

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2010～2014

課題番号：22390374

研究課題名(和文)多光子顕微鏡によるLIVEイメージング：生きた口腔で細胞膜修復装置を明らかにする

研究課題名(英文)Live Imaging of membrane repair by high sensitive multi-photon laser microscope in vivo system.

研究代表者

三宅 克也(Miyake, Katsuya)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：30219745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：高感度多光子顕微鏡により、損傷した細胞膜修復機構を詳しく解析することができた。GFP標識された培養細胞または分離筋束内のタンパク質、dysferlin, MG53, annexin-A1, -A2, -A4, -A5, -A6, -A7, -S100および-MICAL1の膜修復のための素早い動きのLiveイメージングに成功した。また今まで不可能であった小胞が損傷部に融合する決定的瞬間を撮影することもできた。これらの結果は、細胞膜損傷により細胞内にカルシウムイオンが流入することにより、アクチンが脱重合後、小胞同士が互いに融合しながら損傷部へ融合するpatch hypothesisを強く支持する結果であった。

研究成果の概要(英文)：Plasma membrane disruption is a common form of cell injury in mammalian tissues under physiological conditions. We expressed MICAL1-, Annexins-, MG53-, dysferlin-GFPs in culture cells or in vivo, and then subjected them to a plasma membrane disruption created by a two-photon laser. Subsequent confocal imaging with a high sensitive detector unit revealed more striking wave and faster (second time-scale) accumulation of MICAL1-GFP at the disruption site comparing to MG53 or dysferlin-GFPs, followed by actin-RFP depolymerization (second time-scale). We also observed, for the first time in culture cells or living skeletal muscle cells responding to a membrane disruption, subsequent confocal imaging revealed striking accumulation of annexins (A1, A2, A4, A5, A6, A7, S100A10, S100A11)-GFPs at the disruption site. The membrane repair mechanism is now well learned at the cellular and molecular level by multi-photon laser microscope with a high sensitive detector unit.

研究分野：細胞生物学・組織学・解剖学

キーワード：細胞膜修復 細胞膜損傷 Annexin MICAL dysferlin 筋ジストロフィー 二光子 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内の細胞は、生理的な活動によって、その細胞膜は常に傷つけられている。しかしながら、細胞は細胞膜を損傷しても、その損傷膜を秒単位で修復する能力を持っている。例えば、咀嚼することにより、口腔内の上皮細胞、結合組織内の様々な細胞、筋線維などの細胞膜が傷つき修復を繰り返し、食物が消化管を通過することにより、その上皮細胞が損傷修復を繰り返す。また、歯磨きによるブラッシングによっても、歯肉の上皮細胞が損傷修復し、そのことが健康な歯茎の維持に必要であることが示唆された。また、ブラッシングによるマッサージによって、舌の筋線維も損傷修復をしていることも明らかにされている。

筋線維などの細胞は、運動等の生理的負荷により常に傷ついているが、この膜損傷は、損傷部から流入するカルシウムイオンが引き金となり、細胞内小胞のエクソサイトーシスによる細胞内からの膜供給により瞬時に損傷が修復される。しかしながら、この小胞の細胞内器官の由来は、ライソゾームなど様々な報告があり混沌としている。またこの修復に関わるタンパク質が報告されているが、明瞭な Live イメージングによる小胞融合が膜修復をする瞬間は未だ捉えられていない。我々は、筋細胞では dysferlin が膜修復に重要であることを明らかにしたが、最近ではその関連タンパク質である MG53 なども細胞膜修復に必要であることが報告され、他のタンパク質との関わりが注目されている。さらに、これらの小胞融合にはアクチン脱重合が必要であることも報告してきた。細胞膜修復には、各細胞によって特有の細胞膜修復機構が備わり、スピードは異なるが、細胞内からの損傷部への膜供給は必須と考えられる。

近年、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の技術が進み、レーザー顕微鏡検出器も高感度に改良され、迅速精細なライブイメージングを得る事が可能となり、細胞内の素早い分子の動きの解析が期待できる時期に来ている。

2. 研究の目的

本研究は、高感度検出器と二光子および一光子を組み合わせた多光子レーザー顕微鏡を用い、細胞膜修復時に関わるタンパクを GFP を指標にして、培養細胞および生体内に近い状態での精細な形態学的 Live イメージングができるシステムを確立するため、生きたマウスの口腔内などを小さな実験モデルに考えた。

細胞膜の修復には細胞外カルシウムが必要であり、損傷部から侵入したカルシウムイオンが引き金となり、細胞内小胞が瞬時に融合しながら大きなパッチ胞となり、損傷部に融合して塞ぎ、カルシウムイオンの流入を抑えることができる (パッチ仮説)。この細胞内の小胞はライソゾームであるというデー

