

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570158
 研究課題名 (和文) 免疫細胞活性化初期過程の細胞内 1 分子イメージング解析
 研究課題名 (英文) Single molecule imaging and quantitative analysis of initial activation process in immune cells
 研究代表者 十川 久美子 (SAKATA-SOGAWA KUMIKO)
 独立行政法人理化学研究所・1 分子イメージング研究ユニット・ユニットリーダー
 研究者番号： 20291073

研究成果の概要：
 薄層斜光照明法により、高いシグナル/ノイズ比の鮮明な細胞内の蛍光 1 分子像を取得した。3 次元イメージングおよび定量解析法開発によりシグナル分子の細胞内定量解析を可能にした。人工脂質二重膜上の副刺激受容体マイクロクラスターの解析により、T 細胞受容体と同様補助因子シグナルも同様に局在するが、時間経過とともに分離し、T 細胞活性化に作用していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1 分子イメージング、蛍光観察、免疫細胞、GFP 融合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

T 細胞などの免疫細胞では、特異的抗原刺激により抗原提示細胞との接触面で、免疫シナプスと呼ばれる特徴的な構造を形成する。これは、受容体などのシグナル伝達分子、接着分子が細胞接着間の中心部に集積したものである。この免疫シナプスが、免疫細胞の活性化初期過程で必須であると言われてきた。我々は、抗原提示細胞由来の MHC-抗原複合体、接着分子を人工脂質二重膜に埋め込むことで、細胞の接触面でのイベントをガラス表面で再現した。蛍光ラベルシグナル分子を発現した T 細胞を脂質二重膜に落とし、蛍光分子の動態を、細胞接触開始(タイムゼロ)から観察することを可能にした。これにより、数十

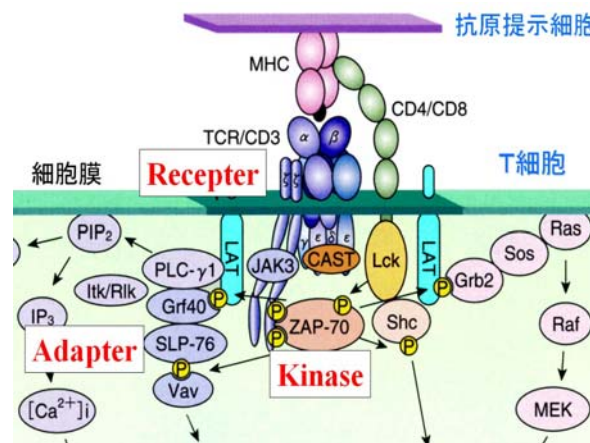


図 1. 免疫細胞表面におけるシグナル伝達。

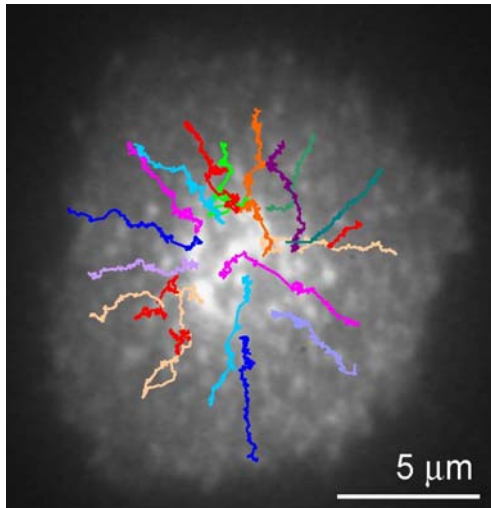


図2. T細胞の抗原特異的の刺激によるマイクロクラスターの形成と細胞中心への動き。

分子からの T 細胞受容体、キナーゼ、アダプターが共局在するマイクロクラスターが初期に形成され、接触面の中央に移動していく様子を観察することができた。マイクロクラスターが、周辺部分で新しく形成され続けること、シグナルタンパク質のリン酸化が行われていること確認した。接触後数分で中央に形成される T 細胞受容体の集積では、シグナルタンパク質のリン酸化が行われないことから、免疫細胞活性化の初期過程において、免疫シナプスの形成ではなく、マイクロクラスターが重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた (Yokosuka, Sakata-Sogawa et al., Nature Immunology, 2005) .

