

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440091

研究課題名(和文) 多重染色超解像顕微鏡による細胞骨格と接着斑のパターン形成機構の解明

研究課題名(英文) The spatial patterning mechanisms of cytoskeletons and focal adhesions analyzed by multitarget super-resolution microscopy

研究代表者

木内 泰 (Kiuchi, Tai)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70443984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン細胞骨格、微小管、中間径フィラメント、接着斑の空間パターンの形成機構を調べるために多重染色超解像顕微鏡法IRISを用いて、それぞれの構造の空間的な位置関係を光の回折限界以下の分解能で解析した。その結果、細胞の場所に応じて中間径フィラメントがアクチン線維や微小管に近接していた。また微小管の伸長は、アクチンストレスファイバーの配置に影響を受けていた。これらの結果は、それぞれの細胞骨格や接着斑は、互いに相互作用しながら空間的なネットワークを形成していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：To investigate the spatial patterning mechanisms of actin filaments, microtubules, intermediate filaments and focal adhesions, these spatial relationships in a diffraction-limited area were analyzed by multitarget super-resolution microscopy, IRIS. These multiplexed super-resolution images showed area-specific proximity between cytoskeletons and focal adhesions. The combination of IRIS with live-cell imaging of microtubule tips showed that the speed and direction of microtubule growth is highly influenced by collision and subsequent interaction with actin stress fibers. These results suggest that the formation process of cytoskeletal structures dynamically interact with each other.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞骨格 超解像顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

細胞が方向性をもって移動していくためには、アクチン線維や微小管、中間径フィラメントといった細胞骨格や細胞外基質との接着構造を適切な空間パターンで配置する必要がある。細胞内ではアクチン線維は、重合と脱重合を繰り返し、微小管も伸長と退縮を繰り返す。このため、これらの細胞骨格の配置パターンは極めて動的である。さらに近年ストレスファイバーに沿って伸びる微小管やアクチン線維の求心性流動と同じ速度で動く微小管が観察され、アクチン線維と微小管を架橋するタンパク質として MACF1/ACF7、APC、CLASP も報告されている。また微小管と接触した接着斑の崩壊も観察されている。このことから細胞は、機能の異なる細胞骨格や接着斑を相互作用させることでそれぞれの構造を適切なパターンで動的に配置し、方向性のある移動という高度な機能を実現していると予想される。しかし従来の光学顕微鏡の分解能では、一見すると細胞内を縦横無尽に走っているように見える細胞骨格や接着斑の微小空間での位置関係の解析には不十分であった。このため細胞骨格と接着斑のパターン形成機構については不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

近年、光学顕微鏡の分解能を超えた超解像顕微鏡が開発され、細胞内の微細な構造が観察されている。しかし、蛍光色素を用いることから同一の細胞で観察できるタンパク質は 2~3 種類が限界であった。本研究では、研究代表者が開発した多重染色超解像顕微鏡法 IRIS を用いて、アクチン線維や微小管、中間径フィラメント、接着斑の分布を光の回折限界以下の範囲で解析する。そのために各構造を IRIS で可視化する蛍光プローブを作製する。そして光学顕微鏡では一見無秩序に見える細胞骨格や接着斑の分布に多重染色超解像で秩序と法則性を見出し、そのパターン形成機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞内の微細構造を解析するためには、光学顕微鏡の分解能を超えた超解像顕微鏡が有効である。特に PALM や STORM といった単分子可視化法を応用した超解像顕微鏡では、その分解能は 20 nm まで到達している。しかし、分解能が高くなったことで標的分子を非常に高い効率でラベルしなくては、標的分子の分布を正確に可視化できないという問題点が指摘されている。さらに蛍光色素を用いることから同一の細胞で観察できるタンパク質は 2~3 種類が限界である。研究代表者が開発した超解像顕微鏡 IRIS は、PALM/STORM のラベル方法を改良し、内在性タンパク質に結合解離する蛍光プローブを導入することで、このラベリングと多色の二つの問題を解決した。この蛍光プローブを

