

原子間力顕微鏡を用いた生細胞内側焦点接着斑観察方法の開発

国立大学法人 金沢大学ナノ生命科学研究所 特任助教 市川 壮彦

1. 研究の背景と目的

焦点接着斑 (Focal Adhesion, FA) は細胞表面付近で細胞自身と細胞外マトリックス (ECM) を接着しているタンパク質集合体であり形態維持や細胞移動にとって必須であるだけでなく細胞周辺の微小環境を検知するシグナルセンターとしても機能している^{[1][2]}。FA は細胞膜を貫通している $\alpha\beta$ -integrin と integrin の細胞内ドメインに結合する talin、paxillin、vinculin、 α -actinin 等の分子から構成されており、これらの細胞内構成分子にアクチン骨格が結合することで細胞の移動等を可能にしている^[3]。FA 形成の異常は胚発生、免疫、創傷治癒等に影響を与えることが知られている一方、FA の詳細な構造やその形成過程については未だ多くが不明である^{[4][5][6]}。

劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD) は新生児に発症する単一遺伝子変異による腎疾患であり、約 10,000 - 40,000 人に 1 例が発症し生後 1 ヶ月で約半数が死亡する^[7]。発症メカニズムは現在でもほとんど不明であり根本的な治療方法も存在しない。ARPKD 患者の腎臓には直径 2 cm 以下の嚢胞が無数に生じ、腎集合管の拡張と胆管の異形成が特徴として見られる^[7]。

ARPKD の原因は PKHD1 遺伝子の変異であり、これは fibrocystin/polyductin (FPC) をコードしていることが報告されている^{[8][9]}。FPC は細胞接着やそれに関するシグナル伝達に関与すると考えられているが、どのような働きをしているのか、その変異がどのようにして病態を引き起こすのかといったことはまだほとんど分かっていない。ARPKD 患者の腎上皮細胞では FA 形成に異常が見られることから、このことが細胞接着や移動の異常を介して尿細管や胆管の異形成を引き起こ

している可能性が考えられている (Fig. 1(a))^[10]。

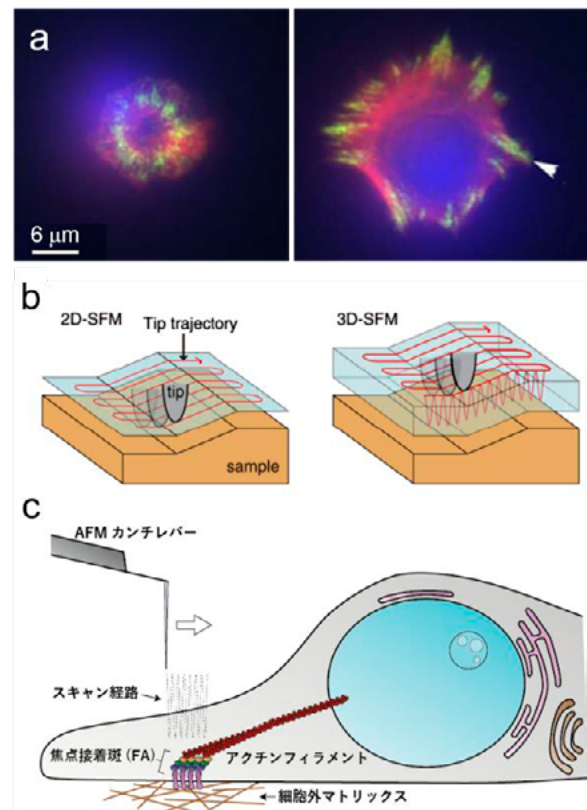


Fig. 1 (a) 正常な腎上皮細胞 (左) と ARPKD 患者の腎上皮細胞。青: 核、赤: アクチン、黄色: FA。矢じりが異常形成した FA。スケールバー: 6 μ m。(S. Israeli et al. Am J Physiol Cell Physiol 2010 を改変)。(b) 2D-AFM と 3D-AFM の模式図 (T. Fukuma et al. Phys. Rev. Lett. 2010 を改変)。(c) 3D-AFM を応用したナノ内視鏡法による細胞内 FA 観察の模式図。