2. 研究の目的

T 細胞以外の免疫細胞である NK 細胞、B 細胞においても、免疫シナプスが形成されることが分かっている。これらの細胞でもマイクロクラスターにおける活性化が示唆されている。免疫細胞は、刺激の種類、強さ、時間により、活性化・不活化・細胞死など異なる変化を示すことが知られているが、詳しい機構は明らかでない。我々のこれまでの研究により、T 細胞活性化の開始と維持がマイクロクラスターにより時間空間的に制御されていることが分かってきた。マイクロクラスター構成シグナルタンパク質の詳細な解析により、刺激の種類、強さ、長さが細胞にどのように認識され、伝えられているかを解明することが可能であると考えられる。

さらに、全反射照明法による細胞膜表面の解析だけでなく、細胞内部観察用の薄層斜光照明法により、シグナル伝達分子、転写因子の細胞内でのシグナル応答の観察を目的と

する。

3. 研究の方法

T 細胞と抗原提示細胞の接触面の様子は、コンフォーカル顕微鏡の断面像でも観察できるが、接触面でのタンパク質相互作用をリアルタイムで詳細に観察することはできない。我々は、カバーガラス上に脂質二重膜を

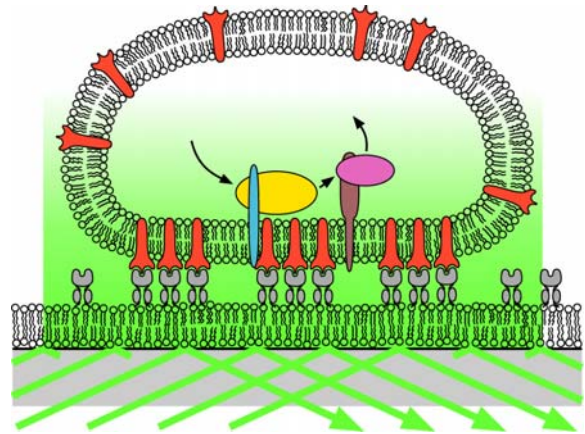


図3. ガラス上の脂質二重膜を用いた細胞接触面の全反射照明観察。

形成し、抗原提示細胞由来の MHC-抗原ペプチド複合体および接着分子の GPI アンカー型キメラタンパク質を埋め込んだ。GFP 融合タンパク質として蛍光ラベルシグナル分子を発現した T 細胞をこの脂質二重膜に落とすことで、接触開始直後からの蛍光タンパク質の動態を観察、解析することができる。

研究分担者である徳永が考案・構築した蛍光 1 分子顕微鏡システムは、コンフォーカルとは異なり、レーザー光を集光させないことから、弱い蛍光の観察に、特に威力を発揮する。

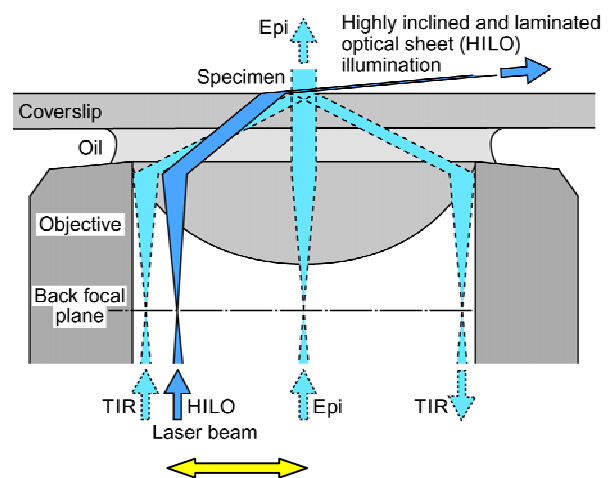


図4. 励起用レーザー光入射位置シフトによる照明方法の切り換え

試料の照明を局所的に制限する工夫により、低背景光が可能である。本研究では、細胞表面観察用には全反射照明法(TIR)、細胞内部用には、薄層斜光照明法(HILO)を用いる。PC コントロールにより、照明法の切り換えが簡単に行えるのが大きな特徴である。

4. 研究成果

(1) 薄層斜光照明法による細胞核内の3次元イメージング定量解析 (Nature Methods, 2008) 薄層斜光照明法では、細胞の厚みよりも薄い約7ミクロンの幅で、細胞内部だけを薄層状に照明する。これにより通常用いられる落射照明法に比べて約7倍のシグナル/ノイズ比が得られることを明らかにした。顕微鏡のステージPC制御によりフォーカスコントロールと合わせることで、3次元イメージングを可能にした。このシステムにより、核膜輸送タンパク質 importin β と GFP の融合タンパク質の3次元イメージングを行った。数十分子程度の GFP-importin β が結合した核膜孔の3次元画像を得ることができた。さ

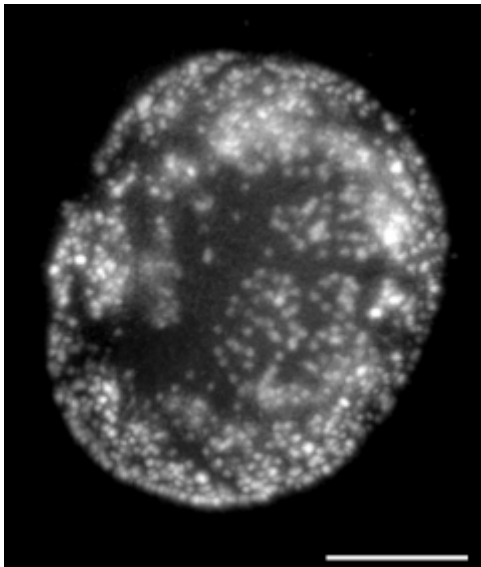


図5. 細胞核の核膜孔の3次元画像 (スケールバーは5ミクロン)