固定した細胞に加え、標的分子に結合したプローブの中心点をナノメータ精度で決定する(図1)。このプローブの結合解離を多数の蛍光画像で取得し、それらの中心点を積算することで超解像画像を再構築する。プローブは結合解離しているため、測定する蛍光画像の枚数に比例して高密度に標的分子をラベルすることができる。さらに結合解離しているプローブは簡単に洗い流し、別の標的に対するプローブと交換できる。このため複数の標的を連続的に可視化する多重染色超解像イメージングが可能である。本研究では、アクチン線維を可視化する結合解離プローブとしてアクチン結合性ペプチドである lifeact を用いた。また微小管、中間径フィラメント、接着斑を可視化する結合解離プローブを各構造に局在するタンパク質からフラグメントを作製し、標的構造に対して結合解離するものをスクリーニングした。

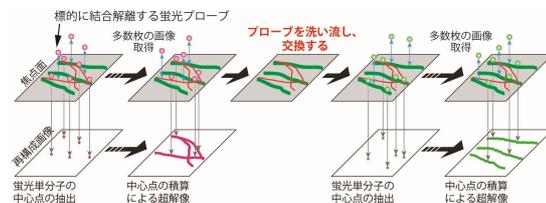


図1: IRIS 超解像顕微鏡法の模式図

4. 研究成果

(1) IRIS 超解像イメージングによるアクチン細胞骨格の可視化:

アクチン結合性ペプチドである lifeact のアクチン線維上での結合解離を蛍光単分子可視化法で計測した。In vitro で重合させたアクチン線維上での結合解離を観察したところ、アクチン線維上での滞在時間の半減期は、23 ms であった。また1本のアクチン線維の太さは、23 nm の半値幅で可視化できた。このことは IRIS 方式の超解像顕微鏡法の分解能は、従来の超解像顕微鏡法の中でも最も高い分解能に匹敵していることを示している。さらにアクチン線維 1 μm あたりの標識密度は、1200 まで到達した。アクチン線維には、1 μm あたり 360 個の単量体アクチンが存在している。単量体アクチンの大きさは、約 5-6 nm であるため、大きさが 10 nm 以上の抗体は、1 μm あたり最大でも 180 個しか結合できない。このことから、アクチン線維に結合解離を繰り返す lifeact を用いた IRIS 方式の標識方法ならば、抗体の最大標識密度の 66 倍まで到達できた。このように高密度で標識することで、1本のアクチン線維を連続的な構造物として可視化できた(図2)。固定した XTC 細胞のアクチン細胞骨格を可視化した結果、従来の光学顕微鏡では観察できない微細なアクチン線維が観察できた(図3)。

(2) 微小管、中間径フィラメント、接着斑を可視化する IRIS 用プローブの作製:

微小管結合タンパク質 (EB1, CLIP-170, CLASP2γ, APC, KIF1A, MAP4, Tau) 中間径フ

フィラメント結合タンパク質 (Plectin-1) 接着斑局在タンパク質 (Paxillin, Vinculin, Talin-1, Src, FAK, PIPKI γ -90) のフラグメントを 46 種類作製した。293 細胞にこれらのフラグメントを発現させ、その細胞溶解液を取得した。固定した XTC 細胞にそれぞれのフラグメントを含む細胞溶解液を加え、標的構造に対する結合解離を単分子可視化法で観察した。その結果、18 種類のフラグメントが標的構造上で結合解離していた。

(3) 3つの細胞骨格と接着斑の多重染色超解像観察：

スクリーニングの結果得られたプローブと lifeact を用いて、同一の細胞でアクチン線維と微小管、中間径フィラメント、接着斑の多重染色超解像画像を得た (図 4)。細胞の中心に近い領域では中間径フィラメントがアクチン線維に絡みつき、微小管には絡んでいないことが観察された。一方細胞の辺縁部では、逆に中間径フィラメントはアクチン線維には絡まらず、微小管に絡み付いていることが観察された。また TIRF 照明と Epi 照明で交互に蛍光単分子画像を取得することで、細胞の底面と全体の超解像画像をそれぞれ再構築した。その結果、接着斑やアクチンストレスファイバーの近傍では、微小管は接着斑の約 100 nm 上を走っていた。この接着斑やアクチンストレスファイバー近傍での微小管の伸長を観察するために EB1-EGFP のライブイメージングを行った。その後 IRIS 超解像画像を取得した。その結果、微小管はアクチンストレスファイバーに衝突を繰り返しながら、その伸張方向を 3 次的に変化させていることが明らかになった。これらの結果からそれぞれの細胞骨格と接着斑は、相互に相互作用しながら空間的なネットワークを形成していることが示唆された。

