

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：38005

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19334

研究課題名（和文）超速超高感度・偏光解消顕微鏡の開発によるアクチン膜骨格動態と神経膜拡散障壁の解明

研究課題名（英文）Development of the ultrafast depolarization detection microscope and unravelling of actin membrane skeleton dynamics and neuronal diffusion barriers

研究代表者

楠見 明弘（Kusumi, Akihiro）

沖縄科学技術大学院大学・膜協同性ユニット・教授

研究者番号：50169992

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、超高速・超高感度・偏光解消顕微鏡を開発すること、細胞膜を仕切っているアクチンコンパートメント間での膜分子のホップ運動と膜骨格の揺らぎとの相関を検証すること、神経細胞軸索起始部の拡散障壁の成因を解明することを目的とした。新たに開発した顕微鏡は偏光および輪帯照明を可能にし、細胞骨格と膜分子の同時観察を実現した。さらに、アクチン線維の揺らぎを高速でマッピングし、細胞膜上の分子の拡散運動を精密にマッピングした。特に、神経細胞の軸索起始部における拡散障壁を超える新たな脂質アンカー型分子の動態も明らかにし、その詳細なメカニズムを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された超高速・超高感度顕微鏡と、その画像に基づく画像相関法による揺らぎや拡散運動のマッピング画像は、細胞膜と膜骨格の相互作用などを詳細に観察することを可能にしたもので、細胞生物学の研究に大きな寄与をもたらす可能性がある。この技術は、細胞の生理的状態や病態を理解する上での重要な手段となる。さらに、この顕微鏡技術の応用は医学、生物学のみならず、材料科学など他分野においても新たな展開を見せる可能性がある。特に、神経細胞の軸索起始部における拡散障壁の解明は、神経細胞膜上の分子の分布の制御機構の解明に繋がるもので、神経疾患の原因や治療法開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop an ultrafast, highly sensitive, depolarizing microscope, investigate the correlation between the hopping motion of membrane molecules and fluctuations in the actin cytoskeleton (which forms membrane compartments), and elucidate the causes of diffusion barriers in the axonal initial segments of neuronal cells. The newly developed microscope enabled polarized and annular illumination, allowing simultaneous observation of the cytoskeleton and membrane molecules. Furthermore, it rapidly mapped the fluctuations of actin fibers and precisely mapped the diffusion movements of molecules on the cell membrane. Notably, it also revealed the dynamics of lipid-anchored molecules that overcome the diffusion barriers in the neuronal axon initial segments, providing detailed insights into their mechanisms.

研究分野：細胞生物物理学

キーワード：超高速・超高感度蛍光顕微鏡 偏光解消 アクチン膜骨格 神経膜拡散障壁 軸索起始部

1. 研究開始当初の背景

我々は既に世界最速の1蛍光分子顕微鏡(33 μ s分解能;ビデオ速度の1,000倍;2番目より33倍速い;通常の蛍光観察では10 μ s分解能)を開発し、超速PALMによる生細胞観察も可能にした。この方法を用い、さらに今までの研究成果を合わせて、「細胞膜はアクチン膜骨格によって仕切られており、膜分子は各コンパートメントに短時間閉じ込められては、次々と隣のコンパートメントにホップしながら拡散運動する」という発見(1万回以上引用)をさらに展開し、1蛍光分子追跡で再確認した。これを、「膜骨格フェンスモデル」と呼んでおり、このような拡散運動を、「ホップ拡散」と名付けた(図1)。

今までの方法では、ホップ拡散を、直径40nmの金コロイド微粒子を用いて実験をおこなっており、金コロイドのサイズによるアーチファクトの懸念が100%払拭できていた訳ではなかったからである。このホップの機構としては、アクチン膜骨格の暫時的な切断・細胞膜とアクチン膜骨格の揺らぎのために、両者間に、暫時的に隙間ができることなどが考えられてきた。しかし、実験的な根拠は得られていなかった。

