

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02585

研究課題名(和文)細胞膜の仕切りが担う、分子複合体形成制御素過程の1分子直接観察

研究課題名(英文) Direct single-molecule observation of the elementary process of molecular complex formation regulated by the compartmentalized plasma membrane

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：分子反応を本質的に制御している「閉じ込め効果」の生体内での直接測定はこれまで極めて困難であった。本研究では、その技術的限界を打破するため、細胞膜上の1蛍光分子の究極速度での1分子運動観察を目指した。超高感度・超高速カメラの開発と、蛍光色素の選定により、最速3万コマ/秒(ビデオ速度、30コマ/秒の1,000倍)での撮影と、アクチン膜骨格の仕切りに抑制を受けた運動(ホップ拡散)の1分子直接観察に成功した。超解像PALM/dSTORM観察と組み合わせた測定により、細胞の足としてはたらく接着斑の機能制御に、接着斑の群島構造と、アクチン膜骨格の仕切りによる足場が重要な役割を果たすことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

- (1) 本研究で開発した超高感度・超高速カメラにより、現在、1分子観察用途で最も利用されているsCMOSカメラの10倍以上の高速観察が可能となり、生体内の「閉じ込め効果」の原理の理解と、それによる細胞内シグナル制御の研究の進展に大きく寄与することが期待される。
- (2) 開発したカメラを応用した超解像PALM/dSTORM観察では、1画像あたり従来5分以上かかっていた撮像時間を10秒程度まで短縮できた。この技術により、従来の理解とは大きく異なる接着斑の微細構造と動態が明らかになりつつあり、今後、生細胞中の様々な微細構造の超解像レベルの動態と機能の研究において重要な貢献を果たすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：By directly observing elementary processes of molecular reactions at the single-molecule level, alongside visualizing the nano-architecture of functional structures in living cells, a significant acceleration of the understanding of "confinement effect", of critically importance for essential biological functions, is anticipated. The ultrafast camera system developed in this study enabled the highest time resolution in single fluorescent-molecule imaging to date, which is 30 kHz or every 33 microseconds, 1,000 times faster than the normal video rate. The camera successfully detected fast hop diffusion of single molecules in the plasma membrane compartmentalized by the actin-based membrane skeleton. Furthermore, the camera reduced the data acquisition periods required for PALM/dSTORM super-resolution microscopy to less than 10 s, which revealed the dynamic nano-organization of the focal adhesion (FA), leading to the model of compartmentalized archipelago of FA-protein island clusters.

研究分野：生物物理学

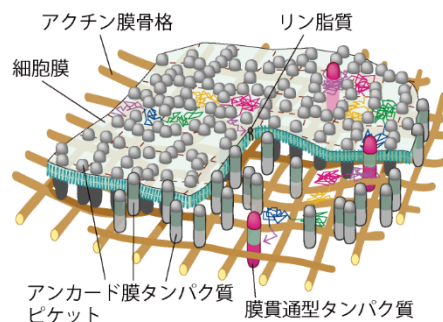
キーワード：1分子観察 超解像観察 細胞膜 アクチン膜骨格 閉じ込め効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子運動の「閉じ込め効果」は、材料科学において、多孔性材料や複合材料の機能を決める最も重要な効果の一つである。細胞生物学や生物物理学においても、生体内における分子反応や代謝の制御から、拡散運動の偏りで生じる局在化や極性形成に至る、生体維持に必須の機能を理解するための鍵として研究がおこなわれ、物理学的な観点からも注目を集めてきた。しかしながら、*in vitro* 実験で生体内の「閉じ込め効果」のある環境を再現するのは難しく、一方で、生体内で分子運動の「閉じ込め効果」を正確に測定することも、測定技術の時間/空間精度の限界のために極めて困難であった。

我々は以前、金コロイドで標識した細胞膜上の受容体や脂質の拡散運動を、1分子ごとに、世界最速の $25\mu\text{s}$ 時間分解能で追跡する技術を開発し、アクチン膜骨格の網目による「フェンス効果」と、フェンスに結合した膜貫通型タンパク質が立ち並ぶことで拡散障壁となる「ピケット効果」により、細胞膜は 100 nm 程度 (細胞種により $30\text{--}250\text{ nm}$ と異なる) の大きさに仕切られていることを明らかにした (右図; Fujiwara et al., *J. Cell Biol.* 2002; Fujiwara et al., *Mol. Biol. Cell* 2016)。



