

2024年9月18日

東京大学
科学技術振興機構 (JST)

複雑な細胞小器官の状態を一目で理解する方法を開発 ——蛍光イメージングと多パラメーター次元削減法を用いた オルガネラランドスケープ解析法——

発表のポイント

- ◆細胞内のさまざまな小器官（オルガネラ）の状態を全体像（ランドスケープ）として一目で直感的に観察・分析できる新しい方法「オルガネラランドスケープ解析法」を開発しました。
- ◆この方法により、これまで捉えにくかった異なるオルガネラ間の接触や、物質取り込み過程でのオルガネラの変化を理解できるようになりました。
- ◆未知のオルガネラの発見や、外部環境、感染、薬剤、疾患などが細胞小器官に与える影響の評価など、幅広い目的に使用されることが期待されます。

概要

東京大学大学院医学系研究科の水島昇教授、本田郁子准教授、栗川義峻特任助教らによる研究グループは、多種類の細胞小器官（オルガネラ）（注1）の状態を全体像（ランドスケープ）として一目で理解できる新しい方法「オルガネラランドスケープ解析法」を開発しました。

従来の方法では、細胞内で密集し常に変化しているオルガネラを同時に多種類区別して解析し、その複雑な全体像（ランドスケープ）を定量に理解することは困難でした。本研究では、オルガネラを個別の粒子として分離し、多数の指標で同時に分析した多次元情報を二次元平面に次元圧縮することで、多数のオルガネラのランドスケープを一度に解析できるようになりました（図1）。この新しい方法によって、オルガネラの相互関係や分布が直感的に理解できるようになります。例えば、小胞体とミトコンドリアの接触部位の検出や、細胞が物質を取り込む過程（エンドサイトーシス）における関連オルガネラの経時的変化の包括的な可視化が可能となりました。

この方法で細胞内のオルガネラの全体像を可視化することにより、未知のオルガネラの発見や、さまざまな生理的・病理的条件下でのオルガネラの相互作用や分布などの変化の評価などへの応用が期待されます。