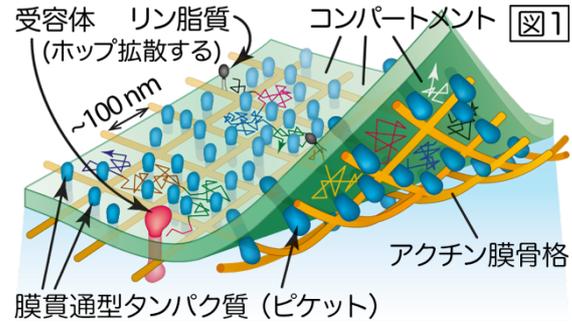


図1: 細胞膜を裏打ちし、仕切りを入れてコンパートメント化するアクチン膜骨格

一方、予備的な検討の結果、神経細胞の軸索起始部の細胞膜において、膜骨格フェンスモデルとホップ拡散について、以下のような興味深い結果が得られていた(図2)。神経細胞は、『細胞体・樹状突起』と『軸索』に分かれている。細胞膜は一続きの液体であるにもかかわらず、これら2領域に特異的な分子は混じらない。それは、軸索が細胞体に繋がる部分の軸索起始部(axonal initial segment=AIS)の細胞膜に、リン脂質でさえも(もちろん膜貫通タンパク質も)拡散できない(通さない)拡散障壁があるからである(Nakada et al. 2003 Nat. Cell Biol.)。その障壁は、AISのアクチン膜骨格の揺らぎが通常の細胞膜よりもはるかに少なく、またNa⁺チャネルなどの膜貫通タンパク分子(ピケット, 図2下)が密に結合することで出来ていると考える(図2下)。

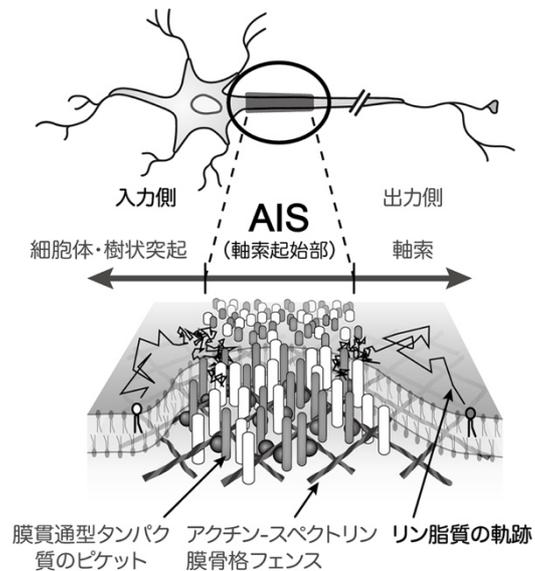


図2: 神経細胞の軸索と細胞体の間にある軸索起始部(AIS)の細胞膜には、リン脂質も通さないような拡散障壁ができる。しかし、予備実験で、この拡散障壁は、『分子種特異的』である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

第1の目的は、超速・超高感度・偏光消頭顕微鏡を開発することである。「1. 研究開始当初の背景」の欄に述べた超速・超高感度顕微鏡をベースとし、細胞骨格の局所揺らぎ(柔軟さ)を高い時間・空間分解能でマッピングして動画化する顕微鏡を開発する。この種の装置は世界初である(1分子偏光で、ほとん

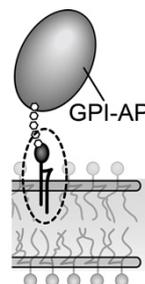


図3: GPI-APの構造。細胞外のタンパク質部分が、リン脂質のPIに共有結合で繋ぎ止められている。

ど動かない分子の向きを求める方法とは、目的が全く異なる)。細胞骨格の揺らぎ画像と同時に細胞膜での1分子観察が可能である。

第2の目的は、開発した顕微鏡を用いて、細胞膜を裏打ちし、仕切りを入れてコンパートメント化するアクチン膜骨格(図1)の揺らぎを、細胞膜全面にわたって画像化することである。細胞膜上のアクチン膜骨格だけを画像化するためのプローブ(Halo-Lifeact-PM-linker; +TMRが偏光に有用)は開発済みである(Shirai et al., 2018, PLoS One)。膜骨格の揺らぎと細胞膜分子の1分子レベルでのホップ拡散を同時観察し、膜分子のコンパートメント間のホップと膜骨格の揺らぎの相関を解明する。

第3の目的は、開発した顕微鏡を用いて、神経細胞の軸索起始部(axonal initial segment=AIS)の細胞膜にある、リン脂質でさえも拡散できない(通さない)拡散障壁の機構を解明することである。さらに、GPIアンカー型の『超拡散』の機構を解明する。

