

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19352

研究課題名（和文）クライオ電子顕微鏡による細胞内分子構造解析法：微小管形成の場を原子レベルで捉える

研究課題名（英文）Cryo-EM visualization of the intracellular molecular imaging

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、中心体非依存性微小管ネットワークの形成の場を題材に、クライオ電子顕微鏡法による細胞内分子構造解析法の整備を行った。目的タンパク質を蛍光標識したCOS7細胞をグリッド上で培養・急速凍結し、クライオ蛍光顕微鏡で標的分子のグリッド上でのマップを作成、その後、細胞周辺の薄い部分を狙ってクライオ電子線トモグラフィー撮影を行った。得られた画像を3次元再構成し、その解釈は深層学習またはテンプレートマッチングにより自動化に成功した。また、iPS心筋細胞を用いて、核周辺のZ軸方向に5-10 μm の厚さのある部分をFIB-SEMにて薄切し、クライオ電子線トモグラフィー法のスキームを一通り確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞レベルのクライオ電子線トモグラフィー解析は、細胞内局所で起こる様々な生理的・病理的反応の場を、細胞内の分子構造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ークスルーにつながることを期待される。今後の課題は、本手法のスループットを如何に向上させ、一般的な技術として定着させるかである。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we developed a method for analyzing intracellular molecular structures by cryo-electron microscopy, visualizing the centrosome-independent microtubule network formation. COS7 cells transfected with the fluorescently labeled target protein were cultured on an EM grid and quickly frozen. The cryo-CLEM produced the map of target molecules on the grid, followed by cryo-electron tomography imaging. The resulting image stacks were reconstructed in 3D, and their interpretation was successfully automated by deep learning or template matching. In addition, using iPS cardiomyocytes, thin sections 5-10 μm thick in the Z-axis direction around the nucleus were cut by FIB-SEM. A whole scheme of the cryo-electron tomography method was established.

研究分野：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 クライオCLEM クライオFIB-SEM 微小管

1. 研究開始当初の背景

これまで構造生物学的手法は、様々な生体分子の原子分解能の構造を明らかにすることによって、その作動機構の解明に大きく貢献してきた。一方、構造生物学的手法により解明された原子構造が、細胞内の生理的・病理的研究課題に応用されることはまれであり、細胞レベルの現象を対象とする細胞生物学的解析と構造生物学的解析との間には大きなギャップが存在する。

そのような中、昨今のクライオ電子顕微鏡解析技術の発展により、細胞内で分子構造を測定するポテンシャルを持つクライオ電子線トモグラフィー法が注目を集めている。しかし、細胞レベルのクライオ電子線トモグラフィー法はまだ過渡期の技術で、細胞内の分子構造の測定を行うためには、まだルーチン化されていない多くの工程・装置が必要となる。

2. 研究の目的

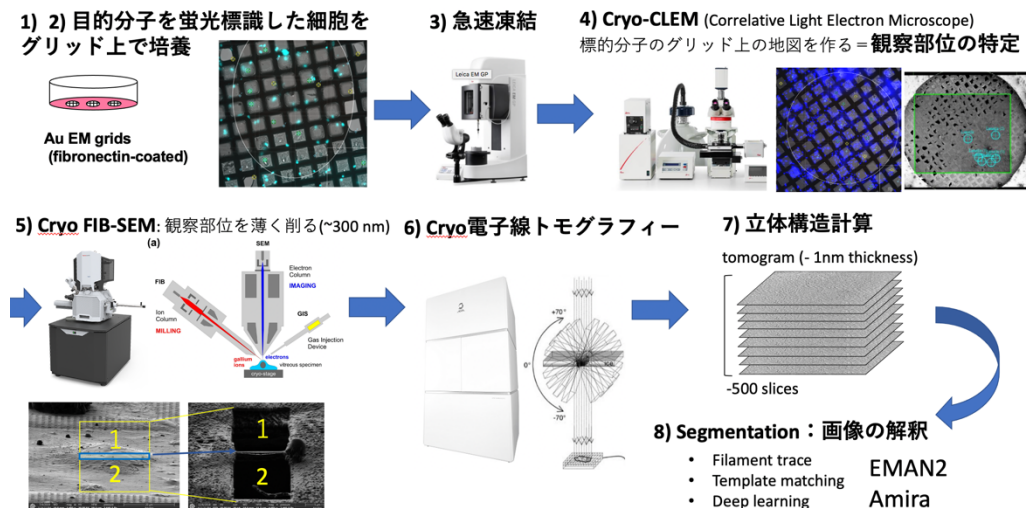
本研究は細胞生物学的解析と構造生物学的解析との間のギャップを埋めるための技術開発・整備を目的とする。クライオ電子線トモグラフィー法を中心技術として、細胞内 *in vivo* の分子構造を 1 ナノメートル以上の高分解能で解明するための技術基盤を整備し、構造生物学的手法を細胞生物学的課題に適用できるようにする。これにより、細胞内局所で起こる様々な生理的・病理的反応の場を、細胞内の分子構造変化として捉えることが可能となり、医学・生命科学的課題へ応用できる技術を開拓できる。

