

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650049

研究課題名(和文)オルガネラ膜表面をin situで構造解析するための細胞膜剥離法の開発と応用

研究課題名(英文)Improved unroofing method in AFM and cryo-electron microscopy to observe the interaction between organelles and cytoskeleton.

研究代表者

白倉 治郎 (Usukura, Jiro)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30143415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜剥離法(unroofing)は細胞質の可溶性成分を流出させ、細胞内のオルガネラや線維を露出させる方法である。原子間力顕微鏡の標本作製法に適用するとカンチレバーを直接細胞内に導き、オルガネラ表面やアクチン線維の表面構造を分子レベルで解析できることが明らかとなった。また、クライオ電顕と組み合わせると極めて高コントラストで細胞骨格などが観察できることがわかった。このように極めて有効な標本作製法であるが、再現性は悪く、改良が期待されていた。そこで我々は二つの細胞膜剥離法の開発改良を行った。

研究成果の概要(英文)：Two unroofing methods via tearing off cell membrane with adhesive mesh and sonication developed and used for AFM and cryo-electron microscopy instead of vitreous ice section. An improved unroofing method enabled the cantilever of AFM to reach directly into a cell to visualize the intracellular cytoskeletal actin filaments, microtubules, clathrin coats, and caveolae in PBS at molecular resolution. The actin filaments clearly exhibited a short periodicity of approximately 5-6 nm. In cryo electron microscopy, unroofing enabled us to view membrane cytoskeleton panoramically with extremely high contrast in native state. Many actin filaments and microtubules were observed clearly on the cytoplasmic surface of the plasma membrane at extremely high contrast, because soluble components of cytoplasm flowed out on breaking off the cells. Furthermore, Cryo-EM combined with unroofing revealed a network of smooth ER beneath the cell membrane first time in native ordinary cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞膜剥離法 細胞骨格 滑面小胞体 クライオ電顕 原子間力顕微鏡 アクチン 膜

1. 研究開始当初の背景

最近の分析機器の性能は極めて高く、抽出精製された核酸やタンパク質であれば、そのシーケンスや分子構造までも決めることができる。しかし、*in situ*でのオルガネラの形態やタンパク質の分子構造となると、観察法はまだ確立されていない。抽出や精製は一つの標本作製法であると考え、*in situ*での高分解能観察を可能にする標本作製法が少ない。電子顕微鏡(電顕)観察の標本作製法は超薄切片法が長い間主流であった。1989年、超音波によるunroofing(旧細胞膜剥離)法の開発により、初めて、フリーズエッチングで細胞膜「裏打ち」のアクチン線維やクラスリンが観察された(Heuser J 1989)。原子間力顕微鏡(AFM)は水中で高分解能観察が可能であるが、やはり適当な標本作製法がなく、専ら細胞の外表面の記録のみであった。我々はこの細胞膜剥離法をAFMに適用し、初めて細胞内アクチン線維や微小管の構造を水中で測定することに成功した(Usukura J et al. 2012)。反響は大きく、世界第8位の引用があった。しかし、クライオ電顕への応用は困難であった。なぜなら、グリッドの支持膜上に細胞を培養した場合、超音波により支持膜が破壊されてしまい、細胞は流されてしまう。実は、ガラス上に培養した細胞においても、ガラスに密着した細胞膜の裏打ち構造が観察できるだけであり、オルガネラなどは損壊、流失してしまう。そこで、小胞体やミトコンドリアなどのオルガネラ膜と細胞骨格との空間構造を電顕やAFMで観察できる標本作製法を開発する。これにより、オルガネラ膜と細胞骨格との空間構造が明らかになり、オルガネラの輸送や運動のメカニズムが明確になると考えられる。

2. 研究の目的

エンドソーム、ミトコンドリア、小胞体など細胞内小器官(オルガネラ)と細胞骨格との空間構造的な研究、すなわち、オルガネラの細胞質側表面とアクチン線維や微小管との相互関係の形態学的研究は極めて少ない。観察分析機器の性能は十分過ぎるのであるが、その機器に持ち込むための手段がない。例えば、原子間力顕微鏡(AFM)は膜の表面構造を分子レベルで、しかも水中で解析できるが、オルガネラの表面を露出し、探針プローブの標的とさせることができない。これは適当な標本作製法が無いため、電子顕微鏡(電顕)観察についても同様である。そこで、細胞質の可溶性成分を流失させ、細胞骨格とオルガネラを露出させる新規細胞膜剥離法を開発し、オルガネラの表面構造をAFMや電顕で明らかに

