

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業, ソロタイプ
(英語) Advanced Research & Development Programs for Medical Innovation, PRIME

研究開発課題名： (日本語) 低侵襲細胞表層イメージングによる細胞の内因性力発生・維持システムの
動作原理の解明
(英語) understanding the mechanism of intracellular force-generation and -maintenance by
non-invasive live- cell imaging

研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院生命科学研究科 准教授 吉村成弘
所属 役職 氏名： (英語) Shigehiro Yoshimura, Associate Professor, Graduate School of Biostudies, Kyoto
University

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合

日本語

研究項目 I：表層アクチンの動的構造維持機構の解明と内因性力発生・応答における役割

・低侵襲型高速原子間力顕微鏡を用いて、COS7 細胞の表層および葉状仮足を 2~10 秒の時間能で観察し、生きた細胞内部でのアクチン単繊維のダイナミクスを解析する技術を確立した。

・各種培養細胞における表層アクチンの重合・脱重合ダイナミクスの定量的な解析をおこない、生きた細胞内での重合・脱重合の turnover を明らかにした。COS7 の解析結果からは、細胞内の free G-actin のプールはこれまでに考えられてきたよりも低いことを示唆する結果が得られた。また、cytochalasin B や Jasplakinolide などの重合・阻害剤が表層アクチンの turnover を阻害すること、Arp2/3 複合体、formin、thymosin β 4、profilin 等の関連タンパク質はこれに関与しないことを明らかにした。さらに、アクチンの重合はおもに細胞膜直下で進行し (0.2 filaments/sec/ μm^2)、合成された繊維は細胞内部に向かって移動する (沈む) 事が分かった。これは、細胞表層におけるアクチンの turnover を理解する上で重要な発見であると共に、細胞表層における様々な現象 (エンドサイトーシス等) を理解する上で重要な知見となり得る。以上の成果を原著論文として発表した。

・培養細胞の葉状仮足におけるアクチンの動態を観察し、細胞端における力のバランスを解析した。細胞端から 0.5-1.0 μm 付近では細かく枝分かれしたアクチンのネットワークが観察され、それが毎秒約 10 nm で細胞内部に水平移動している。この移動過程の途中で細かい枝分かれは減少するが、ネットワーク構造全体が内部に移動する速度に変化はない。阻害剤を用いた実験から、この水平移動は barbed end におけるアクチン重合が主な駆動力になっており、myosin の関与は見られなかった。これは、運動時におけるネットワークの水平移動に myosin が関与するというこれまでの報告と異なる。表層のアクチンネットワークと異なり、葉状仮足でのアクチンの重合・脱重合サイクルには Arp2/3 複合体、formin, capping protein が大きく関与し、その阻害によりアクチンの構造および葉状仮足の形状は大きく変化した。また、細胞端の前後運動とアクチンの重合との間に密接な時空間的連携があることを見出した。

研究項目 II：細胞膜微細構造の定量的解析法の確立と膜張力維持機構における役割

・クラスリン依存的エンドサイトーシスにおける細胞膜の形態変化を高速原子間力顕微鏡で可視化し、膜の陥没から成長、小胞の切り離しまでの一連の過程を可視化する事に成功した。また、共焦点顕微鏡ユニットからの蛍光シグナルを同時に取得し、膜変形過程におけるタンパク質の関与を同時空間的に解析する手法を確立した。

・EGFP 融合 clathrin および mCherry 融合 caveolin を発現した細胞の観察から、定常状態の COS7 細胞の表面における clathrin 被覆ピットおよびカベオラの大きさと持続時間を詳細に解析することに成功した。Clathrin 被覆ピットは直径が 140-250 nm、寿命が 130-210 秒であったのに対して、カベオラはそれよりも直径が小さく (5-150nm)、寿命が長い (250 秒以上)。

・阻害剤および RNA 干渉を用いた解析から、アクチンおよびその他のアクチン関連タンパク質群 (Arp2/3 複合体、N-WASP など) が小胞切り離し過程における膜変形の駆動力になっていることを示す結果を得た。膜形状像の詳細な解析から、局所的なアクチンの重合・脱重合が膜に対して及ぼす力を解析することに成功した。

英語

研究項目 I

・ We established a method to analyze the dynamic structural changes of cell cortex and lamellipodia in a living COS7 cell by using high-speed atomic force microscope (HS-AFM) for live cell imaging.

・ By using HS-AFM, we visualized and analyzed dynamic polymerization/depolymerization turnover of actin in a cell cortex in different types of the cell. The result from COS7 cells indicated that the amount of intracellular free G-actin pool is less than what has been estimated in previous studies. In addition, we demonstrated that inhibitors for actin dynamics (cytochalasin B and Jasplakinolide) reduced the turnover rate in the cell cortex, but Arp2/3 complex, formin, thymosin β 4 and profilin are not involved in the maintenance of cortical actin network. We also found that polymerization occurs near the plasma membrane and the newly synthesized filaments gradually descend down into the cytoplasm. These results are the first spatiotemporal analysis of single actin fibers in the cortex.

