

学位論文題名

Study on Cytoskeletal Microdynamics in Living Cells by Scanning Probe Microscopy and Particle Tracking Analysis

(走査型プローブ顕微鏡と単粒子追跡解析による
生きた細胞内における細胞骨格マイクロ動力学の研究)

学位論文内容の要旨

生命の最小単位である細胞の内部には、線維状タンパク質重合体のネットワークである細胞骨格が張り巡らされており、細胞骨格の動力学は細胞レベルの生命現象にとって重要な役割を果たしている。例えば、心筋細胞の拍動は、細胞骨格の周期的な収縮により発生する。細胞分裂には、細胞骨格の再編成による収縮環の形成が不可欠である。これらは、細胞全体にわたるスケール(数マイクロメートル~数十マイクロメートル)での細胞骨格の動きによって導かれる。また、細胞内小器官の輸送過程など、より小さなスケール(数十ナノメートル~数百ナノメートル)の生命現象にも細胞骨格の動きが寄与していると考えられている。生命現象の機構を解明するにあたり、生きた細胞の中で細胞骨格の小さな動きを検出する方法を構築し、さらにその動きの背景にある力を明らかにすることは重要である。

細胞骨格の動きを調べるには、生きた細胞の内部構造を観察するための顕微鏡法が必要である。蛍光顕微鏡法は、蛍光標識された分子や小器官を選択的にイメージングできるため、非常に有効である。蛍光標識には、遺伝子操作により蛍光タンパク質を目的タンパク質に融合し、その融合体を細胞内で発現させる方法が広く用いられる。また、走査型プローブ顕微鏡法(SPM)も細胞に対して近年応用されるようになってきている。SPMのうちコンタクトモードは、鋭い探針(プローブ)で細胞表面をなぞることにより、細胞表面を裏打ちする硬い構造、即ち細胞骨格を高空間分解能でイメージングできる。ただし、通常のコンタクトモードSPMの時間分解能は数分オーダーであり、小さなスケールでの細胞骨格の動きの観察には不十分であった。

本研究では、まずコンタクトモードSPMの改良による細胞骨格の高速生細胞SPMイメージングの実現を行った。通常のコンタクトモードSPMを用いて数秒オーダーの時間分解能で生細胞を観察すると、プローブの力を制御するフィードバック回路の感度に起因してプローブが発振し、意味のある画像が得られなかった。そこで、フィードバック回路を抑制してプローブの力を画像化することにより、3~12秒の時間分解能での生細胞観察を実現した。この高速生細胞SPMを用いて細胞辺縁部を観察し、長さ数百ナノメートルの線維状の物体がネットワーク内で配向を変化させる様子や、直径数百ナノメートルの顆粒状の物体(マイクロドメイン)が乱雑に運動する様子など、小さなスケールでの動きを測定することに成功した。蛍光染色法により、線維状の物体の分布がアクチン線維の分布と一致することがわかった。さらに、アクチン線維を選択的に破壊する試薬の投与により、線維状の物体が消失した。また、遺伝子操作によりタンパク質の蛍光標識を行い、高速SPMと蛍光顕微鏡法による同時イメージングを行うことにより、アクチンおよびアクチン線維結合タンパク質コータクチンのマイクロドメインへの局在を見出した。これらの結果は、高速生細胞SPMを用いることにより、アクチン線維からなる細胞骨格の動きを秒スケールの時間分解能で観察できることを示している。

マイクロドメインの乱雑な運動は細胞骨格内部に揺らぎがあることを示しているが、この揺らぎに関する報告はほとんどなかった。そこで、細胞骨格の揺らぎの特性を明らかにするために、高速生細胞 SPM を用いてマイクロドメインの動きを秒スケールの時間分解能で観察し、単粒子追跡法による解析を行った。単粒子追跡法は、粒子の軌跡から動きの統計的性質を解析する方法であり、マイクロドメインの動きに対して適用することができる。解析の結果、ブラウン運動のような単純拡散様の性質を見出した。この性質は、試料温度の 37°C から 25°C への低下、またはモータータンパク質ミオシン II の活性を低下させる Y-27632 (ミオシン II 活性化タンパク質 ROCK の阻害剤) の投与によって失われた。ミオシン II はアクチン線維を線維長軸方向に滑らせることから、このようなミオシン II によるアクチン線維の滑り運動が細胞骨格を攪拌していると考えられる。