する。これにより、オルガネラの細胞内における位置の決定、輸送、運動のメカニズムを明らかにするのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では超音波照射(ソニケーション)による細胞膜剥離法と接着性を高めたガラス、またはグリッドによる接触引き剥がし(tear off法)による細胞膜剥離法の二種類の標本作製法を確立し、細胞骨格、小胞体などの表面構造とそれらが織りなす空間構造の解析に活用する。また、応用研究としてはインフルエンザウイルスの細胞への侵入メカニズムを細胞内から観察し、詳細に解析する。上述二つの細胞膜剥離法の確立のためには、細胞膜が剥がれる原理を最初に解明する。接着性を高めたガラスによる膜剥離は理解しやすいが、超音波ではいかなる刺激が有効かを見極める必要がある。そこで、初年度は特に超音波発生装置の開発を優先しておこなった。出力との関係、水中で生じる波、気泡発生がどのように細胞膜破壊につながるかを明らかにした。トミー精巧(株)との共同で出力を1W以下でも制御できる装置を作製し、出力と膜剥離の関係性を明らかにした。次に水中における微細な泡の発生にはプローブ先端形状が重要であることが判明し、数種類の先端形状を試験しベクトリアルに射出できるようなプローブを開発した。次年度では、どのような角度でこの微細な泡を細胞に当てれば、膜だけが除かれるのかを検討した。一方、tear off法ではこれまでの経験から接着時間や剥がし方により膜の剥がれ具合が異なるため、これらのパラメーターを精査した。

4. 研究成果

細胞膜剥離法(unroofing)は細胞質の可溶性成分を流出させ、細胞内のオルガネラや線維を露出させる方法である。原子間力顕微鏡の標本作製法に適用するとカンチレバーを直接細胞内に導き、オルガネラ表面やアクチン線維の表面構造を分子レベルで解析できることが明らかとなった。また、クライオ電顕と組み合わせると極めて高コントラストで細胞骨格などが観察できることがわかった。このように極めて有効な標本作製法であるが、再現性は必ずしも良いとはいえず、改良が期待されていた。そこで我々は二つの細胞膜剥離法を開発改良を行った。一つは従来からの超音波を利用した細胞膜剥離法であり、他の一つは接着性を高めたメッシュやガラスによる引き剥がし法である。超音波によるunroofingは比較的再現性が良いが、市販の装置は出力が50Wと高く、1W未満での制御が出来ないのが現状である。そのため、瞬間的に超音波を照射してunroofingしていたが、多くの場合、膜の内面は観察できても、大半のオ

ルガネラや細胞骨格は流出してしまうことがわかった。クライオ電顕用にメッシュ上で培養した細胞はもっと悲惨で支持膜ごと細胞がなくなってしまう。そこで、我々は超音波照射により、どのように細胞膜剥離が起こるかを調べた。その結果、プローブ型の超音波発生装置では水中で超音波を発生するとプローブ先端から微細な気泡(cavitation)が発生する。この気泡が細胞膜に衝突し、消滅するときの衝撃波により細胞膜が破壊される。また、細胞の破碎や脱落を抑制するためには出力を1W未満に制御する必要があることもわかった。このため、出力0.3~1Wで有効なcavitationを起こす超音波発生装置を開発した。また、試料を観察しながら効率よく細胞膜剥離ができるように、超音波発生プローブの位置制御装置、実体顕微鏡、水平照明装置を組み合わせ、新たに総合的な細胞膜剥離装置を開発した(図1)。

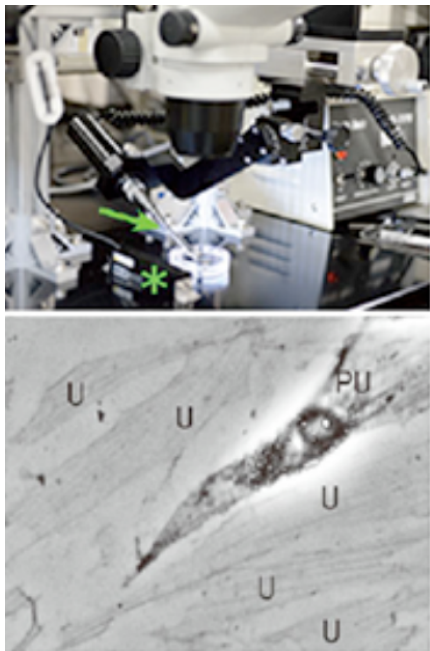


図1 最近開発した超音波照射による細胞膜剥離装置(上)と細胞膜剥離した標本(下)。Uは完全に剥離した状態で核などはなくなっているが細胞骨格は残っている。PUは部分的に細胞膜剥離した状態で、核などのオルガネラも残っている。矢印は超音波プローブを示す。アスタリスクは水平照明装置

