

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840071

研究課題名(和文)ディープエッチEM - PALM相関顕微鏡法の確立、膜ダイナミクス研究への適用

研究課題名(英文)Development of correlation microscopy between deep-etch EM and photoactivation localization microscopy. Application to study of membrane dynamics.

研究代表者

吉村 安寿弥(Yoshimura, Azumi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：90467340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜を「面」として捉えることができる急速凍結・ディープエッチレプリカ電子顕微鏡法と超解像度光学顕微鏡イメージング技術による同一視野・同一構造のcorrelation microscopyを確立することに成功した。この手法を用い、細胞膜陥入構造であるカベオラの曲率調節と構成分子の関連を調べた結果、曲率によらず全てのカベオラが、その構成分子であるタンパク質カベオリンのクラスターを有することが分かった。

研究成果の概要(英文)：A method of correlative imaging between DEEM and photo-activation localization microscopy (PALM) was developed in order to link the localization of the molecules and the topological information with higher efficiency and accuracy. Using this method, the relationship between curvature of caveolae, the plasma membrane invaginations, and their main component caveolin was examined. The correlated images show that caveolae of all curvatures contain caveolin cluster.

研究分野：電子顕微鏡法

キーワード：カベオラ 電子顕微鏡 超解像度顕微鏡法 correlation microscopy

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 急速凍結・ディープエッチレプリカ電子顕微鏡法 (ディープエッチ EM) は細胞膜を「面」として捉えることができるという利点を持つ。つまり細胞膜上(外側・内側の両方)の微細構造を正面から膜を含めて 見ることができる。これまでに、シナプス小胞のエクソサイトーシス (Heuser et al., 1979)、クラスリン被覆ピット (Heuser, 1980) やカベオラ (Rothberg et al., 1992)、膜直下の細胞骨格ネットワーク (Morone et al., 2006) など多くの膜構造の形態・形態変化を明らかにしてきた。特にカベオラ (細胞膜の陥入構造) の観察においてはディープエッチ EM は唯一その被覆構造である縞状構造を高解像度で可視化できる方法である。しかし、超薄切片法などの他の電顕技術と同様に、分子の標識は免疫染色に頼らざるを得ず、目的分子の位置特定が容易ではない、観察領域が限定されるために細胞の全体像が捉えにくいという欠点があった。

(2) 超解像度イメージングが開発され、解像度は $\sim 20$  nm と、細胞試料の電子顕微鏡観察の解像度 (数 nm) に迫りつつあり、高い精度のコリレーションが可能となってきた。超解像度イメージングと超薄切片法 (Watanabe et al., 2011)、クライオ電子線トモグラフィー (Fridman et al., 2012) とのコリレーションは報告されていたが、ディープエッチ EM とのコリレーションについてはまだ報告がなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、以上の背景をもとに、細胞膜構造に最適な ディープエッチ EM と超解像度イメージング PALM (photoactivation localization microscopy) の correlation システムの確立し、以下の研究に応用することを目的とした。

- ・ カベオラにおける構成分子の局在とカベオラの曲率調節との関連の解明
- ・ 細胞膜-小胞体-脂肪滴 間のコレステロール輸送における caveolin (カベオラ主要構成分子) の役割の解明

## 3. 研究の方法

(1) 光活性化蛍光タンパク質である dendra2 と caveolin-1 の融合タンパク質を培養細胞に発現させた系を用い、以下の2点を実行した。

- ① PALM でより多くの蛍光シグナル得ることと、微細構造の保存状態を高めることの両方を可能にする化学固定条件の決定
- ② PALM とディープエッチ EM による同一構造の位置特定精度向上のための位置指標の決定

(2) カベオラの曲率と構成分子の局在の関

連、また細胞膜-小胞体-脂肪滴間のコレステロール輸送における caveolin の役割を検討するために以下の2点を行った。

- ① 細胞膜のコレステロール量を操作し、コレステロール量と曲率の関係を検討
- ② ①で見出した条件を用いてカベオラの曲率を調節し、曲率と構成分子の局在の関連を、確立した correlation microscopy を用いて検討
- ③ 細胞膜コレステロール量が小胞体の構造、カベオラと小胞体の位置関係に与える影響を検討

## 4. 研究成果

研究期間内に以下の (1) - (4) の成果を得た。

(1) 細胞膜の陥入構造であるカベオラ (直径 60~100 nm) について photoactivation localization microscopy (PALM) との correlation 手法を確立することに成功した (図 1)。この手法を用い、カベオラの被覆構造、曲率、構成分子である caveolin-1 のクラスターの有無の関連を調べた。

