

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19548

研究課題名（和文）クライオ電子顕微鏡を用いた心筋リモデリングの分子基盤の解明

研究課題名（英文）Cryo-EM structural analysis of the cardiac remodeling

研究代表者

仁田 亮（Nitta, Ryo）

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40345038

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：in vitro構造解析では、心筋細胞圧負荷刺激への関与が示されている微小管、微小管結合タンパク質MAP4、微小管モーターKinesinの三者複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析を行い、MAP4による微小管安定化とKinesinの運動阻害の分子機構を解明した。
in cell構造解析では、iPS心筋細胞を用いて、グリッド上での細胞培養、高圧凍結、凍結置換処理、電子顕微鏡観察のルーチン化に取り組み、サルコメアなど種々のオルガネラを高分解能で描出することに成功した。さらに、目的分子の高分解能立体構造を取得するため、FIB-SEMによる細胞切削、クライオ電子線トモグラフィー撮影、立体構築手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小管結合タンパク質MAP4はタウファミリータンパク質の一つであり、こららによる微小管の安定化制御が破綻すると、心不全や認知症などさまざまな病態が引き起こされる。そのため、今回の高分解能構造解析の知見は、心不全や認知症など細胞の変形を伴う疾患の病態解明や、新たな治療薬の開発につながる成果である。また、細胞レベルのクライオ電子線トモグラフィー解析は、様々な生理動態・病態を、細胞内の分子構造の変化として捉えることができる唯一の手法である。ゆえに本研究により、細胞内で起こっている現象を分子レベルで可視化することが可能となり、細胞生物学・分子病理学などの大きなブレイクスルーにつながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In vitro cryo-EM structural analysis of kinesin-MAP4-microtubule complex revealed the molecular mechanism of the microtubule stabilization by MAP4 as well as the inhibition mechanism of kinesin motility by MAP4.

We have also performed in cell structural analysis using electron tomography. Freeze substitution of iPS cardiomyocytes clearly visualized several organelles including the sarcomere. Cryo-electron tomography of iPS cardiomyocytes provided higher resolution structures of large molecular complexes in cell, including the lamin network lining the inside of nuclear envelope.

研究分野：解剖学、組織学、細胞生物学、構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 クライオ電子線トモグラフィー 構造生物学 心筋リモデリング 心筋症 微小管 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋組織は常に心臓内圧変化を感知して循環血液量の調節を行っている。しかし、心臓内圧の過度な持続的上昇は、心筋細胞の機械的伸展を介して交感神経系および内分泌系を賦活化し、心筋組織を代償性病理解答へと導く。この現象を心筋の「リモデリング」と呼び、心筋細胞は肥大化して弾性を失い、求心性心肥大による不可逆性の心室拡張不全を来し、次いで慢性炎症の機転により間質の繊維化・血管新生が進み、終末期には心室収縮不全に陥る。心筋細胞のリモデリングは高血圧性心筋症、弁膜症、心房細動、心筋梗塞後、肥大型・拡張型心筋症など様々な心疾患の予後をも左右する重要な病理解答であるが、それを完全に制御できる治療法はなく、心筋細胞リモデリングの分子機構解明および新規治療法開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、最先端のクライオ電子顕微鏡構造解析技術を駆使して、リモデリング心筋細胞の原子から細胞レベルにおけるシームレスな構造解析を行い、心筋細胞リモデリングの分子病理機構解明を目的とする。まずは圧負荷(伸展)刺激への関与が示されている微小管、微小管結合蛋白質 MAP4、微小管モーターKinesin を主要な役者とし、リモデリング時に誘導される微小管を中心とした病理解答機構を構造生物学的に解明し、さらにリモデリング責任分子の原子分解能構造解明による新規創薬に向けたシーズ創出を目指す。

