

68. 細胞のメカノセンスとシグナル伝達はいかに収束するか

渡邊 直樹

*京都大学 大学院医学研究科 神経・細胞薬理学

Key words : 細胞骨格, メカノセンス, シグナル伝達, 超解像顕微鏡, 細胞分子イメージング

緒言

細胞のメカノセンスとシグナル伝達のクロストークを高い時空間解像度で描出するための細胞分子イメージング eSiMS 顕微鏡や多重超解像顕微鏡 IRIS の開発と応用を行った。

方法、結果および考察

生体分子は、様々な相互作用を介し分子複合体を形成しつつ生命機能を支えている。われわれは、高密度標識による高精度画像と無制限の多重染色を実現した超解像蛍光顕微鏡法 IRIS の開発に成功した^{1,2)}。これは、2014 年ノーベル賞を受賞した超解像顕微鏡の問題を克服し、その能力を拡張する新コンセプトの超解像顕微鏡である。既存の代表的な超解像顕微鏡法の 1 つ PALM/STORM 法では、12 nm ほどの蛍光抗体のサイズや外来から導入可能な蛍光分子の密度の上限から、原理的に解像度を 20 nm 以下にすることは原理的に困難であり、実際の画像にもくムラが生じやすいことが、顕微鏡の分解能が向上したことにより判明した「超解像ジレンマ」として、ここ数年クローズアップされていた。それに対し、われわれの IRIS 法は、迅速に結合解離を繰り返すプローブを用いて標的タンパク質を可視化するアイデアにより、従来法にない精細かつ忠実な画像が得られることを見出した (図 1)。さらに、プローブを洗い流して順次別のプローブと交換することで、上限のない種類のタンパク質の分布を同一標本内で観察できた (図 2)。

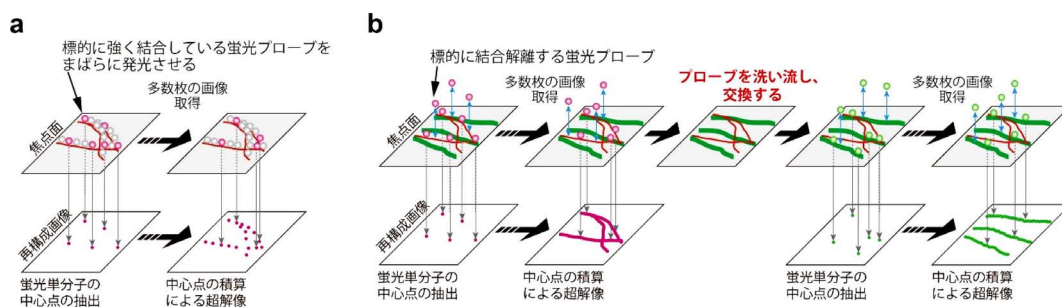


図 1. 超解像顕微鏡法 PALM/STORM と比較した IRIS の優位性

(a) PALM/STORM 法では、標的に蛍光抗体や蛍光タンパク質ををまばらに発光させる。多数の画像を用い、それらの中心点を積算することで超解像画像を再構成する。(b) IRIS 法では、標的に繰り返し結合・解離する蛍光プローブを用い結合位置を抽出し、超解像画像を再構成する。IRIS では取得する画像枚数を増やすことで標識密度を高めることができる。また、プローブを順次交換することで無制限の多重染色が可能である。

*現所属：京都大学 大学院生命科学研究所 分子動態生理学
京都大学 大学院 医学研究科 神経・細胞薬理学 (兼務)

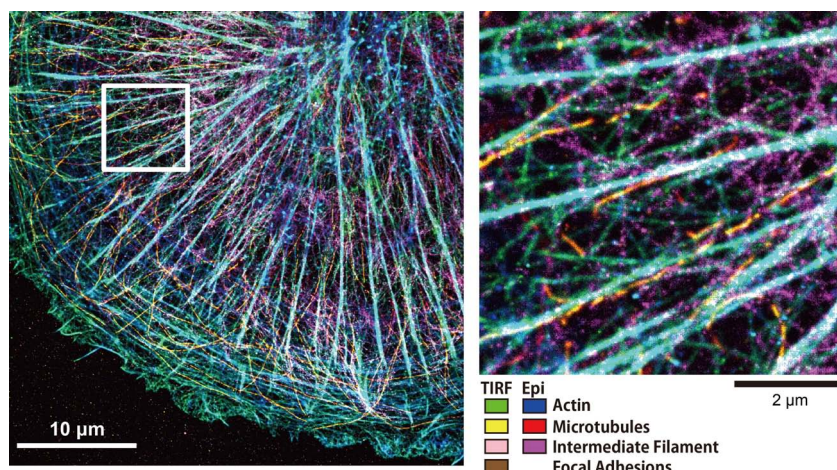


図2. IRISによる多重染色超解像

細胞の底面、および全体で可視化されたアクチン線維、微小管、中間径フィラメント、接着斑。

IRIS法は、通常の免疫組織学的な手法に比べ、①無制限の多重染色、②高密度標識による忠実な超解像画像、③狭い領域にある複数分子配置の正確な可視化、④細胞や組織全体を俯瞰、⑤3次元超解像への拡張性、⑥タンパク間相互作用のマッピングといった様々なメリットをもたらすことが期待されており、現在、光学系の最適化や多種の標的に対するプローブライブラリーの作製を進めている。

また、先行研究^{3,4)}において開発された電気穿孔法による高効率分子標識が可能な細胞分子イメージング法 eSiMS 顕微鏡を用いて、細胞のメカノセンスとシグナル制御のクロストークの解明を進めた。同法は、初代培養の細胞系でも容易に分子可視化を最適化できるため、高速細胞運動のモデル細胞系であるキンギョのケラトサイトを用い、II型ミオシンの収縮力がアクチン線維を安定化させることを確認した。この結果は、2010年にNature誌に掲載されたWilsonら⁵⁾の結論とは正反対の性質を明らかにするとともに、分子の直接観察による精度の高い検証の重要性を示している(投稿中)。eSiMS法は、細胞外マトリクスと接着機構、細胞増殖シグナルに関わる分子間の相互作用の解明に応用することで、これらの機構の相互作用について新しい知見が得られつつある。

文 献

- 1) Kiuchi T, Higuchi M, Takamura A, Maruoka M, Watanabe N. Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes. *Nat Methods*. 2015 Aug;12(8):743-6. doi: 10.1038/nmeth.3466. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26147917
- 2) 木内泰, 渡邊直樹 (2016) 高密度・多重染色超解像顕微鏡法 IRIS の原理と実践 生体の科学 第 67 巻 第 3 号 270-276
- 3) 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*. 2014 Apr;25(7):1010-24. doi: 10.1091/mbc.E13-03-0162. Epub 2014 Feb 5. PMID: 24501425
- 4) Yamashiro S, Mizuno H, Watanabe N. An easy-to-use single-molecule speckle microscopy enabling nanometer-scale flow and wide-range lifetime measurement of cellular actin filaments. *Methods Cell Biol*. 2015;125:43-59. doi: 10.1016/bs.mcb.2014.10.013. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25640423
- 5) Wilson CA, Tsuchida MA, Allen GM, Barnhart EL, Applegate KT, Yam PT, Ji L, Keren K, Danuser G, Theriot JA. Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature*. 2010 May 20;465(7296):373-7. doi: 10.1038/nature08994. PMID: 20485438
- 6) 山城佐和子, 渡邊直樹 (2015) 細胞骨格 (アクチン系) 生体の科学 第 66 巻 第 5 号 504-505