我々はこれまで、細胞膜においては、このアクチン膜骨格の仕切りによる「閉じ込め効果」が、細胞膜分子の拡散運動や会合/集合を制御し、シグナル伝達の足場として働くというモデルを提案してきた。しかし、標識にもちいた金コロイドは直径 40 nm と、ターゲットの細胞膜分子 (数 nm) に比べるとずっと大きく、1分子運動に対する影響の懸念が常にあった。また、多色観察も不可能であった。

そのため、細胞膜の「閉じ込め効果」の研究の今後の進展には、ターゲット分子より小さい蛍光色素1分子 (1 nm 程度) の標識を検出できる感度での、金コロイドによる $25\mu\text{s}$ 時間分解能に近い速度の1分子運動追跡技術の開発、さらに、多色観察によりごく短時間 (ms オーダー) の分子間相互作用を検出できる技術の開発が喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

これまでのビデオ速度 (30 コマ/秒) での1蛍光分子観察技術では、細胞膜の仕切りのサイズ ($30\text{--}250\text{ nm}$) は、従来の光学分解能 (250 nm) より小さいこと、その中での細胞膜分子の拡散が非常に速い ($5\text{--}10\mu\text{m}^2/\text{s}$) こと、また、定常状態では仕切りの中での滞在が非常に短い ($1\text{--}数10\text{ ms}$) ことから、その運動は大きく平均化の効果を受け、解析が困難であった。本研究ではその技術的限界を打破し、細胞膜の「閉じ込め効果」を直接観察し、その中での分子反応の素過程を1分子レベルで調べることにより、本研究の核心をなす学術的「問い」である、生体内の分子反応を本質的に制御している「閉じ込め効果」の1分子機構の理解を大きく進めることを目的とした。

3. 研究の方法

我々が株式会社フォトロンと共同で開発してきた、GaAsP イメージインテンシファイアーを光ファイバーで CMOS カメラにカップルした高感度 CMOS 高速カメラと、それを搭載した顕微鏡システムを検証/改善し、超高速観察に適した蛍光色素と照明方法を検討することにより、シグナルの検出効率の向上を図った。さらに、開発したカメラで1分子局在化ベースの超解像 PALM/dSTORM 観察を高速化した。これまで1枚の超解像画像取得に5分以上かかっていた撮像時間を秒オーダーまで短縮し、2色同時生細胞超解像観察を実現することで、「閉じ込め効果」に関わる生細胞中の微細構造の超解像レベルの動態と機能の理解が可能となる。超解像 PALM 観察と1蛍光分子超高速追跡を組み合わせ、細胞の足としてはたらく接着斑での1分子レベルの構成分子の出入りを調べることにより、その機能制御の解明を目指した。

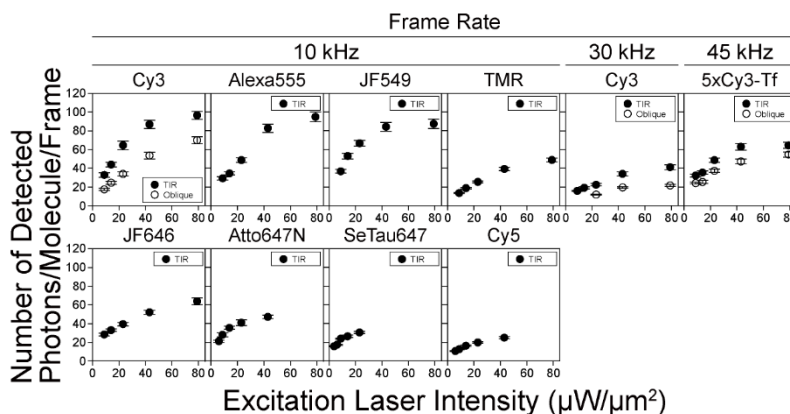
4. 研究成果

(1) 究極速度での1蛍光分子観察

光安定性、シグナル強度に優れ、蛍光1分子イメージングによく使われる8種の蛍光色素について、フレーム時間 0.1 ms (撮影速度 1 万コマ/秒) の間に得られる光子数を評価した。下図に示すように、励起レーザー強度を上げるにつれてフレーム時間あたりの光子数は増加するが、暗状態の励起三重項からの緩和時間 ($\sim\mu\text{s}$) が律速になるため飽和が起り、得られる光子数には限界がある。8種の色素のうち最も超高速観察に適しているのは Cy3 で、フレーム時間 0.1 ms (1 万コマ/秒) に約 100 光子得られ、位置決め精度は 20 nm 、フレーム時間 0.033 ms (3 万コマ/秒) に約 40 光子得られ、位置決め精度は 34 nm であった。

