

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0196

研究課題名（和文）ライブセルハイブリッドイメージングによる細胞膜微細構造変化の分子機構解明

研究課題名（英文）live-cell hybrid imaging of morphological dynamics of the plasma membrane

研究代表者

吉村 成弘（YOSHIMURA, Shigehiro）

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90346106

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：高速原子間力顕微鏡（高速AFM）と蛍光顕微鏡のハイブリッドライブイメージングシステムにより、クラスリン依存性エンドサイトーシスにおける細胞膜の変形過程の詳細な分子機構を解明することに成功した。膜変形活性を持つCIP-4タンパク質が、低分子量Gタンパク質を介してピット周辺に集合し、アクチン重合を促進することで近傍の細胞膜を変形させることが重要であることを明らかにした。また、膜形態の光回折限界を超えた同時観察を可能とするために、高速AFMと薄層斜光照明技術のハイブリッド顕微鏡の構築に取り組み、細胞膜上の蛍光標識分子の1分子イメージングおよび超解像画像取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでエンドサイトーシス機構の解析には、電子顕微鏡による詳細な膜形状の観察と、蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングで得られるタンパク質局在情報に大きく依存していた。本研究で確立した高速原子間力顕微鏡と高分解能蛍光顕微鏡のハイブリッドライブイメージングシステムにより、エンドサイトーシスにおける細胞膜の形状とタンパク質局在を同時に解析することが可能となり、膜変形活性を持つタンパク質群がクラスリンピット周辺の細胞膜を変形させる分子メカニズムを解明することに成功した。これは、シグナル伝達研究分野における重要な知見であり、同技術の有用性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：We established a hybrid live-cell imaging system by combining high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) and fluorescence microscopy and revealed the detailed morphological changes in the plasma membrane and protein localizations during the clathrin-mediated endocytosis. CIP4, which has membrane-deforming activity, is recruited to the plasma membrane via small G protein Cdc42, and promotes the assembly of actin, which induces a small membrane bulge near the clathrin pit. We also established a hybrid microscope system by combining HS-AFM and highly inclined and laminated optical sheet (HIL0) illumination to overcome the limitation of light diffraction, and successfully visualized a single molecule in the plasma membrane by super-resolution radial fluctuation.

研究分野：ライフサイエンス / 生物物理学 / 機能生物化学 / 構造生物化学

キーワード：ライブセルイメージング 高速原子間力顕微鏡 超解像顕微鏡 エンドサイトーシス 膜ダイナミクス
クラスリン BARドメインタンパク質 ウィルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細胞活動における細胞膜形状変化：細胞膜は細胞が周囲の環境や細胞とのコミュニケーションにおける重要な中継地である。膜受容体を介したシグナル伝達、膜タンパク質による情報伝達物質の取り込みに加え、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの膜小胞を介した経路が、シグナル伝達、免疫、発生、神経伝達、細胞運動、など多くの細胞活動において重要な役割を果たしている。近年、膜変形に関与する多くのタンパク質が同定され、細胞内局在および動態が解明されつつある中で、「膜の形状変化」に関する構造情報は *in vitro* での生化学的な実験系に依存している。しかし、*in vitro* と *in vivo* の結果には隔たりも多く、生きた細胞を対象とした細胞膜の形態観察技術が求められている。

研究代表者は、オリンパス株式会社と共同で、生細胞の表層をイメージングすることに特化した高速原子間力顕微鏡 (ライブセル高速 AFM) の開発に成功した。この技術は、生きた細胞の細胞膜形状を数秒の時間分解能、 ~ 10 nm の空間分解能で可視化できる、世界でオンリーワンの技術である。さらに、このライブセル高速 AFM と市販の共焦点レーザー顕微鏡とを組み合わせることにより、クラスリン依存的エンドサイトーシスに伴うタンパク質局在と膜形状変化とを同時イメージングし、それらの関係を解明することに成功した。

高速 AFM で得られた細胞膜の形状情報によると、小胞の切り離し過程では、小胞周辺の膜構造変化は必ずしも対称的ではなく、時に非対称的であり局所的な微細構造変化を伴って進行している。このことは、小胞周辺の不均一なタンパク質局在を示唆するものであるが、現在の技術では、共焦点レーザー顕微鏡の光学分解能と高速 AFM の空間分解能との間には一ケタ以上の差があり、その正確な位置関係を明らかにする事は困難である。オンリーワンの技術をさらにレベルアップさせ、膜形状変化の分子機構を解明するには、高速 AFM の時空間分解能と同等の性能を持つ光学顕微鏡システムとの融合が必要であり、そのための国際共同研究およびネットワーク構築を推進する必要があると考えている。既存の 2 種の異なる顕微鏡をそのまま組み合わせただけでは、お互いの長所を活かした相関イメージングは実現できない。