3. 研究の方法

全反射励起光の偏光スイッチは、全反射ミラーを回転させて行う。

開発した超速・超高感度・偏光解消顕微鏡を用い、アクチン骨格の揺らぎと、膜タンパク質の拡散運動をもとにした細胞マッピングを蛍光画像相関法によって行う。これらの相互相関マッピングを作成することにより、アクチン骨格の揺らぎと、膜タンパク質の拡散運動の空間相関を明らかにする。また、このソフトウェアを高速化することで、非常に多くのデータ解析を短時間で行うことを目指す。

4. 研究成果

研究成果はまだ論文として出版されていないため、2024年6月末日時点で公開できる範囲のみ、成果を記述する。

第1の目的の、超速・超高感度・偏光解消顕微鏡の開発に成功した。全反射ミラーを回転台に載せることで、効率よく簡便に偏光照明する方法を採用し、非常にうまく機能している。また、これにより輪帯照明も可能にした。細胞骨格と細胞膜分子の同時観察ができるようにした。

第2の目的である、開発した顕微鏡を用いて、細胞膜を裏打ちすると同時に細胞膜に仕切りを入れてコンパートメント化するアクチン膜骨格の揺らぎを、細胞膜全面にわたって画像化することに成功した。1本ずつのアクチン線維を見るという方法ではなく、細胞膜上のアクチン膜骨格の局所揺らぎを、光学顕微鏡の分解能で、画像相関を計算してマッピングする方法でおこなった。さらに、膜分子の局所拡散運動も、膜分子の画像の相関画像を得ることで、細胞膜全面にわたって拡散運動に基づく画像を得た。これらをムービー全体に行うことで、相関マッピングの時間変化を追えるようにした。実際には、細胞膜分子3種(CD59, CD86, LDL受容体)について、これを行った。さらに、これら両者の相互相関ムービーも得られるようにした。そのため、これらの計算を高速で行うソフトウェアの開発に注力した。アクチン膜骨格の局所揺らぎと、膜分子の局所拡散運動の細胞膜全面にわたる相関が分かってきた。

第3の目的については、AISの細胞膜において、「脂質アンカー型膜分子で親水性部分が大きく極性が高い分子は、膜の片面を1nm程度外側に移動して(浮いて)、区画の仕切り(特にピケット; 図1)をかわすことで仕切りを次々と越えていく」ことが分かってきた。このような拡散障壁と超拡散の生物学的意義としては、「AIS膜の拡散障壁は、神経細胞の膜分子局在制御の基本であるが、脂質アンカー型分子のように拡散障壁に影響されない分子種も細胞には必要で、それらがうまく統合されるようになっている」ということであると考えられる。細胞膜の内側表面でも、脂質アンカー型の重要シグナル分子RasとLynがAISを越えて拡散する様子が捉えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suzuki Kenichi G.N., Kusumi Akihiro	4. 巻 1865
2. 論文標題 Refinement of Singer-Nicolson fluid-mosaic model by microscopy imaging: Lipid rafts and actin-induced membrane compartmentalization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 184093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2022.184093	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 Fujiwara Takahiro K., Tsunoyama Taka A., Takeuchi Shinji, Kalay Ziya, Nagai Yosuke, Kalkbrenner Thomas, Nemoto Yuri L., Chen Limin H., Shibata Akihiro C.E., Iwasawa Kokoro, Ritchie Ken P., Suzuki Kenichi G.N., Kusumi Akihiro	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 Journal of Cell Biology	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) 10.1083/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

1. 著者名 Fujiwara Takahiro K., Takeuchi Shinji, Kalay Ziya, Nagai Yosuke, Tsunoyama Taka A., Kalkbrenner Thomas, Iwasawa Kokoro, Ritchie Ken P., Suzuki Kenichi G.N., Kusumi Akihiro	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 Journal of Cell Biology	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) 10.1083/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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kusumi Akihiro
2. 発表標題 Development of ultrafast camera-based single fluorescent-molecule imaging for cell biology
3. 学会等名 OPTICA Biophotonics Congress: Optics in the Life Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kusumi Akihiro
2. 発表標題 Development of ultrafast single fluorescent-molecule imaging and discovery of the metastable nano-liquid signaling hub on the plasma membrane
3. 学会等名 Minisymposium on developments and applications of advanced fluorescence technologies (招待講演) (国際学会)
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