3. 研究の方法

クライオ電子線トモグラフィー法の工程を一つずつ確認し、技術の最適化を行う。工程は以下の順番で行う (図1)。

- 1)細胞内目的分子の蛍光標識
- 2)細胞の電子顕微鏡グリッド上での培養：電顕グリッド上での培養では、PRIMOによる細胞のパターニング技術を導入し、トモグラフィーでデータを取得したい部分を撮影しやすい場所に配置できるようにする。
- 3)急速凍結：Vitrobot MARK IV (Thermo Fisher Scientific)またはEMGP2 (Leica) を用いた条件検討を行う。
- 4)クライオ蛍光顕微鏡 (Cryo CLEM) によるグリッド上分子マップの作製：Cryo-CLEM (Leica) を導入し、クライオ条件でグリッド上の蛍光マップを作製し、FIB-SEM、Cryo-EM へアウトプットする。
- 5)クライオ収束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (Cryo FIB-SEM) による試料の薄切：阪大蛋白研に設置の Cryo FIB-SEM Aquilos(Thermo Fisher Scientific)を使用し、ミリングの条件検討・効率化を行う。
- 6)クライオトモグラフィーデータ取得：阪大蛋白研のクライオ電子顕微鏡 Krios (Thermo Fisher Scientific) を使い、データの取得方法および自動データ取得法の最適化を行う。
- 7)三次元再構成：IMOD (フリーウェア) を用いた三次元再構成を行う。
- 8)画像解析 (Segmentation)：EMAN2 (フリーウェア) および Amira (Thermo Fisher Scientific) を使い、トモグラムからの分子自動認識の条件検討を行う。

図1. クライオ電子線トモグラフィーのワークフローの構築



4. 研究成果

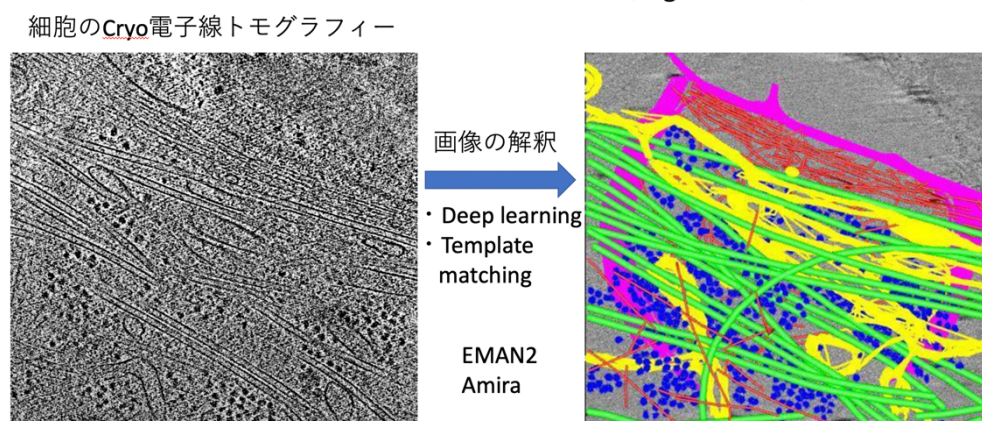
モデル細胞として COS7 細胞、iPS 心筋細胞を用い、前者は Lifeact-mCherry を用いて actin を蛍光標識して細胞の辺縁に近い領域の、後者は Hoechst33342 を用いて核酸を蛍光標識して核周辺の厚さがある領域の解析を行った。

COS7 細胞については、細胞の辺縁の厚さが薄い部分が標的であり、Cryo FIB-SEM の工程は不要である。

急速凍結 (EMGP2) →Cryo-CLEM →Cryo 電子線トモグラフィー (阪大蛋白研 Krios)
→立体構造計算 (IMOD) →画像の解釈 (Segmentation: EMAN2 および Amira を使用) の工程で行った。

図2に COS7 細胞の Cryo 電子線トモグラフィーによって得られたトモグラム (図2左) と、深層学習およびテンプレートマッチングにより自動的にセグメンテーション (図2右) をした一例を示す。

