

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19001

研究課題名(和文)細胞膜骨格の高速超解像弾性マッピング法の開発と細胞運動解析への応用

研究課題名(英文) Development of high-speed super-resolution membrane skeleton elasticity mapping and its application to cell motility analysis

研究代表者

藤原 敬宏 (Fujiwara, Takahiro)

京都大学・高等研究院・特定准教授

研究者番号：80423060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：100 nm 程度の網目構造をもつアクチン細胞膜骨格の機械的特性(バネ弾性)を、高速1蛍光分子追跡で検出した構造揺らぎをもとに定量する方法を確立し、超解像マッピングして形状的特性との相関を得た。超解像画像の取得を高速化し、網目構造の形態変化の影響が小さいように5秒程度に短縮した。見積もられたアクチン膜骨格のバネ定数は主に1-10 pN/ μm の範囲に分布していることが分かった。この観察を1分おきに10回程度にわたって繰り返すことにより、細胞運動にともなうアクチン膜骨格の微細構造とその張力発生の動的時間変化を刻々と追うことが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

- (1) 我々の高速1蛍光分子追跡/1分子局在超解像観察の独自技術を応用し、100 nm程度の微細なアクチン膜骨格の網目構造を5秒程度の短時間観察で超解像可視化するだけでなく、その機械的特性(バネ弾性)を超解像マッピングして形状的特性との相関を得ることができた。
- (2) 幹細胞の分化やガン細胞の浸潤・増殖などの重要な細胞機能に不可欠な、細胞運動にともなう張力発生機構を超解像空間分解能で解明するための技術基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：Super-resolution mapping of the mechanical property (spring elasticity) of the actin-based membrane skeleton of about 100 nm in mesh size was performed. The elasticity was quantitatively estimated from the structural fluctuation as observed by high-speed single fluorescent-molecule tracking of the actin-binding probe. The acquisition time was reduced to ~5 sec so that the effect of structural changes of the meshwork on super-resolution images was minimal. The spring constant of the meshwork was found to range predominantly from 1 to 10 pN/ μm . Such super-resolution image acquisitions can be repeated 10 times every 1 min in the same field of view, providing the method to monitor dynamic structural changes of the actin-based membrane skeleton and reveal how its tension develops during cell migration.

研究分野：生物物理学

キーワード：超解像蛍光顕微鏡法 アクチン膜骨格 1蛍光分子追跡 バネ弾性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超解像蛍光顕微鏡法の開発と実用化は、光学顕微鏡観察に大きな技術変革をもたらし、生細胞観察への応用も進みつつある。しかしながら、多くは形状的特性（微細構造や細胞内局在）の計測にとどまっており、機械的特性をはじめとした、直接、細胞機能に関わる特性の計測と組み合わせた例はほとんどなかった。我々は、細胞膜近傍の1蛍光分子の運動を、通常のビデオレート（時間分解能 33 ms）の330倍速の時間分解能、 $100\mu\text{s}$ で追跡できる高感度高速CMOSカメラシステムを開発してきた。さらに、この独自技術を、1分子局在をベースにした超解像観察（PALM/STORM）に応用し、生細胞超解像画像を数秒に1枚の頻度で取得する技術を開発してきた。また、我々は、細胞膜直下に100 nm程度の大きさに仕切られたアクチン膜骨格の網目が存在し、膜貫通型タンパク質や脂質の1分子運動に対する拡散障壁となっていること、多様な膜貫通型タンパク質が網目に動的な結合/解離を繰り返し、それが網目に沿って立ち並ぶことで生じる「ピケット効果」も拡散障壁としてはたらくこと、を示してきた。これらの知見をもとに、ピケット分子が網目に結合し、停留している期間に示す構造揺らぎを我々の超高速1分子追跡で検出してバネ定数を見積もり、約100 nmの網目を空間的に分解するのに十分な点数でマッピングすれば、アクチン膜骨格の形状的特性のみならず、機械的特性（バネ弾性）をも超解像で画像化できる、という本研究構想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、100 nm程度の網目構造をもつアクチン細胞膜骨格の機械的特性（バネ弾性）を、高速1分子追跡によって定量する方法を確立し、網目構造自体を空間的に分解できる密度で超解像マッピングして形状的特性との相関を得ること、さらにそれを繰り返して動的特性まで得ることを目指した。具体的には、以下の3つを目的とした。