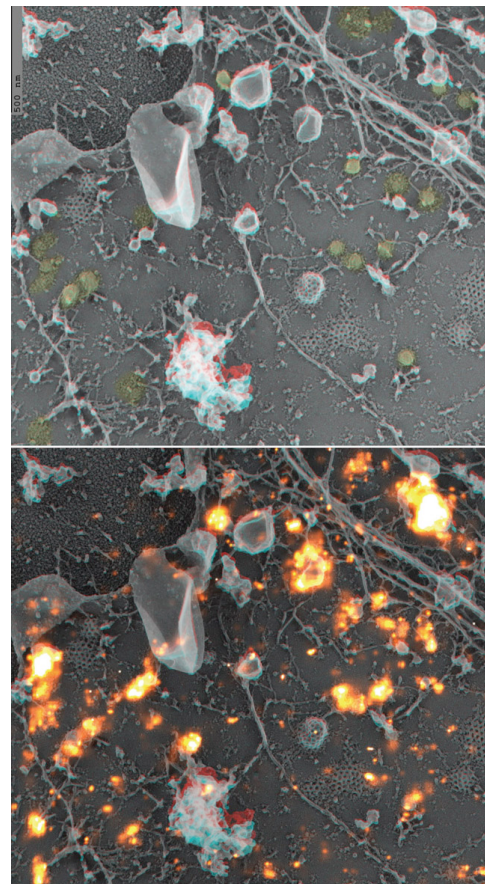


図 1. ディープエッチ EM と PALM の correlation イメージ. カベオラの陥入構造と dendra2 のシグナルが一致している。

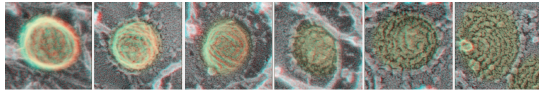


図 2. カベオラディープエッチ EM 像.  
細胞膜表面においてカベオラは様々な  
曲率を呈す.

ディープエッチ EM によって、細胞膜表面においてカベオラは様々な曲率を示すこと (図 2)、カベオラの被覆構造は曲率によって変化しないことを示した。更に PALM との correlation microscopy によって、膜の曲率によらず全てのカベオラがカベオリンのクラスターを有することが分かった。

(2) カベオラはコレステロールに富んだドメインであることが知られている。そこで、カベオラの曲率調節機構を明らかにするために、細胞膜のコレステロール量に応じたカベオラの曲率変化について検討した。その結果、コレステロール量が増加すると曲率が増し、減少すると平坦化することが分かった。つまり、細胞膜のコレステロール量を増減させることによってカベオラの曲率変化を誘導できることが分かった。細胞膜コレステロールの増減によって曲率変化を誘導させたカベオラも、カベオリンを保持していた。しかし caveolin-1 の免疫標識は膜の脂質構成や抗体の種類によって大きく左右された。特にコレステロール除去によってカベオラの平坦化を誘導すると、カベオリンの免疫標識効率が激減した。しかし PALM との correlation microscopy によって、コレステロール除去によって平坦化したカベオラもカベオリンクラスターを保持することがわかった。

(3) 細胞膜のコレステロール量操作によってカベオラの曲率が変化することを利用し、曲率変化が可逆的であるかどうかを検討した。その結果、平坦化したカベオラは、細胞膜コレステロール量の増加によって陥入状態に戻ることを示すことに成功した。このようなカベオラの曲率の変化は数分という短時間で起こること、同様の曲率変化が単離した細胞膜においても起こることを確認した。これらの結果から、カベオラは細胞膜の脂質環境に応じて曲率を可逆的に調節すること、この反応は一切のエネルギーを必要としないことが示唆された (図 3)。

(4) 小胞体は細胞膜からのベシクルを介さない、エネルギー非依存的なコレステロール輸送に関与すると示唆されている。細胞膜コレステロール量を増減させ、小胞体の構造に対する影響を検討したが、変化は認められなかった。また、細胞膜近傍の小胞体へのカベオラの集積も認められなかった。

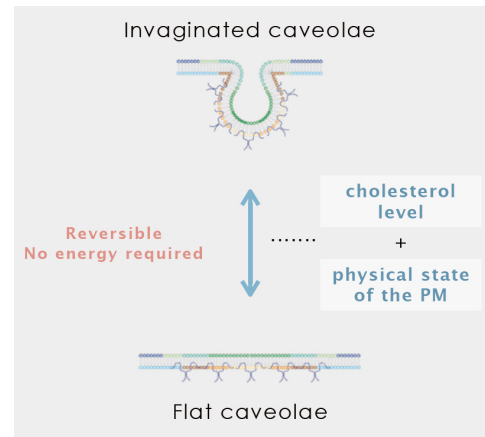


図 3. カベオラの曲率変化のモデル

これら (1) - (4) の結果は、カベオラが細胞膜のコレステロールレベルに応じて曲率を変えること、この曲率変化 (陥入-平坦化) に伴って caveolin-1 はドメイン内に保持されること、曲率変化は可逆的であり、一切のエネルギーを必要としないことを示唆する。

本研究で確立されたディープエッチ EM と PALM による、同一視野、同一構造の correlation microscopy は、細胞膜内外の表面構造の構成分子の位置情報と微細形態情報を高解像度で対応付けることが可能であり。様々な膜構造や膜に付随した構造に応用できる点で有用な技術になることが期待される。

## 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)

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. Azumi Yoshimura, John Heuser  
Structural changes in caveolae induced by manipulation of cholesterol-levels in the plasma membrane  
EMBO Conference, Systems Dynamics in Endocytosis  
2013.9.29 – 10.4, Villars (Switzerland)

2. Azumi Yoshimura, John Heuser  
Using Deep-etch EM to Correlate Structural Changes in Caveolae with Cholesterol-levels in the Plasmalemma  
XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROSCOPIA  
2013. 10.22, Caxambu (Brazil)

3. Azumi Yoshimura, John Heuser  
Alterations in caveolar morphology produced by  
varying plasmalemmal cholesterol,  
revealed by quick-freeze, deep-etch electron  
microscopy  
2014 ASCB/IFCB Meeting  
2014.12.6 –12.10, Philadelphia, U.S.A.

4. Azumi Yoshimura, John Heuser  
Structural changes in caveolae induced by  
manipulation of cholesterol-levels in the plasma  
membrane  
18th iCeMS International Symposium / 15th  
International Membrane Research Forum  
2015.3.2 – 3.4, 京都大学（京都府・京都市）

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
吉村 安寿弥（Yoshimura Azumi）  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点  
（iCeMS）・研究員  
研究者番号：90467340

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし