

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310087

研究課題名(和文)細胞膜分化による構造変換機構の解明

研究課題名(英文)Structural Changes by Plasma Membrane Differentiation

研究代表者

諸根 信弘(Morone, Nobuhiro)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・講師

研究者番号：50399680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：組織幹細胞でみられる前駆細胞から成熟細胞への分化過程では、細胞や細胞膜の形態が大きく変わる。そのため、細胞膜と細胞骨格系との相互作用、即ち、細胞膜との境界領域に局在する膜骨格・カベオラ・クラスリン被覆ピットの構造ネットワークが重要な役割を果たす。急速凍結レプリカ電子顕微鏡法により、これら細胞膜裏打ち構造群の構造形成(変換)を詳しく観察した。カベオラの被覆構造において、カベオラの表面被覆構造が2種類のフィラメントから形成されている。カベオラ本体の周囲に、半月状の特殊フィラメント構造が形成されているなどの新しい知見を得た。その他の構造についても、細胞膜分化との関係を現在引き続き検討中である。

研究成果の概要(英文)：Cellular morphology of tissue stem cells is dramatically changed during the differentiation process from progenitors toward matures. The interaction between plasma membranes and cytoskeletons, the structural networks of actin-based membrane skeleton, caveolae, and clathrin-coated pits at the interface with the plasma membrane play crucial roles. By rapid-freeze, freeze-replica electron microscopy, we carefully visualized the cytoplasmic surface of those structures, and particularly got the novel findings about caveolar filaments and crescent-like structures. Also the other researches regarding the plasma membrane differentiation are going on.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：細胞膜 細胞 幹細胞 分化 カベオラ アクチン膜骨格 クラスリン被覆ピット 電子顕微鏡法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞の分化では、形態が大きく変化する。以前より、細胞形態が大きく変化する「マイグレーション、極性形成、エンドサイトーシス」では、細胞膜と細胞骨格系との相互作用、即ち、細胞膜との境界領域に局在する膜骨格の構造ネットワークが重要な役割を果たすと考えられている。膜骨格の構造と構成タンパク質成分は、細胞質内部の細胞骨格とは異なることが知られている (Morone et al., 2006)。これまでに、小腸上皮組織や血球系組織 (赤血球、リンパ球、血小板) の膜骨格が電子顕微鏡で詳しく解析されてきた。中でも唯一、赤血球ゴースト膜の伸展標本では、基本構造の形状に加えて、その構造中での構成タンパク質ひとつひとつの配置が詳細に可視化されてきた。しかしながら、細胞分化過程で膜骨格がどのような役割を果たしているのか? 言い換えると、より未分化な前駆細胞から分化細胞への成熟過程で、膜骨格がどのように変化するのか? は、ほとんど理解されていない。

(2) 申請者は、これまでに細胞膜直下全面に広がるアクチン膜骨格を可視化するとともに、細胞質側表面から 10nm 領域の 3 次元電子線構造解析に世界で初めて成功した (下図のように表紙といっしょに掲載された Morone et al., 2006)。この膜骨格で囲まれた細胞膜ドメインの大きさを定量解析した。これらは、膜分子の 1 分子運動解析で検出された、生きた細胞膜上での膜コンパートメントとも良く一致したため、私たちの可視化法は、ライブイメージングと相補的解析が可能な電子顕微鏡法としても、大きな注目を集めた。このように、申請者の研究室では、細胞膜との境界近傍で、膜骨格構造を 3 次元構造解析する技術が、既に整っている。本研究では、申請者が開発した 3 次元電子顕微鏡法 (フリーズエッチトモグラフィ) により、未分化前駆細胞から分化完了細胞への分化に伴う細胞膜の構造変化 (細胞膜分化=plasma membrane differentiation) を解析することにより、細胞膜直下の膜骨格構造ネットワークの形成意義、生理的意義を理解するところまで研究を発展させたい。

