

うちの とくいわざ

超高速・超解像 1 蛍光分子局在顕微鏡法



京都大学
物質-細胞統合システム拠点、および、再生医科学研究所



京都大学
物質-細胞統合システム拠点

楠見 明弘

藤原 敬宏

近年、1 蛍光分子イメージングの進歩がめざましい。それによって、分子間の結合や集合が、生細胞中で直接に見えるようになった。結果はすさまじいもので、既成概念を覆す発見が相次いでいる (Kusumi et al., 2014)。例えば、我々は「細胞膜に仕切りが入っていること」を見だし、細胞膜の概念にパラダイムシフトをもたらした (Kusumi et al., 2005)。

我々は最近、世界最高速で蛍光分子を1 分子追跡できる高感度カメラを開発することに成功した。このカメラを用いた1 分子追跡装置では、1 分子の位置決め精度を10nm レベルに保ったまま、その分子を、時間分解能を33 マイクロ秒で追跡できた (通常のビデオ速度の1,000 倍)。これには、カメラシステムの開発はもちろん、顕微鏡とのマッチング、蛍光プローブの選定、ターゲット分子の標識方法などの工夫が必要であった。

脂質 (glycosylphosphatidylinositol=GPI) アンカー型タンパク質のThy-1 を観察した結果 (図1)、細胞膜には100nm 程度の仕切りが入っていて、膜分子は仕切られた小部屋 (コンパートメント) に4ミリ秒程度 (指数減衰時間) 閉じ込められては、隣の小部屋に飛び移る運動を繰り返すこと (ホップ拡散) が示された。4ミリ秒の閉じ込めを見いだすには、時間分解能は、その100 倍の40 マイクロ秒よりもよい必要がある。本カメラで初めてこのような観察が可能になった。膜分子の閉じ込めとホップ拡散は、細胞膜でのシグナル変換に重要であることが分かってきた。仕切りは細胞膜直下のアクチン線維の網目で構成されており、シグナル伝達の足場としても利用されている (Kusumi et al., 2012)。

我々はさらに、この超高速1 蛍光分子追跡技術を応用して、生細胞の超解像観察を劇的に改善した。超解像顕微鏡法 (Toomre and Bewersdorf, 2010) は、細胞の構造体を、光回折限界 (250nm 程度) を超える空間分解能で顕微光学観察する技術であり、その代表的な方法の一つに、photoactivated localization microscopy (PALM) がある。この方法では、構成分子に蛍光プローブを結合させ、1 個ずつ光活性化、あるいは発光波長を光変換して1 分子観察をおこない、位置を決定する。この位置を新印象派の絵画のように点描することによって、光回折限界を破る蛍光像が得られる。空間分解能は位置決定の精度と、蛍光標識された分子の密度によって決まり、固定細胞では $10^{-5}0$ nm 程度であることが多い。

しかしながら、この1 個ずつ光らせて位置を決めていく方法では、1 枚の点描画像を得るのに、通常1 万回以上の画像取得をおこなって数万点の座標を求める必要があるため、1 秒間に30 回、即ちビデオレートでおこなっても5 分以上かかってしまう。この、空間分解能の改善が、時間分解能の多大な犠牲の上に成り立っているという問題のため、このままでは刻々と変化する生細胞の観察は困難である。そこで我々は、超高速1 蛍光分子追跡技術をもちいて、PALM 画像が1 秒ごとに得られるようにした。これで、多くの構

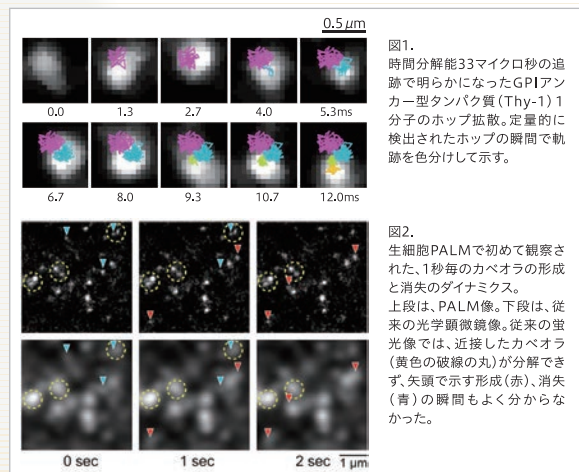
造体が生細胞中で観察できることになる。

図2に、細胞膜上で受容体の輸送とシグナル伝達を担う重要な構造体である、「カベオラ」と呼ばれる直径約70nm の構造体を1 秒毎に観察した結果を示す。カベオラの中心構成分子のカベオリンに、光変換できる蛍光タンパク質dendra2 を融合させ、ヒト培養細胞に発現させて、生細胞超解像観察をおこなった。上段はPALM 像、下段は従来の光学顕微鏡像である。カベオラは直径が70nm と、回折限界の250nm よりずっと小さく、また、高密度に局在する傾向があるため、従来は1 個ずつのカベオラの同定が困難で、その形成・消失のダイナミクス研究と機能研究の大きな障害となっていた。上段の1 秒毎のPALM 像では、黄色の破線の丸で示すように、近接したカベオラが別々に観察できた。また、この3 秒間で、消失したり (青い矢頭)、新しく現れたり (赤い矢頭) したカベオラが多数見られた。これは、「カベオラは数分のオーダーで細胞膜上に存在する、安定な膜ドメインである」という、従来の常識を覆す結果である。

生細胞超解像観察は、空間分解能では電子顕微鏡観察に劣るが、異なる波長の蛍光プローブを利用した多色観察により、異なる構成分子の局在を詳細に比較できるという大きな利点があり、さらに将来的には、それらのダイナミクスを同時に追うことができるようになりそうである。超解像観察と電子顕微鏡観察を組み合わせるお互いの長所を生かす試みもおこなわれており、今後、我々の開発してきた超高速・超解像1 蛍光分子局在顕微鏡法が、広く使われるようになることを期待している。

引用文献

- 1) Kusumi, A. et al. Tracking single molecules at work in living cells. Nat. Chem. Biol. 10, 524-532 (2014).
- 2) Kusumi, A. et al. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 34, 351-378 (2005).
- 3) Kusumi, A. et al. Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 28, 215-250 (2012).
- 4) Toomre, D. & Bewersdorf, J. A new wave of cellular imaging. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 26, 285-314 (2010).



0.5 μm

図1. 時間分解能33マイクロ秒の追跡で明らかになったGPIアンカー型タンパク質 (Thy-1) 1 分子のホップ拡散。定量的に検出されたホップの軌道上で軌跡を色分けして示す。

図2. 生細胞PALMで初めて観察された、1 秒毎のカベオラの形成と消失のダイナミクス。上段は、PALM 像。下段は、従来の光学顕微鏡像。従来の蛍光像では、近接したカベオラ (黄色の破線の丸) が分解できず、矢頭で示す形成 (赤)、消失 (青) の瞬間もよく分からなかった。