

トピックス

生きた細胞の活動を高速原子間力顕微鏡で可視化する

柴田幹大^{1,2}, 内橋貴之^{1,3}, 安藤敏夫^{1,3}, 安田涼平²

¹金沢大学理工研究域数物科学系

²Max Planck Florida Institute for Neuroscience, Neuronal Signal Transduction

³バイオAFM先端研究センター

1. はじめに

物事の本質は人間が持つ視覚（目）では見えないことのほうが多い。特に生命を物質として構成するタンパク質は小さすぎるため（ナノメートル）、目では見ることができない。そんな中、人類は様々な顕微鏡技術を開発・発展させ、目では見えない生命の本質を可視化してきた。物を見るということは、つまりは、プローブと見たい対象との間の相互作用を検出することであるが、プローブに光を使う光学顕微鏡は、生きた姿を液中で観察できる一方、ナノメートルの空間分解能でタンパク質そのものの姿は観察できない。また、プローブに電子を使う電子顕微鏡は、ナノメートルの空間分解能で見ることができ一方、生きた姿は観察できない。このように、顕微鏡技術は常にトレードオフであり、タンパク質が活動している現場で、その動きをナノメートルの精度で可視化できる顕微鏡は未だ存在しない。そんな中、原子間力顕微鏡（AFM）は、プローブに鋭い針を使い、見たい対象と針を接触させることで、その間に生じる力を検出し、試料の表面形状を可視化する。AFMは基板上の試料しか観察することができない一方、液中、ナノメートルの空間分解能で試料の形を直接観察することができる。この特色を最大限に活かすため、金沢大学・安藤研究室は2001年にAFMの高速化に成功し、2010年頃からタンパク質の機能と関連した動きを安定に観察することに成功してきた¹⁻⁴。さらに、近年我々は、この高速原子間力顕微鏡（高速AFM）をタンパク質だけでなく生きた培養細胞や海馬由来の神経細胞の活動を可視化することにも成功した⁵。ナノメートルの空間分解能で、かつ、リアルタイムに生きた細胞を観察したら、何が見えるのであろう？本稿では生きた細胞に高速AFMを適用し、細胞の活動をナノスケールで可

視化した例を紹介する。是非高速AFM動画で細胞が生き生きと動く姿を見ていただきたい（Supplement Movies）。

2. 高速AFMの細胞観察へ向けた装置改良

タンパク質よりも大きく、かつ生きた細胞を高速AFMで安定に観察するためには、走査範囲の拡大、探針が細胞と接触するために生じる細胞へのダメージを最小限にする必要がある。そのため、我々は既存の装置に対して3つの改良を行った（図1）。最初に、走査範囲の拡大のため、既開発されていた広範囲用スキャナーを適用した⁶。広範囲用スキャナーを用いれば、最大 $\sim 40 \mu\text{m}^2$ の走査範囲を $\sim 40 \text{s}$ で走査することができる。次に、高速AFMの走査中に細胞と探針の土台部分が衝突し細胞にダメージを与えるのを防ぐため、長さ $\sim 3 \mu\text{m}$ のAFM探針を作成した。最後に、高速AFMのガラスステージ（ $\Phi 1.5 \text{mm}$ ）のどこに細胞があるのかの目印や、細胞のどの部分をAFMで観察しているのかを明確にするため、光学顕微鏡と組み合わせた。これにより、蛍光画像とAFM画像を同時に取得することはできないが、細胞の全体像を蛍光画像で捉え、細胞の端や中心部を狙って高速AFM観察ができるようになった。

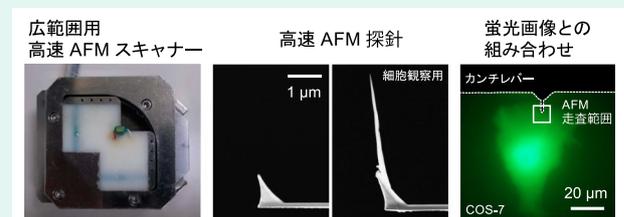


図1 細胞観察用高速AFM.