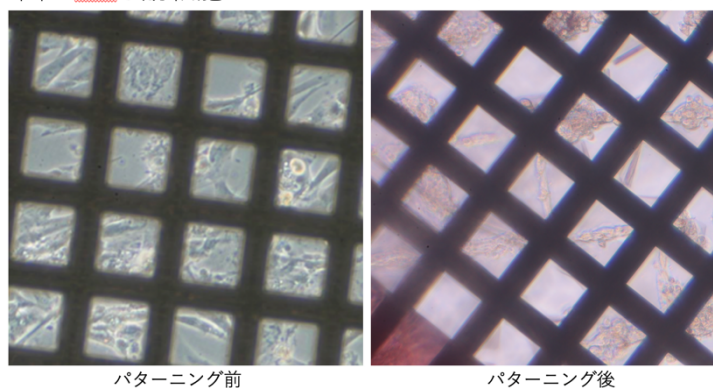
図2. 画像解析：細胞内構造の解釈 (Segmentation)



iPS 心筋細胞については、PRIMO を用いた細胞のマイクロパターンングを実施した (図3)。これにより、グリッドのスクエアの対角線に沿って心筋細胞を綺麗に配置することが可能となり、トモグラフィー撮影の効率化に成功した。

続いて Vitrobot MARK IV で急速凍結後、Cryo-CLEM で Hoechst33342 の蛍光シグナルのグリッドマップを作製した。その蛍光シグナルをメルクマールとして、核膜周囲の Z 軸方向に 5-10 μm の厚さのある部分を FIB-SEM にて 200 nm 以下の厚さになるよう薄切した (図1.(5))。その後、阪大蛋白研のクライオ電子顕微鏡 Krios を用いてクライオ電子線トモグラフィー法により半自動的にデータ収集を行い、IMOD を用いた三次元再構成を行った。現時点では、核膜二重膜と細胞質のミトコンドリアなどの細胞内小器官は十分に描出できているものの、核内部の構造はまだ不明瞭であり、Cryo FIB-SEM のさらなる条件検討が必要である。

図3. iPS心筋細胞のグリッド上のマイクロパターンング



以上から、細胞辺縁など FIB-SEM による薄切が必要ない部分については、ルーチ的にデータ取得が行えるようになってきた。一方で、核周囲など細胞の厚みがある部分については、Cryo FIB-SEM によるさらなる条件検討が必要であり、今後の継続課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Saijo-Hamano Yumiko, Sherif Aalaa Alrahman, Pradipta Ariel, Sasai Miwa, Sakai Naoki, Sakihama Yoshiaki, Yamamoto Masahiro, Standley Daron M, Nitta Ryo	4. 巻 5
2. 論文標題 Structural basis of membrane recognition of <i>Toxoplasma gondii</i> vacuole by Irgb6	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202101149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Imasaki Tsuyoshi, Nitta Ryo, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 CAMSAP2 organizes a γ -tubulin-independent microtubule nucleation centre through phase separation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.77365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi Shinya, Nakano Juri, Imasaki Tsuyoshi, Kita Tomoki, Saijo-Hamano Yumiko, Sakai Naoki, Shigematsu Hideki, Okuma Hiromichi, Shimizu Takahiro, Nitta Eriko, Kikkawa Satoshi, Mizobuchi Satoshi, Niwa Shinsuke, Nitta Ryo	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural model of microtubule dynamics inhibition by kinesin-4 from the crystal structure of KLP-12 γ -tubulin complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.77877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Hiroshi, Abe Tadashi, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Nitta Ryo, Yamamoto Masahiro, Takei Kohji	4. 巻 12
2. 論文標題 Recruitment of Irgb6 to the membrane is a direct trigger for membrane deformation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.992198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で見る医学・生命科学
3. 学会等名 横浜市立大学大学院医学研究科 大学院医学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Nitta
2. 発表標題 Challenges of cryo-EM applications for medical and biological science
3. 学会等名 RIKEN-BDR Online Retreat（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で見る医学・生命科学
3. 学会等名 京都大学大学院理学研究科 大学院セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で見る医学・生命科学
3. 学会等名 日本顕微鏡学会関西支部講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 細胞骨格ネットワーク構築の分子機構とその破綻
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クロススケール計測が解明する細胞骨格ネットワーク構築とその破綻
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による細胞骨格イメージング
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 X線・クライオ電顕で観る構造医科学 微小管ネットワーク形成機構と原虫感染における寄生虫・宿主の攻防
3. 学会等名 第70回SPring-8先端利用技術ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Nitta
2. 発表標題 Cross-scale analyses of centrosome-independent microtubule network formation
3. 学会等名 Frontier of Dynamic Structural Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 凍結電子顕微鏡技術とシングルセル解析技術の融合による構造・機能連関
3. 学会等名 第45会日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Nitta
2. 発表標題 Cross-scale analyses of centrosome-independent microtubule network formation.
3. 学会等名 The 4th RIKEN BDR-Kobe University Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仁田 亮
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で見る医学・生命科学
3. 学会等名 東北大学学際研ライフサイエンスセミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------