これらの研究成果は、Nature Methods (Kiuchi et al., 2015)、生体の科学 (2016)、感染・免疫・炎症 (2016) に報告した。特に多重染色超解像の画像は、Nature Methods 誌の 8 月号の表紙を飾った。さらに 2015 年の日本細胞生物学会 (6/30-7/2 東京) のシンポジウム、2016 年の日本蛋白質科学会 (6/7-9) のシンポジウムで招待講演し、多くの研究者から評価されている。また大学のプレスリリース (2015/7/7)、日刊工業新聞 (2015/7/7)、京都新聞 (2015/7/27)、朝日新聞 (2015/8/13) でも紹介され、社会的にも注目されている。またこの IRIS 方式の超解像顕微鏡法は、2015 年 3 月 11 日に国内特許に出願し、2016 年 3 月 11 日に PCT 出願も果たした。

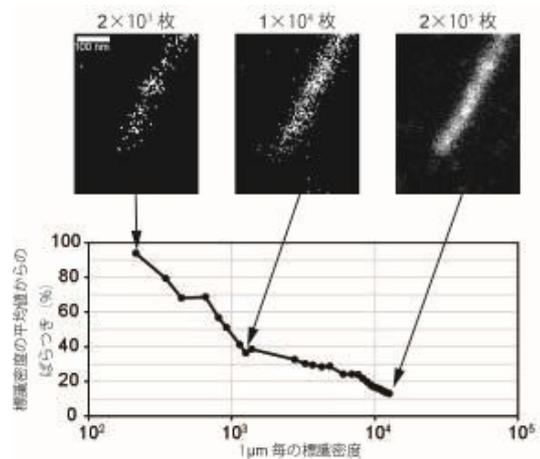


図 2 : アクチン線維を用いた標識密度に応じた超解像の画質向上の検証。標識密度が増加するに従って、再構成される超解像画像がスムーズに標識され画質が向上し (上の画像)、標識のばらつきが減少する (下のグラフ)。画像の上部の数字は、超解像画像を作成するために使った元蛍光画像の枚数。

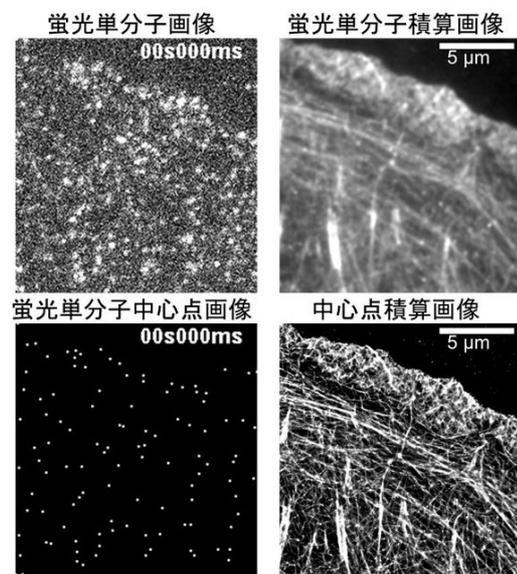


図 3 : アクチン細胞骨格の IRIS 超解像イメージング。固定した XTC 細胞に Atto488-lifeact を加えて、蛍光単分子画像を 50 万枚取得した (左上)。それぞれの蛍光単分子画像の蛍光単分子の中心点をガウス分布で決定し、蛍光単分子中心点画像を作成した (左下)。蛍光単分子画像を積算すると従来の蛍光顕微鏡で得られるアクチン細胞骨格の蛍光画像と同様の画像が得られた (右上)。蛍光単分子中心点画像を積算するとアクチン細胞骨格の超解像画像が得られた (右下)。

