

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26286027

研究課題名(和文)カベオラ被覆構造の分子構築機構の解明

研究課題名(英文)Molecular structure mechanism of caveolae membrane coats

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・教授

研究者番号：50399680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：カベオラと呼ばれる直径70nm程度の小さな膜陥入構造は、神経系以外の細胞膜に普遍的に形成されている。カベオラの機能としては、エンドサイトーシス、トランスサイトーシス、脂肪酸の取り込みなど諸説あるが、概して、電子顕微鏡レベルの構造解析による理解は重要である。カベオラは、細胞膜の細胞質側表面に構築される渦巻き状の微細な被覆構造であるため、分子レベルの集積構築を議論する場合、フリーズレプリカ電子顕微鏡法が有用である。本研究は、カベオラの構造基盤を、電子顕微鏡で解明したものである。

研究成果の概要(英文)：Caveolae are striated membrane invagination (around 70nm in diameter) at the plasma membrane except for neurons, which involved in endocytosis, transcytosis, and fatty acid uptake. Freeze-replica electron microscopy would be useful for caveolar analysis due to their fine structures on the cytoplasmic surface of plasma membrane. This research focused caveolar base structures by electron microscopy.

研究分野：Structrual cell biology

キーワード：1分子科学 細胞膜 カベオラ エンドサイトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) カベオラ構造の分子構成に関して、90年代からカベオリンやコレステロールが主役であろうと推察されてきたが、本研究の開始当初、Cavin-1/PTRF (Polymerase I and transcript release factor) や ATPase EHD-2 (EH-domain containing 2) のカベオラ分子構築への関連性が幾つかの論文で検討されていた。生化学的な解析では、ラフト画分との差別化の観点からも、カベオラ画分を正確に精製することは困難であった。

(2) カベオラは、細胞膜の細胞質側表面に構築される微細な膜陥入構造 (約 70nm) であるため、生化学的な精製画分からの再構成系が実現困難であった。しかし、不完全な再構成系を利用した単粒子解析や、細胞組織の超薄切片のトモグラフィー等々のアプローチにより、少しずつ青写真は見えつつあったが、依然、カベオラの機能と超微構造との相関に於いて、十分な理解が得られていない状況が続いていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、以上の背景をもとに、カベオラの機能を深く理解するために、以下の2点を研究目的とした。

(1) カベオラの構造基盤に関して、これまでの周知の事実であった「渦巻き状の膜被覆構造」以上に詳細な構造情報を獲得すること。

(2) カベオラの分子構築に関して、カベオリンやコレステロール以外の新規タンパク質に関して、電子顕微鏡の解析レベルで明らかにすること。

### 3. 研究の方法

カベオラの構造形成が細胞膜上 (細胞質側表面) で行われるため、カベオラを細胞膜と一緒に観察できる、「フリーズレプリカ電子顕微鏡法」を選択した。細胞には、生理的条件下でカベオラ構造が豊富に構築されているヒト由来がん細胞を利用した。以下の実験系を調整した。

(1) Cavin-1/PTRF (Polymerase I and transcript release factor) あるいは ATPase EHD-2 (EH-domain containing 2) の過剰発現系

(2) 上記該当タンパク質のノックダウン (あるいはノックアウト) の過小発現系

(3) コレステロール包摂化合物による細胞膜でのコレステロール枯渇系

具体的な実験の流れとしては、超微弱な超音波により、細胞膜の細胞質側表面を効率的に裸出させた試料をつくるのが始めた。次に、液化ヘリウムで冷却した純銅ブロックに圧着させることで急速凍結して、低温高真空下で、プラチナ・炭素を低角度回転蒸着させた。最終的に出来上がったレプリカ薄膜の厚さは、数ナノメートル程度であり、カベオラやクラスリン被覆ピット、アクチン膜骨格など細胞膜表面にある全ての構造物が鋳型と

して写しとられていた。タンパク質分子の特定には、免疫金コロイド染色法や、その改良版であるワンステップラベル法を利用した。生化学、分子生物学で利用される抗体の多くは、電子顕微鏡への展開が困難な場合が多い。対象タンパク質が細胞膜中にあることに加えて、電子顕微鏡でのラベル効率が著しく低いことが原因である。そのため、非常に多くの市販抗体を試行錯誤する必要があった。

