

画像情報処理を用いた植物細胞エンドサイトーシスのダイナミクスの解析

植物全能性制御システム解析学分野 116331 島原 佑基

指導教員 馳澤 盛一郎

【序論】

真核細胞が外部から物質を取り込む仕組みのうち、最も基本的な現象の一つとしてエンドサイトーシスがある。エンドサイトーシスにより細胞膜が細胞内に出芽し、エンドソームを形成して外部から物質を取り込み、それらが各細胞小器官に巧みに分配される。例えば、エンドソームの膜タンパク質にはRAB GTPaseと呼ばれる数十種類の低分子GTPaseがあり、その構成比率によって行き先を制御している。RAB5グループをはじめ、エンドサイトーシス関連タンパク質の局在の解析に関しては、標的遺伝子と蛍光タンパク質との融合遺伝子を導入する方法による生細胞での可視化が重要な手法となっている。未解明な部分が多いメンブレントラフィックを詳細に研究するためには、これらの可視化技術が不可欠である。

エンドソーム全般を可視化するマーカーとして利用可能な標的遺伝子は現在のところ報告されていないが、近年、スチリル系の生体染色試薬FM4-64を用いる方法が確立されてきた。FM4-64で可視化して観察する事により、エンドサイトーシスの定量的な解析が可能となる。そこで本研究では、FM4-64と画像解析技術を併せ用いる事で、エンドソームの挙動を定量的に、より詳細に解析することを目的とした。

【結果と考察】

パルスチェイス法の改良と新たに開発した画像解析アルゴリズムの応用

エンドソームの画像データのみを抽出するためには、まず限られた時間に多くの細胞を観察をし、その上で高度の画像処理技術が必要であった。そこで(1) FM4-64処理後の早い時間にエンドソームを観察するためにパルスチェイス法を改良し、(2) 顕微鏡写真を自動的に選択する方法を定め、(3) 画像処理のアルゴリズムを開発した。FM4-64の膜移行は早く、エンドサイトーシスによりパルスラベル後の早い段階で変化が観られることから、プロトコルを改訂してパルスラベル後20分からの観察を可能にした。次に画像処理の方法について検討し、画像からImageJによって測定したデータをExcel形式で取得し、統計解析ならびにプロットによる可視化を自動的に行なうシステムを開発した。入力画像としては、パルスラベル後に一定時間経過した細胞を共焦点レーザー顕微鏡によって撮像したものを用いた(図1-a)。画像処理により出力画像としてエンドソームの位置情報を抽出し(図1-b)、再度入力画像を参照する事によってエンドソームの輝度等の情報を自動抽出した。これにより、撮影から解析結果の評価までの一連の手順についてのスループットを改善することができた。

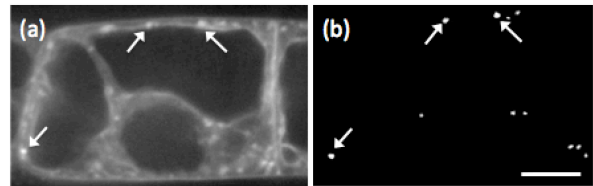


図1. (a)パルスラベル後30分のタバコBY-2細胞。(b)(a)を入力画像として画像処理をした際、エンドソームのみを抽出した。2つの画像を参照し、エンドソームの輝度の情報等を自動抽出した。矢印はエンドソーム。
Bar = 10 μ m

エンドソームの個数とFM4-64の輝度は時間経過とともに減少した

エンドソームの経時的な変化を定量した結果、パルスラベル後の時間の経過とともにエンドソームの個数が減少していた(図2-a)。1細胞あたりのエンドソームの数(これは共焦点画像という、言わば細胞の輪切りの中での結果であるため、「細胞あたりの数」とは異なり、細胞の中央付近に観察されるエンドソームを指す)はパルスラベル後0.5時間の約5個をピークに、2時間後には2個にまで減少した。また、エンドソームのFM4-64の輝度について解析した結果、輝度はパルスラベル後の時間経過とともに減少した(図2-b)。次に、エンドソームの出芽を抑制する阻害剤としてPI3Kのリン酸化阻害剤として知られるWortmanninとチロシンキナーゼの阻害

剤であるThyrophostin A-23の影響について調べた。Wortmanninを処理した細胞を同様に解析した結果、エンドソームの数はパルスラベル後0.5時間で約17個であり、その後時間経過とともに減少するが、処理をしない時と比較して多かった(図2-a)。同様にThyrophostin A-23を処理した場合についても、多くのエンドソームが確認された。また、エンドソームのFM4-64の輝度について解析したところ、Wortmanninを処理した場合には、処理しない場合と比較して輝度が高くなっていった(図2-b)。各種阻害剤で処理したときの経時的なエンドソームの大きさについて調べたところ、Wortmannin、Thyrophostin A-23を処理したときに2.5~3.5 μm^2 のエンドソームが増加していた(図3)。