- (1) アクチン膜骨格バネ弾性定量法の確立
- (2) 超解像弾性マッピング像の取得
- (3) 超解像弾性マッピング像による細胞運動の解析

3. 研究の方法

細胞膜上を拡散する膜貫通型タンパク質プローブがアクチン膜骨格に結合し、停留している期間に示す構造揺らぎを高速1蛍光分子追跡で検出してバネ定数を見積もる。実際の追跡データでは、構造揺らぎと同程度か、それより大きいガウシアン的位置決めエラーが重畳されるので、1蛍光分子毎の位置決めエラーを正しく差し引き、バネ定数を正確に定量する方法を確立する。時間当たりの放射光子数がより多い色素を探索し、正確なバネ定数の定量が可能な1分子追跡時間分解能を達成する。100 nm程度に仕切られたアクチン膜骨格の網目上の多数の停留イベントに対して、定量したバネ弾性にしたがって色分けした点で画像を再構成することで、膜骨格の網目の超解像弾性マッピング像の取得を目指す。網目の形状変化の影響が小さいように、超解像画像1枚の撮影時間は30秒以内を目指す。この間に100 nmの網目の可視化に十分な多数の停留点を取得する必要があるため、膜骨格への結合のオンレートが高く、短時間に何度も結合と解離を繰り返すプローブを探索する。さらに、1分子像の空間的な重複が起こらない適度な頻度で信号の明滅を繰り返し、より多数の停留点を取得できるように、励起強度、酸素濃度、還元剤/酸化剤の配合の条件を検討する。

4. 研究成果

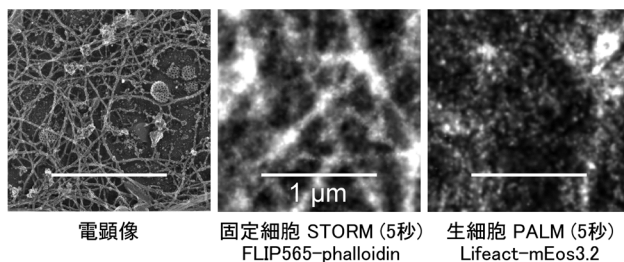
(1) アクチン膜骨格バネ弾性定量法の確立

1蛍光分子毎の点像分布関数の幅、フレーム時間あたりの放射光子数と近傍の背景ノイズから、静止状態の1蛍光分子の位置決めエラーを見積もることにより、アクチン膜骨格に結合したプローブ分子の軌跡から位置決めエラーの寄与を差し引いて構造揺らぎのみを抽出し、アクチン膜骨格のバネ定数を定量できるようになった。最終年度に、この計算を自作の1分子追跡ソフトに組み込み、1分子追跡の軌跡から超解像弾性マッピング像を直ちに得られるようになった。

(2) ① アクチン標識法と色素の検討

細胞膜上の拡散でアクチン膜骨格へ結合と解離を繰り返す、膜貫通型プローブの停留点の点描では、プローブの発現量と停留の頻度が不十分で、約100 nmのアクチン膜骨格の網目構造を可視化する空間分解能を得るのは困難であることが分かった。そこで、結合時間が平均1秒以下で観察中に数回の交換が見込める、

蛍光標識 Lifeactペプチドアクチンプローブを利用する方法に変更した。代表的な光変換型蛍光タンパク質 mEos3.2 を融合した Lifeactプローブによる点描では、蛍光タンパク質からのシグナルが小さく、空間分解能が不十分であった（図右；生細胞PALM）。この問題を解決するため、



