

センターを中心に展開される研究

アクチン細胞骨格の空間構造

研究成果:

アクチン細胞骨格の動態はこれまで蛍光顕微鏡により、詳細に調べられてきたが、電子顕微鏡観察と比較すると、細胞内の一部に限られていることが確認された。我々は原子間力顕微鏡(AFM)、フリーズエッチング法、クライオ顕微鏡、高分解能SEMなどを駆使し、細胞膜の裏打ちを形成するアクチン細胞骨格から核膜細胞骨格に至るまで、その空間的構造を明らかにした。これまでに、確認されたことは以下のとおりである。

1.

細胞膜の裏打ち構造: ストレス線維だけでなく、多くのアクチン線維が存在し、それらが空間的特異性を持って配置されている。我々がType1と命名したアクチン線維は細胞膜に密着するタイプで、脂質二重膜に密着、あるいは沈み込むような形で伸張している。結合タンパク質も少なく、そのためアクチン線維の短周期が容易に観察される。Type2と命名したアクチン線維は細胞膜直下に複雑な網目を形成する線維であり、各所で膜に付着するが、密着したまま伸張することはない。多くのアクチン結合タンパクが結合しているのも、特徴的である。Type3はいわゆるストレス線維であり、膜面から発し、線維束を形成後膜面に平行に伸張するものと、細胞質へ向かう線維束が存在する。これら三つが膜直下のアクチン線維であるが、IQGAP1、VASPのようにアクチン線維に結合するエフェクタータンパクも空間的特異性があることから、これらのアクチン線維はそれぞれ異なる機能を持っているものと考えられる。ちなみにIQGAP1、VASPともtype2に優先的に結合し、Type1やType3にはあまり認められない。一方で、myosin2はType3に最も多く存在し、続いてType2、Type1の順である。

2.

細胞質細胞骨格: 細胞質内のアクチン線維の分布はこれまで光学顕微鏡により捉えられていると思われてきたが、電子顕微鏡観察の結果、その構造は予想以上に異なっていた。まず、細胞内にはストレス線維束の他多くのアクチン線維が存在し、それらが集合・離散し、細胞内を多くのドメインに分割している。そのドメイン内にオルガネラが存在する。細胞質内のアクチン線維は1本1本ではなく2から数本程度の小束を形成していることが多い。またその多くが核膜から発している。

3.

核膜細胞骨格: 核膜表面には多くのアクチン線維が起始、停止している。細胞膜と大きく異なる点は、アクチン線維がType1やType2のような空間分布をとらないこと、またストレス線維は膜面に平行に伸張せず、束化すると同時に細胞質内へ向かう。核膜表面には中間径線維が豊富であり、密に覆っている。核膜表面近傍ではアクチン線維は全て中間径線維に覆われ伴行されるので、それらの起始、停止部を観察することは容易ではない。中間径線維は核膜孔部分から叢状に伸張り、核膜孔を相互に連結しながら、複雑な網目を形成する。これまでの観察からアクチン線維も核膜孔から発し、中間径線維に伴行されながら細胞質に向かうものと考えられる。

得意とする手法:

電子顕微鏡的手法全般、特にフリーズエッチング、クライオ電顕、免疫細胞化学、unroofing法



特任教授
白倉 治郎

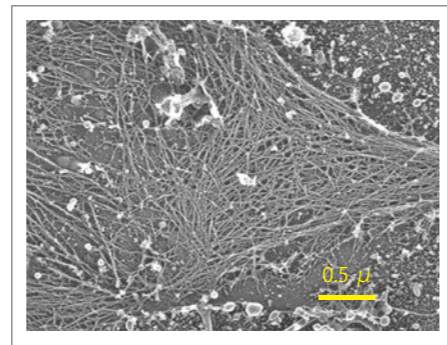


図1: 細胞膜の細胞質側表面に付着する細胞骨格(膜裏打ち構造)細胞を超音波でunroofし、急速凍結後エッチングレプリカとして、透過型電子顕微鏡で観察。多くのアクチン線維が複雑な網目を形成する。