本研究は、2024年9月18日（水）（日本時間）に米国科学誌「PLoS Biology」（オンライン）に掲載されます。

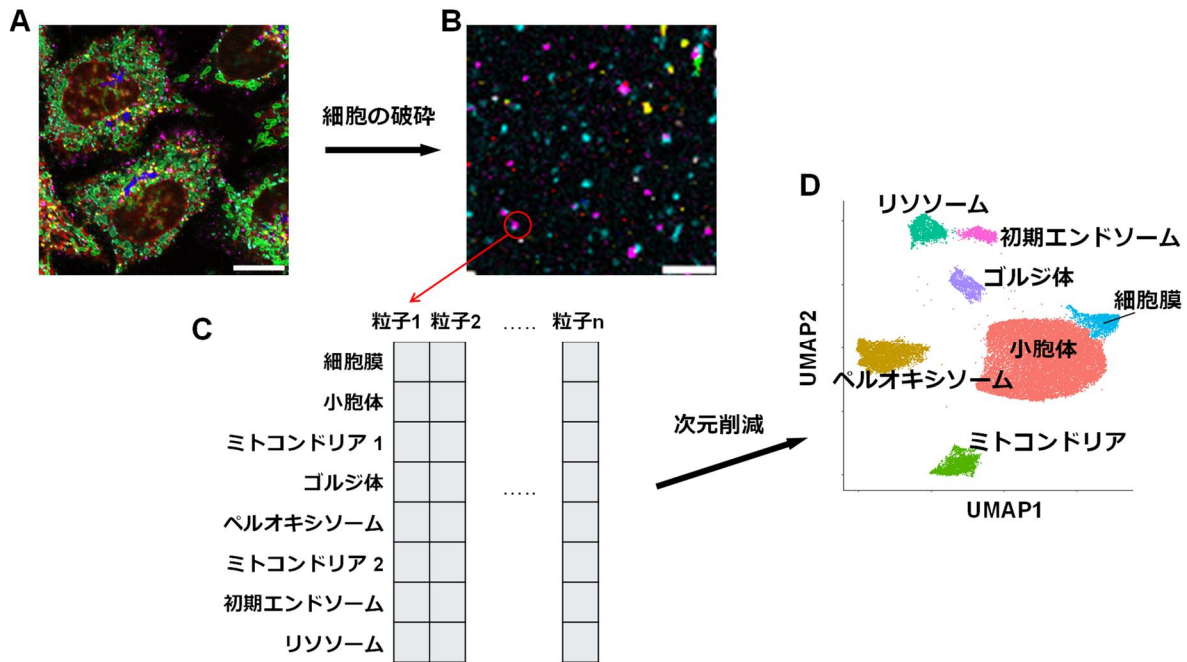


図1 オルガネラランドスケープ解析の模式図

培養細胞を用いて4種類以上のオルガネラを蛍光顕微鏡観察しようとする、オルガネラ同士が密集して存在するため、どのような種類のオルガネラがどのくらい存在するか、すなわちオルガネラのランドスケープを把握するのが非常に困難である。そこで本研究グループは細胞を破碎し、オルガネラをバラバラの粒子状態にすることで分離能を高め、多種類のオルガネラを検出する実験系を開発した。解析の流れを次の模式図で示す。A. 細胞の複数種類のオルガネラ（例えば、細胞膜、小胞体、ミトコンドリア、ゴルジ体、ペルオキシソーム、初期エンドソーム、リソソーム）のオルガネラマーカをそれぞれ異なる蛍光で標識する。B. その細胞をバラバラにして粒子状態にしたものを、顕微鏡で撮影する。C. 画像上の1つ1つの粒子について、各オルガネラマーカの蛍光強度（≒存在量）から多次元データを取得する。D. これを二次元平面上へ次元削減法によって埋め込み（反映し）、オルガネラランドスケープを表現することができる。スケールバーは20 μm 。

発表内容

オルガネラは細胞内の重要な構造体であり、その機能に応じて独特の構造と分子組成を持っています。しかし、これまでのオルガネラ解析法では、細胞内で密集し常に変化しているオルガネラを同時に多種類区別して解析し、その複雑な全体像（ランドスケープ）を定量的に理解することが困難でした。従来の手法は空間分解能（注2）が低く、また同時に解析可能なパラメーターが限られていたため、複雑なオルガネラの状態を包括的に捉えることができませんでした。

この問題を解決するため、本研究グループは、新規のオルガネラ解析手法を開発しました。まず細胞内のオルガネラを個別の粒子状態に分離し、そして多種類のオルガネラ構成分子を蛍光標識し、蛍光イメージングを行います。これにより、空間分解能を大幅に向上させ、同時に多数のパラメーターを解析することが可能になりました。しかし、得られたデータは各粒子上のそれぞれの蛍光強度（≒存在量）からなる多次元のデータであり、このままでは直感的に理解することが困難です。そこで、UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) (注3)と呼ばれる次元削減技術を用いて二次元空間に投影します。この手法により、研究チー

ムは複数種類のオルガネラを同時に可視化し、その全体像を「ランドスケープ」として一目で直感的に捉えることに成功しました。

本研究では、この新手法を用いて7種類の主要なオルガネラのランドスケープ解析を行いました(図1)。さらに、より複雑な現象の可視化にも挑戦しました。

小胞体とミトコンドリアの接触部位(注4)は、カルシウムイオン(Ca^{2+})依存性の情報伝達経路であるカルシウムシグナリングや脂質代謝など、重要な細胞機能の制御に関与していますが、これらの接触部位は非常に小さく、従来の方法では他のオルガネラとの関係を含めて観察することが困難でした。本研究では、特殊な蛍光タンパク質を用いてこれらの接触部位を標識し、他のオルガネラマーカーと同時に新しい解析法で検出することに成功しました(図2)。この成果により、さまざまな生理的条件下での小胞体-ミトコンドリア接触部位の変化を他のオルガネラとの関係も含めて分析できるようになり、関連する疾患メカニズム(例:神経変性疾患や代謝疾患)の解明にも貢献することが期待されます。