電顕像

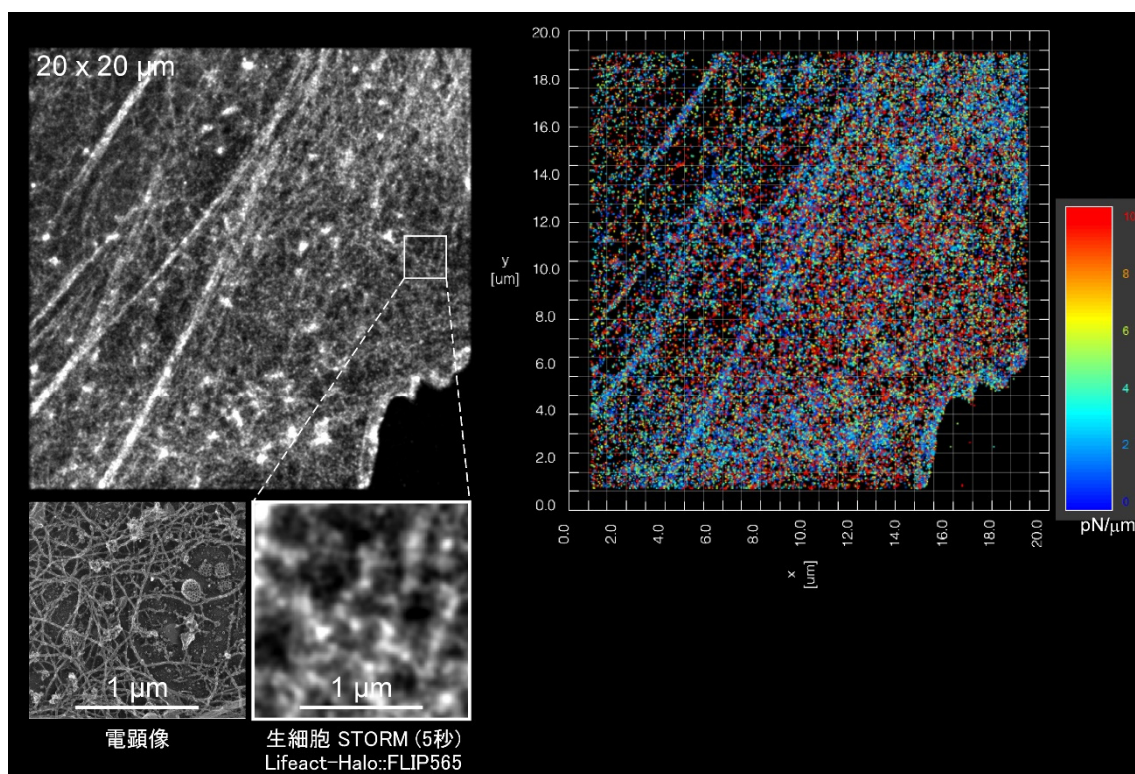
固定細胞 STORM (5秒)
FLIP565-phalloidin

生細胞 PALM (5秒)
Lifeact-mEos3.2

シグナルが大きく、さらに、自発的高速明滅をおこなう有機蛍光色素による標識を検討した。より高速な1蛍光分子追跡が可能である（フレームあたりの1蛍光分子シグナルが大きい）こと、構造揺らぎを正確に決められる（10フレーム以上の明状態の軌跡が十分得られる）こと、さらに、蛍光褪色までの時間が長くタイムラプス観察に 응용が可能なこと、を要件として色素を探索した。選定した色素で固定細胞のファロイジン染色をおこなったところ、電顕像（左）に近い密度で網目構造が可視化できた（中；固定細胞STORM）。