らに、GFP-importin β の1分子イメージング解析により、GFP-importin β の核膜孔滞在時間、結合定数などの定量解析を行った。細胞内の蛍光1分子イメージングにより定量解析できることを示すことができた。また、未発表データであるが、生きた細胞の核内で、転写因子の1分子イメージングにより滞在時間の定量解析も行うことができた。これらの解析方法の開発により、細胞内シグナル分子の定量解析を可能にした。

(2) T細胞補助刺激受容体マイクロクラスター

の動態解明 (Immunity, 2008) T細胞活性化に不可欠な補助刺激受容体であるCD28を加えた人工脂質二重膜によるマイクロクラスターの観察を行ったところ、初期にはT細胞受容体と同じマイクロクラスターに局在し、リン酸化酵素を呼び寄せることで活性化をポジティブに制御することを見いだした。さらに刺激後10分程度経過し、細胞中央分に集積すると、T細胞受容体から分離し、その周囲に輪状にとどまってT細胞の活性化を維持していることが分かった。

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8件)

(1) 十川久美子・徳永万喜洋、免疫細胞シグナルの1分子イメージングと分子動態、生化学、81, 218-222, 2009. 査読無

(2) 徳永万喜洋・十川久美子、薄層斜光照明法で見えてくる新たな生命現象、実験医学、26, 163-168, 2008. 査読無

(3) T. Yokosuka, K. Sakata-Sogawa, M. Tokunaga, T. Saito 他、(8人中2,3番目)、Spatiotemporal Regulation of T Cell Costimulation by TCR-CD29 Microclusters and Protein Kinase C γ Translocation., Immunity, 29, 589-601, 2008. 査読有

(4) 十川久美子・徳永万喜洋、細胞蛍光1分子イメージング、遺伝子医学MOOK 9, 192-196, 2008. 査読無

(5) M. Tokunaga, K. Sakata-Sogawa, N. Imamoto, Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. Nature Methods, 5, 159-161, 2008. 査読有

(6) 徳永万喜洋・十川久美子、細胞1分子イメージングと定量解析～シグナル伝達の可視化：バイオテクノロジージャーナル、7, 659-663, 2007. 査読無

[学会発表] (計17件)

(1) K. Sakata-Sogawa Single molecule imaging and quantitative analysis in living cells. Curie Institute Seminar, 2009/01/19. Paris, France

(2) K. Sakata-Sogawa & M. Tokunaga, Single molecule imaging and quantitative analysis in living cells. EMBO Workshop, 2009/01/15. Marseille, France

(3) 十川久美子・徳永万喜洋、細胞膜における免疫シグナル伝達分子相互作用の1分子イメージング徒弟量解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会シンポジウム「膜ドメイン研究の新展開」、2008/12/10、神戸

(4) M. Tokunaga & K. Sakata-Sogawa, Single molecule imaging by HILO microscopy in living cells and stochastic emergence of multiple intermediates detected by single-molecule protein unfolding. Albert Einstein College of Medicine Seminar, 2008/08/25, New York, USA.

(5) K. Sakata-Sogawa & M. Tokunaga, Single molecule imaging and quantitative analysis of transcription factors in living cell by HILO microscopy. Gordon Research Conference on Single Molecule Approach to Biology, 2008/08/19, New Hampshire, USA.

(6) K. Sakata-Sogawa & M. Tokunaga, Multi-color imaging of transcription factors in T cell activation, Focus on Microscopy 2007, 2007/4/11, Valencia, Spain.

[図書] (計1件)

徳永万喜洋・十川久美子、丸善、第3版現代界面コロイド化学の基礎、2009年、399ページ～401ページ

[その他]

テレビ番組での研究活動紹介：

「サイエンスゼロ 新型顕微鏡」NHK 教育テレビ、2007年6月放映

新聞報道：

「個々の細胞分子動き鮮明に観察」2008年1月7日掲載、日本経済新聞、他静岡新聞、日経産業新聞、愛媛新聞など

研究内容紹介ホームページ：

<http://www.riken.go.jp/r-world/research/lab/rcai/mole/index.html>

<http://web.rcai.riken.jp/en/lab/mole/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

十川 久美子

独立行政法人理化学研究所・1分子イメージング研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：20291073

(2) 研究分担者

徳永 万喜洋

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授

研究者番号：00192659