3. 研究の方法

A. in vitro 構造解析(クライオ電子顕微鏡単粒子解析)

微小管-Kinesin-MAP4 複合体の高分解能構造解析を行い、MAP4 による微小管安定化と Kinesin の運動阻害の分子機構を解明する。

B. in cell 構造解析(電子線トモグラフィー)

iPS 心筋細胞にストレッチ(伸展)刺激を負荷した際の、細胞内の微小管を中心とした構造・立体構築の変化を電子線トモグラフィーにより解明する。ストレッチ刺激時間を変化させ(0-24 時間)、形態・構造の変化を時系列で追跡し、リモデリングの病理構造基盤を明らかにする。まずは細胞内を広く俯瞰する目的で凍結置換法によるサンプル調整を行い、その後クライオ電子線トモグラフィー解析に向けてサンプル調整・データ取得に進む。

4. 研究成果

A. in vitro 構造解析(クライオ電子顕微鏡単粒子解析)

我々はクライオ電子顕微鏡の単粒子解析法により、一本の微小管に MAP4 と Kinesin を結合した複合体の高分解能 立体構造解析に成功した。これによると、MAP4 は微小管の長軸方向に沿って結合し、tubulin 同士の縦の結合を安定化することにより微小管の脱重合を抑制していることがわかった。また、MAP4 と Kinesin が同時に微小管に結合すると、MAP4 は Kinesin を微小管上にトラップすることにより Kinesin の微小管上の運動を阻害し、その結果、細胞内物質輸送を阻害することが明らかとなった。