### 4. 研究成果

以下に示す、2つの大きな発見があった。

(1) カベオラ表面被覆構造、すなわち渦巻き状の構造群が、2種類のフィラメント構造に分類されることが分かった。Cavin-1/PTRF (Polymerase I and transcript release factor) の過剰発現系で、その構造が変化した。また、Methyl-beta-dextrin や Nystatin などのコレステロール包摂化合物の投与によるコレステロール枯渇系で、カベオラ構造は平坦化したうえに、各々異なる形態変化を示した。このように、カベオラフィラメントの分子構築に対して、Cavin-1/PTRF (Polymerase I and transcript release factor) と細胞膜中の cholesterol の影響が強いことが改めて確認された。

(2) カベオラ構造の周辺部にみられる、(渦巻き構造とは別の) 半月状の特殊フィラメント構造については、免疫コロイド染色像から、ATPase EHD-2 (EH-domain containing 2) が主成分である可能性が高いと考えられた。但し、Cavin-1/PTRF (Polymerase I and transcript release factor) の過剰発現系でも、この半月状の構造群が幾分か増えている印象を受けたので、分子構成に Cavin-1 が含まれていることは確かなようだ。カベオラの構造物 (直径 10nm 以下のフィラメント様構造) を明瞭にラベルするには、従来よりも高いラベル効率が必要となるが、本研究が成功した要因としては、多くの抗体選定に加えて、化学固定に始まるクウェンチング、ブロッキング、洗浄の過程を必要最小限に抑えることで、抗体認識サイトのエピトープの変性や流出を防いだことが良かったと考えられる。

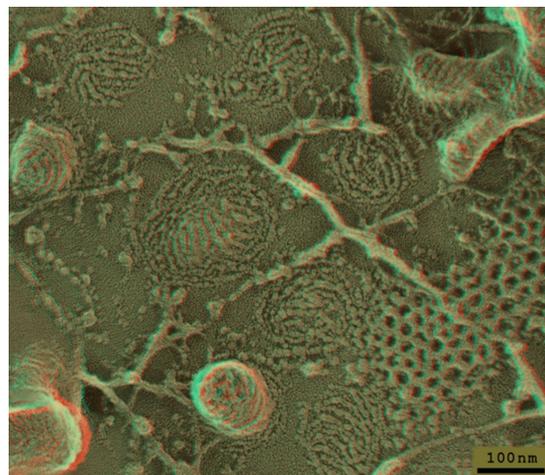


図1 ヒト由来膀胱上皮がん細胞の細胞膜（細胞質側表面）の電子顕微鏡写真。クラスリン被覆ピットとカベオラ構造（平坦化あるいは変形したもの）が、アクチン膜骨格で仕切られている様子が観察されている。

補足事項：浸透圧変化と機械的刺激に応じて、カベオラの構造形態は大きく変化することが知られている（Sinha B., et al. Cell2011）。定常状態と低張状態のカベオラについて、電顕像による構造（直径）と超解像による輝点密度との相関性を検討した結果、定性的な一致がみられた。カベオラ被覆構造と分子構成を解くうえで、このようなナノレベル解像度の相関解析は有用である。