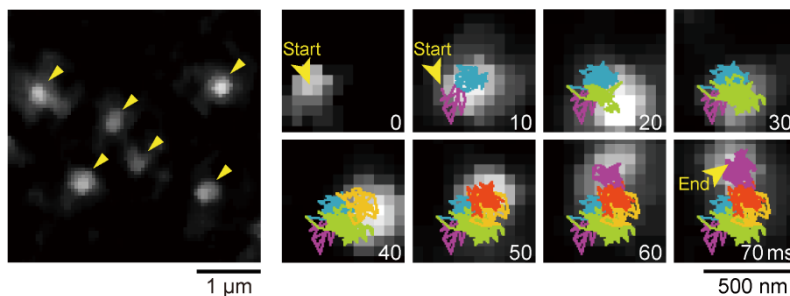
位置決め精度の低下のため、現在利用できる蛍光色素ではこれ以上撮影速度を上げることは困難である。蛍光色素の特性で限界の撮影速度が決まっているという意味で、現在は 3 万コマ/

秒が1 蛍光分子観察の究極速度となる（ビデオ速度の1,000倍）。Cy3を平均5個結合しているタンパク質ではフレーム時間0.022 ms（4.5万コマ/秒）の観察が可能であった。カメラ自体は10万コマ/秒以上の撮影が可能であり、今後、より明るい（時間あたりに得られる光子数が多い）色素が開発されれば、さらなる時間分解能の向上が期待できる。



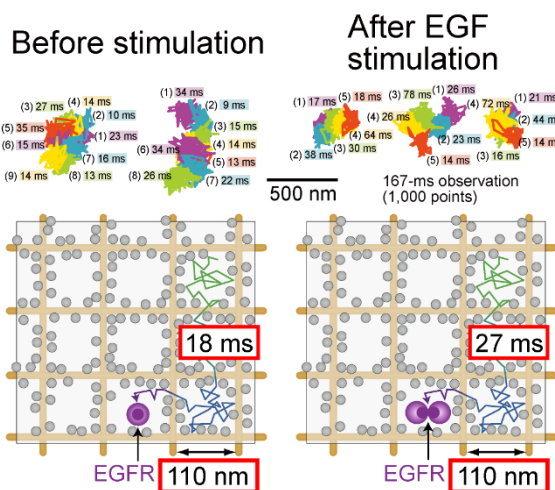
(2) 細胞膜分子の超高速1分子運動追跡

開発したカメラによる、細胞膜上でのリン脂質アナログ（Cy3標識DOPE）の1分子超高速追跡により、細胞膜の最も基本的な構成分子であるリン脂質でも、その運動は単純な熱揺らぎ（ブラウン運動）からかけ離れていて、「フェンス効果」と「ピケット効果」による細胞膜の仕切りにしばしば閉じ込められ、ときどき隣の区画に飛び移る「ホップ拡散」を示し、その区画のサイズは金コロイドによる測定と同様、約100 nmであることが示された。下図は0.1 ms時間分解能（1万コマ/秒）でCy3標識DOPEの運動を70 ms間追跡したときの10 msごとのスナップショットと、区画ごとに色分けされた軌跡を示す。膜貫通型受容体（Cy3標識トランスフェリンを結合したトランスフェリン受容体）も同じサイズの区画に閉じ込めを受けるが、リン脂質に比べて区画ごとの滞在時間が長いこと、同じ分子ではベール側（細胞の底面側）とアピカル側（上面側）で仕切りのサイズと滞在時間に有意差はないこと、が明らかになった。