タが示されたが、その後、明らかな小胞の由来は明瞭にされず混沌としている。この小胞の由来をまず明らかにすることが、細胞膜修復機構を解明する最も重要なテーマである。そこで、我々はカルシウムが豊富で、修復力が速いことが予想される生きた哺乳類の口腔内を小さな実験室にすることを考え、その環境を確立することを本研究課題の柱に据えた。

3. 研究の方法

多光子レーザーによる細胞膜損傷と膜修復アッセイ

二光子レーザー顕微鏡はピンホールを必要とせず、X, Y, Z 軸方向に、回数、部位、および時間を調節して、強力なレーザーをナノレベルで目的部位に照射できる。この特長を利用し、細胞膜に様々な穴を開ける方法として使用した。同時に二光子または他の様々なレーザーによってスキャンすることによって、細胞膜修復に関わる様々な分子の Live イメージングを行った。

損傷修復した膜は FM 試薬 (Invitrogen) の侵入を止め、細胞内の蛍光は上昇しない。それに比べ、カルシウムを含まない培養液またはレクチンなどの阻害剤を含む培養液中では膜修復は行われず、細胞内の蛍光は上昇し続ける。これらの細胞内に侵入して蛍光を発する FM 試薬の蛍光を経時的に測定することにより、細胞膜修復の有無を測定した。

高感度多光子顕微鏡による観察

近年、GaAsP など高感度拡張検出器ユニットや QUASAR 'スペクトル検出器を組み合わせ、レーザー顕微鏡の画像解像度および取り込みスピードをあげる取り組みが進んでいる。本研究では、正立型多光子レーザー顕微鏡 (NL0710, Zeiss) に、高感度拡張検出器ユニット (LSM BiG, Zeiss) を取り付け、GFP 標識遺伝子を導入し、目的のタンパク質を発現させた培養細胞、マウス分離筋線維または分離筋束を用いて、細胞内および生体内の LIVE イメージングを行った。FM 試薬を膜損傷マーカーとして、二光子レーザー (Ti:Sapphire Laser, input Power 3.0W at 820 nm, output 1.7-2.0 mW at 820nm, Chameleon Vision II, Coherent,) によって細胞膜の損傷を用い、488, 594, または 820nm で蛍光励起を行い、高感度拡張検出器ユニット (GaAsP 1 & 2, 2 波長蛍光) によって蛍光を得て Live イメージング (Zeiss, Zen2010) を行った。

4. 研究成果

培養細胞の膜修復関連タンパクの Live イメージング

FM4-64 (Invitrogen) を損傷マーカーとして D-PBS (+) に混ぜ、dysferlin, MG53, MICAL, annexin (A1, A2 and A5) を遺伝子導入した BS-C-1, C2C12, または A431 細胞を二光子レ

レーザーにより損傷を行い，LSM BiG による高感度動画解析を行った．その結果，カルシウム存在下で MICAL は損傷後，すぐに損傷部に向かいアクチンが脱重合するタイミングでこの集積が観察され，同時に FM4-64 で可視化された多くの小胞が損傷部で融合する様子が確認された．

分離筋線維・筋束内の膜修復関連タンパクの Live イメージング

エレクトロポレーションにより，マウス足底筋に直接遺伝子を導入し，分離筋線維，または分離せずそのまま筋束内の筋細胞の Live イメージングを行った．膜修復タンパク質として報告されている dysferlin は修復された細胞膜に素早く集積した．MG53, annexin (A1, A2, A4, A5, A6, または S100A10, -A11) ならびに MICAL を発現した筋線維は，30 秒から 10 分かかけ比較的ゆっくりと損傷中心部に集積した．しかしながら，ライソゾームは全く反応せず損傷部には融合しなかった．これらの結果は，様々なタンパク質が，損傷部から流れ込んで来たカルシウムをシグナルに，膜修復のためのそれぞれの役割を担い，絶妙なタイミングで協調する細胞膜修復機構の存在を示している．

