

擬似的な超解像度画像解析手法による
生細胞内アクチンフィラメントの微小ゆらぎの解析

(論文の内容の要旨)

岡 知 輝

アテローム性動脈硬化症の発症、進展は、血管内腔を覆う内皮細胞が動脈内の様々な血流パターンに応答することによって生じる。安定した流れ場では、内皮細胞は流れの方向に配向、伸長するが、血管分岐部などの複雑な渦が存在する部位では、細胞形状は円形となる。この円形の内皮細胞では炎症が生じ、血中の低比重リポタンパク質の過剰な透過と血管内膜での蓄積、単球の接着、浸潤が活発になる。血管壁に浸潤した単球はマクロファージに分化し、酸化した低比重リポタンパク質を貪食して泡沫細胞になり、血管壁中に蓄積することでプラークが形成される。このようなアテローム性動脈硬化症は、重篤な脳血管疾患や心疾患へと繋がる。このように、細胞の血流をはじめとした各種力学刺激の感知、それらへの応答と疾病の発症、進展は深く関係している。このため、細胞の力学刺激の感知のメカニズムは非常に重要で、多くの研究がなされてきた。その中でも、細胞に負荷された力学刺激が細胞骨格の1つであるアクチンフィラメント (F-actin) を介して細胞間や細胞基底部に伝達され、これらの部位に存在するタンパク質の活性化等が報告されており、F-actin は細胞の力学刺激感知において重要な構造体であると考えられている。従来の研究では、F-actin はホルマリン固定した細胞内で力学刺激の負荷前後の静止画像で観察されるなど、静的な構造体として扱われてきた。しかしながら、細胞内、あるいは細胞膜上のタンパク質には熱ゆらぎが存在し、これらは動的な構造体であることが明らかになってきた。力学刺激の感知に重要な F-actin にも熱ゆらぎが存在していると考えられ、F-actin による力学刺激の伝達機構を解明するためには、生きた状態の細胞内の F-actin を実時間で観察する必要がある。

以上のことから、本研究では、遺伝子導入技術を用いて生細胞内の F-actin を緑色蛍光タンパク (GFP) によって可視化し、微小なゆらぎの観察を行った。

第1章の「諸論」では、細胞の力学刺激の感知のメカニズムを知る重要性、本研究の目的を述べた。

第2章の「生細胞内の F-actin のゆらぎの観察」では、緑色蛍光タンパク質とアクチン結合ペプチド Lifeact との蛍光タンパク質融合発現ベクターの遺伝子導入によって、F-actin を可視化した。この F-actin のゆらぎを 10 Hz で観察し、以下のことを明らかにした。

- 1) 緑色蛍光タンパク質とアクチン結合ペプチド Lifeact との蛍光タンパク質融合発現ベクターをマウス胎児皮膚由来株化細胞である NIH3T3 に遺伝子導入することによって、生細胞内の F-actin を可視化した。遺伝子導入を行なった細胞は抗生物質 GENETICIN を用いて選択し、GFP 融合タンパクを発現した細胞のみを残した。本研究で使用した細胞の蛍光タンパクの発現率は約 60%であった。生細胞内の F-actin を倒立位相差顕微鏡に接続された共焦点スキャナーユニットで1秒間に10コマ撮像した。
- 2) 観察した F-actin の最小のゆらぎの振幅は、約 0.3 μm だった。これは、レイリーの法則から求められる蛍光顕微鏡の空間分解能 0.2 μm とほぼ同程度であった。このことから、

F-actin のゆらぎを観察、評価するためには、より高い空間分解能での観察が必要と考えられた。また、本研究の F-actin の可視化に使用した緑色蛍光タンパク質の Lifeact-GFP は、F-actin への接着力が弱く、接着と離脱は高頻度で生じていると考えられる。この離脱直後の緑色蛍光タンパク質の蛍光が、ゆらぎの解析に影響を与えている可能性も考えられた。

第 3 章の「擬似的な超解像度画像解析手法を用いたゆらぎの解析」では、蛍光顕微鏡の空間解像度の問題を解決するため、擬似的に空間解像度を向上させる画像解析手法を独自に考案、導入した。この擬似的な超解像度画像解析手法は、画像解析ソフトを用いて得られた蛍光画像の F-actin に沿って 10 点ほどで蛍光輝度分布を取得した。蛍光輝度分布のピーク位置に F-actin が存在すると仮定し、位置座標を取得した。この座標から得られた近似曲線を放物線と仮定し、この曲線を F-actin として解析することによって解像度を擬似的に向上させた。擬似的な超解像度画像解析手法を用いた生細胞内の F-actin の微小なゆらぎの解析により、以下のことを明らかにした。