Visualization of Living Cells by High-speed Atomic Force Microscopy

Mikihiro SHIBATA^{1,2}, Takayuki UCHIHASHI^{1,3}, Toshio ANDO^{1,3} and Ryohei YASUDA²

¹Department of Physics, Kanazawa University

²Max Planck Florida Institute for Neuroscience

³Bio-AFM Frontier Research Center

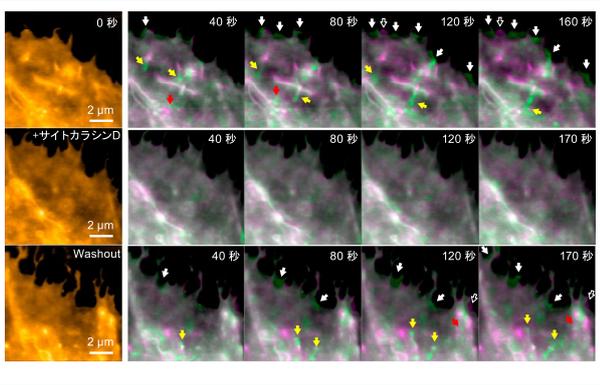


図 2
COS-7 細胞の細胞端の高速 AFM 画像。観察条件は 200×200 pixels², $10 \mu\text{m}^2$, 10 s/frame. (右図) 0 秒の AFM 画像を Magenta, 各秒で撮影した AFM 画像は Green の色調で表し, 両方の画像を重ねて示す. Green で見える部分は各秒で新たに現れた構造であり, Magenta で見える部分は消失した構造となる.

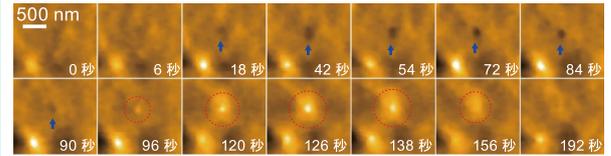
3. 細胞周辺部で起こる形態変化

最初に, 様々な細胞研究で幅広く使われている HeLa 細胞と COS-7 細胞に上述の改良を施した高速 AFM を適用し, 細胞端での高速 AFM 観察を行った. HeLa 細胞の辺縁部を観察した結果, 細胞端から中心部へ向かう波のような形態変化が観察された (Supplement Movie 1). この形態変化は, アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D の添加によって抑制される. 一方, COS-7 細胞の細胞周辺部では, 一方向の波のような形態変化は観察されず, 海岸で見られる波打ち際のような形態変化が観察された (図 2, Supplement Movies 2, 3). この形態変化もまた, アクチン重合阻害剤で抑制される一方, 上皮成長因子や成長因子の投与によってその動きが活発になる様子も観察された (Supplement Movies 4, 5). これらの結果から, 高速 AFM で観察された細胞周辺部の形態変化は, AFM の探針と細胞との接触によるアーティファクトではなく, 細胞の膜細胞骨格 (膜の裏打ち構造) であるアクチン繊維の重合・脱重合といった細胞の活動に由来する形態変化と考えられる.

4. エンドサイトーシスにおける細胞膜の形態変化

次に, COS-7 細胞の中心部 (細胞核に近い部分) の高速 AFM 観察を試みたところ, 細胞表面でピット (陥入構造) の形成と消失が繰り返し観察された (Supplement Movie 6). 細胞が細胞外の物質を取り込む過程の 1 つにエンドサイトーシスがある. 高速 AFM で観察されたピットがエンドサイトーシスに関わるかどうかを確かめるため, 細胞膜から膜小胞を分離する際に重要な働きをするダイナミンの阻害剤を投与した. その結果, 細胞表面でのピットの形成・消失が観察され

キャップを伴うエンドサイトーシス



キャップを伴わないエンドサイトーシス

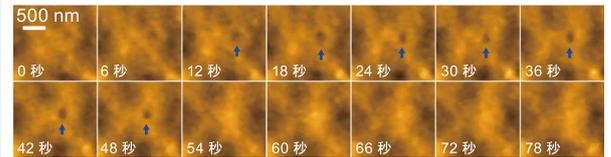


図 3
COS-7 細胞の細胞表面で見られるエンドサイトーシスの高速 AFM 画像. 画像の黒い部分 (青色の矢印) が細胞膜表面に出現したピットである.