この単純拡散様の細胞骨格の揺らぎが、他の細胞内小器官の動きに対して反映されているかどうかを調べるため、マイクロドメインと同等の大きさをもつ初期エンドソームの動きを調べた。初期エンドソームに局在する Rab5 タンパク質を緑色蛍光タンパク質で標識し、蛍光顕微鏡法による初期エンドソームの観察と単粒子追跡法による動きの解析を行った。その結果、単純拡散様の性質は見られなかったものの、熱的な揺動力による細胞骨格線維の曲げ変形の理論と一致する性質を見出した。この性質は、細胞骨格を破壊する試薬を投与することにより大きく乱された。従って、初期エンドソームの動きには細胞骨格が寄与しているものの、細胞骨格線維の滑り運動ではなく曲げ変形のダイナミクスが支配的に働いていると考えられる。

さらに、ROCK の常時活性化型変異体 (constitutively active ROCK; CA-ROCK) を細胞内に発現させることによりミオシン II を活性化させ、細胞骨格の硬さをフォースマッピングモード SPM により評価した。その結果、CA-ROCK の発現により細胞骨格の硬さが顕著に減少した。この現象は、ミオシン II の力によってアクチン線維同士の架橋が切断され、アクチン細胞骨格が流動化することを示している。

これらの結果から、細胞骨格線維の滑りと曲げによる細胞内小器官の輸送機構のモデルを提案する。熱平衡状態においては、細胞骨格の曲げ変形のダイナミクスが輸送過程を支配している。ここに活性化したミオシン II が加わると、ミオシン II が局所的にアクチン線維同士の架橋を破壊しながらアクチン線維を滑らせる。この滑り運動に基づいて新たに単純拡散様の輸送過程が発生し、2つの異なる輸送過程が細胞内で混在すると考えられる。

本研究では、細胞骨格の高速生細胞 SPM イメージングの確立と、単粒子追跡法による細胞骨格の動力学解析を行った。高速生細胞 SPM は、回折限界を超える空間分解能を実現することができ、蛍光退色の影響による観察時間の制限がない。従って、蛍光顕微鏡法の弱点を補うことのできる有効な手法として、細胞生物学への応用が期待である。また、アクチン細胞骨格に対し揺動力を加えて攪拌するという、細胞内におけるミオシン II の新たな働きを発見した。この働きは、近年報告されたミオシン II 依存的な細胞内小胞輸送などの原因になっている可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 端 和 重
副 査 教 授 龔 劍 萍
副 査 教 授 佐々木 直 樹
副 査 准教授 芳 賀 永
副 査 助 教 水 谷 武 臣

学位論文題名

Study on Cytoskeletal Microdynamics in Living Cells by Scanning Probe Microscopy and Particle Tracking Analysis

(走査型プローブ顕微鏡と単粒子追跡解析による
生きた細胞内における細胞骨格マイクロ動力学の研究)

近年、様々な生命現象を細胞レベルで解明するにあたり、細胞骨格の動力学的性質が注目されている。細胞内には多数の小器官が存在し、それらの動的振る舞いが時空間的に制御されることで、巨視的な生命活動(形態形成や運動など)が作り出されている。細胞骨格とは、細胞内における線維状のタンパク質重合体であり、この繊維はさらに複雑で密な網目状ネットワークを形成している。多くの細胞内小器官のサイズは、細胞骨格の網目サイズと同等かそれ以上の大きさであるため、それらの移動や配置は細胞骨格ネットワークに大きく束縛される。これらの細胞骨格に束縛された小器官の動的振る舞いは、細胞骨格線維の力学的性質や、ネットワークの動的な再編過程に支配されると考えられている。しかし、細胞骨格の詳細な動態の観測・解析は発展途上であり、特にナノメートルスケールの分解能レベルではあまり解明されていない。本論文は、細胞骨格の動態の観測とその定量的な解析について、主として走査型プローブ顕微鏡(SPM)と単粒子追跡解析(PTA)を用いて行った研究である。