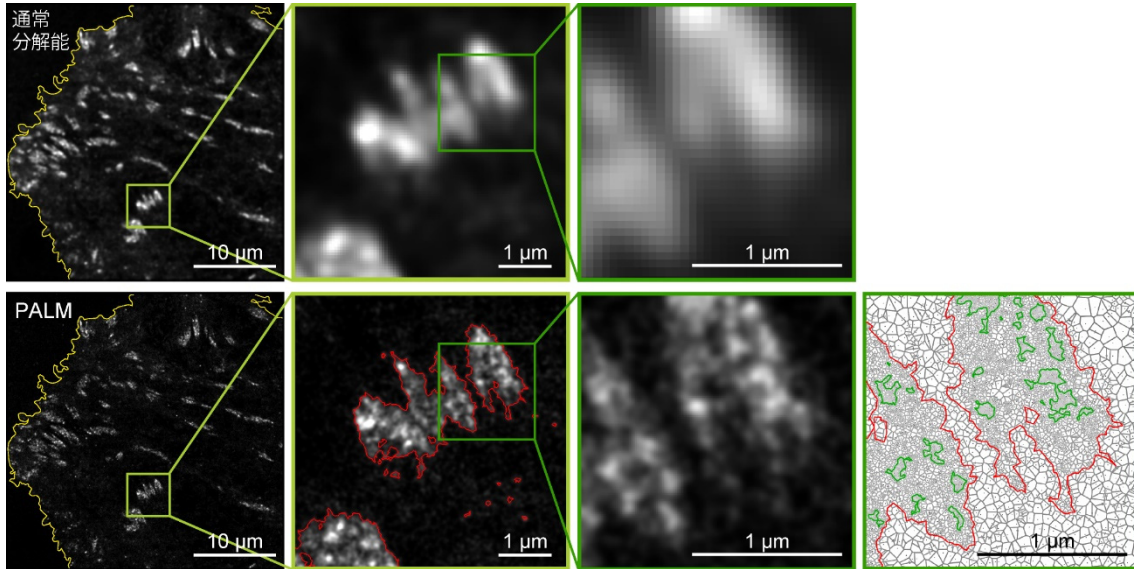
(3) オリゴマー誘起トラッピング効果の検証

上皮成長因子（EGF）受容体は、EGF刺激によりダイマー化が促進されること、下流のシグナル分子（Grb2, SOS, Ras, Raf, 等）が細胞質側にリクルートされてシグナル複合体（オリゴマー）を形成すること、が知られている。EGF刺激前後の受容体の運動を時間分解能0.167 ms（6,000コマ/秒）で調べたところ、受容体の運動が閉じ込めを受ける区画の面積に変化はない一方で、区画ごとの滞在時間が1.5倍長くなった（右図）。このことから、仕切りによる「オリゴマー誘起トラッピング効果」が、細胞膜上のEGF刺激を受けた領域でオリゴマーの長距離運動を抑制し、増殖制御のシグナル伝達を局所化する役割を果たしている可能性が示された。

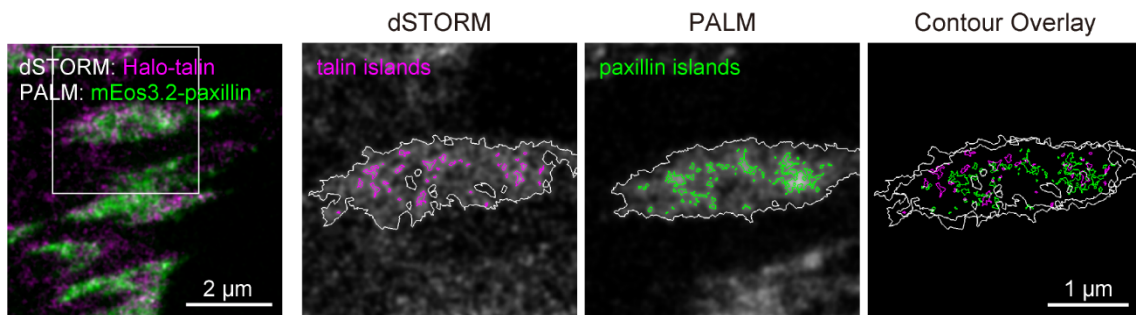


(4) 超解像PALM/dSTORM同時観察による接着斑ユニット群島構造の解明

1分子局在化ベースの超解像PALM/dSTORM観察は、空間分解能が最も高い超解像法の1つであるが、通常のビデオ速度（30コマ/秒）の撮影では1画像あたりの撮像時間が5分以上かかり、刻々と変化する生細胞の観察は難しかった。しかしながら、本研究で開発したカメラで1,000コマ/秒（超解像蛍光プローブの特性で決まる限界の撮影速度）の撮影をおこなうことにより、撮像時間を10秒程度まで短縮できた。また、1蛍光分子観察によく使われるsCMOSカメラで数100コマ/秒の撮影をする場合、撮影できる画像は256x256画素程度に限られるが、開発したカメラでは1,000コマ/秒でも640x640画素の撮影が可能で、下図の左端の画像に示すように、ほぼ細胞全体にわたる領域（35x35ミクロン）の超解像画像が得られる。下段のPALM像をズームアップすると、それぞれの接着斑（赤色の輪郭）の中でのナノスケールの分子集合体が超解像の精度で検出できた（下段右端の図の緑色の輪郭）。