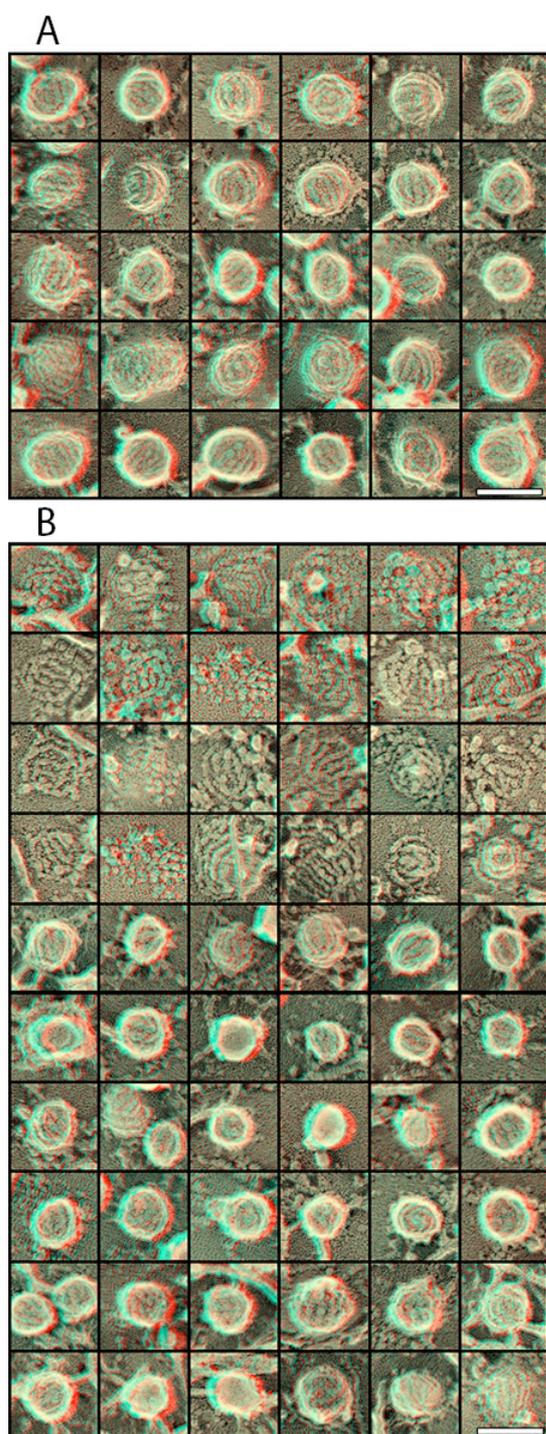


図2 ヒト由来子宮頸がん細胞のカベオラ構造の定常状態（A）と低張状態（B）の電子顕微鏡写真。低張状態では、平坦化と極小化したカベオラの画分が増えている。（スケールバーは100nm）

## 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10件）

1. Sone M, Morone N, Nakamura T, Tanaka A, Okita K, Woltjen K, Nakagawa M, Heuser J, Yamada Y, Yamanaka S, Yamamoto T. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Metabolism*. (2017) in press. (査読あり)
2. Agostini M, Romeo F, Inoue S, Niklison-Chirou MV, Elia AJ, Dinsdale D, Morone N, Knight RA, Mak TW, Melino G. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ*. (2016) 23(9):1502-14. DOI: 10.1038/cdd.2016.36. (査読あり)
3. Kim H, Okamoto H, Felber AE, Polomska A, Morone N, Heuser JE, Leroux JC, Murakami T. Polymer-coated pH-responsive high-density lipoproteins. *J Control Release*. (2016) 228:132-40. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.03.005. (査読あり)
4. Fujiwara TK, Iwasawa K, Kalay Z, Tsunoyama TA, Watanabe Y, Umemura YM, Murakoshi H, Suzuki KG, Nemoto YL, Morone N, Kusumi A. Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. (2016) 27(7):1101-19. DOI: 10.1091/mbc.E15-04-0186. (査読あり)
5. Honda M, Minami I, Tooi N, Morone N, Nishioka H, Uemura K, Kinoshita A, Heuser JE, Nakatsuji N, Aiba K. The modeling of Alzheimer's disease by the overexpression of mutant Presenilin 1 in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. (2016) 469(3):587-92. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.12.025. (査読あり)
6. Nakatsuji H, Numata T, Morone N, Kaneko S, Mori Y, Imahori H, Murakami T. Thermosensitive Ion Channel Activation in Single Neuronal Cells by Using Surface-Engineered Plasmonic Nanoparticles. *Angew Chem*

