

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18370062

研究課題名（和文）免疫クライオ電顕による新鮮膜細胞骨格ナノ分子システムの解明

研究課題名（英文）Nano architecture of membrane cytoskeleton in native state revealed by immuno-cryo-electron microscopy

研究代表者

臼倉 治郎 (USUKURA JIROU)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授

研究者番号：30143415

研究成果の概要：膜細胞骨格の主成分であるアクチン線維の空間構造が明らかにされた。アクチン線維は空間的に膜に密着するタイプと膜面と平行に走り所々で接着するタイプおよびストレスファイバーに分類でき、独特の網目構造作り運動と関与する線維は第二のものであることが分かった。また、これらを制御するアクチン結合タンパク質にも空間特異性があることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：細胞生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：膜細胞骨格、クライオ電顕、アクチン線維、

1. 研究開始当初の背景

分子生物学的手法により様々なタンパク質が精製され、結晶構造が解かれている現在、今後の課題は機能との関連を細胞内で探ることである。細胞内ダイナミクス分野では細胞内輸送、ラメリポディアの形成、細胞周期に伴うダイナミクスendocytosis など多くの課題が研究されてきたが今ひとつ具体性に欠け、根本的な理解に至らなかった。それは標的物質、細胞骨格、制御タンパク質、膜などの相互の位置関係（空間構造）が理解されない（画像として視覚化されない）ためと考えている。そこで、我々が開発した標本作製技術で標的物質を同定しながら膜・細胞骨格の空間構造を三次元的に実

像として観察し、幾つかの重要な細胞内ダイナミクスを根本的に解明することを目標としている。

2. 研究の目的

これまで細胞内ダイナミクスの解析は主に生化学的な分析と蛍光顕微鏡を用いたlive cell imaging が主流であった。live cell imaging では機能状態を観察できるが、対象とするタンパク質が単なる輝点であり、その内部構造（形）はもとより、その周辺に何があるか（空間構造）まではわからない。生化学的研究では、一般に、個々のタンパク質に注目し、それと結合するタンパク質を一つ一つ調べ上げてきた。しかし、この方法では数多くのタンパク質が集合離散を繰り返している動的な系（システム）の全体像を把握する

ことは困難であり、それゆえシステムの「へそ」を捉えることができない。そこで個々の部品の位置関係からシステムの全体像を捉えるという発想に転換した。すなわち、細胞内ダイナミクスを空間構造から解析することである。このためには電顕による観察が必須であるが、従来の切片法、免疫細胞化学、フリーズフラクチャー法では細胞骨格や標的タンパク質との空間構造を観察するのは難しく、これまでは実現しなかった。最近、我々は標本作製技術として新 unroofing 法を開発し、急速凍結フリーズエッチング法と免疫標識法と組み合わせる技術を開発した。その結果、標的分子を同定しながら膜細胞骨格を3D トモグラフィーとして観察することに成功した(J. Cell Biol2006, Nature Cell Biol. 2008)。また、水を含んだネイティブな膜構造をクライオ電顕で観察することにも成功した(投稿中)。これらの基盤技術をもとに膜細胞骨格の空間構造を解析し、膜機能といかに結びついているかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の特色は新しい方法論により新しい視点から細胞内ダイナミクスを明らかにすることである。本研究により確立した新電顕技術である免疫フリーズエッチングトモグラフィー(「よくわかる生物電子顕微鏡技術」白倉治郎著 共立出版 2008、J. Cell Biol 2006, Nature Cell Biol. 2008)とクライオ電顕法により、細胞の leading edge にある膜細胞骨格の空間構造を明らかにする。

4. 研究成果

急速凍結フリーズエッチング法による膜裏打ち構造の観察

最初にタンパク質を同定せずに膜裏打ち構造の電子顕微鏡像を示し、概説する。図1はラットの皮膚細胞由来である FRSK 細胞の腹側細胞膜の細胞質側表面像である。細胞を壊し、細胞質を洗い流してもなお相当量のアクチン線維や中間径線維であるケラチン線維、微小管、クラスリンなどが膜に付着していた。ここに存在するアクチン線維はいわゆる細胞骨格とは別物と言うわけではなく、相互に連絡している。しかし、全く同じではなく、後述するようにこれらのアクチン線維に結合するタンパク質は細胞質中のストレスファイバーとは異なっていた。後ほどこれらの線維がアクチンからなることを証明するが、これらの線維は抗体標識によらずともそれらの太さと形状で識別できる。アクチン線維がなぜ膜に密着するのかその仕組みは分らないが、よく観察すると束ではなく1本1本のアクチン線維として膜に付着している。図2のように拡大すると線維上に明瞭な縞目模様を見ることができるが、これはGアクチンの結合により線維が形成されているため