2. 研究の目的

本研究課題では、本研究代表者らが確立した高速 AFM 技術と、世界をリードする超解像顕微鏡技術等を組み合わせ、生きた細胞で膜形状とタンパク質局在とを同時空間で観察する、世界で最高峰のイメージング技術を確立することを目的とする。そして、この技術を用いて、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスに伴う膜変形過程の分子メカニズムを解明することを最終的な到達点と定める。

3. 研究の方法

本研究課題には、以下の 5 グループが参画する。海外のチームを含め、メンバーのすべてが 20 才台後半から 40 才台前半の若手研究者で構成されており、高いモビリティとアダプタビリティで国際共同研究を遂行する。京都大学では大学院生 3 名が研究協力者として参加し、顕微鏡の操作を行う。また、北海道大学では、大場雄介教授が研究協力者として参加し、分担者の吉田・パウデルと密に連携しながら顕微鏡開発および観察を推進する。

- ・京都大学 (吉村, 桑田) : 高速 AFM によるエンドサイトーシスの観察
- ・北海道大学 (吉田, パウデル): 光学顕微鏡構築、細胞膜のイメージング
- ・お茶の水大学 (植村) : 膜融合関連タンパク質の機能解析
- ・EMBL (Ries) : 超解像顕微鏡構築、エンドサイトーシスのイメージング
- ・Yale University (Zhang) : 膜融合タンパク質の相互作用解析、生物物理

研究期間は 4 年間で設定し、ハイブリッド顕微鏡の開発から応用までを、フェーズ 1 ~ 3 に沿って進める。

フェーズ 1 : 高速原子間力顕微鏡と超解像蛍光顕微鏡との融合

このフェーズでは、主に京都大学、北海道大学、EMBL が共同し、高速 AFM 技術と超解像顕微鏡技術との融合を目指す。EMBL のグループでは、各種超解像顕微鏡 (PALM/STORM) を自作してきた実績がある。京都大学および北海道大学から EMBL に研究者 (分担者、協力者) を派遣し、顕微鏡技術の融合に関する検討・実験をおこなう。特に以下の項目を検討する。

- i) AFM と超解像との両立を可能にする光学系の設計・構築および高速化
- ii) 時空間的相関イメージングを可能にする制御系の検討・構築

フェーズ 2 : ハイブリッド顕微鏡を用いた膜変形・切り離し過程の可視化・解析

フェーズ 1 で検討・構築した光学系を高速 AFM に組み込み、膜小胞生成過程の可視化解析に挑む。この実験は、京都大学と北海道大学の分担者で行う。膜切り離しのステップには、これまで報告されてきたダイナミン以外に、多くのタンパク質の関与が報告されつつある。京都大学では、高速 AFM を用いた解析により、エンドサイトーシス過程における細胞骨格関連タンパク質の関与を示す重要なデータを得ている。また、EMBL のグループでも、超解像顕微鏡を用いて、小胞周辺の細胞骨格の局在に関する高空間分解能局在情報の取得に成功している。ここでは、その両

者を組み合わせ、クラスリン依存的エンドサイトーシスにおける膜変形・小胞生成の分子メカニズムを明らかにする。

フェーズ3：ハイブリッド顕微鏡を用いた膜融合過程の可視化・解析

フェーズ2までに確立したイメージング技法を、膜融合過程の解析に応用する。京都大学、北海道大学、EMBLに加え、膜融合タンパク質複合体 (SNARE 複合体) の研究で多くの業績を上げてきた Yale 大学の Zhang と、お茶の水大学植村のグループが参加し、膜融合に必要なタンパク質群の局在と、膜変形過程を可視化解析する。植村は、超解像顕微鏡を用いて膜融合に関与するタンパク質のイメージングにたずさわり、近年では、膜融合の瞬間を可視化するプローブの開発を行っている。ここでは、その技術・経験を高速 AFM に融合し、蛍光観察と高速 AFM とのハイブリッド観察を試みる。

4. 研究成果

フェーズ1：高速原子間力顕微鏡と超解像蛍光顕微鏡との融合

欧州分子生物学研究所のグループが有する各種超解像顕微鏡 (PALM/STORM) と京都大学で有する高速 AFM 技術とを融合するためのシステムの検討をおこなった。高速 AFM のスキャナユニットがステージ上部を占領するため、これと空間的に干渉しない光学系の作成法や、超解像顕微鏡の高速化に取り組んだ。高速 AFM が搭載されている倒立型顕微鏡のサイドポートを利用して、超解像の光学系を導入する可能性を検討した。また、ソフトウェア的には、現有の高速 AFM と共焦点レーザー顕微鏡とを組み合わせた相関イメージングシステムに関して、空間的位置合わせ法を確立した。クラスリンの蛍光輝点と高速 AFM での凹みとの位置合わせを行ったところ、ライブセル観察では 20 nm 程度、固定した細胞では最大 10 nm 程度の精度での位置合わせを可能にした。これは、エンドサイトーシスピットを同定するのに十分な解像度であるが、ピット内での位置を特定するには不十分な解像度であった。

