

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）

研究期間：2019～2023

課題番号：18K19962

研究課題名（和文）3次元分子配向観察法の開発と細胞内微細構造ダイナミクス研究への応用

研究課題名（英文）Development of 3D molecular orientation imaging and its application to cellular architectural dynamics

研究代表者

谷 知己（Tomomi, Tani）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：80332378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 47,000,000円

研究成果の概要（和文）：生命を構成する個々の細胞内にも前後や左右といった向きがあり、これは細胞極性と呼ばれている。細胞を構成する核や小胞体などの細胞内微細構造は、この細胞極性に応じて配置されており、この配置が神経細胞や筋肉細胞といった細胞の役割と密接に関わっている。個々の細胞がもつ細胞極性がどのような分子基盤に基づいて制御されているのかは不明の点が多い。本研究では、生体分子の向きがわかる光学技術を、生きた細胞内や組織内で、さらには個体まるごとの体内で適用できる新しい光学顕微鏡を開発した。細胞に極性が形成されるしくみを、分子の向きを見ることから理解することで、生物の形づくりや、心臓や脳ができる仕組みの解明に寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光学顕微鏡法は生体分子に蛍光タンパク質分子をつけることにより、生体分子の種類のみならず、その分布や量を生きた細胞の中で調べるための、今日なくてはならない技術である。我々はこの光学顕微鏡法に改良を加えて、分子のかたちに関わる情報も得られる新しい光学顕微鏡法を開発した。この光学顕微鏡法は小型モデル実験生物の中で、分子が形作る生体構造を調べるために非常に有効である。このような基礎生命科学は生体組織の発生や再生における形作り、あるいはその仕組みの破綻であるがん転移のしくみの理解にも役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Every single individual cells that make up life, there are orientations such as front and back, left and right, which is referred to as cell polarity. The subcellular structures, such as the nucleus and endoplasmic reticulum, are arranged according to this cell polarity, and this arrangement is closely related to the roles of cells, those in nerves and muscles. Little is known about the molecular basis of how the cell polarity of individual cells is organized. In this study, we developed a new optical microscope that reports molecular orientations in live cells, tissues, and even whole organisms. Through understanding the mechanisms of cell polarity by observing the orientation of molecules that compose the cells, we will explore the mechanisms behind the morphogenesis of the body plans in life.

研究分野：生物物理学

キーワード：バイオイメージング 蛍光偏光 細胞骨格 ライトシート顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の谷は、2010年から2019年まで米国ウッズホール Marine Biological Laboratory の PI として進めてきた、蛍光1分子の向きを焦点平面内の絶対角度として観察できる蛍光偏光顕微鏡の開発を、2019年夏の日本への帰国後に、さらに発展させたいと考えた。この分子配向観察技術は多細胞個体の形態形成のしくみやがん細胞の転移メカニズムなど、細胞内外における分子配向制御やその破綻が鍵を握る重要な生命現象において、全く新しい知見を提供する手法になる。在米時に開発した光学顕微鏡で観察できる分子配向は全反射照明顕微鏡であるため、細胞が接着する基質直下の2次元平面に限定されており、細胞内深部や多数の細胞から構成される組織内、さらには個体内での観察には適用できなかった。そこで本研究では、細胞内部や組織内部、さらには生きた個体内で、3次元空間における分子の配向が観察できる光学顕微鏡の開発を目指した。研究費申請書を作成した時点では海外共同研究者との研究テーマが念頭にあり、細胞接着装置の分子機構を解明することを主な目的としていたが、研究開始から半年後の2020年にコロナ禍となり海外との共同研究推進が困難となったため、広く細胞骨格系全般を解析対象とするに至った。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、細胞内部や組織内、生体内に広がる細胞骨格や細胞外マトリクス、細胞膜などの生体超分子を構成する個々の分子の分子配向を3次元空間において可視化し解析する新しい光学顕微鏡システムの確立にある。蛍光分子の向きを定量する方法としては、研究代表者がすでに開発した発光双極子の向きを解析する偏光光学技術を用いる一方で、細胞内や生体組織内における蛍光分子の向きに依存せず等しい強さで励起する励起光学系は、これまで用いてきた全反射照明法に代わる新たな光学系の開発が求められる。この新規の励起光学系として、薄層シート状の励起光を観察光学系の焦点平面において交差させ、励起光の偏光が3次的に偏らないような偏光をもつ薄層ライトシート照明法を開発する。分子配向を観察するベンチマークとして、多数の培養細胞集団で形成される球状のスフェロイドや、線虫、ショウジョウバエ、小型魚類胚などの小型モデル動物を利用する。