- 1) 擬似的な超解像度画像解析手法によって得た F-actin 像は、元の蛍光画像とよく一致した。F-actin とした近似曲線の決定係数 r^2 は、0.9 以上であった。また、擬似的な超解像度画像を作成するために使用した画像解析ソフト Image J の蛍光輝度分布解析ツールの解像度は $0.08 \mu\text{m}$ であったことから、解像度を 2.5 倍向上したと考えられた。さらに、離脱した緑色蛍光タンパク質が原因と考えられる蛍光ノイズの影響を取り除いた。
- 2) F-actin には、蛍光顕微鏡の解像度程度の振幅のゆらぎが観察された。このゆらぎは、1 本の F-actin 上で異なり、端付近は中間部分に比べてゆらぎの振幅が大きかった。これは、観察した F-actin に、画像で確認できない細い F-actin や他のタンパク質構造体が接着し、フィラメント上で異なる張力が負荷されることが原因だと考えられる。さらに、今回観察した F-actin は比較的太いことから、ミオシン軽鎖を含んだストレスファイバーだと考えられる。このように、F-actin は細胞内で複雑な構造体を形成しているため、ゆらぎが不規則になり、さまざまなパターンが観察されたと考えられる。また、三次元的にゆらいでいる F-actin を二次元平面の画像で解析したため、ゆらぎ情報が断片化したことも考えられる。

第 4 章の「アクチンフィラメントネットワーク内のゆらぎの関係性の解析」では、擬似的な超解像度画像解析手法により、ネットワーク構造を形成している複数本の F-actin のゆらぎの相関を解析した。ゆらぎの関係性の解析により、以下のことを明らかにした。

- 1) ネットワーク構造内の複数の F-actin を、細胞中央付近と細胞膜付近に分けてゆらぎの解析を行なった。これらの F-actin のゆらぎには、細胞部位ごとでの異なる傾向は見られなかった。

- 2) ネットワーク構造内で F-actin のゆらぎの相関を解析した結果, 相関はほとんどみられなかった. これは, ネットワーク構造内で比較的隣接した F-actin 間でも同様であった. このことから, 細胞内の F-actin はネットワーク構造全体ではなく, それぞれが独立してゆらいでいることが示唆された. この独立したゆらぎによって, 力学刺激が細胞に負荷されていない状態でも F-actin が接合している局所, F-actin 同士の接着部位には, ゆらぎによるひずみが発生していることが考えられる.

第 5 章の「アクチンフィラメント接着部のひずみの解析」では, ネットワーク構造内で独立してゆらいでいる 3 本の F-actin の接着部位で発生すると考えられるひずみを解析した. この結果, 接合部位ではゆらぎによる進展, 圧縮のひずみがランダムに繰り返し発生していることが示唆された. 他の研究で, 内皮細胞に流れを負荷した時に細胞骨格成分の 1 つである中間径フィラメントのゆらぎが停止する現象が観察されている. ただし, この研究では数秒に 1 コマ程度の観察結果である. 以上のことから, 細胞に対する流れ負荷時に細胞骨格のゆらぎによるひずみが消失し, この状態が細胞の力学刺激の感知のメカニズムに関与している可能性も考えられる.

第 6 章の「今後の展望」では, 今後, 行うべき研究内容を以下に示した.

- 1) 細胞の力学刺激の感知のメカニズムを知るためには, 力学刺激負荷瞬間の細胞内の F-actin のネットワーク構造の変形を観察する必要がある. 培養細胞をディッシュに培養してフローチャンバーに設置, せん断応力を負荷すると, 圧力によって底面がごく僅かに歪んでしまい, 観察が不可能である. このために, ほとんど変形しないステンレス製ディッシュを用いてフローチャンバーを作成することで, 流れ負荷時のディッシュ変形によるピントのずれを抑え, せん断応力を負荷した瞬間の細胞内の F-actin 構造の変形の観察を行う. この観察した瞬間的な F-actin の構造の変形から, 細胞内の力学刺激の伝達を解析し, 細胞の力学刺激の感知のメカニズムに関与するタンパク質構造体の特定が期待できる.
- 2) F-actin と微小管は, 張力と圧縮力が釣り合うことで成り立つテンセグリティ構造を形成している. このテンセグリティ構造を参考にしたモデルを用いてゆらぎの数値解析を行うことにより, 実験では観察できないゆらぎの詳細な解析が期待できる. このモデルに使用するフィラメント構造の径やヤング率などは, 細胞内タンパク質の濃度などによって変化することが知られていることから, 慎重に決定する必要がある.

第 7 章の「結論」では, 本研究で得られた成果と今後の研究内容の総括を述べ, 擬似的な超解像度画像解析手法を用いた生細胞内の F-actin ゆらぎの実時間観察による生細胞内の力学的な状態の解析の有効性を示した.

以上，本論文では，顕微鏡空間分解能の限界を解決するための独自の擬似的な超解像度画像解析手法を考案し，F-actin の微小なゆらぎを解析した．本研究の成果は，細胞内の力学状態を明らかにするものであり，今後の細胞の力学刺激の感知メカニズムの研究での評価方法の1つとして寄与するものである．