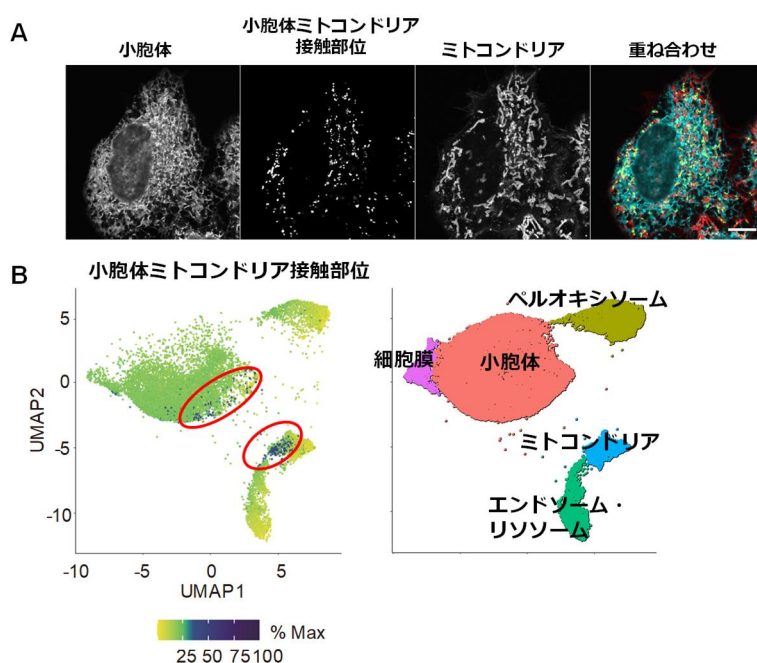


図2 小胞体-ミトコンドリア接触部位の検出

- 細胞における小胞体-ミトコンドリア接触部位および小胞体、ミトコンドリアの蛍光顕微鏡画像。接触部位は非常に小さく、他のオルガネラとの関係を含めて観察することが困難である。そこでこれを粒子状にし、他のオルガネラマーカーの標識を加えて、ランドスケープ解析を行った。スケールバーは10 μm 。
- オルガネラランドスケープ解析における小胞体-ミトコンドリア接触部位の検出。6種類の主要なオルガネラのランドスケープ解析で、小胞体-ミトコンドリア接触部位が小胞体およびミトコンドリアを示すクラスター中に検出された(赤い楕円で示した蛍光強度の高い部分が接触部位)。

また、細胞が外部から物質を取り込む過程(エンドサイトーシス)には、さまざまなエンドサイトーシス関連オルガネラ(注5)が関与し、その性質が時間とともに変化します。本研究では、上皮成長因子とトランスフェリンという異なる運命をたどる2種類の積み荷タンパク質の取り込み過程を同時に追跡することで、本手法の汎用性と解像度の高さを実証しました(図3)。その結果、トランスフェリンが取り込まれてから細胞外にリサイクルされる過程や、上皮

成長因子が取り込まれてからリソソームで分解される過程を、複数のオルガネラとの相互作用を含めて可視化できるようになりました。

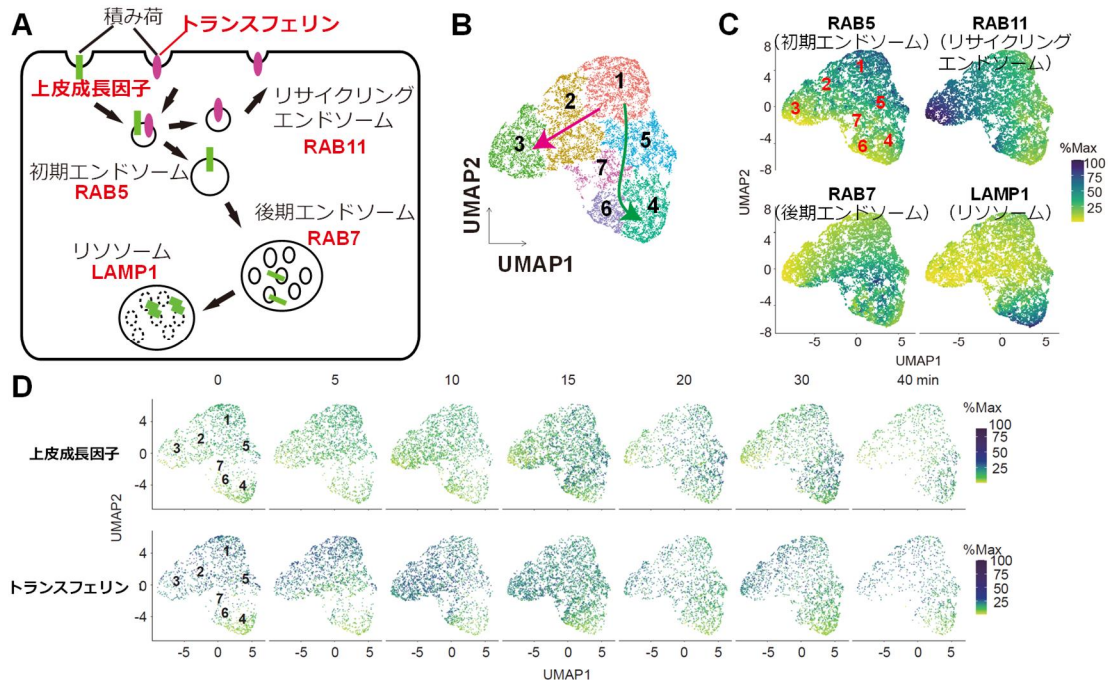


図3 エンドサイトーシス関連オルガネラの遷移状態の解析

- A. 解析したエンドサイトーシス経路の模式図。トランスフェリンは、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソームを経由して再び細胞外へ、上皮成長因子は、初期エンドソーム、後期エンドソームを経由してリソソームで分解されることが知られている。
- B. エンドサイトーシス関連オルガネラのランドスケープ解析。上皮成長因子、トランスフェリンを含むエンドサイトーシス関連オルガネラを抽出し、4種類のオルガネラマーカの蛍光強度情報（四次元）を二次元平面へとUMAPを用いて埋め込んだ。二次元平面上でクラスタリング（注6）を行ったところ7つのクラスタに分かれた。説明が前後するが、CおよびDで示した解析によって各クラスタの特徴を調べた結果、矢印で示すトランスフェリン（桃色）と上皮成長因子（緑色）の移動経路が明らかとなった。
- C. 各オルガネラマーカの蛍光強度の二次元平面上での分布図。オルガネラマーカごとに異なる領域に分かれている。初期エンドソームはクラスタ1、リサイクリングエンドソームはクラスタ2,3、後期エンドソームはクラスタ5,7、リソソームはクラスタ4,6に主に分布している。
- D. エンドサイトーシス過程における上皮成長因子とトランスフェリンの二次元平面上での分布の変化図。上皮成長因子は、刺激後、0~10分ではクラスタ1（初期エンドソーム）周辺に、15分後にはクラスタ5,7（後期エンドソーム）周辺に、20分後以降はクラスタ4,6（リソソーム）へと分布を変化させている。トランスフェリンは、刺激後0~5分ではクラスタ1（初期エンドソーム）やクラスタ2（リサイクリングエンドソーム）周辺に、10~15分後にはクラスタ3（リサイクリングエンドソーム）へと分布を変化させ、20分後以降は数を減少させている（細胞外への放出）。

この解析手法は、細胞内の複雑なプロセスをより詳細に理解する道を拓き、オルガネラ研究に新たな展望をもたらします。例えば、これまで見過ごされてきた新たなオルガネラのサブ

セットの発見や、外部環境、感染、薬剤、疾患がオルガネラに与える影響の評価など、幅広い応用が期待されます。また、オルガネラの動態や相互作用をより深く理解することで、細胞生物学の基礎研究から医学応用まで、さまざまな分野に貢献する可能性があります（図4）。

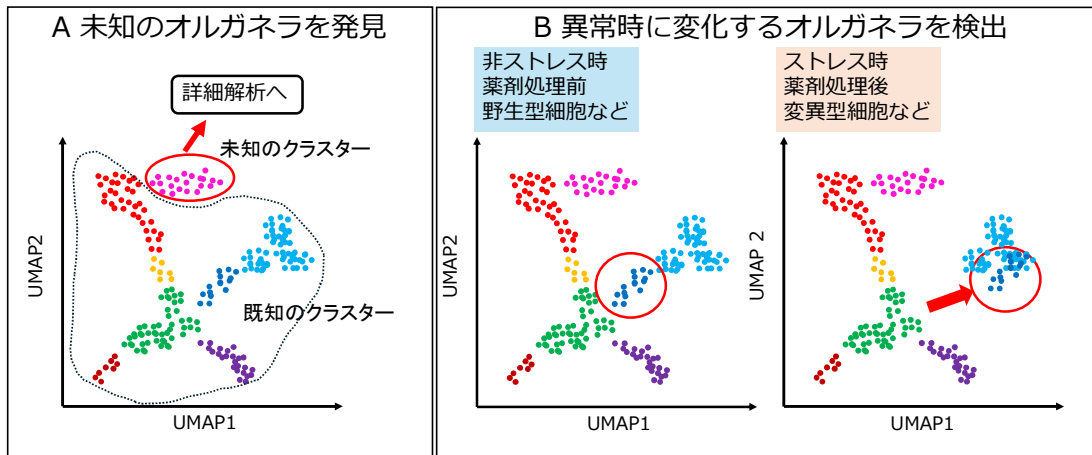


図4 オルガネラランドスケープ解析の想定される応用例の模式図

- A. オルガネラランドスケープ解析では、これまで知られていたオルガネラを構成するクラスターに加えて、未知のクラスター（赤枠）が検出されるかもしれない。さらに、そのようなクラスターを採取して詳細な解析（オミクスや電子顕微鏡解析など）を組み合わせることで、新規のオルガネラとしての特徴を発見できる可能性がある。
- B. 細胞外環境や遺伝的要因の変化はオルガネラに対してさまざまな変化を引き起こすが、このような複雑な様子を捉えるのにオルガネラランドスケープ解析は適している。例えば、ストレス、薬剤処理や遺伝子変異などの変化によって、赤枠で示したようなオルガネラランドスケープの分布の変化が見られた場合、どのオルガネラに影響があるのかを一目で見つけることができる。

