

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770167

研究課題名(和文) デジタル画像相関法を用いた細胞骨格空間ダイナミクス解析法の確立

研究課題名(英文) Measurement of cellular dynamics using digital image correlation method

研究代表者

水谷 武臣 (Mizutani, Takeomi)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40451405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：デジタル画像相関法を用いて、生きた細胞内の細胞骨格の動きを評価する方法の確立を目指した。細胞骨格をイメージングするツールを作製し、細胞骨格の動きを解析した。細胞骨格間に力学的な相互作用が存在することが示唆された。この手法の確立を通じて、細胞骨格間の力学相互作用の評価や3次元環境下での細胞が出す力の評価へと展開することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Using live cell imaging and digital image correlation method, we measured cytoskeletal dynamics. This method will be helpful to study mechanical interaction between cytoskeletons or cellular contractile force in 3D.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

GFP(Green Fluorescent Protein)などの蛍光タンパク質は、他のタンパク質との融合タンパク質として用いることで、細胞内の特定のタンパク質の局在を明らかにするツールとして大変有効である。生きた細胞内で発現させることが出来るため、単に局在を明らかにするだけでなく、局在の時間変化も知ることが出来る。このツールを用いて多くの研究者が、細胞運動、細胞分裂、外部からの刺激環境下、等における特定のタンパク質の局在変化を調べている。

細胞の運動等を議論する上では、タンパク質の局在に加えて、その物理量を測定することが重要だと考えられている。そこで、生きた細胞内における特定のタンパク質の局在を観察する手法を元に、細胞内でのそのタンパク質の「流れ」や細胞骨格のような弾性体を想定したときの「歪」を測定する手法が幾つか提案されてきた。

従来の方でライブイメージングから「歪」を算出する場合、手作業による解析が主であった(例えば $\alpha$ -actinin のドット間の距離をマニュアルで計測する)。しかしながらこの方法では、画像内の特徴的な点を人が判断するために、対象とするタンパク質の局在に対する制約が存在する。一方、本研究では、画像の蛍光強度分布を元に「歪」解析を行うため、アクチン繊維のように一見すると一つながりの繊維に見えても、解析アルゴリズムにより、その繊維中に発生する「歪」を解析することが可能になる。また、FRAPを用いた「流れ」解析では、局所的な情報は得られても、細胞全体や細胞集団全体に対する空間分布を測定することはできない。これらの問題点を解決するような手法開発が必要であると考える。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞骨格上に発生する「歪」と「流れ」の空間変化を測定する手法を開発する。蛍光タンパク質タグを付した細胞骨格タンパク質を細胞内に発現させて、タイムラプス観察を行う。得られた画像を数値解析することで、「歪」と「流れ」の物理量を抽出する。既存の方法(マニュアルによる歪解析、Fluorescent recovery after photobleachingによる流れ解析、等)とは異なり、物理量の空間分布が測定出来ること、蛍光タグを付したタンパク質であれば測定対象が細胞骨格にとらわれないこと、多くの研究者が利用しているライブセルイメージングに対する数値解析法を確立するので汎用性が高いこと、が本研究の特色である。また、この解析を高精度でおこなうための、細胞や細胞集団の細胞骨格、細胞接着や細胞内張力等に関係する情報分子の分布やその時間変化の観測法の最適化をおこなう。これらによって、細胞が運動する際の細胞骨格のダイナミクス

や細胞骨格間の相互作用をしらべる。また3次元環境下での細胞が出す力の測定に向けた提案を行う。

### 3. 研究の方法

細胞内での細胞骨格間の力学バランスを明らかにする、もしくは、細胞が出す力の測定法を模索するために、本研究では以下のことに取り組んだ。

- (1) 細胞骨格に発生する物理量測定法の確立と細胞骨格間の力学的相互作用の検証
- (2) 細胞が出す力によって細胞外基質に発生させた変形を評価する方法の確立