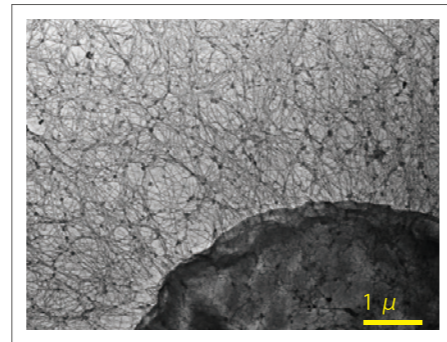


図2: 細胞膜をTriton Xで溶解後、固定し、凍結乾燥後全載標本として、超高圧電子顕微鏡で観察。細胞質内は多数のアクチン線維により占められている。

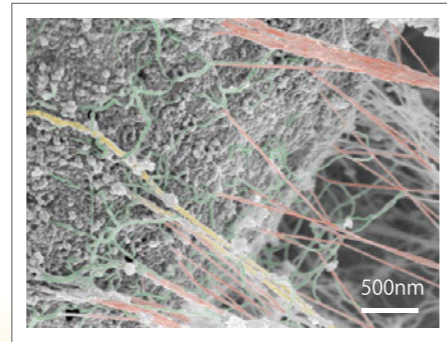


図3: 高分解能走査電顕による核膜表面の細胞骨格。実際は多くの中間径線維で埋め尽くされているが、標本作製過程で機械的に線維が破損し、除去されている部分を観察した。赤:アクチン線維 緑:中間径線維 黄:微小管

論文発表(2007~2013):

1. Kamasaki T, O'Toole E, Kita S, Osumi M, Usukura J, McIntosh JR, Goshima GAugmin-dependent microtubule nucleation at microtubule walls in the spindle. **J Cell Biol.** 202;25-33. 2013
2. Yamazaki A, Nishizawa Y, Matsuura I, Hayashi F, Usukura J, Bondarenko VAMicrotubule-associated protein tau in bovine retinal photoreceptor rod outer segments: Comparison with brain tau. **Biochem. Biophys. Acta** 1832: 1549-1559 2013
3. Tsuji T, Yoshitomi H, Usukura J Endocytic mechanism of transferrin-conjugated nanoparticles and the effects of their size and ligand number on the efficiency of drug delivery. **Microscopy** 62: 341-352 2013
4. Usukura J, Yoshimura A, Minakata S, Youn D, Ahn J, Cho SJ Use of the unroofing technique for atomic force microscopic imaging of the intra-cellular cytoskeleton under aqueous conditions. **J. Electron Microsc.** 61 321-326 2012 doi: 10.1093/jmicro/dfs055
5. Suzuki A, Hori T, Nishino T, Usukura J, Miyagi A, Morikawa K, Fukagawa T. Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins. **J. Cell Biol.** 193 125-140, 2011.
6. Yamazaki A, Tatsumi M, Bondarenko VA, Kurono S, Komori N, Matsumoto H, Matsuura I, Hayashi F, Yamazaki RK, Usukura J. Mechanism for the regulation of mammalian cGMP phosphodiesterase6. 2: Isolation and characterization of the transducin-activated form. **Mol Cell Biochem.** ;339 : 235-51 2010
7. Yamazaki A, Bondarenko VA, Matsuura I, Tatsumi M, Kurono N, Komori N, Matsumoto H, Hayashi F, Yamazaki RK, Usukura J. Mechanism for the regulation of mammalian cGMP phosphodiesterase6. 1: Identification of its inhibitory subunit complexes and their roles. **Mol Cell Biochem.** 339: 215-33. 2010
8. Sugiura K, Muro Y, Futamura K, Matsumoto K, Hashimoto N, Nishizawa Y, Nagasaka T, Saito H, Tomita Y, Usukura J. The unfolded protein response is activated in differentiating epidermal Keratinocyte. **J Invest Dermatol.** 129 2126-2135 2009
9. Kondo M, Sakai T, Komeima K, Kurimoto Y, Ueno S, Nishizawa Y, Usukura J, Fujikado T, Tano Y, Terasaki H. Generation of transgenic rabbit model of retinal degeneration **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 50 1371-1377 2009
10. Sato S, Omori Y, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K, Tani A, Toda T, Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Fukawa T Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. **Nature Neurosci.** 8 923-31 2008 if 16.8
11. Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Kondo T, Constantini F, Murohara T, Takahashi M Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. **Nature Cell Biol.** 10 329-337 2008
12. Watanabe T, Wang S, Kaneko M, Usukura J, Kaibuchi K Ultrastructural study of Rac1 and its effectors beneath the substratum-facing membrane. **Cell Struct Funct.** 33 101-107 2008
13. Yoshimura K, Usukura J, Sokabe M. Gating-associated conformational changes in the mechanosensitive channel MscL. **Proc Natl Acad Sci USA.** 105 4033-8 2008
14. Yamauchi Y, Kiriyaama K, Kubota N, Kimura H, Usukura J, Nishiyama Y The UL14 tegument protein of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient nuclear transport of the alpha transactivating factor VP16 and viral capsids. **J Virol.** 82 1094-1106 2008
15. Sakata S, Watanabe Y, Usukura J, Mabuchi I Characterization of native myosin VI isolated from sea urchin eggs. **J Biochem.** 42 481-90 2007
16. Sakurai K, Onishi A, Imai H, Chisaka O, Ueda Y, Usukura J, Nakatani K, Shichida Y Physiological properties of rod photoreceptor cells in green-sensitive cone pigment knock-in mice. **J Gen Physiol.** 130 21-40 2007