発表者・研究者等情報

東京大学大学院医学系研究科

水島 昇 教授

本田 郁子 准教授

栗川 義峻 特任助教

田村 律人 特任研究員：研究当時

現：欧州分子生物学研究所 博士研究員

小池 誠一 特任助教：研究当時

現：富山大学大学院生命融合科学教育部 特命助教

論文情報

雑誌名：PLOS Biology

題名：Organelle landscape analysis using a multi-parametric particle-based method

著者名：Yoshitaka Kurikawa[‡], Ikuko Koyama-Hondal^{‡, *}, Norito Tamura, Seiichi Koike, & Noboru Mizushima* ([‡]共同第一著者、*共同責任著者)

DOI: 10.1371/journal.pbio.3002777

URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002777>

研究助成

本研究は、科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究（ERATO）「水島細胞内分解ダイナミクスプロジェクト（課題番号：JPMJER1702）」（研究総括：水島昇）、科学研究費助成事業 特別推進研究「膜構造の分解を基軸とした細胞内分解の研究（課題番号：22H04919）」（代表：水島昇）、科学研究費助成事業 基盤研究(C)「オルガネラ粒子マルチパラメーター計測で展開する細胞内オルガネラ遷移」(代表:本田郁子)の支援により実施されました。

用語解説

（注1）細胞小器官

オルガネラとも呼ばれる細胞小器官は、真核生物の細胞内で膜などによって区画された構造単位である。核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、ペルオキシソームなどがあり、各々が生命の維持に不可欠な特有の機能を持つ。例えば、核はDNAの保護と遺伝情報の制御、ミトコンドリアはエネルギー生産、小胞体はタンパク質の合成と修飾、リソソームは細胞内物質の分解などを担当し、互いに協調して細胞の恒常性維持に寄与している。オルガネラの適切な機能は、細胞の健康状態と密接に関連しており、その異常はさまざまな疾患の原因となることがある。

（注2）空間分解能

空間分解能とは、空間的に近接した2つの点や物体を区別できる能力を指す。高い空間分解能は、より小さな構造や混み入った物体どうしの位置関係を識別できることを意味する。本研究では、オルガネラを個別の粒子として分離することで、従来の手法よりも高い空間分解能でオルガネラを観察することを可能にした。

（注3）UMAP（Uniform Manifold Approximation and Projection）

多次元データを二次元や三次元の空間に投影する次元削減技術の一つ。複雑なデータ構造を保持しながら可視化することができ、クラスタリングや分類などのデータ分析に広く用いられる。本研究では、多種類のオルガネラマーカーの情報を二次元平面上に表現し、オルガネラの全体像を把握するために使用された。

（注4）小胞体とミトコンドリアの接触部位

小胞体とミトコンドリアが近接し、物理的に接触している領域。この接触部位は、カルシウムシグナリング、脂質代謝、オートファジーの制御など、さまざまな細胞機能に重要な役割を果たしている。近年、これらの接触部位の重要性が認識され、その構造や機能の解明が進んでいる。

（注5）エンドサイトーシス関連オルガネラ

細胞が外部環境から物質を取り込む過程（エンドサイトーシス）に関与するオルガネラの総称。初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、リソソームなどが含まれる。これらのオルガネラは、取り込んだ物質の選別、分解、再利用などの過程で連携して機能し、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしている。

(注6) クラスタリング

クラスターとは、類似した特性を持つデータポイントやオブジェクトの集合を指す。クラスタリングは、大量のデータを類似性に基づいていくつかのグループ（クラスター）に分類することである。本研究では、多次元データを分析する際に機械学習を用いたクラスタリング技術を使用し、異なるタイプのオルガネラやその状態を識別・分類した。これにより、複雑なオルガネラの分布や関係性を視覚化し、理解することが可能になった。

問合せ先

<研究内容について>

東京大学大学院医学系研究科

教授 水島 昇 (みずしま のぼる)

Tel : 03-5841-2862 E-mail : nmizu[at]m.u-tokyo.ac.jp

准教授 本田 郁子 (ほんだ いくこ)

Tel : 03-5841-2862 E-mail : honikuko[at]m.u-tokyo.ac.jp

<JST 事業に関すること>

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部 ICT/ライフィノベーショングループ

今林 文枝 (いまばやし ふみえ)

Tel : 03-3512-3528 E-mail : eratowww[at]jst.go.jp

<機関窓口>

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム

Tel : 03-5841-3304 E-mail : ishomu[at]m.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

Tel : 03-5214-8404 E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp