

細胞内アクチンフィラメントのフェムト秒レーザー切断と再生ダイナミクス

(阪大院工¹、京大再生研²、JST-CREST³、ENS de Cachan PPSM⁴、LBPA⁵)安国 良平¹, Jean-Alexis SPITZ^{1,4,5}, Rachel Meallet-RENAULT⁴,細川 陽一郎^{1,3}, 朝日 剛¹, 宿南 知佐², 開 祐司^{2,3}, 増原宏^{1,3}

【序】アクチンは細胞の中でフィラメント構造をとり細胞骨格を形成しているタンパク質の一つで、フィラメントへの重合反応と、フィラメントからの脱重合反応は、細胞の機能発現の源となる細胞内の運動に深くかかわっている。例えば、外圧を受けた動物細胞は、細胞内のアクチンフィラメントを再偏成し、自らを保持しようとする[1]。このようなアクチンの重合・脱重合反応に関する研究は古くから分子生物学におけるトピックスの一つとして扱われており[2]、近年では細胞内におけるアクチンフィラメントの形成から機能発現へ至るメカニズムが注目されている。我々は、集光フェムト秒レーザーにより単一細胞内の局所的なアクチンファイバーを能動的に操作し、そのメカニズムを調べる手法を確立しようとしている。高い開口数の対物レンズで集光されたフェムト秒レーザーは、多光子吸収による3次元微細加工が可能であることや、熱的損傷の少ない加工ができるという利点から単一細胞への応用が注目されており、細胞骨格や細胞内小器官、細胞膜のアブレーションが報告されている[3,4,5]。本研究ではその一貫として、フェムト秒レーザーをマウス線維芽細胞内のアクチンファイバーに照射することで切断し、その後のアクチンファイバーの変化を顕微蛍光イメージングにより観察した。

【実験】試料として、フィブロネクチンをコートしたガラスボトムディッシュに培養したマウスNIH3T3線維芽細胞を用いた。トランスフェクションを用いたりポフェクションにより緑色蛍光タンパク質(EGFP)結合アクチンを細胞内で発現させ、アクチンフィラメントを可視化した。細胞活性を維持するために、顕微鏡上で温度、湿度、CO₂濃度をそれぞれ37℃、100%、5%に保ちながら実験と観察を行った。

Fig. 1 にフェムト秒レーザーシステムの概略図を示す。フェムト秒レーザーパルス(800 nm, 120 fs, 4nJ/pulse)を倒立顕微鏡に導入し、100倍対物レンズ(NA = 1.25)を用いて細胞内部へ集光した。EGFPの励起光源として波長473nmの半導体励起ブルーレーザーを用い、CCDカメラにより顕微蛍光イメージングを行った。

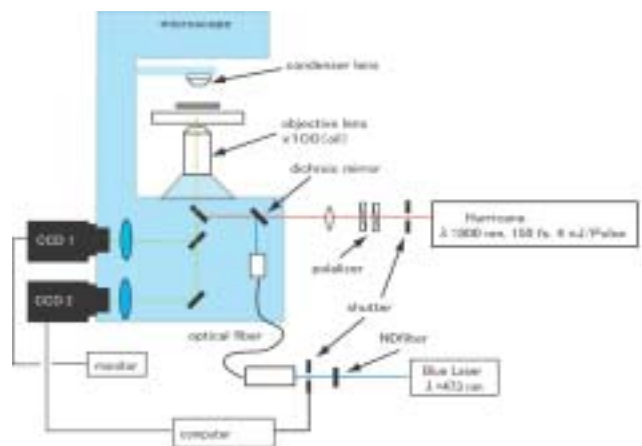


Figure 1. フェムト秒レーザーシステム

【結果と考察】レーザー照射によりアクチンファイバーを切断すると、まず集光径(1 μm)程度の領域で蛍光像が暗くなり、それが徐々に広がる様子が観察された(Fig. 2)。ファイバー以外の場所への照射ではこの現象は見られないことから、これはテンションのかかっているアクチンファイバーが収縮していると考え

