

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570150

研究課題名(和文)クライオ位相差電顕トモグラフィーによる興奮収縮連関の構造的基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the structural basis of the excitation and contraction coupling using phase-contrast electron cryotomography

研究代表者

村田 和義 (MURATA, Kazuyoshi)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：20311201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ウサギ骨格筋よりトライアド膜をその活性を保った状態で抽出し、位相差クライオ電子顕微鏡下で観察した。その結果、表面に多数の膜タンパク質を含む小胞を数種類確認することができた。その一つは筋小胞体であると確認できた。次に、目的のトライアドジャンクションの場所を特定するために、DHPRの抗体を用いて蛍光と金コロイドで標識し、蛍光顕微鏡とクライオ電子顕微鏡でその場所を探した。その結果、蛍光標識された筋小胞体の近辺でさらに金コロイド標識された膜断片を確認することはできたが、そこにTJと思われる構造を見つけることができなかった。今後引き続き膜抽出条件の見直しを行い、TJを多く含む試料の検討を行う。

研究成果の概要(英文)：We extracted enzymatically-active triad membranes from rabbit's skeletal muscle and examined them using electron cryomicroscopy. A lot of proteoliposomes were successfully observed in the sample. Some of them were identified as sarcoplasmic reticulum (SR). We further labeled the dihydropyridine receptor (DHPR) in T-tubules using the anti-beta subunit antibody conjugated fluorescent dyes and gold colloids to detect the triad junction (TJ). Although we can find gold-labels near SRs, The region of TJ has not been found out yet. We will also reconsider the condition of membrane extraction to preserve TJ abundantly, and examine it again in the future.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：高分解能電子顕微鏡解析 膜タンパク質 興奮収縮連関 クライオ電子顕微鏡 電子線トモグラフィー

## 1. 研究開始当初の背景

筋肉における興奮収縮連関は神経応答の最も身近な例として古くから研究されて来た。そして、生理機能や個々の分子の活性については非常に多くの研究がある。しかし、これに対する構造学的な知見は未だ乏しい。

申請者は電子顕微鏡の単粒子解析法を使って、興奮収縮連関の入力側分子である Dihydropyridine receptor (DHPR) の分子の構造を明らかにした (Murata et al. BBRC 2001) (Murata et al. JEM 2010)。また、出力側分子の Ryanodine receptor (RyR) の構造は同様の方法で既にサブナノメートルの解析が行われている。興奮収縮連関で重要なことは、神経興奮異より活性化された DHPR の構造変化が、隣接する RyR にどのように伝えられるかであり、これをつかさどるトライアドジャンクションの構造的基盤の解明が望まれる。

## 2. 研究の目的

トライアドジャンクション (TJ) は、骨格筋細胞の筋小胞体と T 管膜との間に形成された構造体で、神経興奮を筋収縮運動に変換するための重要な膜-タンパク質複合体である。この膜-タンパク質複合体は、主に T 管膜にあり神経興奮センサーとして働く電位依存性 L 型カルシウムチャンネル (DHPR) と、筋小胞体膜にあり筋小胞体からのカルシウム放出を促すカルシウム放出チャンネル (RyR) からなり、骨格筋ではこれらが機械的に相互作用して興奮収縮連関を行っていると考えられている。

本研究では、ウサギ骨格筋から TJ を含むトライアド膜をできるだけ保存のよい状態で抽出し、これを氷包埋して、位相差クライオ電子顕微鏡によりその傾斜像を撮影する。そして、電顕トモグラフィーにより TJ 膜-タンパク質複合体全体の三次元構造を解析する。このことにより、興奮収縮連関の構造的基盤を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 安定なトライアド膜の調製と輸送

トライアド膜は、Mitchell らの方法 (J. Cell Biol., 96,1008 (1983)) に従い、ウサギ (日本白色種) より骨格筋を摘出後、それを直ちにブレンダーミキサーで粉碎し、遠心分離を行い、ショ糖密度勾配遠心をして、その精製標品を得た。そして、標品を 4 度に保ったまま生理研に輸送した。また、抽出したトライアド膜の一部は、同時に DHPR のリガンド結合活性を測定し、DHPR が失活していないことを確認した。

### (2) 電顕試料作製とクライオ電子顕微鏡法

トライアドジャンクション膜は、低温に保

ったまま生理研に搬送し、直ちに膜穴グリッド (Quantifoil R1.2/1) 上で急速凍結して、液体窒素保存容器中で保管した。そして、この凍結グリッドを電顕用クライオホルダーに装填して、加速電圧 200kV の電子顕微鏡 (JEM2200FS) で観察した。

### (3) 位相差クライオ電顕トモグラフィー

画像コントラストを高めて個々のチャネル分子を観察するため、電顕用 Zernike 位相板 (500nm) を対物レンズの後焦点面に挿入した。そして、試料を ±70 度の範囲で 2 度ずつ連続的に傾斜させて像を撮影し、チャネル分子の立体再構成像を得た。

### (4) DHCP の抗体標識によるトライアドジャンクションの探索

これまでに、トライアド膜断片試料から膜タンパク質を含む小胞をたくさん観察できたが、その中に含まれるトライアドジャンクションの位置を特定することができなかった。そこで、TJ の T 管膜側に含まれる DHPR の抗体を使って、トライアド膜断片を蛍光物質 (Alexa Fluoro488) と金コロイド粒子 (10nm) でラベルし、これを光顕と電顕で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 安定なトライアド膜の調製と輸送