小胞融合による細胞膜修復の決定的瞬間の細胞内 LIVE イメージングに成功

これまで，小胞融合およびエクソサイトーシスによる膜修復の報告はあるが，高速で行われる融合の決定的瞬間を撮影することはできなかった．今回，高感度検出器を備えた多光子レーザー顕微鏡により細胞内 LIVE イメージングを行なったところ，GFP タグを用いて，アネキシン(A1, A2, A4, A5, A6, A7), ならびにアネキシン結合タンパク質(S100A10, S100A11)を発現した小胞が互いに融合しながら，損傷部に融合する様子が明瞭に観察された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Kanagawa M, Lu Z, Ito C, Matsuda C, Miyake K, Toda T., Contribution of dysferlin deficiency to skeletal muscle pathology in asymptomatic and severe dystroglycanopathy models: generation of a new model for Fukuyama congenital muscular dystrophy. PLoS One. 2014 Sep 8;9(9):e106721. (査読有)
2. Araki N, Ikeda Y, Kato T, Kawai K, Egami Y, Miyake K, Tsurumaki N, Yamaguchi M., Development of an automated fluorescence microscopy system for photomanipulation of genetically encoded photoactivatable proteins (optogenetics) in live cells. Microscopy (Oxf). 2014 Jun;63(3):255-60. (査読有)

3. Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H., Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPS Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy In Vitro. PLoS One. 8(4):e61540, 2013. (査読有)
4. Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, Araki N, Nishino I, Hayashi Y. The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72). PLoS Curr. 4:e5035add8caff4., 2012. (査読有)
5. 三宅克也, 荒木伸一「高感度多光子顕微鏡による細胞膜修復の LIVE イメージング」, 顕微鏡 vol.46(Suppl.2.p.109-112), 2011. (査読無)

〔学会発表〕(計 25 件)

1. Miyake K, Goda M., Nakagawa T., Inoue S., Araki N.: Directly observed membrane disruption and resealing during centrifugation of sea urchin eggs by centrifuge polarizing microscope. J.Physiol.Sci., Vol.65, Suppl.1, p.S148, 2015. (第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 第 92 回 日本生理学会大会合同大会, 3.21-23, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015.)
2. Miyake K, Goda M., Inoue S., Araki N.: Directly observed membrane disruption and resealing during centrifugation of sea urchin eggs. The 2014 ASCB Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA, Dec.6-9, 2014.
3. 馬場智朗, 三宅克也, 川合克久, 秦勝志, 大内史子, 反町洋之, 荒木伸一: 骨格筋特異的カルパイン-3 の膜損傷時における動態. 日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会 広島大学(広島県広島市), 10.25-27, 2014.
4. 三宅克也, 江上洋平, 川合克久, 荒木伸一: ライブセルイメージングによる細胞膜修復を行う小胞膜の起源についての検討. 日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会, 広島大学(広島県広島市), 10.25-27, 2014.
5. 三宅克也, 馬場智朗, 川合克久, 秦勝志, 大内史子, 反町洋之, 荒木伸一: 骨格筋特異的カルパイン-3 の膜修復時における動態. 第 119 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 自治医科大学(栃木県下野市), 3.27-29, 2014.