### 4. 研究成果

(1) 細胞骨格に生じた物理量を評価する手法の開発を行った。蛍光標識した対象物が動く様子を一連の画像として撮影し、画像間での同一点の探索から対象物の変位の空間分布を求めるプログラムを作成した(画像相関法)。開発したプログラムを用いて、蛍光タグ付き中間径フィラメント(vimentin)を細胞に発現させ、他の細胞骨格フィラメントであるアクチン繊維を崩壊させる試薬(Cytochalasin D)を投与した際における中間フィラメント繊維に発生した変形を評価した(図1)。さらに平行移動成分と歪成分の平均値を解析し、時間変化を評価した。

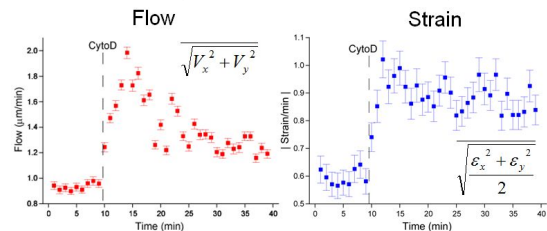


図1 中間径フィラメントに生じた変形解析

アクチン繊維の崩壊とともに平行移動成分、歪成分の両方ともに上昇すること、平行移動成分についてはその後減少してゆくことを発見した。これらの結果は、細胞内でアクチン繊維とビメンチン繊維が力学的に相互作用していることを示唆している。

さらに、他の細胞骨格である微小管とビメンチン繊維との力学的相互作用を明らかにするため、蛍光タグ付き中間径フィラメントと微小管(tubulin)を発現させた細胞に対して、微小管を崩壊させる試薬(Nocodazole)を投与し、その際の中間径フィラメントに発生した変形を画像相関法によって評価した。さらに、変位の空間分布から歪の平均値の時間変化を評価した(図2)。

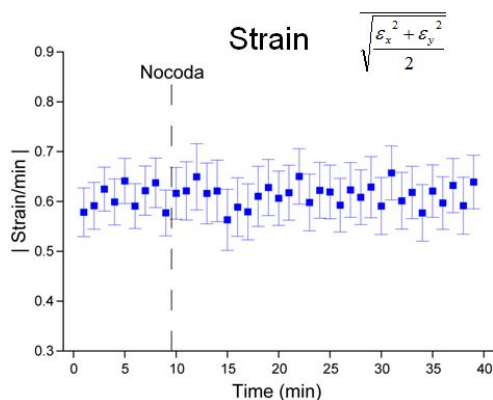


図2 微小管崩壊下での中間径フィラメントに生じた変形解析

アクチン繊維を崩壊させたときとは異なり、中間径フィラメント繊維には有意な歪は生じなかった。この結果は、微小管は中間径フィラメントとさほど大きな力での相互作用をしていないか、もしくは、微小管の物性値がアクチン繊維よりも小さいか、どちらかの可能性を示唆している。

画像相関法プログラムの開発と細胞骨格タンパク質発現用プラスミドの構築によって、細胞骨格に生じた変形を評価することが可能となり、さらには、細胞骨格間の力学バランスを議論することが可能となった。

(2) 細胞が出す力によって細胞外基質に発生させた変形を評価する方法の確立を模索した。細胞外基質の一つであるコラーゲンを蛍光標識した。また、細胞膜を構成するタンパク質に GFP を結合させ、それを発現する細胞を構築した。細胞をミックスした状態でコラーゲンをゲル化させた。こうすると、3次元環境下で活動する細胞と細胞外基質を生きたまま観察することが出来る(図3)。

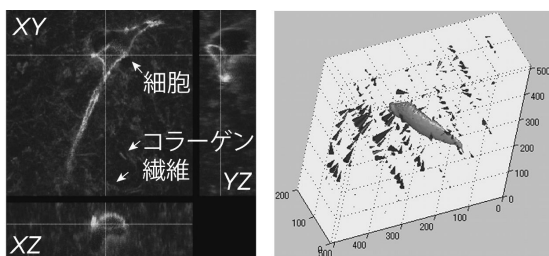


図3 3次元環境下に存在する細胞のイメージング(左)とコラーゲン基質に生じた変形の空間分布解析(右)

タイムラプス撮影をし、得られた画像に対して画像相関法を用いて解析すると、3次元での細胞が出している力に依存した変形を評価することが可能となった。現在、得られた数値の妥当性の評価を進めている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

(1) T. Mizutani, K. Takeda, H. Haga, M. Todo, K. Kawabata:

"Modulation of extracellular conditions prevents the multilayering of the simple epithelium"

Histochemistry and Cell Biology, Vol. 141(5), (2014) 459-471. 【査読有】

DOI: 10.1007/s00418-013-1176-8.