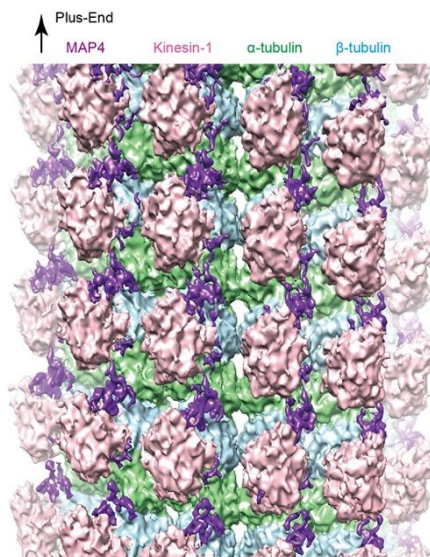


図 1: 微小管-Kinesin-MAP4 複合体のクライオ電子顕微鏡構造

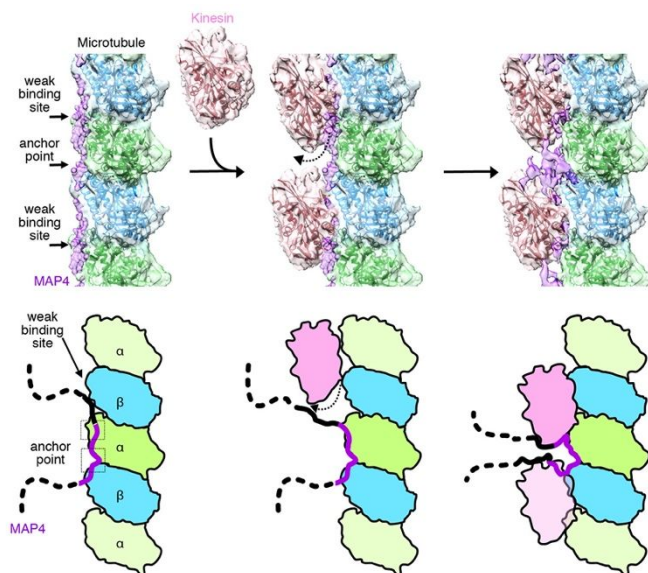


図 2: 微小管-Kinesin-MAP4 複合体の詳細構造および MAP4 による Kinesin 運動阻害のモデル

B. in cell 構造解析 (電子線トモグラフィー)

健常者由来の iPS 心筋細胞を用いて、電子顕微鏡グリッド上での培養、高圧凍結、凍結置換処理、電子顕微鏡観察、電子線トモグラフィー撮影・立体構築のルーチン化に取り組み、サルコメアや種々のオルガネラ、核膜周囲の構造などを俯瞰するとともに、高分解能で立体構築することに成功した。さらにこれらを、より高分解能な立体構造として描出するために、クライオ電子線トモグラフィー法の確立を行った。そのためには、急速凍結処理をした心筋細胞を、クライオ条件(-180)に保ったまま、200-300 nm の厚さに削る必要がある。そのために FIB-SEM(収束イオンビーム走査型電子顕微鏡)による細胞切削技術を導入した。健常者由来の iPS 心筋細胞を用いて、FIB-SEM(収束イオンビーム走査型電子顕微鏡)による切削条件を確立し、クライオ電子線トモグラフィーにより撮影、立体構築を行った。その結果、ラミンネットワークなどの立体構造を高分解能で可視化することに成功した。一方で、クライオ電子線トモグラフィー用試料作製の効率化、特に、目的の場所を効率的に見つけるために、クライオ蛍光顕微鏡との併用を検討すること、また、クライオ電子顕微鏡像のコントラストを上げるための技術開発、さらには、得られた画像の迅速な処理方法の開発など、様々な課題が浮かび上がってきており、今後の研究で一つ一つ克服・解決していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigematsu Hideki, Imasaki Tsuyoshi, Doki Chihiro, Sumi Takuya, Aoki Mari, Uchikubo-Kamo Tomomi, Sakamoto Ayako, Tokuraku Kiyotaka, Shirouzu Mikako, Nitta Ryo	4. 巻 217
2. 論文標題 Structural insight into microtubule stabilization and kinesin inhibition by Tau family MAPs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 4155 ~ 4163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201711182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shima Tomohiro, Morikawa Manatsu, Kaneshiro Junichi, Kambara Taketoshi, Kamimura Shinji, Yagi Toshiki, Iwamoto Hiroyuki, Uemura Sotaro, Shigematsu Hideki, Shirouzu Mikako, Ichimura Taro, Watanabe Tomonobu M., Nitta Ryo, Okada Yasushi, Hirokawa Nobutaka	4. 巻 217
2. 論文標題 Kinesin-binding?triggered conformation switching of microtubules contributes to polarized transport	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 4164 ~ 4183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201711178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nitta Ryo, Imasaki Tsuyoshi, Nitta Eriko	4. 巻 67
2. 論文標題 Recent progress in structural biology: lessons from our research history	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 187 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfy022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 X線とクライオ電子顕微鏡で観る細胞骨格研究
3. 学会等名 第23回神戸ポートアイランド創薬フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 X線とクライオ電子顕微鏡で観る細胞骨格研究：原子レベルから細胞・組織レベルへの展開
3. 学会等名 第5回HONGO HEART CLUB（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 臨床から基礎へ：医師のキャリアパスを考える
3. 学会等名 関西5医科大学研究医養成コースコンソーシアム合宿（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 自己紹介と神戸大学における教育・研究の展開
3. 学会等名 新緑会平成31年新春学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 微小管が織りなす生命現象の構造生命科学的探求
3. 学会等名 神戸大学先端融合研究環シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 Cryo-EM and X-ray Structural Studies to Elucidate the Microtubule Mediated Physiological Phenomena
3. 学会等名 第5回Neuroscience Network in Kobeシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 微小管が織りなす生命現象の構造生命科学的探求
3. 学会等名 日本医学会連合Rising Starリトリート(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 微小管が織りなす生命現象の超分子解剖学的探求
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 Cryo-electron microscopic analyses of cardiomyocytes to elucidate the structural mechanisms of the mechano-responses in heart
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電顕で見る細胞骨格ネットワーク構築の分子構造基盤
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小室一成（今崎剛，仁田英里子，仁田亮（分担執筆））	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 210
3. 書名 Cutting Edge of Molecular Cardiology 新しい臨床を開拓するための分子循環器病学	

1. 著者名 田中 啓二、若槻 壮市（仁田亮，今崎剛（分担執筆））	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 248
3. 書名 イメージング時代の構造生命科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----