6. M. Ghojani, G. Humphrey, J. Farrington, K. Miyake, K. Micheva, B. Busse, P. Blank, S. Smith, J. Zimmerberg. Multiple Antibody Co-localization Imaging of Skeletal Muscle. Biophysical Society 57th Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA, Feb.2-6, 2013.
7. 濱田 萌, 三宅克也, 松田知栄, 川合克久, 江上洋平, 林 由起子, 荒木伸一. GaAsP 搭載型多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング:細胞膜修復時におけるアネキシン結合タンパク S100A11 の動態, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, サポート高松(香川県高松市), 3.28-30, 2013.
8. 松尾巴瑠奈, 三宅克也, 塚本真由, 濱田 萌, 松田知栄, 川合克久, 江上洋平, 林 由起子, 荒木伸一. 多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング:細胞膜修復時におけるアネキシン A4 の動態, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, サポート高松(香川県高松市), 3.28-30, 2013.
9. 塚本真由, 三宅克也, 松尾巴瑠奈, 濱田 萌, 松田知栄, 川合克久, 江上洋平, 林 由起子, 荒木伸一. 多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング:細胞膜修復時におけるアネキシン A7 の動態, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, サポート高松(香川県高松市), 3.28-30, 2013.
10. 三宅克也, H.M.Fishman, H.C.Pant, J.Zimmerberg, 荒木伸一. GaAsP 搭載型多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング:イカ神経線維の細胞膜修復第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, サポート高松(香川県高松市), 3.28-30, 2013.
11. Miyake K., Egami Y., Matsuda C., Hamada M., Hayashi Y., McNeil P.L., Araki N. MICAL1 an F-actin-di 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 3.28-30, サポート高松(香川県高松市), 3.28-30, 2013.
12. Miyake K., Tanaka T., McNeil P.L., Araki N., Requirement for cholesterol in membrane repair indicates a possible mechanism by which statins cause muscle injury. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, サポート高松(香川県高松市), 3.28-30, 2013.
13. 三宅克也, 松田知栄, 濱田萌, 川合克久, 江上洋平, 林由起子, 荒木伸一:細胞膜修復時におけるアネキシン, MICAL1, およびアネキシン結合蛋白 S100 タンパクの動態とエクソサイトーシス. 日本解剖学会第 68 回中国・四国支部学術集会, 鳥取大学(鳥取県鳥取市), 10.19-20, 2013.
14. 荒木伸一, 池田結香, 加藤琢磨, 川合克久, 江上洋平, 三宅克也:水銀アーク光源蛍光顕微鏡をベースとした photo-manipulation システムの構築. 日本解剖学会第 68 回中国・四国支部学術集会, 鳥取大学(鳥取県鳥取市). 10.19-20, 2013.
15. Matsuda C., Miyake K., Kameyama K, Araki N., Nishino I and Hayashi Y., Dysferlin and affixin in sarcolemmal repair. New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference. New Orleans, LA, USA, Jun.18, 2013.
16. Miyake K., Matsuda C., Hamada M. 1, Kawai K. 1, Egami Y.1, Hayashi Y.K., McNeil P.L., Araki N. Annexins and the partner proteins S100 in Plasma Membrane Repair and Ectosome Generation.merica Society for Cell Biology, Annual Meeting, New Orleans, LA, USA, Dec.14-18, 2013.
17. Matsuda C., K Miyake, K Kameyama, H Takeshima, E Keduka, N Araki, I Nishino, YK Hayashi. Real time analysis of sarcolemmal repair mediated by dysferlin and MG53. 16th International WMS Congress, Algarve, Portugal, Oct.19, 2011.
18. 三宅克也, 松田知栄, 江上洋平, 濱田 萌, 林 由起子, 荒木伸一. GaAsP 搭載型多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング:アネキシン小胞による細胞膜修復. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 山梨大学(山梨県甲府市), 3.26-28. 2012.
19. 三宅克也, H.M.Fishman, H.C.Pant, J.Zimmerberg, 荒木伸一. GaAsP 搭載型多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング:イカ神経線維の細胞膜修復, 第 67 回中国・四国支部学術集会, 山口大学(山口県宇部市) 10.20-21, 2012.
20. 松尾巴瑠奈, 塚本真由, 濱田 萌, 三宅克也, 松田知栄, 川合克久, 江上洋平, 林 由起子, 荒木伸一. 多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング:アネキシン A4 および A7 小胞による細胞膜修復. 日本解剖学会, 第 67 回中国・四国支部学術集会. 山口大学(山口県宇部市), 10.20-21, 2012.
21. Matsuda C., Miyake K., Kameyama K, Araki N., Nishino I and Hayashi Y., Dysferlin and affixin is involved in sarcolemmal repair. 17th International congress of the World Muscle Society. Perth, Australia. Oct.10, 2012.

22. Miyake K., Egami Y., Matsuda C., Hamada M., McNeil P.L., Araki N., MICAL1 an F-actin-disassembly factor links membrane repair. America Society for Cell Biology, Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, Dec.15-19, 2012.

23. Miyake K., Egami Y., McNeil P.L., Araki N., MICAL an F-actin-disassembly factor links membrane repair. J.Physiol.Sci.,Vol.61, Suppl.1, p.S271, 2011. (第 88 回日本生理学会大会, 第 1 16 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会抄録集, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2011).

24. Miyake,K., MICAL an F-actin disassembly factor links membrane repair. Fifth Annual Dysferlin Conference, Chicago, IL, USA, July 11-14, 2011.

25. 三宅克也, 松田知栄, 江上洋平, 濱田 萌, 林 由起子, 荒木伸一. 高感度多光子顕微鏡による細胞膜修復の LIVE イメージング, 2011. 日本解剖学会, 第 66 回中国・四国支部学術集会、徳島大学(徳島県徳島市) 11.12-13, 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

三宅 克也 (MIYAKE, KATSUYA)
香川大学・医学部・准教授
研究者番号：30219745

(2)研究分担者

江上 洋平 (EGAMI, YOUHEI)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：80432780

松田 知栄 (MATSUDA, CHIE)
独立行政法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル部門・主任研究員
研究者番号：50344099

金川 基 (KANAGAWA, MOTOI)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：00448044

田中 享 (TANAKA, TORU)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号：60217049

深井 直実 (FUKAI, NAOMI)
奥羽大学・歯学部・教授
研究者番号：60134681

吉山 昌宏 (YOSHIYAMA, MASAHIRO)

岡山大学・歯学部・教授
研究者番号：10201071

(3)連携研究者

荒木 伸一 (ARAKI SHINICHI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10202748