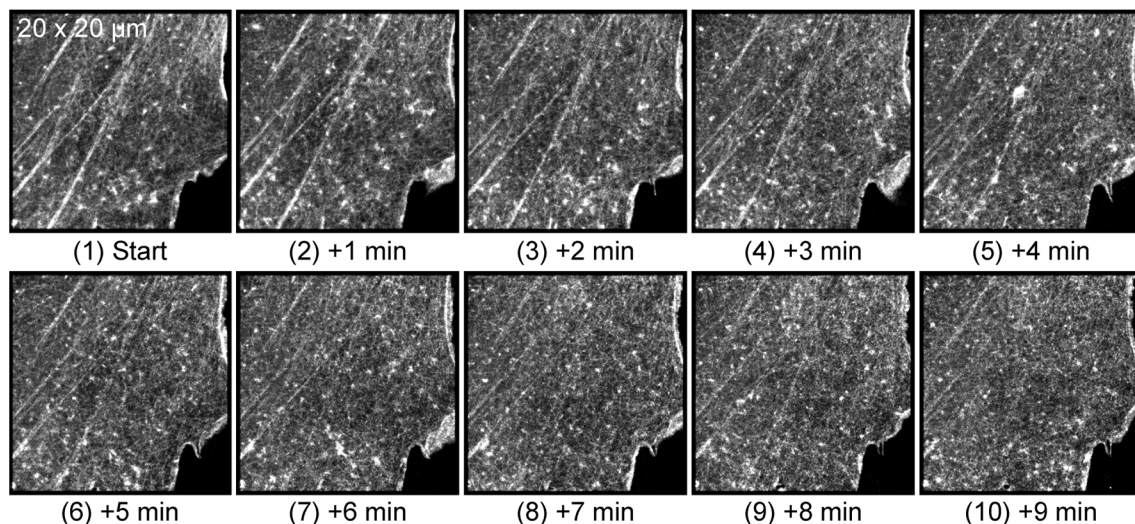
(2)-② アクチン膜骨格超解像弾性マッピング像の取得

Haloタグ融合 Lifeactプローブを発現したヒト上皮 T24細胞を、Haloリガンド化した色素で標識した。3 kHz、5秒間（15,000フレーム）の生細胞STORM撮影をおこない、1フレーム以上のシグナルからアクチン膜骨格の超解像画像（図左）を、10フレーム以上のシグナルから超解像弾性マッピング像を取得した（右）。超解像画像1枚の撮影時間は5秒と、当初目標の30秒を大幅に短縮し、100 nm 程度の網目構造を解像する空間分解能が得られた。計算で見積もられたアクチン膜骨格のバネ定数は主に 1-10 pN/ μ m の範囲に分布しており、以前、光ピンセットによる金コロイド標識膜貫通型タンパク質の牽引で見積もられた値（Sako et al., J. Cell Biol. 1995）と近い結果が得られた。



(3) タイムラプス生細胞超解像観察

選定した色素により、5秒間の超解像画像取得を1分おきに10回にわたって繰り返すことが可能になり、細胞運動にともなうアクチン膜骨格の微細構造とその機械的特性（バネ弾性）の動的時間変化を刻々と追うための基盤技術を確認した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 P. Sil, N. Mateos, S. Nath, S. Buschow, C. Manzo, K.G.N. Suzuki, T. Fujiwara, A. Kusumi, M.F. Garcia-Parajo, and S. Mayor	4. 巻 31
2. 論文標題 Dynamic actin-mediated nano-scale clustering of CD44 regulates its meso-scale organization at the plasma membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell	6. 最初と最後の頁 561-579
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E18-11-0715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 I. Koyama-Honda, T.K. Fujiwara, R.S. Kasai, K.G.N. Suzuki, E. Kajikawa, H. Tsuboi, T.A. Tsunoyama, and A. Kusumi	4. 巻 219
2. 論文標題 High-speed single-molecule imaging reveals signal transduction by induced transbilayer raft phases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e202006125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202006125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takahiro Fujiwara
2. 発表標題 Dynamic entrance and exit of integrin molecules at focal adhesion protein islands as revealed by super-spatiotemporal resolution single-molecule microscopy
3. 学会等名 Academia Sinica-Kyoto University Bilateral Symposium: Cellular and Molecular Sensing, Recognition and Response (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Fujiwara
2. 発表標題 Actin-induced compartments and islands in focal adhesions as revealed by simultaneous ultrafast PALM and single-molecule tracking
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Fujiwara
2. 発表標題 Organization of focal adhesion based on actin-induced compartments and dynamic protein islands as revealed by ultrafast single-molecule imaging
3. 学会等名 1st WPI NanoLSI-iCeMS Joint Symposium on Nanoimaging and Advanced Materials for Life Science (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
インド	National Centre for Biological Science		