(2) R. Tanaka, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata:

"Tempo-Spatial Change of Cellular Stiffness and Geometry in the Process of Developing Epithelial Cell-Cell Adhesion Measured by Atomic Force Microscopy"

Japanese Journal of Applied Physics Conference Proceedings, Vol. 1 (2013) 011004 (7 pages). 【査読有】

DOI: 10.1143/JJAPCP.1.011004.

(3) S. Ishihara, M. Yasuda, T. Nishioka, T. Mizutani, K. Kawabata, H. Shirato, H. Haga:

"Irradiation-tolerant lung cancer cells acquire invasive ability dependent on dephosphorylation of the myosin regulatory light chain"

FEBS Letter, Vol. 587(6), (2013) 732-6. 【査読有】

DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.055.

(4) K. Takemoto, T. Mizutani, K. Tamura, K. Takeda, H. Haga, K. Kawabata:

"The number of cyclic stretch regulates cellular elasticity in C2C12 myoblasts"

CellBio, Vol. 1(1), (2012) 1-10. 【査読有】

DOI: 10.4236/cellbio.2012.11001.

(5) N. Seito, T. Yamashita, Y. Tsukuda, Y. Matsui, A. Urita, T. Onodera, T. Mizutani, H. Haga, N. Fujitani, Y. Shinohara, A. Minami, N. Iwasaki:

"Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice"

Arthritis & Rheumatism, Vol. 64(8), (2012) 2579-88. 【査読有】

DOI: 10.1002/art.34463.

(6) 水谷 武臣:

"2次元と3次元環境下での細胞と細胞骨格の力学計測"

M&M2012 材料力学カンファレンス論文集 (2012) OS1101. 【査読無】

(7) K. Tamura, T. Mizutani, H. Haga, K.

Kawabata:

"Active fluctuation in the cortical cytoskeleton observed by high-speed live-cell scanning probe microscopy"

Acta Biomaterialia, Vol. 7(10), (2011) 3766-3772. 【査読有】

DOI: 10.1016/j.actbio.2011.06.013.

〔学会発表〕(計8件)

水谷 武臣: 細胞の力学コミュニケーション, 大阪府立母子保健総合医療センター研究所セミナー, 2013年11月6日, 大阪府立母子保健総合医療センター研究所(和泉市)

R. Tanaka, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata: Tempo-spatial Change of Cellular Stiffness in the Process of Developing Epithelial Cell-cell Adhesion Measured by Atomic Force Microscopy, 20th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2012年12月17日, Okinawa Kariyushi Urban Resort Naha(那覇市).

水谷 武臣: 2次元と3次元環境下での細胞と細胞骨格の力学計測, M&M2012 材料力学カンファレンス, 2012年9月22日, 愛媛大学(松山市).

R. Tanaka, T. Mizutani, H. Haga, K. Kawabata: Evaluation of microtubule deformation by live cell imaging and image analysis, 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月22日, 名古屋大学(名古屋市).

水谷 武臣: 画像解析を用いた細胞内外の力学量計測, 第四回「光塾」, 2012年8月26日, 北海道大学(札幌市).

田中 良昌、水谷 武臣、芳賀 永、川端和重: 細胞骨格に発生した不均一な歪み: ライブセルイメージングと画像解析による力学量測定法の提案, 2011年度日本生物物理学会北海道支部例会, 2012年3月6日, 旭川市民文化会館(旭川市)

T. Mizutani: Imaging for Cellular Mechanics: Dynamic Behavior of Cytoskeletal Networks and Cellular Contractile Force, The Fifth Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology, 2011年11月5日, Huashia Hotel (China).

水谷 武臣: 細胞の時空間ダイナミクス計測: ライブセルイメージングから細胞骨格の力学バランスと細胞が発生する力をみる, 九州大学共同利用研究会, 2011年9月21日, 九州大学(福岡市).

〔その他〕

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g3/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水谷 武臣 (MIZUTANI TAKEOMI)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 40451405