate of DL549-actin (%)	
	(Intensity of FH1FH2-associated F-actin)	Intensity of free F-actin
1 μ M actin only	9.86 \pm 1.4 (n = 8)	
1 μ M actin + 3 μ M profilin	10.3 \pm 2.1 (n = 25)	9.05 \pm 1.7 (n = 25)
mDia1 (FH1FH2) + profilin	61.9 \pm 9.7 (n = 7)	68.3 \pm 11 (n = 8)
mDia2 (FH1FH2) + profilin	84.8 \pm 22 (n = 8)	32.8 \pm 4.5 (n = 13)
FMNL2 (FH1FH2) + profilin	25.0 \pm 5.3 (n = 5)	16.5 \pm 3.8 (n = 4)

の駆動力は2説あり、ミオシンによるアクチン線維の牽引と、細胞周縁で盛んに起こるアクチン重合の発生する力が提唱されており、実際は複数の駆動力が働いていると考えられている。アクチン線維流動の生体内における意義は未だよくわかっていないが、アクチン線維は力の作用点であるため、アクチン線維の挙動は細胞内力動態を反映する指標となり得る。

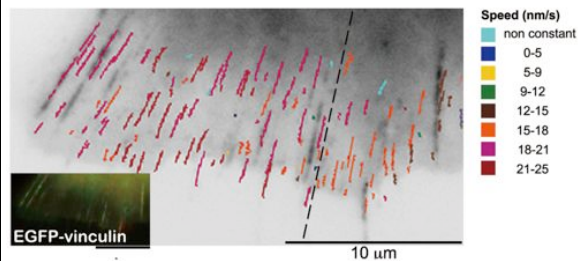


図4 Nascent adhesion を含むラメリポディアのアクチンスペックル速度・軌跡マップ。

本研究では、新・アクチン単分子スペックル解析を用いて、培養繊維芽 XTC 細胞における接着斑周辺でのアクチン線維流動の速度と方向をサブミクロンスケールで詳細に解析した。まず、形成初期の接着斑 (nascent adhesion) について検討した結果、nascent adhesion 上を通過するアクチンスペックルは周辺を通過するアクチンスペックルと速度及び方向に差異がないことから、nascent adhesion はアクチン線維流動にほとんど影響を与えないことが分かった (図 4)。

次に、成熟した接着斑について検討した。その結果、接着斑の存在により、アクチン線維流動が微小スケールで複雑に変化することを明らかにした (図 5)。興味深いことに、接着斑前方では、アクチン線維は接着斑に集まるように速いスピードで流動した。

この観察は、接着斑が周りのアクチンネットワークに作用し、おそらくミオシン II を含む構造を形成して、ミオシンの牽引力により自身の方向に流動を変化させていることを示唆する。また、接着斑の前方と細胞膜の間の領域では、流動の速度は他の細胞辺縁部位と比較して速く、接着斑の領域に近づくに

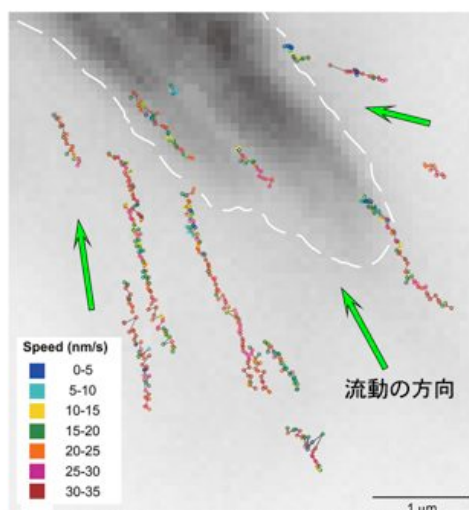


図 5 接着斑前方のアクチン線維流動速度・軌跡マップ

つれて減速した (図 5)。これは、ミオシンの牽引によってアクチンネットワークの流動は加速するが、接着斑近傍では牽引力の現象あるいは接着斑との連結により流動が抑えられていることを示唆する。このように接着斑近傍のアクチンネットワークの複雑な動態は、力と細胞内構造・現象との関わり合いを示唆するが、これまで他の手法では分解能が不十分のため見出されず、最新の単分子スペックル解析法により初めて明らかとなった。

これらの現象は、接着斑が周りのアクチンネットワークに作用し、自身の方向に流動を変化させていることを示唆する。細胞は、接着斑-アクチン流動相互作用を調節して、接着斑におけるメカノセンス機構の活性を制御している可能性がある。これらの結果から、

接着斑が周りのアクチンネットワークに作用し、接着斑形成を促進するモデル (図 6) を提唱している。

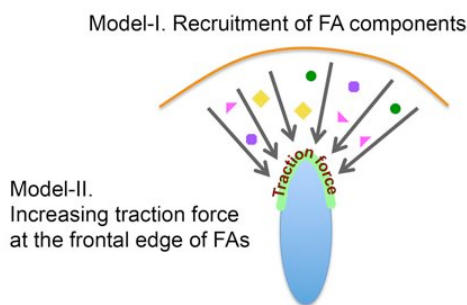


図 6 接着斑 (青楕円) がアクチン線維流動を調節することにより、接着斑形成を促進する可能性がある。

モデル 1: 接着斑構成分子のアクチン線維流動によるリクルートメント。

モデル 2: アクチンネットワークと接着斑の相互作用によりアクチン線維流動に由来する牽引力がかかる。流動を接着斑の方向に集めることで、牽引力を増大させる。

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 2 件)

① 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.

DOI: 10.1091/mbc.E13-03-0162

査読有り

② 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).” *Dev. Growth Differ.* 55 (2013) 508-514.

DOI: 10.1111/dgd.12060

査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① 山城佐和子, 水野裕昭, Smith MB, Ryan GL, Vavylonis D, 渡邊直樹. “New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales.” 第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 19 日～6 月 21 日、名古屋

② Yamashiro S, Mizuno H, Smith MB, Ryan GL, Vavylonis D, Watanabe N. “Revisiting lamella hypothesis and myosin II-induced actin disassembly using a high-resolution single-molecule speckle microscopy with a new actin probe polymerizable to forming-assembled actin filaments.” アメ

リカ細胞生物学会年会、2012年12月15日～
12月19日、アメリカ、サンフランシスコ

③ 山城佐和子、水野裕昭, Smith MB, Ryan
GL, Vavylonis D, 渡邊直樹. “Improved
single-molecule speckle microscopy
methods which enable to analyze dynamics
of various cellular actin structures.” 第
45回日本発生生物学会・第64回日本細胞
生物学会合同大会、2012年5月28日～5月
31日、神戸

〔図書〕(計 1 件)

① 山城佐和子、圓岡真宏、水野裕昭、渡邊
直樹:アクチン研究の最新動向ー構造から調
節、恒常性、可視化、モデリングまで: Update
Review (2012) 実験医学 第30巻 第18号,
羊土社 pp2998-3005

〔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

山城 佐和子 (YAMASHIRO, Sawako)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 00624347