本研究では報告者がこれまで開発してきた、原子間力顕微鏡 (AFM) を応用した「ナノ内視鏡法」を用いて FA の詳細な構造とその形成過程を観察することにより ARPKD メカニズムの一端を解明しようとする。

AFM は鋭くとがった探針を試料に接近させ探針と試料の間に働く原子間力を一定に保つよう

に探針-試料間距離をフィードバック制御することによって微細な表面構造を観察する顕微鏡である。光学顕微鏡と比べ非常に高い空間分解能で観察が可能であり、液中の1原子観察が既に達成されている^{[11][12]}。通常のAFMは表面形状に合わせてなぞっていくように探針を走査する2次元AFM (2D-AFM) であるが、これに対し1点毎に強制的にカンチレバーを引き上げ下ろす時のz方向の引っかかり力を測定することにより3次元空間の構造物を測定する方法が3次元AFM (3D-AFM) である (Fig. 1(b))^{[13][14]}。報告者が所属する研究室では既にこの3D-AFMを用いてマイカ表面に形成される水和分子の3次元構造観察に成功している^{[15][16]}。報告者は3D-AFM技術を細胞内観察に応用し、細く長い探針を用いて細胞内部にアプローチし細胞内器官の微細構造を観察する技術の開発を行ってきた (Fig. 1(c))。

本研究では、3D-AFMを生細胞内観察に応用した「ナノ内視鏡法」を用いてFA形成過程の詳細を明らかにすると共に、PKDH1変異によるFA形成への影響を明確にすることによってARPKD治療方法開発のための基礎情報を得ることを目的とする。このことは未だに治療法の存在しないARPKDの創薬ターゲット提供に繋がる可能性があると同時にAFMを用いて細胞内観察を行った初の例となり回折限界を超えた微小スケールで生きた細胞内を観察する次世代ツールの確立となり得るものである。

2. 研究結果

FAのマーカーであるPaxillinにYFPが融合したタンパク質を発現するラット線維芽細胞を作製し、それを用いて蛍光で焦点接着斑の位置を確認し、その付近をナノ内視鏡AFM観察した (Fig. 2)。蛍光像や弱拡大のAFM像では先端ほど細く

なっているように見えたが、先端をさらに拡大してみると30-300 nm程度の島状の構造物が分布していることが明らかになった。この結果は、FAが数十nmのislandを形成しているという1分子イメージングの結果とよく一致する^[17]。

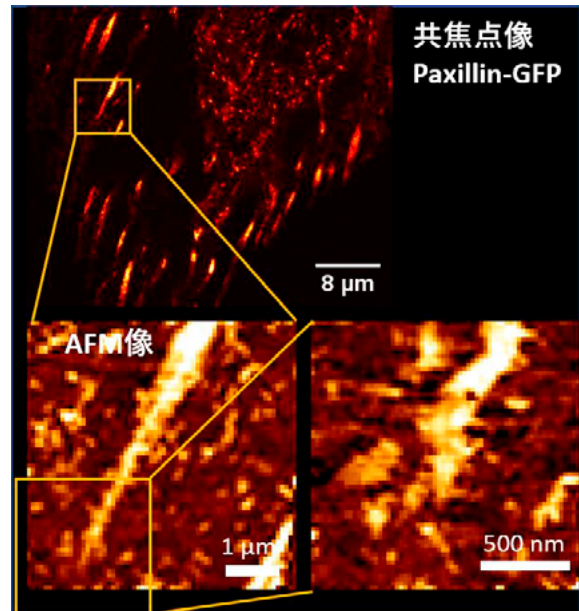


Fig. 2 ラット線維芽細胞 (Ref52) の Paxillin-YFP 像。
下図は四角で囲まれた領域を AFM 観察した結果。

次に、FA形成中のタイムラプスライブイメージングを行った。Fig. 3(c)の左図はナノ内視鏡AFM像、右図はPaxillin-YFP像で赤点線に掛かる力をクロスセクションで示したのがFig. 3(d)である。Fig. 3(e),(f)は27分後のAFM、蛍光、力のクロスセクション像である。0分の像と比較すると、繊維状の構造が出現し、さらにFA全体が細胞後方に引っ張られたような構造になっている。繊維状の構造はFAを基盤として伸長しているように見える。これは恐らく、アクチン繊維がFAから伸長し細胞内の他の構造と接続し、FAを引っ張る力が発生したためと思われる。

