

高速 AFM と蛍光イメージングを用いた細胞膜動態の高分解計測

研究代表者

大場 雄介 北海道大学大学院医学研究院 教授

共同研究者

吉村 成弘 京都大学大学院生命科学研究科 准教授

藤岡 容一郎 北海道大学大学院医学研究院 講師

吉田 藍子 北海道大学大学院医学研究院 博士研究員



1. 研究の背景と達成目標

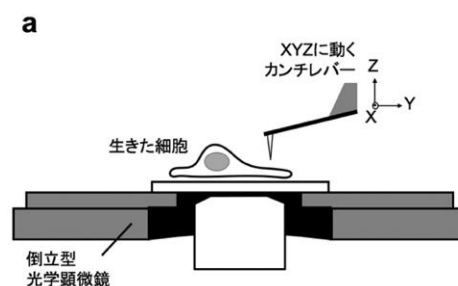
細胞膜は細胞内と外環境を隔てる脂質二重層膜であると同時に、細胞内外のコミュニケーションを司るインターフェースである。外部からの様々な刺激に応じた細胞膜の形状と成分の動的変化が、細胞活動や運命決定において重要である。本研究では、低侵襲性高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）と蛍光バイオイメージング顕微鏡のハイブリッドイメージングシステムの構築を行い、生理的条件下およびがんや神経疾患などの病的状態で見られる膜成分・膜結合タンパク質・シグナル因子の動態と細胞膜動態の関係性を解明する。本研究を通じて新たな学問分野である「細胞膜ナノ動態学」を創出するため、以下の達成目標を設定した。① 細胞膜表面の微細構造変化の動態と「膜成分」「膜構造タンパク質」「シグナル因子」の時空間変化という多次元の事象を、同一サンプルで同時可視化することを達成する。② 膜関連分子の微細動態・細胞内局在と、よりマクロな動態（エンドサイトーシスやエクソサイトーシス）との関連を解明する。③ がんや神経疾患、感染症の発症機序を解明する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・高速 AFM と共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせたハイブリッドイメージングシステムの構築を行った。
- ・このハイブリッド技術を用い、がん細胞の膜動態の経時変化を 10 nm、秒スケールで撮像・解析した。
- ・ヒトがん細胞膜にはエンドサイトーシスの生じやすい領域（PMD）があることを発見した。
- ・細胞内シグナル伝達経路を解析し、上皮成長因子受容体シグナルが PMD 形成に関与することを見出した。

3. 研究成果

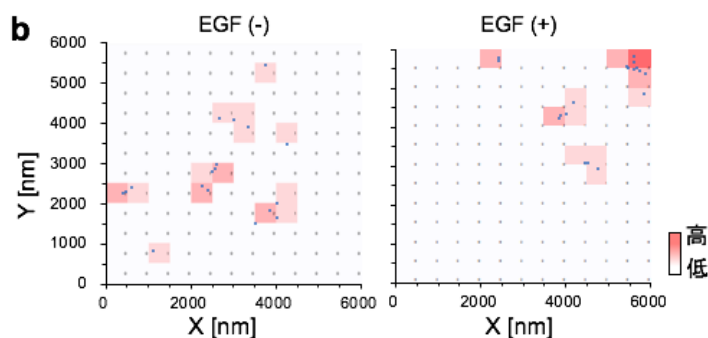
まず、生きた細胞で細胞膜の微細構造変化と膜構成要素の動態を同時空間的に可視化する観察系を確立した。細胞研究用として開発された高速 AFM と倒立型顕微鏡のハイブリッドイメージングシステムは、生きた細胞の膜の形状像とタンパク質の局在像の同時相関イメージングを可能とする（図 a）。ここでは、光学顕微鏡の空間的分解能を上げるため、共焦点レーザー顕微鏡とのハイブリッド相関イメージングシステム