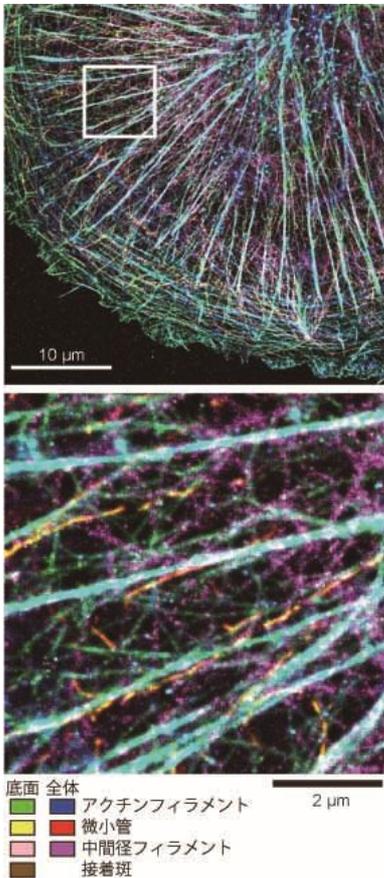


図4: IRISによるアクチン線維、微小管、中間径フィラメント、接着斑の多重染色超解像イメージング。TIRF照明とEpi照明で細胞の底面と全体でそれぞれ超解像画像を再構築した。下図は、上図の白い枠の拡大画像。

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4件)

木内 泰, 渡邊 直樹, 超解像顕微鏡法 IRIS の開発による無制限多重染色と高精細な画質の実現, **感染 免疫 炎症**, 査読無し, 46(2), 34-45, 2016

木内 泰, 渡邊 直樹, 高密度・多重染色超解像蛍光顕微鏡法 IRIS の原理と実践, **生体の科学**, 査読無し, 67(3), 270-276, 2016

Kiuchi T, Higuchi M, Takamura A, Maruoka M, Watanabe N, Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes., *Nature Methods*, 査読有り, 12, 743-746, 2016, doi: 10.1038/nmeth.3466

Yamashiro S, Mizuno H, Smith MB, Ryan GL, Kiuchi T, Vavylonis D, Watanabe N, New single-molecule speckle microscopy reveals modification of the retrograde actin flow by focal adhesions at nanometer scales., *Mol. Biol. Cell*, 査読有り, 25, 1010-1024, 2014, doi: 10.1091/mbc.E13-03-0162.

[学会発表](計5件)

T Kiuchi, N Watanabe, Multitarget super-resolution imaging of cytoskeletons and

focal adhesions, IGER International Symposium on "Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage", 2016年12月12-13日, 名古屋大学 ES 総合館 ES ホール(愛知県名古屋市)

木内 泰, 結合解離プローブを用いた超解像顕微鏡法 IRIS による高密度標識・多重染色イメージング, 日本蛋白質科学会, 2016年6月7-9日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

木内 泰, 渡邊 直樹, 超解像顕微鏡 IRIS による細胞骨格の多重染色イメージング, 生体運動合同班会議, 2016年1月8-10日, キャンパスプラザ京都(京都府京都市)

T Kiuchi, N Watanabe, IRIS, new concept super-resolution microscopy that produces superfine multi-target images by high density labeling., The American Society for Cell Biology, 2015年12月12-17日, San Diego (USA)

木内 泰, 山城 佐知子, 渡邊 直樹, 細胞骨格や接着斑で形成される細胞内微細構造の多重染色超解像イメージング, 日本細胞生物学会, 2015年6月30日-7月2日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 結合解離プローブを用いた観察方法
 発明者: 木内 泰, 渡邊 直樹
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特許願 2015-048692 号
 出願年月日: 平成 27 年 3 月 11 日
 国内外の別: 国内

名称: 結合解離プローブを用いた観察方法
 発明者: 木内 泰, 渡邊 直樹, 三好 拓志, 佐々木 瞭
 権利者: 同上
 種類: PCT 出願
 番号: PCT/JP2016/057817
 出願年月日: 平成 28 年 3 月 11 日
 国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ:
<http://www.pharm2.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木内 泰 (KIUCHI, Tai)
 京都大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号: 70443984