これにより、AFMにより水中で細胞骨格の高分解能像や細胞膜直下の滑面小胞体の存在などを明らかにすることができた(Nature Science Reportに投稿中)(図2)。また、同様な試料をフリーズエッチング法により細胞膜直下の滑面小胞体の存在を確認できた(図3)。さらにmildなunroofingを求め、接着性を高めたメッシュやガラスによる引き剥がし法を改良した。これは、超音波法よりもさらに歩留まりが悪い方法であるが、特別な装置を必要としないなど

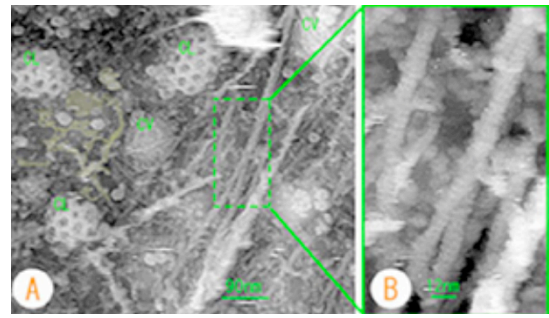


図2 細胞膜剥離した標本の液中AFM像。細胞膜内面に付着したアクチン線維やクラスリン被覆(CL)やカベオラ(CV)を観察できる。BはAの四角で囲んだ部分の拡大像で、アクチン線維特有の縞状の短周期構造を認めることができる。液中でありながら、電顕同等の高分解能を示している。

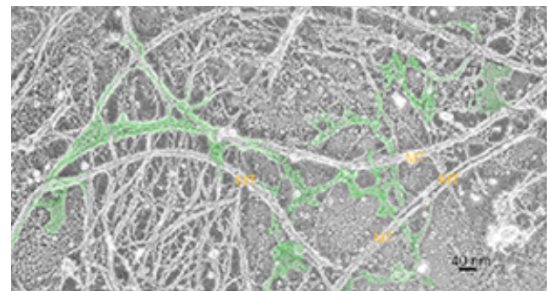


図3 細胞膜剥離標本のフリーズエッチング電顕像。細胞膜の内面には多くの細胞骨格が付着している。その間を縫うように滑面小胞体(緑色に塗ってある部分)が存在する。MT:微小管

また、核やミトコンドリアなどの多くのオルガネラを残したまま、細胞膜を剥ぐためには必須の方法でもある。そこで、これまでとは異なる発想により、2.5mm×2.5mmのガラス上にまず細胞を培養し、接着性を高めた、メッシュ(クライオ電顕の場合)またはガラス(フリーズエッチングの場合)上に細胞面を下にして被せた。さらに、solidな接着を確保するために上から直径5mmのカバーガラスを載せた。さらに、余分な水分を濾紙で吸い取り、1~2分後、リングル液を注いで、浮力によりガラスを引き剥がす。この過程で細胞が破れ、オルガネラ、細胞骨格を含んだ背側の細胞膜が Alcian blue を塗布してある下部のガラス、またはメッシュ上に接着した状態で採取できる。この方法により、クライオ電顕にて生きている状態の細胞骨格や滑面小胞体を観察することに成功した(図4)。

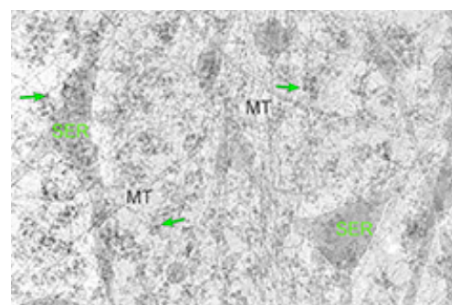


図4 細胞膜剥離した無固定 (native) 細胞のクライオ電顕像。標本が厚いのでアクチン線維、微小管(MT)、滑面小胞体(SER)が相互に重なって観察される。矢印はリボゾームを指している。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, Usukura J, Cheng J, Hotta N, Shimada Y, Isomura H, Suzuki M, Fujimoto T, Takahashi T. ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. *Nat. Commun.* 7 10060 2016 査読有
2. Hayakawa EH, Tokumasu F, Usukura J, Matsuoka H, Tsuboi T, Wellems TE. Imaging of the subsurface structures of “unroofed” Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Exp Parasitol.* 153:174-179 2015 査読有
3. Sanuki R, Watanabe S, Sugita Y, Irie S, Kozuka T, Shimada M, Ueno S, Usukura J, Furukawa T. Protein-4.1G-mediated membrane trafficking is essential for correct rod synaptic location in the retina and for normal visual function. *Cell Rep.* 10: 796-808 2015 査読有
4. Owa M, Furuta A, Usukura J, Arisaka F, King S M, Witman G B, Kamiya R, Wakabayashi K. Cooperative binding of the outer arm-docking complex underlies the regular arrangement of outer arm dynein in the axoneme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 9461-9466 2014 査読有

[学会発表] (計 16 件)