を構築した。クラスリン依存性経路のマーカータンパク質であるクラスリンと緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質 (EGFP-CLCa) を発現させたヒト類上皮細胞がん由来の A431 細胞をハイブリッドシステムで観察すると、個々のピットが蛍光輝点として観察できる。この状態でタイムラプス相関イメージングを行い、高速 AFM 像と蛍光像との重ね合わせを行った。これにより、がん細胞上におけるクラスリン被覆ピット (CCP) の動態観察が可能になった。

上皮増殖因子受容体 (EGFR) の活性化は、様々なシグナル伝達経路を活性化する。過剰な EGFR の活性化は細胞のがん化を引き起こすことが知られている。細胞はこれを防ぐため、活性化した EGFR をエンドサイトーシスにより細胞膜から取り込み分解するとされる。また、EGFR 阻害薬は多くのがん治療に用いられている。そこで、EGFR シグナリングと膜動態の関係について検証した。EGF 刺激により EGFR を活性化し、エンドサイトーシスを誘発すると、CCP が分裂や度重なる出現を経て、クラスター化する様子が観察された (図 b)。クラスター化は、径にして約 600 nm の領域で認められた。

また、EGFR 阻害薬はクラスターの形成を抑制した。これらの結果から、細胞膜にはエンドサイトーシスを効率的に行うために予めプログラムされたドメインが存在しており、この膜ドメインは EGFR の活性によって維持されることが示唆された。今後は、同定した膜ドメインと発がん、EGFR 阻害薬感受性との関係を明らかにしたい。



4. 今後の展開

細胞膜動態はこれまで主に電子顕微鏡で得られたスナップショットの並べ替えによって描かれてきた。一方、生細胞では膜の要素の時空間的变化は蛍光顕微鏡により可視化・解析されてきた。これらは独立した観察法であり、膜の「動態」は両者の結果をすり合わせて想像されてきたに過ぎないといえる。本研究の成果である低侵襲高速 AFM とバイオイメーキングのハイブリッドシステムは、同一サンプル、同時刻、同一空間での膜動態とその要素を可視化・解析することができる技術である。本研究により、膜の「静態学」からナノ「動態学」へという大きなブレークスルーと、細胞生物学・医学生物学研究にパラダイムシフトをもたらせると期待できる。本研究の先には、がんや感染症などの国際的医療問題解決に資する新たな研究分野「細胞膜ナノ動態生物学」の創生と細胞膜動態を標的とした新たな創薬基盤の確立も期待できる。

5. 発表実績

1. Fujioka Y, Nishide S, Ose T, Suzuki T, Kato I, Fukuhara H, Fujioka M, Horiuchi K, Satoh AO, Nepal P, Kashiwagi S, Wang J, Horiguchi M, Sato Y, Paudel S, Nanbo A, Miyazaki T, Hasegawa H, Maenaka K, Ohba Y. A sialylated voltage-dependent Ca^{2+} channel binds hemagglutinin and mediates influenza A virus entry into mammalian cells. *Cell Host Microbe* 23 (6): 809-818.e5, 2018
2. 大場雄介. 細胞内シグナル伝達とエンドサイトーシスの光による可視化と制御. 第 36 回日本骨代謝学会, 長崎, 2018 (招待講演)
3. Fujioka Y, Satoh AO, Horiuchi K, Fujioka M, Tsutsumi K, Sasaki J, Nepal P, Kashiwagi S, Paudel S, Nishide S, Nanbo A, Sasaki T, Ohba Y. A peptide derived from phosphoinositide 3-kinase inhibits endocytosis and influenza virus infection. *Cell Struct Func* 44 (1): 61-74, 2019
4. 吉田藍子, 酒井信明, 吉村成弘, 大場雄介. クラスリン依存性エンドサイトーシスに伴う細胞膜動態のライブセル可視化解析. 第 92 回日本生化学会大会, 横浜, 2019 (招待講演)
5. Yoshida A, Sakai N, Takahashi N, Yoshimura SH, Ohba Y. Live-cell imaging and analysis of the plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis by high-speed atomic force microscopy. ASCB|EMBO 2019 meeting, Washington DC, 2019 (口頭発表)