である。要するに縞目間の粒状の物質がGアクチン分子そのものである。

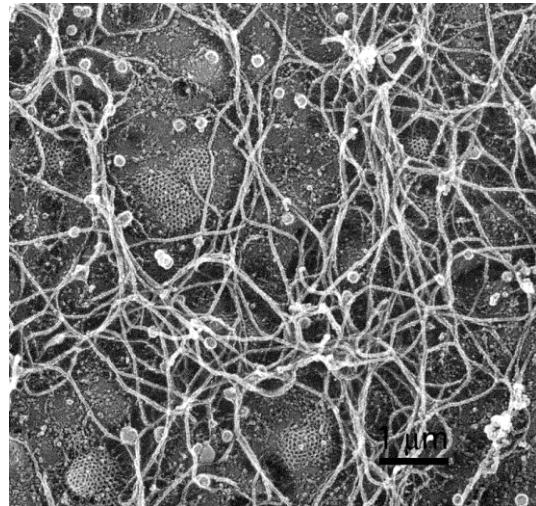


図1 FRSK 細胞腹側膜の細胞質側表面

この写真で曲がりくねって走行している大半の線維がケラチンよりなる中間径線維(10nm 線維)である。アクチン線維とは異なり膜面より少し浮いて分布している。

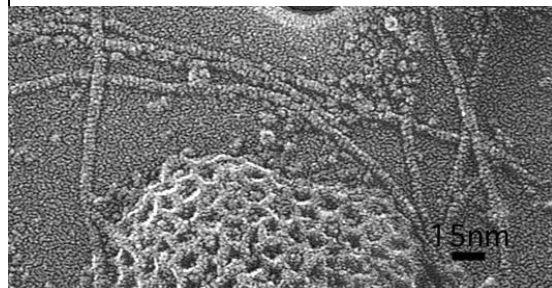


図2 膜に密着するタイプのアクチン線維

免疫フリーズエッチングによる解析

免疫標識は物質と形態を結びつける有力な手段であり、これを利用した免疫細胞化学は光学顕微鏡、電子顕微鏡の観察手段を問わず形態学で最も頻繁に使用されている。しかし、切片の表面に露出しているエピトープを免疫標識するこれまでの電子顕微鏡免疫細胞化学では標的タンパク質のおよその場所が分るだけであり、どの構造物の構成要素であるかは分らない。フリーズエッチングと免疫標識を結びつけることは困難であったが、unroofing により抗体を容易に膜の細胞質表面に到達させることができるため可能となった。当然のことながら免疫フリーズエッチングレプリカは電子顕微鏡で観察するため、二次抗体は電子線に対してコントラストを持つ金コロイド標識を使用している。したがって、金コロイドがどこにあるかで標的タンパク質を同定する。例えば膜細胞骨格のアクチン線維とスペクトリンが区別でき、Arp2/3 がアクチ

ン線維の枝分かれ部分に存在することなどより詳細な存在場所が明らかとなる。我々は免疫細胞化学ではなくむしろ免疫分子化学に近いと考えている。図3はIQGAP1に対する抗体で標識した膜細胞骨格であり、このタンパク質がアクチン線維上に存在することが分る。IQGAP1はRho-ファミリー GTPaseであるCdc42, Rac1の下流で機能するタンパク質であるが、他のタンパク質を介せず直接アクチン線維と結合できる。Cdc42は膜タンパク質であるのでIQGAP1はアクチン線維とCdc42を架橋し、アクチン線維を膜に付着させるように働いているのかもしれない。したがって、Cdc42はIQGAP1を介し間接的に膜細胞骨格のアクチン線維ネットワークの再編などに関与していると予測される。実際、IQGAP1は培養細胞では細胞質に近いストレス線維よりも細胞周辺部の膜裏打ちアクチン線維に豊富であることから、ラメリポディアや細胞の伸張運動に関与していると考えても不思議ではない。実はこのような観察結果は極めて重要で、IQGAP1はアクチン結合タンパク質であるが場所特異性があり、場所と必要に応じてアクチン線維と結合することを示唆している。これは他のアクチン結合線維についても言えることであろう。必要に応じての結合には磷酸化などを考慮すれば良いのであるが、なぜ場所特異性が生まれるのかは今後明らかにされるべき問題である。すなわち、ストレスファイバーを形成するアクチン線維と膜に密着するアクチン線維は性質が異なることを意味しており、結合蛋白質がそれらを見分けてアクチン線維に結合していることになる。図4はGFP-アクチンを発現しているHeLa細胞を抗GFP抗体で標識した膜細胞骨格である。ほとんどのアクチン線維が抗GFP金コロイドで標識されているのが分る。蛍光顕微鏡と比較することで光学顕微鏡によるlive cell imagingとの整合性がとれるので今後重要な標識法となるであろう。なお、これらの写真は見やすくするためにコントラストを逆転させている(ネガフィルムのまま)。したがって、金コロイドは白い点として観察され、その周りにはIgGのハローが存在する。丁度二重丸のようにも見える。

クライオ電子顕微鏡による膜細胞骨格解析

クライオ電子顕微鏡は名前の通り極低温で観察できるので、試料が十分薄ければ急速凍結することにより水を含んだ新鮮材料を観察することができる。しかし、前処理をいっさいしない新鮮生物試料は電子散乱が少ないのでコントラストが低く、かつ電子線

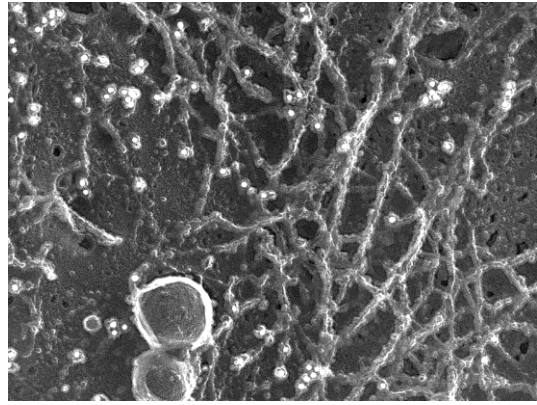


図3 抗IQGAP1で標識した細胞膜細胞質側表面のフリーズエッチング像コントラストを反転しているため金コロイドは白い点として見える。

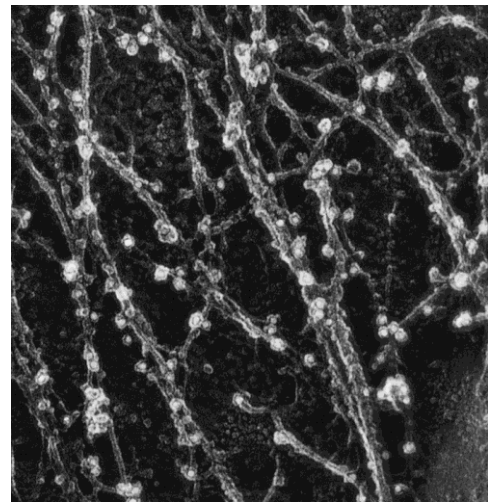


図4 GFP-アクチンを発現している細胞の膜細胞骨格を抗GFP抗体で標識したフリーズエッチング像

照射による熱損傷を受けやすい。そのため長時間電子線を照射しながら目的の場所を探すことは難しい。これまでは生細胞の観察よりは分離精製したタンパク質の構造解析が中心に進められた。電子線により透過像が得られる厚さは加速電圧にもよるが200nm以下であるので細胞丸ごとの観察は難しい。仮に電子線が透過しても細胞質が厚く、多重散乱により像は不鮮明なものとなる。しかし、最近Max-PlanckのBaumeisterのグループは電子顕微鏡用のメッシュグリッド上に細胞を培養し、急速凍結して細胞質の少ない周辺部分に電子線を当て観察した。それでもかなり厚いのでZ軸方向の構造の重複や多重散乱による像の不明瞭さはさけられないが、トモグラフィーにより立体再構築することで解決した。我々は膜剥離により得た背側膜とその膜細胞骨格複合体を観察することを考えつき、よい結果を得た。膜細胞骨格は前述のように唯一

リーズエッチングでのみ観察可能であったが、クライオ電子顕微鏡による新鮮状態での観察はそれぞれの方法の結果を相互に検証できることを意味しており大きな進歩である。新鮮状態のアクチン線維は直線的ではなく、流線を描いて走行し、微小管も大きなカーブを描きながら断片化せず伸びていることが分かった(図5)。免疫標識も可能であるが、抗体を反応させるために時間がかかるので軽く固定する必要がある。しかし、水を含んだ状態で観察できることと、前述のように免疫フリーズエッチングでしか得られない情報を別の方法で検証できると言うことは特筆すべき点である。図6は図3と同様アクチン結合蛋白の一つである IQGAP1 に対する抗体で標識した膜の裏打ち構造である。脱水、包埋などをしていないので抗原性がよく保存されており、S/N比が小さく標識はアクチン線維上のみ存在する。また、免疫フリーズエッチングとは異なり白金も蒸着していないので、標識である金コロイド粒子を容易に識別できる。

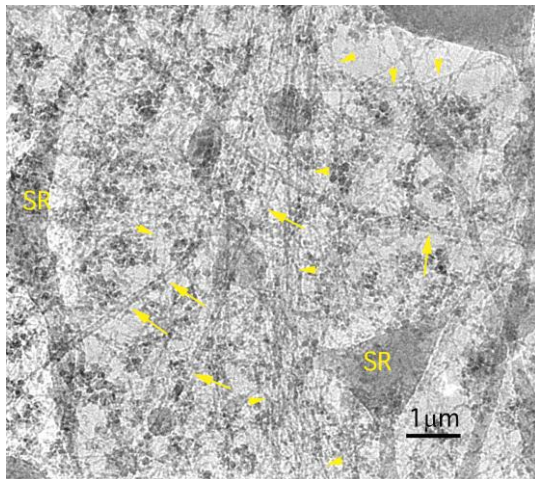


図8 無固定新鮮状態の膜細胞骨格のクライオ電子顕微鏡像
黄色の二重矢印は微小管、一面に存在する細い線維(矢頭)はアクチン線維、SRは滑面小胞体を示す。

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12件)

- ① Kondo M, Sakai T, Komeima K, Kurimoto Y, Ueno S, Nishizawa Y, Usukura J, Fujikado T, Tano Y, Terasaki H. Generation of transgenic rabbit model of retinal degeneration
Invest Ophthalmol Vis Sci. 50 1371-1377 2009 査読有

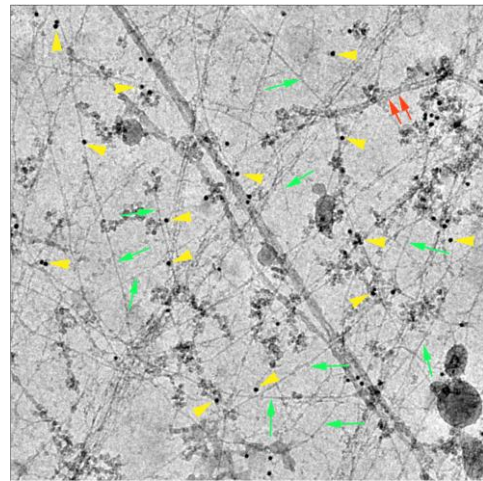


図9 抗IQGAP1抗体で標識した膜細胞骨格のクライオ電子顕微鏡像
緑色の小矢印はアクチン線維、矢頭はIQGAP1の抗体標識、二重矢印は微小管

- ② Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, Sawai H, Kobayashi K, Tani A, Toda T, Usukura J, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation
Nature Neurosci. 11 2008 923-931 査読有
- ③ Morone N, Nakada C, Umemura Y, Usukura J, Kusumi A.
Three-dimensional molecular architecture of the plasma-membrane-associated cytoskeleton as reconstructed by freeze-etch electron tomography
Methods Cell Biol. 88 2008 207-236 査読有
- ④ Watanabe T, Wang S, Kakeno M, Usukura J, Kaibuchi K.
Ultrastructural study of Rac1 and its effectors beneath the substratum-facing membrane.
Cell Struct Funct. 33 2008 101-107 査読有
- ⑤ Yoshimura K, Usukura J, Sokabe M.
Gating-associated conformational changes in the mechanosensitive channel MscL.
Proc Natl Acad Sci U S A. 105 2008 4033-8 査読有
- ⑥ Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Kondo T, Constantini F, Murohara T, Takahashi M. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin.
Nature Cell Biol. 10 2008 329-337 査読有
- ⑦ Sakata S, Watanabe Y., Usukura J, Mabuchi I
Characterization of native myosin VI isolated from sea urchin eggs. *J Biochem.* 42 481-90 2007 査読有
- ⑧ Sakurai K, Onishi A, Imai H, Chisaka O, Ueda Y, Usukura J, Nakatani K, Shichida Y
Physiological properties of rod photoreceptor cells in green-sensitive cone pigment knock-in mice.
J Gen Physiol. 130 21-40 2007 査読有