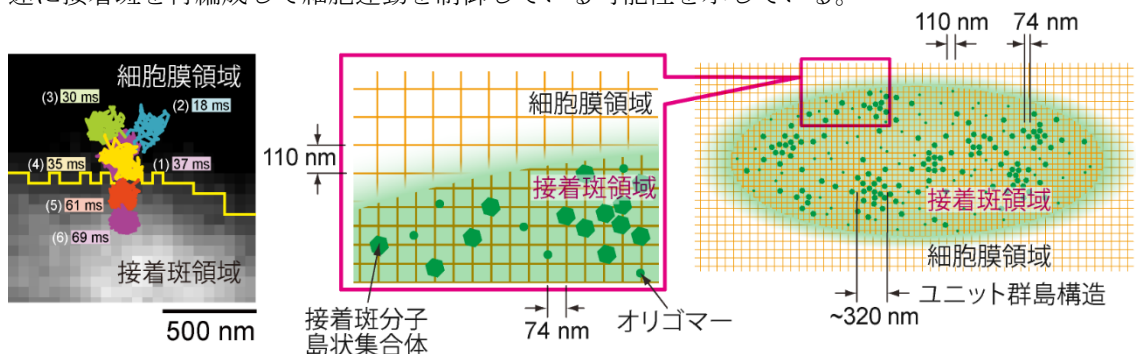
超解像 PALM/dSTORM 2 色同時観察により、パキシリン、タリン、FAK、ビンキュリンなどの接着斑構成分子がそれぞれ少数集まって形成される直径約 30 nm のナノクラスターが、直径約 320 nm の領域に集まってサブミクロンスケールの群島構造を形成する（下図）ことにより、接着斑の構造が階層的に組織化されていること、さらに、この群島構造は 10 秒程度のタイムスケールで刻々と再編成され、機能ユニットとして働いている可能性、が示された。



(5) 膜骨格の仕切りを足場にした接着斑の構造と機能の制御

接着斑内部の、群島以外の領域の細胞膜の構造を調べた。（接着斑には直接関係ない）トランスフェリン受容体の運動を時間分解能 0.167 ms (6,000 コマ/秒) で追跡したところ、接着斑の内外を拡散で出入りし、接着斑の内部でもホップ拡散で群島の間を移動できることが分かった（下図左）。接着斑内部は仕切りで占められており、仕切りのサイズ (74 nm) は外部の仕切りのサイズ (110 nm) に比べて小さく、区画あたりの滞在時間は長い。これらの結果は、群島を構成する島状集合体、それより小さいオリゴマーに加え、モノマー分子も網目の細かい仕切りに結合して、内部をホップ拡散する分子の拡散障壁となっている可能性を示している。接着分子インテグリンの場合は、接着斑内部までホップ拡散で入り、ユニット群島構造上で拡散を停止する（停留時間はミリ秒-数 10 秒まで幅広い）ことが分かった。

以上の結果は、細胞の足としてはたらく接着斑の機能制御に、ユニット群島構造と膜骨格の仕切りによる足場が重要な役割を果たしていること、また、構成分子がユニット群島内の拡散、および、接着斑内外の拡散による出入りで交換可能な接着斑の構造により、外部の刺激に応じて急速に接着斑を再編成して細胞運動を制御している可能性を示している。



本研究の成果は、2023 年 6 月、Journal of Cell Biology に 2 報の論文（超高感度・超高速カメラの開発と細胞膜の仕切りの研究、接着斑の構造と機能の研究）として同時に発表された。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 T.K. Fujiwara, S. Takeuchi, Z. Kalay, Y. Nagai, T.A. Tsunoyama, T. Kalkbrenner, K. Iwasawa, K.P. Ritchie, K.G.N. Suzuki, and A. Kusumi	4. 巻 222
2. 論文標題 Development of ultrafast camera-based single fluorescent-molecule imaging for cell biology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e202110160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202110160	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 T.K. Fujiwara, T.A. Tsunoyama, S. Takeuchi, Z. Kalay, Y. Nagai, T. Kalkbrenner, Y.L. Nemoto, L.H. Chen, A.C.E. Shibata, K. Iwasawa, K.P. Ritchie, K.G.N. Suzuki, and A. Kusumi	4. 巻 222
2. 論文標題 Ultrafast single-molecule imaging reveals focal adhesion nano-architecture and molecular dynamics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e202110162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202110162	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takahiro Fujiwara
2. 発表標題 Unraveling mesoscopic organization of the plasma membrane by ultrafast single fluorescent-molecule tracking and localization microscopy
3. 学会等名 金沢大学ナノ生命科学研究所 「NanoLSI Open Seminar」（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤原敬宏	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 1072
3. 書名 先端の分析法 第2版（澤田嗣郎 監修）第4章 第3節4項 「1分子検出蛍光顕微鏡」	

〔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
研究協力者	楠見 明弘 (Kusumi Akihiro)		

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
---------	---------