られる。Fig. 3 に切断されたアクチンファイバーの切断端間の距離の時間変化を示す。これからアクチンファイバーは20秒程度の時間で4~10 μm 収縮することが明らかになった。この収縮の時間変化は粘性抵抗の高い場でのバネの収縮運動とよく一致することから、切断直後の収縮はファイバーの弾性エネルギーの解放によるものだと考えられる。また収縮は長い場合で数分間に及び、この場合は収縮距離と時間の関係が線形であるため弾性エネルギーの解放では説明できず、アクチンフィラメントの解離反応だと考えられる。その後数十分から数時間の間切断されたファイバーの観察を続けたところ、切断されたアクチンファイバーの周辺から現れた細いフィラメントが寄り集まるようにして、切断されたファイバー同士をつなぐ様子を観察することに成功した(Fig. 4)。また他のケースでは切断されたファイバーの一方の端は収縮後再生せずもう一方の端のみが再生する場合や収縮後全く再生しない場合も観察された。

[1] K. Naruse, T. Yamada, M. Sokabe, 1998, *Am. J. Physiol.* **43** H1532.

[2] S. Kumar, I. Z. Maxwell, A. Heisterkamp, T. R. Polte, T. P. Lele, M. Salanga, E. Mazur, D. E. Ingber, 2006, *Bio. Phys. J.* **90** 3762.

[3] A Heisterkamp, I. Z. Maxwell, E Mazur, J. M Underwood, J. A. Nickerson, S Kumar, D. E. Ingber, 2005, *Opt. Express.* **13** 3690.

[4] W. Watanabe, N. Arakawa, S. Matsunaga, T. Higashi, K. Fukui, K. Isobe and K. Itoh, 2004, *Opt. Express.* **12** 4203.

[5] K. König, 2000, *Histochem. Cell Biol.* **114** 79.

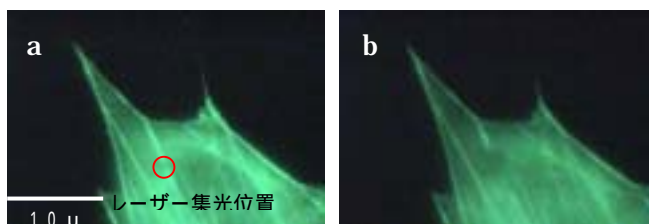


Figure 2. a)フェムト秒レーザー集光直後のアクチンファイバーと b)その後の収縮

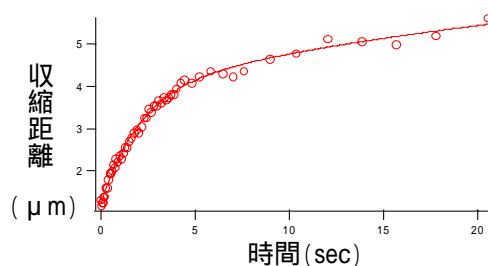


Figure 3. ファイバー切断後の収縮距離の時間変化

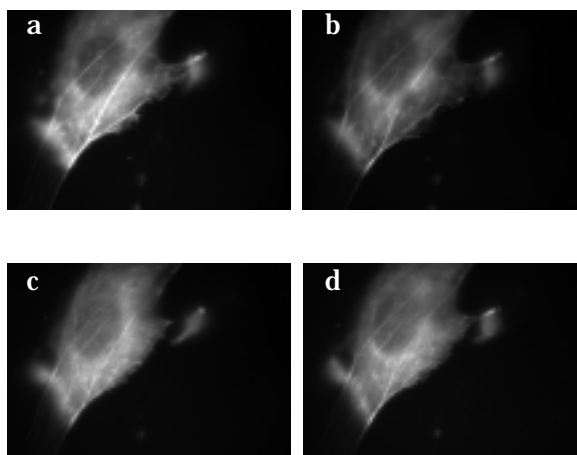


Figure 4. 切断後の再生過程

a) レーザー照射前

b) レーザー照射直後

c) 18分後

d) 40分後