- ⑨ Sugiura K, Muro Y, Nishizawa Y, Okamoto M, Shinohara T, Tomita Y, Usukura J LEDGF/DFS70, a major autoantigen of atopic dermatitis, is a component of keratohyalin granules. *J. Invest. Dermatol* 127:75-80 2007 査読無
- ⑩ Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai S, Ike H, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography *J. Cell Biol.* 174 851-862 2006 査読有
- ⑪ Matsui T, Hogetsu K, Usukura J, Sato T, Kumasaka T, Akao Y, Tanaka N Structural insight of human DEAD-box protein rck/p54 into its substrate recognition with conformational changes. *Genes Cells* 11 439-452 2006 査読無
- ⑫ Yamazaki A, Yamazaki M, Yamazaki RK, Usukura J Illuminated rhodopsin is required for strong activation of retinal guanylate cyclase by guanylate cyclase-activating proteins. *Biochemistry* 45 1899-1909 2006 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① Usukura J. 3D architecture of membrane cytoskeleton and spatial specificity of actin binding proteins revealed by immuno-freeze-etching electron microscopy. Ninth International Symposium on Biomimetic Materials Processing January 20-23 2009 Nagoya Japan
- ② Usukura J. Spatial architecture of membrane cytoskeleton and spatial specificity of actin binding proteins revealed by immuno-freeze-etching and cryo-microscopy. The 48th Annual meeting of the American Society for Cell Biology December 13-17 2008 San Francisco, USA
- ③ Usukura J. 3D Architecture of Membrane Cytoskeleton and Spatial Specificity of Actin Binding Proteins Revealed by Immuno-freeze-etching and Cryo-microscopy. The 39 NIPS International Symposium November 10-12 2008 Okazaki Japan
- ④ Usukura J. 3D Architecture of Membrane of Undercoat and Spatial Specificity of Actin Binding Protein Localization. The 5th International Forum on Oxidative Stress and Aging September 12-13 2008 Ancona, Italy
- ⑤ Usukura J. 3D architecture of membrane undercoat and spatial specificity of actin binding proteins revealed by immuno-freeze-etching and

cryo-electron microscopy. XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. August 23-27 2008 Medical University of Gdansk, Poland

- ⑥ 臼倉治郎 Molecular shapes reconstructed on the artificial membrane. The First iCeMS International Symposium The Eleventh MEMBRANE RESEARCH FORUM 2008 年 2 月 21 日 京都フジタホテル
- ⑦ 臼倉治郎 A Pilot Study for the Assessment on a Biological Toxicity Caused by Nano-particles. Eight International Symposium on Biomimetic Materials Processing 2008 年 1 月 21 日-24 日 Noyori Conference Hall
- ⑧ 臼倉治郎 Cryo-electron microscopic analysis of three dimensional membrane cytoskeleton 第 40 回日本発生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会 2007 年 5 月 28 日-30 日 福岡国際会議場
- ⑨ 臼倉治郎 次世代電子顕微鏡技術による細胞内空間構造の解明を目指して 日本電子顕微鏡学会 2007 年 5 月 21 日 新潟コンベンションセンター

[図書] (計 1 件)

- ① 臼倉治郎 「よくわかる生物電子顕微鏡技術—プロトコール・ノウハウ・原理」共立出版 2008 年 7 月 200 頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.numse.nagoya-u.ac.jp/bio>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼倉 治郎 (USUKURA JIROU)
名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授
研究者番号：30143415

(2) 研究分担者

田中 信夫 (TANAKA NOBUO)
名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授
研究者番号：40126876

渡辺 崇 (WATANABE TAKASHI)
名古屋大学・高等研究院・特任講師
研究者番号：10402562