ず, 観察バッファーで洗うと再びピットが観察された (Supplement Movies 6, 7). また, エンドサイトーシスの活性化因子である Rab5 の恒常性活性型変異体を細胞に過剰発現させると, 観察されるピットの出現頻度が上がり, その寿命時間が短くなることから (Supplement Movie 8), 観察されたピットは, エンドサイトーシスに由来すると結論できる. 興味深いことに, ピットが閉じる際, 単にピットが閉じる場合と, キャップ (突起構造) を伴ってピットが閉じる場合の 2 種類が観察された (図 3). このキャップを伴うエンドサイトーシスの生物学的意義は今のところ不明であるが, 細胞内に物質を取り込む際, 周りの細胞膜が, たも (キャップ) のような働きをして一度のエンドサイトーシスでより多くの物質を取り込む働きをしているのではないかと考えている.

5. 神経細胞の高速 AFM 観察

このように, 高速 AFM の生きた細胞観察では, 細胞端の形態変化, エンドサイトーシスによる細胞膜の形態変化といった, 細胞の膜動態を鮮明に観察することができる. また, 薬剤に対する応答も観察できるため, 特定のタンパク質の阻害剤を併用すれば, 細胞の形態に与える影響を観察することができそうである. この高速 AFM による細胞観察の特色を活かし, 次なるターゲットとして, 生きた神経細胞の活動を可視化することを試みた. 具体的には, 海馬由来の低密度初代神経細胞培養法を高速 AFM 観察のために最適化し, 発達初期の未成熟な神経細胞の高速 AFM 観察を行った. その結果, 培養 9 日目の神経細胞では, 神経突起が伸びたり縮んだりする様子 (Supplement Movie 9), 培養 13 日目では, 樹状突起を取り囲み波打つような形態変化をする構造とエンドサイトーシス (Supplement Movie 10), 培養 15 日目では, 樹状突起が

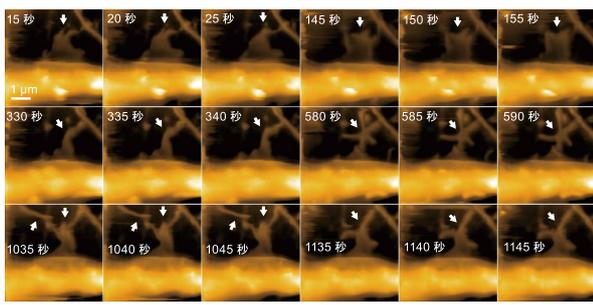


図 4 培養 15 日目の海馬由来の神経細胞の高速 AFM 画像。観察条件は $200 \times 200 \text{ pixels}^2$, $5 \mu\text{m}^2$, 5 s/frame 。樹状突起から突出した構造 (白矢印) は時間とともに様々な形態に変化する。

ら突出したダイナミックに形を変える構造 (図 4, Supplement Movie 11) を観察することに成功した。成熟した神経細胞は、樹状突起に記憶の貯蔵部位であるスパインを持つ。高速 AFM は高空間分解能で細胞の膜動態を直接観察できるため、成熟した神経細胞へ高速 AFM 観察を適用し、記憶形成時のスパインの形態変化をナノスケールで観察することが今後の課題である。