まず、筆者はSPMによって生きた細胞の細胞骨格を秒スケールの時間分解能で観察する方法の確立を行った。フィードバック回路を抑制して探針に発生する力を画像化することにより、3~12秒の時間分解能での生細胞の微細形態の可視化を実現した。この高速生細胞SPMを用いて細胞辺縁部を観察し、長さ数百ナノメートルの線維がネットワーク内で配向を変化させる様子や、直径数百ナノメートルの顆粒状の領域(マイクロドメイン)が乱雑に運動する様子など、小さなスケールでの様々な動態を観察することに成功した。また、これらの線維およびマイクロドメインは、主としてアクチンタンパク質からなる細胞骨格の一部であることも分子生物学的解析により特定した。

マイクロドメインの動態から細胞骨格の動力学を調べた。高速生細胞SPMを用いてマイクロドメインの動きを秒スケールの時間分解能で観察し、PTAにより動きの特性を調べた。解析の結果、マイクロドメインの揺らぎにブラウン運動のような単純拡散様の性質が見出された。試料温度の310Kから298Kへのわずかな減少、またはモータータンパク質ミオシンIIの活性を抑制する試薬の投与によって、この運動は著しく低下した。これらの結果は、この運動が熱雑音を起源とするブラウン運動ではなく、ミオシンIIによるアクチン線維の滑り運動によって細胞骨格に揺らぎが生じ、これを起源としていると考えられる。

次に、マイクロドメインと同等の大きさをもつ膜小胞の動きを調べた。膜小胞に局在するRab5タンパク質を緑色蛍光タンパク質で標識し、蛍光顕微鏡法による膜小胞観察とPTAを行った。その結果、単純拡散様の性質は見られないが、熱的な揺動力による細胞骨格線維の曲げ変形の理論と一致

する性質を見出した。この性質は、細胞骨格を破壊する試薬を投与することにより大きく変化した。従って、膜小胞の動きには細胞骨格が寄与しているが、細胞骨格線維の滑り運動ではなく曲げ変形が支配的に働いていると考えられる。

さらに、ミオシンIIの活性に関係するタンパク質（ROCK）の常時活性化した変異体を細胞内に発現させることによりミオシンIIを活性化させ、細胞骨格の硬さをフォースマッピングモードSPMにより評価した。その結果、変異体の発現により細胞骨格の硬さが顕著に減少した。この現象は、ミオシンIIの力によって細胞骨格が流動化することを示している。これらの結果から、細胞骨格線維の滑りと曲げによる細胞内小器官の輸送機構のモデルを提案する。熱平衡状態においては、細胞骨格の曲げ変形のダイナミクスが輸送過程を支配している。ここに活性化したミオシンIIが加わると、ミオシンIIが局所的にアクチン線維同士の架橋を破壊しながらアクチン線維を滑らせる。この滑り運動に基づいて新たに単純拡散様の輸送過程が発生し、2つの異なる輸送過程が細胞内で混在すると考えられる。

本研究では、細胞骨格の高速生細胞SPMイメージングの確立と、単粒子追跡法による細胞骨格の動力学解析を行った。高速生細胞SPMは、可視光回折限界を超える空間分解能を実現することができる、蛍光退色の影響による観察時間の制限等がない。従って、蛍光顕微鏡法の弱点を補うことのできる有効な手法として、細胞生物学への応用が期待である。また、アクチン細胞骨格に対し揺動力を加えて攪拌するという、細胞内におけるミオシンIIの新たな働きを発見した。この働きは、近年報告されたミオシンII依存的な細胞内小胞輸送などの起源になっている可能性がある。

これを要するに、著者は、SPMの応用可能性を広げただけでなく、細胞骨格の動力学について揺らぎに関する新知見を得たものであり、生物物理学に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。