FAから伸長しているアクチン繊維はこれまで、

伸長した状態で FA と結合していると考えられてきたが、実際には FA を起点としてアクチン繊維が伸長している新たな可能性を提示することとなった。現在これらの結果をまとめて論文を作成している。

将来的には、より高分解能で長時間の FA 観察を行うことにより FA の形成から崩壊までの過程を詳細に明らかにする。FA 構成分子である Vinculin をノックアウトした細胞を作製し、Vinculin が FA 形成とアクチン繊維の結合にどのように関わるのかを明らかにする。また、微小管の重合が FA 形成を阻害することが報告されているため、微小管重合阻害剤を用いることにより微小管が FA 形成に及ぼす影響について明らかにする。さらに、ARPKD における FA 形成を観察するために短鎖干渉 RNA (siRNA) を転写するプラスミドベクターを用いて ARPKD の原因遺伝子産物である Fibrocystin/Polyductin (FPC) をノックダウンした MDCK 細胞を作製する。ARPKD モデル細胞における FA と正常 MDCK 細胞における FA の構造・形成過程を比較することにより ARPKD 患者の細胞で起こっている FA 形成異常メカニズムを明らかにする。

3. 結論

ナノ内視鏡 AFM を用いて生きた細胞内の FA を観察する手法を確立し、その形成過程を高分解能で観察することに成功した。その結果、FA 先端では島状の構造が点在していること、FA に接続しているアクチン繊維は FA を基盤として伸長する可能性があることを明らかにした。