6. | おわりに

高速 AFM 動画は画像が鮮明であるため、他の顕微鏡技術で捉えられた動画とは違った印象・凄みがある。実際に、本稿で紹介した動画は youtube にアップされ <https://www.youtube.com/watch?v=4N6WCXWHbdE>, 研究者以外の方々にも興味を持っていただけた。しかしながら、我々が最終目標とするスパイン可塑性の観察には従来型の高速 AFM では制約がある。また、AFM 画像からだけでは観察対象の認識は困難といった問題点もある。そこで近年開発された、全反射照明による 1 分子蛍光観察と高速 AFM 観察の同時観察が可能である **Tip-scan 型の高速 AFM⁷⁾** を神経細胞の観察に適用しようと考えている。最近、超解像蛍光顕微鏡により数十ナノメートルの空間分解能で生きた細胞の姿が観察され始めている。高速 AFM は細胞の膜動態を直接観察できる利点があるので、2つの技術を組み合わせれば、神経細胞の記憶形成の素過程を細胞レベル・分子レベルで詳細に観察することが可能となり、記憶のメカニズムの一端を明らかにできると期待できる。

謝 辞

広範囲用 AFM スキャナーは金沢大学の渡辺大輝氏にご協力をいただきました。深く感謝いたします。

文 献

- 1) Shibata, M. *et al.* (2010) *Nature Nanotech.* **5**, 208-212. DOI: 10.1038/nnano.2010.7.
- 2) Kodera, N. *et al.* (2010) *Nature* **468**, 72-76. DOI: 10.1038/nature09450.
- 3) Uchihashi, T. *et al.* (2011) *Science* **333**, 755-758. DOI: 10.1126/science.1205510.
- 4) Ando, T. *et al.* (2014) *Chem. Rev.* **114**, 3120-3188. DOI: 10.1021/cr4003837.
- 5) Shibata, M. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* **5**, 8724. DOI: 10.1038/srep08724.
- 6) Watanabe, H. *et al.* (2013) *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 053702. DOI: 10.1063/1.4803449.
- 7) Fukuda, S. *et al.* (2013) *Rev. Sci. Instrum.* **84**, 073706. DOI: 10.1063/1.4813280.



柴田幹大

柴田幹大 (しばた みきひろ)

金沢大学理工研究域数物科学系テニュアトラック准教授

2007年名古屋工業大学大学院工学研究科博士課程修了(工学), 05-08年名古屋工業大学 DC1, PD, 08-11年金沢大学 SPD, 11-13年 Duke 大学海外特別研究員, 13-15年 Max Planck Florida Institute, Postdoctoral fellow, 15年金沢大学博士研究員を経て 16年3月より現職。

研究内容: 記憶に関わる現象をナノスケールで可視化する

E-mail: msshibata@staff.kanazawa-u.ac.jp



内橋貴之

内橋貴之 (うちやし たかゆき)

金沢大学理工研究域数物科学系教授

1998年大阪大学工学研究科終了(工学), 98-2000年アトムテクノロジー研究体・博士研究員, 00-02年姫路工業大学工学部・助手, 02-04年トリニティ・カレッジダブリン・シニアサイエンティスト, 04-06年金沢大学自然科学研究科助手, 06-14年金沢大学理工研究域准教授を経て 15年4月より現職。

研究内容: 高速原子間力顕微鏡の開発とバイオ応用

連絡先: 〒920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: uchihast@staff.kanazawa-u.ac.jp



安藤敏夫

安藤敏夫 (あんどう としお)

金沢大学理工研究域数物科学系教授

1980年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了, 同年 UC San Francisco 博士研究員, 83年同助手, 86年金沢大学理学部講師, 96年より現職。

研究内容: モータタンパク質, 高速 AFM の開発とバイオ応用研究

連絡先: 同上

E-mail: tando@staff.kanazawa-u.ac.jp

URL: <http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/index.htm>



安田涼平

安田涼平 (やすだ りょうへい)

Max Planck Florida Institute for Neuroscience, Scientific Director

1998年慶應義塾大学理工学研究科修了(理学), 2000-05年 Postdoctoral fellow Cold Spring Harbor Laboratory, 05-12年 Assistant professor, Duke 大学医療センターを経て 12年6月より現職。

研究内容: 記憶に関わる分子プロセスおよびシナプスの構造変化の可視化

連絡先: 1 Max Planck Way, Jupiter, FL 33458

E-mail: Ryohei.Yasuda@mpfi.org