- Int Ed Engl.* 2015. 54(40):11725-9. DOI: 10.1002/anie.201505534. (査読あり)
7. Hirai K, Reboul J, Morone N, Heuser JE, Furukawa S, Kitagawa S. Diffusion-coupled molecular assembly: structuring of coordination polymers across multiple length scales. *J Am Chem Soc.* 2014. 136(42):14966-73. DOI: 10.1021/ja507971r. (査読あり)
  8. Weng L, Enomoto A, Miyoshi H, Takahashi K, Asai N, Morone N, Jiang P, An J, Kato T, Kuroda K, Watanabe T, Asai M, Ishida-Takagishi M, Murakumo Y, Nakashima H, Kaibuchi K, Takahashi M. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. *EMBO J.* 2014. 33(18):2098-112. DOI: 10.15252/emj.201488289. (査読あり)
  9. Murakami T, Nakatsuji H, Morone N, Heuser JE, Ishidate F, Hashida M, Imahori H. Mesoscopic metal nanoparticles doubly functionalized with natural and engineered lipidic dispersants for therapeutics. *ACS Nano.* 2014. 8(7):7370-6. DOI: 10.1021/nn5024818. (査読あり)
  10. Endo M, Yamamoto S, Emura T, Hidaka K, Morone N, Heuser JE, Sugiyama H. Helical DNA origami tubular structures with various sizes and arrangements. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014. 53(29):7484-90. DOI: 10.1002/anie.201402973. (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

1. Morone N, Mori Hajime, Heuser J. Intracellular crystallization of insect virus and polyhedra revealed by quick-freeze, freeze- fracture electron microscopy. The 2014 ASCB/ ifcb meeting on December 6-10 at Philadelphia, USA
2. Morone N, Mori Hajime, Heuser J. Mesoscale organization of insect virus-polyhedra crystals revealed by rapid- freeze, freeze-fracture EM. 18th International Microscopy Congress on September 7-12, 2014 at Prague, Czech
3. Morone N, Mori Hajime, Heuser J. Insect virus- polyhedra crystals revealed by tepid-freeze, freeze-fracture EM. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会. 2014 年 05 月 11 日 ~2014 年 05 月 13 日. 幕張 日本
4. 村上達也, 中辻博貴, 沼田朋大, 諸根信弘, 金子周司, 森泰生, 今堀博. プラズモンナノ材料による神経細胞の熱感

受性イオンチャネルの光活性化. Biochemistry and Molecular Biology 2015 on December 1-4, 2015 at Kobe, Japan

5. Kuwahara R, Yokoyama K, Aoyama K, Mitsuoka K and Morone N. Three dimensional structure of cytoskeleton in axon. The 2nd East- Asia Microscopy Conference. 2015 年 11 月 24 日~ 2015 年 11 月 27 日. 姫路 日本
6. 栗原隆亮, 青山一弘, 光岡薫, 諸根信弘. 神経軸索内膜骨格の 3 次元構造. 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会. 2015 年 05 月 13 日~ 2015 年 05 月 15 日. 京都 日本
7. 青山一弘, 諸根信弘, 栗原隆亮, 横山佳奈, 光岡薫. Cryo-STEM Tomography による細胞構造の 3 次元解析. 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会. 2015 年 05 月 13 日~ 2015 年 05 月 15 日. 京都 日本
8. 諸根 信弘. カベオラと細胞膜の相互作用点に関する構造解析的検証. 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会. 2015 年 05 月 13 日~ 2015 年 05 月 15 日. 京都 日本
9. 諸根 信弘, 森 肇, Heuser John. 感染性タンパク質結晶化の細胞内メゾ構造解析. 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会. 2015 年 05 月 13 日~ 2015 年 05 月 15 日. 京都 日本
10. Kuwahara R, Aoyama K, Mitsuoka K and Morone N. Three dimensional structure of ring- shaped membrane skeleton in axon. 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会. 2015 年 05 月 13 日~ 2015 年 05 月 15 日. 京都 日本
11. 諸根信弘. 細胞やタンパク質分子複合体の無氷晶凍結に必要な基礎原理と方法論. 第 72 回日本顕微鏡学会. 2016 年 06 月 14 日~ 2016 年 06 月 16 日. 仙台 日本

[図書] なし

[産業財産権] なし

[その他] ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

諸根 信弘 (NOBUHIRO MORONE)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・客員教授  
研究者番号 : 50399680

### (2)研究分担者 なし

### (3)連携研究者 なし

### (4)研究協力者 なし