リン酸化の阻害によりエンドソームの成熟が遅れた

FM4-64はパルスラベル直後は細胞膜上にあり、その後時間の経過とともにエンドサイトーシスによって液胞膜へと移行する。そこで、その移行を定量的に評価するため、細胞膜上のFM4-64の輝度と液胞膜上の輝度の比を求め、これを移行率と定義して解析した。その結果、エンドサイトーシスの細胞膜から液胞膜への移行率はパルス後約2時間まで上昇し、その後は定常に達することがわかった(図4)。また、PI3Kの阻害剤であるWortmanninを処理したとき、移行率の上昇はコントロールと比較して1時間程遅れていた(図4)。これは、阻害剤によりエンドソームの成熟に必要なリン酸化が阻害され、成熟が遅れたためと考えられる。また、Wortmanninを処理した場合、1細胞あたりのエンドソームの数は増加した(図2-a)。これらの結果から、エンドソームの成熟が遅れ、いわばメンブレントラフィックの”渋滞”が起きていると考えられる。

【総括】

本研究により、Wortmannin処理時のエンドサイトーシスの進行の遅れを定量的に測定することが可能となった。今後、画像解析アルゴリズムと阻害剤処理を組み合わせ、定量データからモデル化、およびシミュレーションを行う事で、エンドサイトーシスの挙動解析の進展が期待できる。

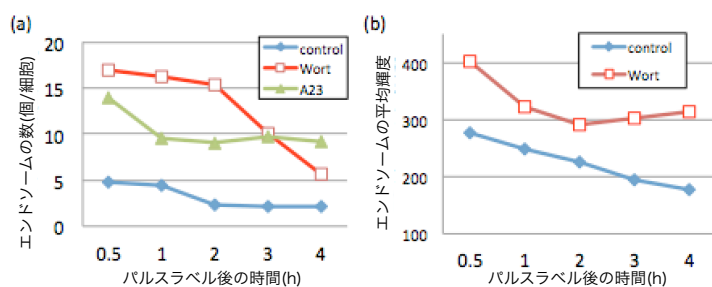


図2. グラフの横軸はパルスラベル後の時間。(a)エンドソームの個数の変化。(b)縦軸はエンドソームの平均輝度の変化。Wortmannin処理時には、エンドソームの個数も輝度もコントロールと比較して大きかった。

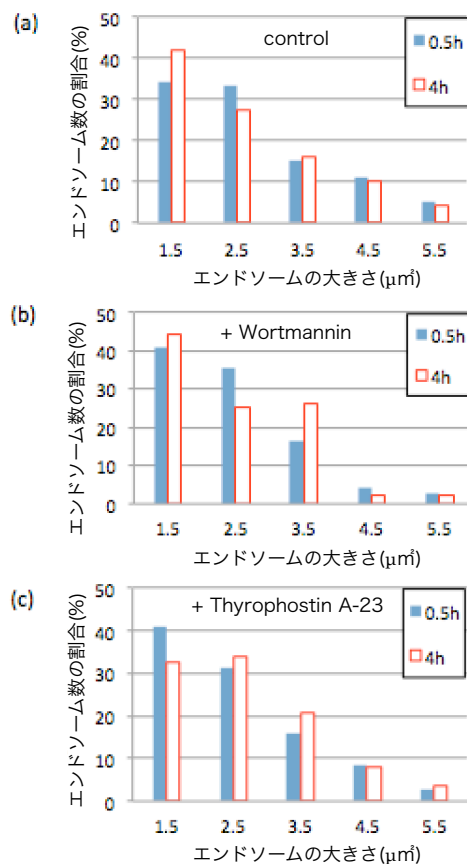


図3. パルスラベル後0.5時間と4時間のエンドソームの大きさ。(a)コントロール、(b)Wortmannin処理、(c)Thyrophostin A-23処理。

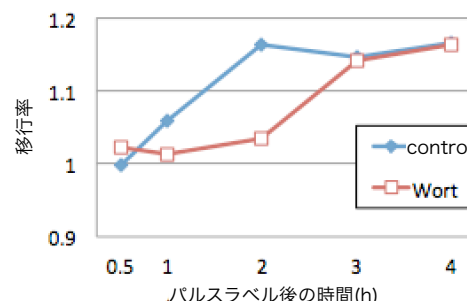


図4. 細胞膜上のFM4-64の輝度と液胞膜状のFM4-64の輝度の比を求め、これを移行率と定義した。その結果、移行率はパルスラベル直後から時間経過とともに上昇し、パルスラベル後2時間で移行率のピークに達した。一方、Wortmanninを処理すると移行率の上昇が遅れ、パルスラベル後3時間でほぼピークに達し、移行率の上昇が遅れが確認された。