・ Dynamics of actin network in lamellipodium was also analyzed by HS-AFM. The retrograde flow of branched actin filaments (~ 10 nm/sec) was observed. The number of branches was eventually reduced as the filaments moved towards the center of the cell. This retrograde flow of actin is mainly driven by polymerization at the barbed end, and not by myosin. In contrast to the cortex, Arp2/3 complex and formin are involved in the polymerization of actin, the oscillation of the cell edge is tightly related to the amount of actin polymerization in lamellipodium.

研究項目 II

・ By using HS-AFM, the morphological changes of the plasma membrane in endocytotic process (bending, budding, invagination, and scission) has been visualized in a living COS7 cell. We also successfully established a simultaneous imaging technique in which fluorescence signal from confocal laser scanning unit and AFM image were simultaneously obtained. This technique is highly useful in analyzing the function of specific proteins in morphological changes of the plasma membrane.

・ From the analyses of COS7 cells expressing EGFP-clathrin and mCherry-caveolin, we could distinguish clathrin-coated pit (CCP) and caveolae on the AFM image. The CCP has larger diameter (140-250 nm) and shorter life time (130-210 sec) than those (5-150 nm, >250 sec) of caveolae.

・ By using inhibitors and siRNA, we found that actin and actin-binding proteins (Arp2/3 complex and N-WASP) are involved in the scission step of the CCP. Arp2/3-dependent actin polymerization is involved in the morphological change of the plasma membrane when the pit closes.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 3件）

1. YOSHIMURA SH, HIRANO T. HEAT repeats - versatile arrays of amphiphilic helices working in crowded environments? *Journal of Cell Science*, 2016, 129, 3963-3970.
2. ZHAN Y, YOSHIDA A, SAKAI N, UEKUSA Y, KUMETA M, YOSHIMURA SH. “*In vivo* dynamics of the cortical actin network revealed by fast-scanning atomic force microscopy” *Microscopy*, 2017 (in press).
3. KONISHI HA, ASAI S, WATANABE T, YOSHIMURA SH. In vivo analysis of protein crowding within the nuclear pore complex in interphase and mitosis. *Scientific Reports*, 2017 (under revision).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「高速原子間力顕微鏡による生体膜動態のライブセルイメージング」, 口頭, 吉田藍子, 酒井信明, 植草良嗣, 糸田昌宏, 吉村成弘, 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2016/11/18, 名古屋, 国内.
2. 「高速原子間力顕微鏡を用いた生体膜と皮質アクチンネットワーク動態のライブセルイメージング」, 口頭, 吉田藍子, 酒井信明, 植草良嗣, 張雁書, 糸田昌宏, 伊藤修一, 吉村成弘, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/11/30, 横浜, 国内.
3. 「高速原子間力顕微鏡を用いた生体膜と皮質アクチンネットワーク動態のライブセルイメージング」, ポスター, 吉田藍子, 酒井信明, 植草良嗣, 張雁書, 糸田昌宏, 伊藤修一, 吉村成弘, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 横浜, 国内.
4. 「Role of cortical actin dynamics in endocytic process revealed by fast-scanning atomic force microscope」, ポスター, YOSHIDA A, ZHAN Y, SUZUKI Y, ITAGAKI, Y, SAKAI N, UEKUSA Y, KUMETA M, YOSHIMURA SH, iGER International Symposium on Now in actin study, 2016/12/12, Nagoya, Japan, 国際.
5. 「Live-cell analysis of actin dynamics by fast-scanning atomic force microscope」, 口頭, YOSHIMURA SH, Nuclear Actin in the Regulation of Transcription and Nuclear Structure, 2017/1/26, Wakayama, Japan, 国際.
6. 「Involvement of actin dynamics in endocytotic process revealed by fast-scanning atomic force microscope」, ポスター, YOSHIDA A, SAKAI N, UEKUSA Y, ZHAN Y, KUMETA M, YOSHIMURA SH, Biophysical Society 61st Annual Meeting, New Orleans, USA, 2017/2/14, 国際.
7. 「Protein-rich domains comprise the entropic barrier and coordinate post-mitotic assembly of the nuclear pore complex」, ポスター, KONISHI H, ASAI S, WATANABE T, YOSHIMURA SH, Biophysical Society 61st Annual Meeting, New Orleans, USA, 2017/2/15, 国際.
8. 「Morphological analysis of clathrin-mediated endocytotic process by fast-scanning atomic force microscope」, 口頭, YOSHIDA A, ZHAN Y, ITAGAKI Y, KUMETA M, SUZUKI Y, SAKAI N, UEKUSA Y, YOSHIMURA SH, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島, 2017/3/17, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. タンパク質の形と働きについて，西大和学園高等学校スーパーサイエンスハイスクール特別講義，2017/3/20，奈良，国内
2. タンパク質の形と働きについて，西大和学園高等学校スーパーサイエンスハイスクール特別実習，2017/3/30,31，京都，国内

(4) 特許出願

なし