国外

1. Usukura E, Narita A, Yagi A, Ito S and Usukura J Unroofing methods in AFM imaging for intra-cellular cytoskeletons at molecular resolution The American Society for Cell Biology December 12-16 2015)San Diego Convention Center, Sandiego, CA, USA
2. Usukura J, Matsumoto T, Usukura E, Oharai Y, Sunaoshi T, Tamochi R and Narita A Development of low voltage cryo-electron microscope for simultaneous imaging of bright field, dark field STEM and SEM using unroofed frozen cells. The American Society for Cell Biology December 12-16 2015 San Diego Convention Center, Sandiego, CA, USA
3. Matsumoto T, Sunaoshi T, Usukura J,

Narita A The Cold FEG STEM Brings the Modulation-Free Image Suitable for Protein Structure Analysis. The 2nd East-Asia Microscopy Conference November 24-27(25),2015 The Himeji Chamber of Commerce and Industry, Himeji, Hyogo, Japan

4. Usukura J Development of low voltage cryo-electron microscope for simultaneous imaging of bright field, dark field STEM and SEM using unroofed frozen cells. Microscopy Conference 2015 September 6-11, 2015 Georg-August University Gottingen, Germany
5. Usukura J High resolution AFM direct imaging of the intra-cellular cytoskeleton by using unroofed cells Multinational Congress on Microscopy August 23-28 (24), 2015 Hotel Eger& Park, Eger, Hungary
6. Usukura J, Usukura E, Narita A, Yagi A, Ito S Use of the unroofing technique AFM direct imaging of the intra-cellular structure at high resolution Microscopy & Microanalysis August 2-6, 2015 Oregon Convention Center Portland, Oregon, USA
7. Usukura J Spatial structure of the peri-nuclear cytoskeleton The 15th International Membrane Research Forum, Kyoto, Japan, March 2-4, 2015
8. Usukura J Spatial organization of nuclear membrane cytoskeleton The American Society for Cell Biology December 6-10, 2014 Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA
9. Usukura J, Minakata S. Simultaneous imaging of Cryo-Bright field, dark field STEM and SEM using unroofed living cells with special reference to membrane cytoskeletons. Microscopy & Microanalysis 2014 Meeting August 3-7, 2014 The Connecticut Convention Center Hartford, USA

国内

10. 白倉治郎 細胞にも骨がある？細胞骨格とはなにか 第11回ナノ・バイオメディカル学会大会 平成27年10月31～11月1日 石巻専修大学
11. 白倉治郎 細胞内アクチン線維の空間構造：新規膜剥離法を併用したクライオ電顕、freeze deep etching replica, 原子間力顕微鏡などによる多角的解析 日本顕微鏡学会第38回関東支部講演

- 会 平成 26 年 3 月 8 日 日本女子大学目
白キャンパス 新泉山館・八十年館
12. 臼倉治郎 High resolution in situ
imaging of cytoskeleton by AFM in
liquid environment. International
Workshop -High Resolution Cell
Biology- 平成 27 年 10 月 1 日 名古屋
大学 ES 総合館
13. 臼倉治郎、成田哲博、砂押毅志、二村和
孝、大隅正子 生細胞ナノ空間構造解析
用 Cryo-in lens-S (T) EM の開発
Development of Cryo-in lens-S (T) EM
for biological use 日本顕微鏡学会第
71 回学術講演会 平成 27 年 5 月 13 日
～15 日 国立京都国際会館
14. 臼倉治郎 網膜色素上皮細胞および視細
胞のアクチン細胞骨格の空間構造
Spatial structure of actin
cytoskeletons in retinal pigment
epithelial and photoreceptor cells
日本解剖学会総会・全国学術集会 平成
27 年 3 月 21 日～23 日 神戸ポートアイ
ランド、神戸国際交流会館
15. 臼倉治郎 米国における顕微鏡画像の
データベース化について Image
library as a database in America
Society for Cell Biology 日本顕微鏡
学会第 70 回記念学術講演会 平成 26
年 5 月 11 日～13 日 幕張メッセ
16. 臼倉治郎、南方志帆 クライオ STEM に
よる細胞膜骨格の暗視野像、明視野像、
二次電子像の同時計測 Simultaneous
Imaging of Cryo-Bright Field STEM,
Dark Field STEM and SEM 日本顕微鏡
学会第 70 回記念学術講演会 平成 26
年 5 月 11 日～13 日 幕張メッセ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：細胞膜剥離装置、剥離方法、および
観察方法

発明者：砂押毅志、二村和孝、臼倉治郎

権利者：日立ハイテクノロジーズ

種類：特許

番号：特願 2015-083841

出願年月日：2015/4/16

国内外の別：国内

○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

臼倉治郎 (Usukura Jiro) 名古屋大学・
理学研究科・研究員

研究者番号：30143415

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：