3. 研究の方法

3.(1) 励起光学系の設計と実装

目的とする光学顕微鏡を構築するシステムとして、水平な光路構築が可能な1000mm x 1500mmの光学除振台上に縦置き薄型光学定盤(600mm x 800mm 厚み50mm)を設置し、水平な光学定盤に対して垂直な平面をもつ光路を構築できるようにした。主に縦置き薄型光学定盤上に励起光学系を構築した。励起レーザー光はライトシート照明に必要なガルバノスキャナーシステムを経由し、適当なリレー光学系によって拡大したあと、偏光ビームスプリッターによって2分岐され、各々が直交する光軸をもつ照明用の対物レンズに導入される。照明用対物レンズとして4倍の乾燥系対物レンズから10倍の水浸対物レンズまで対物レンズを選択することによって、細胞内微細構造を観察する数十ミクロンのレンジから小型動物胚全体をカバーする数ミリのレンジまで、観察視野に応じて薄層照明の広がりを変えられる光学系とした。また、照明用対物レンズ直前に置かれた1/2波長板と1/4波長板を調整することにより、薄層ライトシート照明光の偏光をシート平面に対して平行、直交、等方的な偏光等、調整できる光学システムとなっている。

3.(2) 観察光学系の設計と実装

光学除振台上に、蛍光偏光解析用の光学系も含む観察光学系を構築した。45 度折り曲げミラーなどは偏光面を大きく乱すことがわかっているため、蛍光偏光解析光学系より手間の光学系構築には、長い直線光路が確保できる大きな光学基盤が必要となる。このため、水平な平面に光路をもつ光学定盤上に観察光学系を構築した。細胞内や組織内を観察する目的には、水浸対物レンズが最も適している。このため蛍光偏光観察用の対物レンズとしても、100 倍および 20 倍の水浸対物レンズ（ニコン CFI プラン 100x C W およびオリンパス XLUMPlanFL 20x）を使用した。観察光学系の開発では、水平に設置した水浸対物レンズと観察試料を含む耐水性容器の設計および実装、さらに 3 次元観察時に求められる観察試料の遠隔的な 3 次元操作法の開発には膨大な試行錯誤の時間がかかった。開発の結果、3 次元的に観察試料を動かしても観察するライトシート平面内に観察用対物レンズの焦点平面が固定された理想の観察光学システムが完成した。

3. (3) 四分分割蛍光偏光光学系を用いた蛍光偏光の観察と分子配向定量法の確立

焦点平面内で等方的な偏光をもつライトシート照明光によって励起された蛍光分子の蛍光偏光を、蛍光偏光の透過軸に応じて分離された 4 つの像として同一カメラ撮像面上に結像し、画像取得をおこなった。得られた 4 つの蛍光像から蛍光偏光を解析する上で必要となるのは、4 画像における位置の対応関係（registration）、各透過軸がもつ透過効率差の校正（normalization）、そして各透過軸に入射する偏光方向に依存した透過量変化のダイナミックレンジの格差を補正する感度補正（polarization calibration）である。レジストレーションとノーマライゼーションについてはすでに確立した手法に準じて、フルオレセインをはじめとする、蛍光異方性をほとんど示さない低分子量の蛍光色素溶液および、無偏光の LED 光源を励起光とした蛍光画像を用いておこなった。また、蛍光偏光検出感度のキャリブレーションは、無偏光の LED 光源で照明した同心円パターン透過軸をもつ偏光素子の明視野像でおこなった。蛍光偏光の解析には、2016 年 PNAS 誌において研究代表者のグループから発表され、現在公開されている MATLAB ベースの画像解析アルゴリズムを利用した。

4 . 研究成果

4. (1) 細胞接着面と直交する焦点平面内の細胞断層画像における細胞骨格分子配向の解析

培養細胞をモデルとした細胞内微細構造の詳細に関わる知見のほとんどは、細胞が広がる接着面に平行な焦点平面内に限定されている。しかしながら、研究計画当初予定していた細胞接着斑やポドソーム構成分子の分子配向を含め、細胞内微細構造がとる分子構築は接着面に直交する方向にも特徴的な構造（建造物の柱が地面に対して立つように）をとることが知られている。このため、細胞を側面から観察する“プロフィール”像が取得できる光学顕微鏡観察法に基づいて分子配向を観察することは、極めて意義がある。この目的を達成するために、研究代表者の在米期間を含め 10 年以上にわたって共同研究をすすめてきた、東京医科歯科大学医学部の寺田純雄博士や佐藤啓介博士らが開発した分子配向観察用の蛍光プローブ POLARIS アクチンを発現した、ブタ尿細管上皮由来の培養細胞 LLCPK1 細胞を用いて、細胞接着面と直交する焦点平面において細胞を観察

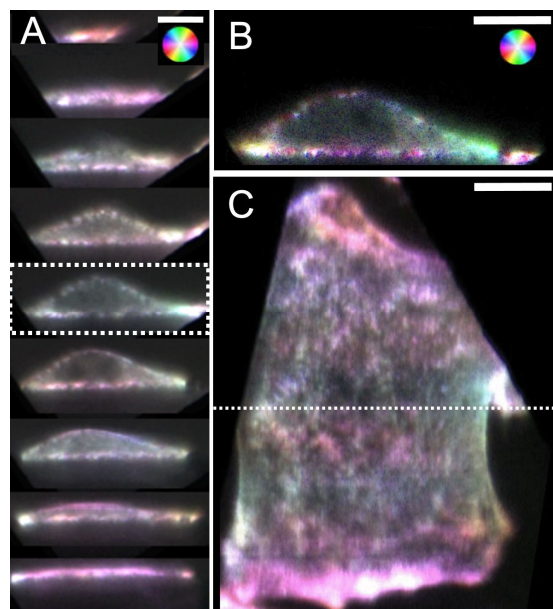


図 1 LLCPK1 生細胞の基質平面と直交する断層面観察面におけるアクチン配向マップ。A 断層像の連続光学切片。破線で囲った一枚を拡大して B に示す。C は断層像を再構築して細胞接着面に平行な断面で示したもの。擬似カラーホイールはアクチン繊維のあり角を示す。スケール：10 ミクロン。

し、その断層面におけるアクチン分子の配向を観察した。

この観察において判明した光学技術上の課題は、カバーガラス上に分散培養した細胞では、細胞接着面となるガラス表面で蛍光が全反射することにより、細胞の断層像面にその鏡像が重なるアーティファクトが発生することである。この問題を解決するためには、細胞は、水の屈折率に近い屈折率をもつ基質(例えば低濃度コラーゲンゲル)上で培養する必要があることが明らかとなった。このような課題を克服した上で POLARIS アクチンを発現する LLCPK1 細胞を接着基質面に直交する平面で断層撮影し、得られた蛍光偏光方向を解析した結果を図 1A,B に示す。またこの断層面に沿った平面内における POLARIS アクチン配向のあおり角を接着面近傍においてマップ化した結果を図 1C に示す。接着斑近傍に特徴的なアクチン配向や、細胞のアピカル側から基質側に向かうアクチン配向が観察できる。今後ライトシートの厚みを薄くすることによって背景光を抑制し、断層観察像の像質を向上させることにより、細胞のプロフィール像から、細胞外基質に応じた細胞内微細構造の特性を明らかにする。

4.(2) 3次元構造をとる上皮細胞集団内における細胞骨格配向の3次元観察

ライトシート照明による蛍光偏光顕微鏡観察で初めて可能となったことのひとつに、3次元的な形状をもつ細胞集団や組織、発生胚内部における分子集合体の分子配向観察がある。細胞骨格タンパク質はオルガノイドや胚発生における形態形成運動の中心的な役割を担っているため、胚の体軸など、より高次の形づくりの仕組みに応じた、組織内、細胞内での分子配向を3次元空間の中で解析することは、個体の形態形成機構を明らかにする上も非常に重要であると考えられる。本研究ではその原理検証として、LLCPK1 細胞集団が形成する腔状構造における細胞内アクチン配向を観察した。観察対象として、POLARIS を恒常的に発現する LLCPK1 細胞をカバーガラス上で培養した。コンフルエント状態で細胞は増殖を停止するが、さらに培養を2週間程度継続すると、細胞層の基質側に水が蓄積して細胞層が浮き上がり、ところどころに水泡状に盛り上がった細胞層が形成される。LLCPK1 は尿管由来で水輸送機構を担う上皮細胞なので、このような水泡を包む内腔を形成すると考えられる。この細胞構造内に張り巡らされたアクチン骨格系の分子配向を、ライトシート蛍光偏光顕微鏡で観察した。その観察結果を図2に示す。現時点の課題としては、あおり成分をもつ分子配向は偏光度が低く検出されるため、焦点平面に平行な分子配向の結果がより誇張されて検出されることである。この問題は、観察対象を回転させるか、あるいは複数の視軸をもつマルチビュー観察をおこなうことにより解決する。現在観察試料を回転可能なステージを導入することによって、この問題の解決をすすめている。

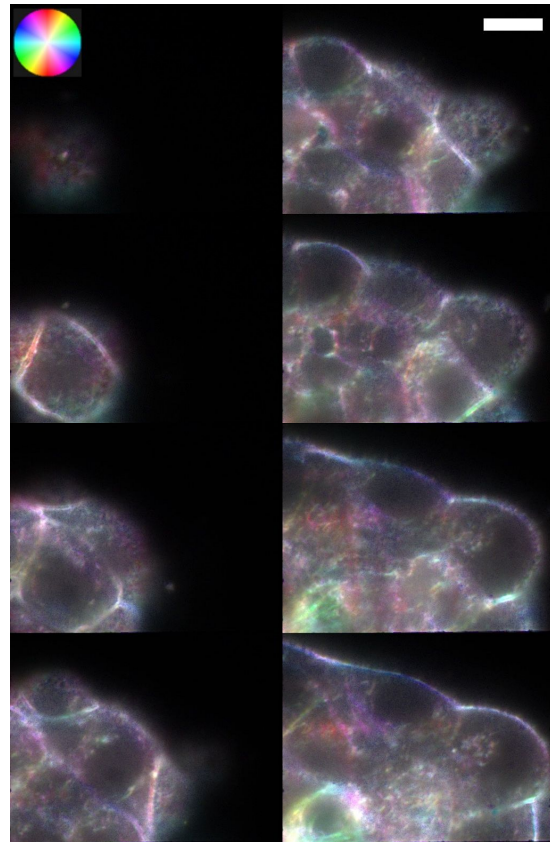


図2 LLCPK1 細胞層が形成する腔状構造を、その表面から4ミクロンステップでより深部に向かって断層撮影し、細胞内部のアクチン配向を解析した結果を示す(左上から下方に4枚、引き続き右上から下方にさらに4枚の連続的な断層像)。擬似カラーホイールはアクチンの配向方向を示す。スケール:10ミクロン。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kyoko Masui, Yasunori Nawa, Shunsuke Tokumitsu, Takahiro Nagano, Makoto Kawarai, Hirokazu Tanaka, Tatsuki Hamamoto, Wataru Minoshima, Tomomi Tani, Satoshi Fujita, Hidekazu Ishitobi, Chie Hosokawa, Yasushi Inouye	4. 巻 7
2. 論文標題 Detection of Glutamate Encapsulated in Liposomes by Optical Trapping Raman Spectroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS omega	6. 最初と最後の頁 9701-9709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c07206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomomi Tani, Maki Koike-Tani, Mai Thi Tran, Michael Shribak, Snezana Levic	4. 巻 11
2. 論文標題 Postnatal structural development of mammalian basilar membrane provides anatomical basis for the maturation of tonotopic maps and frequency tuning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1- 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87150-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nori Nakai, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Masahiko Kawagishi, Hiromasa Ka, Kenta Saito, Sumio Terada	4. 巻 565
2. 論文標題 Development of nanobody-based POLARIS orientation probes enabled multi-color/multi-target orientation imaging in living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugizaki Ayana, Sato Keisuke, Chiba Kazuyoshi, Saito Kenta, Kawagishi Masahiko, Tomabechi Yuri, Mehta Shalin B, Ishii Hirokazu, Sakai Naoki, Shirouzu Mikako, Tani Tomomi, Terada Sumio	4. 巻 118
2. 論文標題 POLARIS, a versatile probe for molecular orientation, revealed actin filaments associated with microtubule asters in early embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2019071118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishii Hirokazu, Tani Tomomi	4. 巻 32
2. 論文標題 Dynamic organization of cortical actin filaments during the ooplasmic segregation of ascidian Ciona eggs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 274-288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-01-0083	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 -

1. 著者名 Koike-Tani Maki, Tominaga Takashi, Oldenbourg Rudolf, Tani Tomomi	4. 巻 118
2. 論文標題 Birefringence Changes of Dendrites in Mouse Hippocampal Slices Revealed with Polarizing Microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 2366-2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2020.03.016	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

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷知己、中井紀、佐藤啓介、寺田純雄
2. 発表標題 Fluorescence polarization light-sheet microscopy for studying 3D molecular architectures in vivo
3. 学会等名 日本生物物理学会第60回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷 知己
2. 発表標題 生体分子 1 分子の配向観察から読み解く細胞のダイナミクス
3. 学会等名 レーザー学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷知己、石井宏和、Shalin Mehta、中井紀、佐藤啓介、寺田純雄
2. 発表標題 Self-organization of actin retrograde flow in lamellipodia
3. 学会等名 日本生物物理学会第61回年会
4. 発表年 2023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