## 2. 研究の目的

組織幹細胞でみられる前駆細胞から成熟細胞への分化過程では、細胞形態が大きく変わる。そのため、細胞膜と細胞骨格系との相互作用、即ち、細胞膜との境界領域に局在する膜骨格・カベオラ・クラスリン被覆ピットの構造ネットワークが重要な役割を果たすと予想される。これらの構造群が細胞膜分化で果たす生理学的機能意義を理解することが、本研究の目的である。細胞膜分化を中心として、膜骨格ネットワークの構造変換や膜骨格で仕切られる細胞膜ドメインを、「急速凍結・ディープエッチ電子顕微鏡法」で 3 次元

可視化する。組織・細胞種に依存した「膜骨格ネットワークの役割」を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

脂肪細胞と上皮細胞系を中心に研究を推進した。細胞膜分化に伴う細胞膜直下構造ネットワークの変化を比較検討した。申請者が実施した電子顕微鏡顕微鏡による組織細胞構造解析法 (フリーズエッチ法) には、以下の特徴がある。

### (1) ヘリウム急速凍結法とディープエッチ・フリーズレプリカ法

ヘリウム急速凍結法は、液化ヘリウム温度付近で、純銅の熱伝導率が最大になる性質を利用している。液化ヘリウムで冷却された純銅に組織細胞を圧着することで、氷晶形成を抑えた急速凍結が実現され、細胞構造が瞬時に固定される。非晶質の氷に包埋された試料をエッチングして構造を裸出させた後、プラチナを低角度回転蒸着させることで、細胞構造のレプリカ薄膜 (厚さ 1~2nm 程度) を調製する。これを透過型電子顕微鏡で観察する。この方法では、細胞膜外表面及び内表面 (細胞質側表面) の構造形成、すなわちカベオラ、クラスリン被覆ピット、膜骨格、細胞骨格系を、高いコントラストで可視化できる。

### (2) 電子線トモグラフィ法

特徴的な同視野の構造領域については、トモグラフィ型透過型電子顕微鏡により連続傾斜像を撮影した後、高性能画像処理計算機で 3 次元像を再構築する。1nm 程度の分解能があるので、タンパク質が集合した大きな分子複合体 (例えば、フィラメントタンパク質の分岐程度、膜骨格で囲まれたドメインサイズの 3 次元定量化、カベオラやクラスリン被覆ピットとの相互作用) を詳細に解析できる。

## 4. 研究成果

研究対象とした細胞膜裏打ち構造群のうち、大きな構造変換が観察されたカベオラについて、主要な研究成果を以下に示す。

### (1) 脂肪細胞系での成果

① マウス胎生由来の前駆脂肪細胞とその分化細胞を利用した。これらの細胞膜直下全体を可視化するとともに、カベオラ構造単位ごとの定量解析を行った。細胞膜分化により、脂肪組織系のカベオラ構造の個数密度 (1 $\mu\text{m}^2$  面積あたりの個数) が 100 倍増大していること、これと併せてアクチン膜骨格の分岐度が単純化していることを明らかにした。

② 培養浸透圧と機械的応力による細胞膜構造変換機構について、マウス肺組織内皮細胞に加えてヒト子宮頸癌由来細胞等で構造解析した結果、カベオラの陥入化・平坦化の構造変換は、細胞種に大きく依存することが分かった。③ 細胞膜陥入構造であるカベオラの構造形成に、細胞内転写因子のタンパク質が深く関与することを電顕免疫金コロイド染

色により明らかにした。

(2)上皮細胞系での成果

カベオラ構造の分子構築を検証した。結果、以下の2点を明らかにした。これらの構造群を可視化できるのは、急速凍結レプリカ法だけで、大変有益な情報である。

①カベオラの表面被覆構造が2種類のフィラメントから形成されている

②カベオラ本体の周囲に、半月状の特殊フィラメント構造が形成されている

これらの構造形成に深く関わるタンパク質の絞り込みを行い、効率的に免疫標識あるいは構造標識する方法の技術的な開発を推進した。

①Protein-A とポリクローナル抗体の事前混合によるワンステップ免疫標識法

②Dendra-2 による相関構造解析のための標識法

候補タンパク質の欠損細胞株でカベオラの被覆構造を注意深く比較したが、対応するタンパク質が担う構造形成を特定することはできていない。しかし、これにより今後の研究全般と国際共同研究の方向性が定まった。現在、siRNA あるいは guideRNA によるノックダウン系の樹立を検討中である。

これらの構造知見を基盤として、組織幹細胞及びiPS細胞での膜分化による構造変換を継続的に推進している。(一部の幹細胞では、カベオラの構造形成及び既述のタンパク質と関連する転写因子の発現が確認された。)

## 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)

①Nishimura H, Ritchie K, Kasai RS, Morone N, Sugimura H, Tanaka K, Sase I, Yoshimura A, Nakano Y, Fujiwara TK, and Kusumi A. (2013) Biocompatible fluorescent silicon nanocrystals for single-molecule tracking and fluorescence imaging. *J Cell Biol.* 202:967-83.  
doi: 10.1083/jcb.201301053

②Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser JE, Agladze K, Nakatsuji N. (2012) Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J.* 34(15):1147-56.  
doi: 10.1093/eurheartj/ehs418

③Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N, Barve M, Asai Y, Tenkova-Heuser T, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N. (2012) A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined,

cytokine- and xeno-free conditions.

*Cell Rep* 2(5):1448-60.

doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.015

④Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK. (2012) Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308.  
doi: 10.1182/blood-2012-03-417881

⑤Kusumi A, Fujiwara TK, Morone N, Yoshida KJ, Chadda R, Xie M, Kasai RS, Suzuki KG. (2012) Membrane mechanisms for signal transduction: the coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes. *Semin Cell Dev Biol.* 23(2):126-44.  
doi: 10.1016/j.semdb.2012.01.018

⑥Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, Stan RV, Butler-Browne G, Vedie B, Johannes L, Morone N, Parton RG, Raposo G, Sens P, Lamaze C, Nassoy P. (2011) Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell.* 144(3):402-13.  
doi: 10.1016/j.cell.2010.12.031

[学会発表] (計16件)

①Morone N. Three findings by electron microscopy in caveolar research. (2013. 12. 27) JSM-MPFI Joint-Seminar 2013, Max Plank Florida Institute for Neuroscience, FL, USA

②諸根信弘、吉村安寿弥、ホイザー・ジョン Dendra 融合タンパク質によるカベオラの急速凍結・ディープエッチ電子顕微鏡法(2013. 05. 20)日本顕微鏡学会第69回学術講演会(大阪)

③Morone N. Cavin regulates caveolar endocytosis by forming crescents that girdle caveolae, stabilizes them in relatively flat conformations, and links them to actin-membrane skeleton. (2012. 12. 17) 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, USA

④諸根信弘. カベオラ動態の細胞電子顕微鏡解析(2011. 06. 27)第63回日本細胞生物学会大会(ワークショップ)北海道大学(北海道)

⑤Morone N. Plasma membrane differentiation during adipogenesis: Freeze - etch electron microscopy for

caveolar architecture. (2012. 1. 13)  
JSM-NUS Joint-Seminar 2011, National  
University of Singapore, Singapore

〔図書〕 (計 1 件)

①和久井文、河野朋子、青山一弘、諸根信弘  
株式会社エヌ・ティー・エス「透過型電子顕  
微鏡法：組織・細胞の 3 次元メゾスケール構  
造解析」(先端バイオマテリアル ハンドブ  
ック) 2012、96-102

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/pp1/  
grp/heuser.html](http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/pp1/grp/heuser.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

諸根 信弘 (MORONE, Nobuhiro)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・  
講師  
研究者番号：50399680

### (2) 研究分担者

ホイザー ジョン (HEUSER, John)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・  
教授  
研究者番号：40571815

### (3) 連携研究者

なし