エンドサイトーシスを直接可視化する走査型イオンコンダクタンス顕微鏡の開発

Development of Scanning Ion Conducting Microscope for Visualization of Endocytosis

金沢大 WPI NanoLSI[1], JST さきがけ[2], 東北大院環境[3]
○高橋康史[1,2]、宮本貴史[1]、井田大貴[2,3]、東宏樹[1]、周縁殊[1]、福間剛士[1]
Kanazawa Univ.[1], JST PRESTO[2]
E-mail: yasufumi@se.kanazawa-u.ac.jp

細胞外分子や細胞膜タンパク質などを細胞内に取り込む機構であるエンドサイトーシスには、様々な経路が存在することが知られており、ウィルスの感染などと密接なかかわりがある。その一方で、エンドサイトーシスの際に生じるくぼみは、直径 100 nm ほどであり、光学顕微鏡の限界を超えたものであり、電子顕微鏡によりスナップショットで捉えることはできるが、阻害剤などの薬効を理解するには、直接エンドサイトーシスを細胞上で可視化する技術が求められてきた。走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)は、ナノピペットをプローブとしてイオン電流をフィードバックシグナルに利用することで、細胞表面の形状を非接触かつ非標識で可視化できる。これまで細胞の連続計測を行い、生細胞のダイナミックな形状変化を可視化してきた。本研究では、ナノピペットの微細化により、エンドサイトーシスの際の細胞表面形状変化を可視化した。

エンドサイトーシスを可視化するため、非常に平坦な播種 1～4 日目の Cos-7 細胞を用いた。溶液には、L15 培地を用いた。ナノピペットは、内径 0.58 mm 外径 1.00 mm のボロシリケイトガラスを使用し、CO_2 レーザープラーを利用して伸張することで作製した。従来法で作製した先端開口径 100 nm のナノピペットと新手法で作製したナノピペットを用いて、エンドサイトーシスの SICM イメージングを行った。計測にはホッピングモードを利用した[1]。従来のナノピペットでは捉えることができなかったアクチン由来と考えられるキャップ上の構造物がくぼみにかぶさるようにして、くぼみが閉じていく様子を可視化することができた。これまでの連続イメージング技術を利用することで、3×3 μm^2 の領域を 64×64 ポイントで約 30 s で取得した[2]。今後は、阻害剤を加えた際のエンドサイトーシスの変化や、エンドサイトーシスに関与するアクチン、クラスリン、カベオラに蛍光タンパク質を発現させることで、形状とタンパク質の機能を細胞レベルで明らかにしていくこと、エクソソームなどの取り込みを直接可視化していく予定である。

(1) Shevchuk, A. I.; Novak, P.; Taylor, M.; Diakonov, I. A.; Ziyadeh-Isleem, A.; Bitoun, M.; Guicheney, P.; Lab, M. J.; Gorelik, J.; Merrifield, C. J.; Klenerman, D.; Korchev, Y. E., *J. Cell Biol.* **2012,** *197* (4), 499-508.
(2) Ida, H.; Takahashi, Y.; Kumatani, A.; Shiku, H.; Matsue, T., *Anal. Chem.* **2017,** *89* (11), 6015-6020.

© 2019年 応用物理学会