当初、分担機関の熊本大学で調製されたトライアド膜は、液体窒素で凍結して生理研に輸送していたが、この凍結融解により、リガンド結合活性が落ちてしまうことから、抽出・精製されたトライアド膜をそのまま 4 度に保ったまま生理研に輸送し、翌日直ちに電顕グリッド上で急速凍結するようにした。その結果、小さく断片化していない球形の膜小胞がたくさん見られるようになった (図 1)。

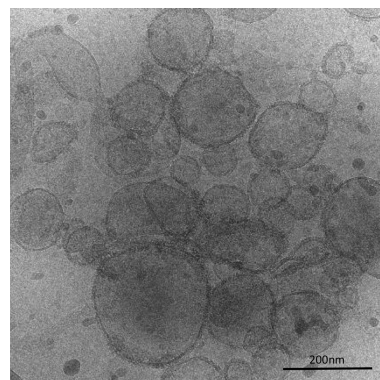


図 1 抽出されたトライアド膜断片のクライオ電子顕微鏡像

### (2) 電顕試料作製とクライオ電子顕微鏡法

トライアド膜を調製後、4 度に輸送し、直ちに電顕グリッド上に氷包埋した試料では、小胞の表面にスパイク状の多数の膜タンパク質を確認することができた (図 2)。

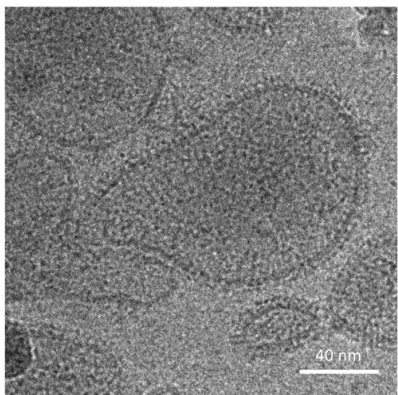


図2 トライアド抽出膜断片のクライオ電子顕微鏡像

(3)位相差クライオ電顕トモグラフィー

トライアド抽出膜断片に存在する膜タンパク質を可視化するために、Zernike 位相板を対物レンズの後焦点面に挿入して、像コントラストを高めて観察した。その結果、膜表面に並ぶタンパク質分子の個々の像を得ることができた(図3)。そこからさらに連続傾斜像を撮影し、電顕トモグラフィーによる三次元再構成を行ったが、今回の解析ではタンパク質分子がはっきりとは見えなかった。照射ダメージが原因と考えられた。今後は、さらに照射量を減らして傾斜像の収集を行う。

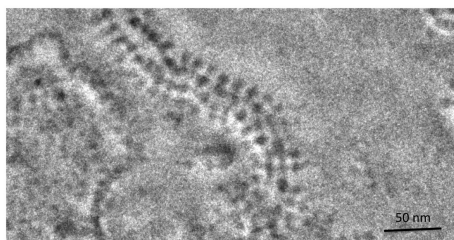


図3 トライアド抽出膜断片の位相差クライオ電顕像

(4)DHCP の抗体標識によるトライアドジャンクションの探索

トライアド抽出膜断片に含まれる多数の小包の中から TJ の場所を特定するために、T管膜に存在する DHPR を、抗体を使って蛍光色素 Alexa Fluor488 とコロイド金で標識した。その結果、蛍光顕微鏡下では、膜断片の位置にほぼ蛍光が見られた(図4)。しかし、急速凍結して氷包埋した電顕グリッド上では、蛍光強度が不十分で、位置の同定はできなかった。また、クライオ電子顕微鏡内においても、コロイド金粒子による標識が十分に得られず、TJ の位置を特定するには至らなかった。

本研究における一連の観察から、トライアド抽出膜断片より、位相差クライオ電子顕微鏡を用いることにより、個々の膜タンパク質を観察することができた。また、現在の試料

では、まだトライアド抽出膜断片の中に十分な量の安定な TJ が含まれていないことが考えられた。今後さらに、試料調製法を検討することにより、TJ の位置を特定し、TJ の三次元構造解析を進めたいと考えている。

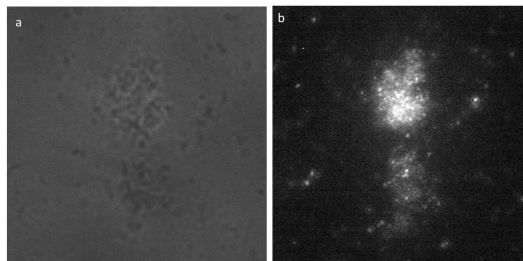


図4 トライアド抽出膜断片の明視野像(a)と蛍光顕微鏡像(b)。ほぼ膜断片の位置に対応して蛍光が確認された。

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3件)

村田和義、國安明彦、クライオ位相差電顕トモグラフィーによる興奮収縮連関の構造的基盤の解明、生理学研究所年報、査読無し、34、2013、pp. 80-81

村田和義、國安明彦、骨格筋トライアドジャンクションの三次元構造解析、生理学研究所年報、査読無し、33、2013、pp. 195-196

村田和義、國安明彦、骨格筋トライアドジャンクションの三次元構造解析、生理学研究所年報、査読無し、32、2011、pp. 210

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 和義 (MURATA, Kazuyoshi)  
生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授  
研究者番号：20311201

(2) 研究分担者

國安 明彦 (KUNIYASU, Akihiko)  
崇城大学・薬学部・教授  
研究者番号：90241348

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：