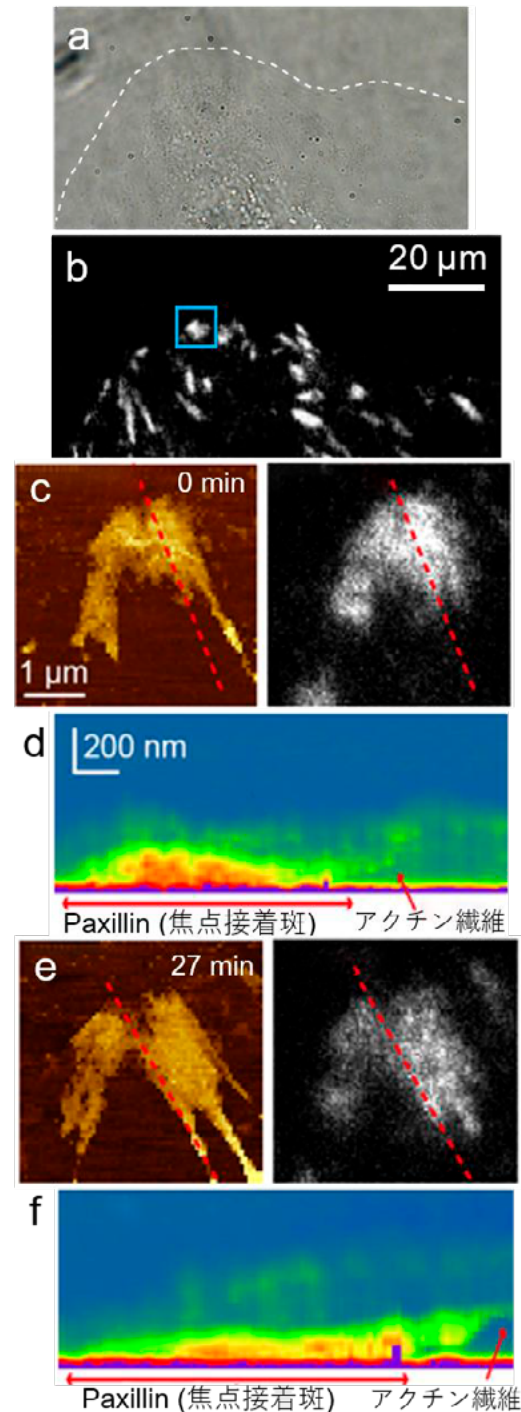


Fig. 3 (a) Ref52 細胞の明視野像。(b) Paxillin-YFP 像。青枠部分を AFM 観察した。(c) 焦点接着班のナノ内視鏡 AFM 像 (左) と Paxillin-YFP 像 (右)。(d) (c) の赤点線に沿ったフォースマップのクロスセクション図。(e) 27 分後の同じ焦点接着班のナノ内視鏡 AFM 像 (左) と Paxillin-YFP 像 (右)。(f) (e) の赤点線に沿ったフォースマップのクロスセクション図。

4. 参考文献

- [1] J. T. Parsons, A. R. Horwitz, M. A. Schwartz, Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 633-643 (2010).
- [2] M. A. Wozniak, K. Modzelewska, L. Kwong, P. J. Keely, Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 103-119 (2004).
- [3] J. M. Goffin *et al.*, Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *J Cell Biol* **172**, 259-268 (2006).
- [4] K. Burridge, K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, C. Turner, Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 487-525 (1988).
- [5] B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, K. M. Yamada, Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton cross-talk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805 (2001).
- [6] A. H. Baker, D. R. Edwards, G. Murphy, Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* **115**, 3719-3727 (2002).
- [7] L. M. Guay-Woodford, R. A. Desmond, Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics* **111**, 1072-1080 (2003).
- [8] C. J. Ward *et al.*, The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* **30**, 259-269 (2002).
- [9] L. F. Onuchic *et al.*, PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet* **70**, 1305-1317 (2002).
- [10] S. Israeli, K. Amsler, N. Zheleznova, P. D. Wilson, Abnormalities in focal adhesion complex formation, regulation, and function in human autosomal recessive polycystic kidney disease epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C831-846 (2010).
- [11] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **56**, 930-933 (1986).
- [12] B. Drake *et al.*, Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science* **243**, 1586-1589 (1989).
- [13] J. Steinwachs *et al.*, Three-dimensional force microscopy of cells in biopolymer networks. *Nat Methods* **13**, 171-176 (2016).
- [14] T. Fukuma *et al.*, Mechanism of atomic force microscopy imaging of three-dimensional hydration structures at a solid-liquid interface. *Phys Rev B* **92** (2015).
- [15] K. Miyazawa *et al.*, A relationship between three-dimensional surface hydration structures and force distribution measured by atomic force microscopy. *Nanoscale* **8**, 7334-7342 (2016).
- [16] T. Fukuma, R. Garcia, Atomic- and Molecular-Resolution Mapping of Solid-Liquid Interfaces by 3D Atomic Force Microscopy. *Acs Nano* **12**,

11785-11797 (2018).

[17] T. K. Fujiwara *et al.*, Ultrafast single-molecule imaging reveals focal adhesion nano-architecture and molecular dynamics. *J Cell Biol* **222** (2023).

5. 本研究にかかわる成果発表等

- M. S. Alam, T. Ichikawa, T. Fujiwara, C. M. Franz, T. Fukuma "Nanoendoscopy-AFM: A new technique to explore Focal Adhesions in living cells", European Microscopy Congress (EMC2024), August 25-30, 2024, Copenhagen, Denmark
- M. S. Alam, T. Shirokawa, T. Ichikawa, C. M. Franz, T. Fukuma, "Investigating the Mechanical Properties and Dynamics of Focal Adhesions in Living Cells by Nanoendoscopy-

AFM Technique," IUPAB2024, June. 24 - 28, 2024, Kyoto, Japan

- Biointerphases Student Poster Awards at AVS-68, "Direct observation of focal adhesion by nanoendoscopy-AFM in live cells", Alam Mohammad Shahidul(令和4年11月6-11日)
- ULVAC Student Prize at IVC-22, "Direct observation of focal adhesions by nanoendoscopy-AFM in live cells", Alam Mohammad Shahidul(令和4年9月16日)

6. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の研究開発助成により行われました。また、ナノ生命科学研究所の福間剛士所長及び実験を担当した Mohammad Shahidul Alam さんに深く感謝いたします。