また、北海道大学には、膜成分 (基質や受容体、脂質組成、膜裏打ちタンパク質等) と膜形態の光回折限界を超えた同時観察を可能にするために、高速 AFM と薄層斜光照明技術 (highly inclined and laminated optical sheet, HILO) のハイブリッド顕微鏡の構築に取り組んだ。HILO では、薄層光で局所的に励起するため高いシグナルノイズ比で膜成分の動態をイメージングできるものの、高速 AFM ユニット周辺には空間的制限があるため、既存の HILO ユニットのそのまま一体化させることは不可能であった。そこで、HILO ユニットの光学系を見直し、光路長を短くするとともに、レーザー光源を空間照射からファイバー照射に変えた。これにより、光源ユニットを HILO の本体のユニットから独立させることができ、高速 AFM と空間的に干渉しない小型 HILO ユニットの作製に成功した (図 1)。この HILO の試作機により、膜上の蛍光標識分子の 1 分子イメージング、Super resolution radial fluctuation (SRRF) 処理による超解像画像取得にも成功した。HILO と高速 AFM の同時イメージングに取り組んでおり、HILO に由来するノイズが AFM 走査に干渉するという問題の解決に向けてシステムを改良中である。

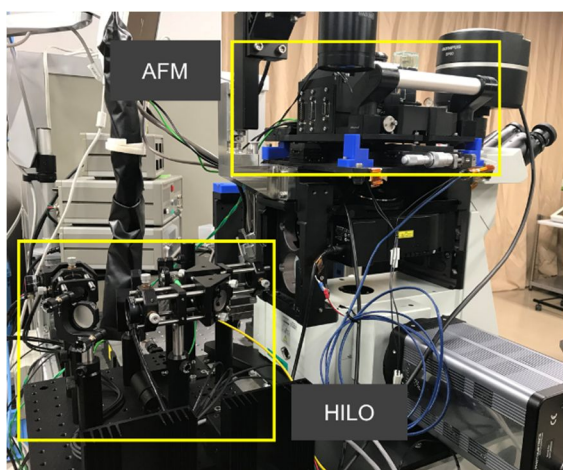


図 1 高速原子間力顕微鏡と薄層斜光照明とのハイブリッド観察システム。薄層斜光照明による蛍光像を Super resolution radial fluctuation 処理することで、超解像画像の取得が可能になった。

フェーズ2：ハイブリッド顕微鏡を用いた膜変形・切り離し過程の可視化・解析

ハイブリッド顕微鏡による光学分解能の上昇と共に、時間分解能の向上に取り組み、クラスリン依存的エンドサイトーシス過程の観察および分子機構の解明に応用した。これまでの 10 秒から 2 秒へと分解能を向上させることに成功し、エンドサイトーシス過程の膜変形、切り離し過程を、より詳細に可視化解析することに成功した。この新技術に、ダイナミン、アクチン、BAR ドメインタンパク質の RNA 干渉や阻害剤を組み合わせることで、これらのタンパク質が、閉口過程を異なるステップで機能していることを示す結果を得た。特に、観察の安定性向上により、RNA 干渉によるタンパク質量の低下が閉口過程における及ぼす影響を定量的に解析することが可能

となり、以下の仕組みを明らかにすることに成功した。i) F-BAR ドメインを持つタンパク質の中でも、CIP4 がクラスリンピット閉口時の非対称的な膜隆起の形成に必要である。ii) 膜隆起の形成には N 末端の BAR ドメインと、中央の非構造領域の両方が必要である。iii) 非構造領域中央部の HR1 モチーフは二量体を形成し、非構造領域の自己集合を促進する。二量化した HR1 は活性化型 Cdc42 と相互作用し、N-WASP を活性化する。iv) N-WASP により Arp2/3 が活性化され、局所的なアクチン重合が促進される (図 2)。このことは、クラスリン依存性のエンドサイトーシスの分子機構解明に迫る重要な知見である。

高速 AFM で極性細胞の頂端膜の形態変化を観察したところ、上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) の刺激で誘発されるクラスリン依存性エンドサイトーシスは頂端膜の限られた領域で生じることを見出した。この発見は、膜上に均一に分布している受容体と基質の相互作用の結果、クラスリンが集積し膜形態変化が誘発されるという従来のモデルとは合致せず、細胞膜にはエンドサイトーシスを効率的に行うために予めプログラムされたドメイン (preprogrammed membrane domain, PMD) が存在することを示唆する。つまり、頂端膜上の膜構成成分 (脂質や膜タンパク質) の不均一な分布が予想される。PMD の正体に迫るべく、まず EGFR から発せられるシグナルの関与を検証した。EGFR のノックダウンおよび阻害条件で PMD が形成されなくなったことから、EGFR シグナリングの下流因子が関与することが示唆された。さらに、各種阻害薬と変異体を用いた EGFR の下流シグナルの解析によって、PMD の形成因子は Src であることを突き止めた。現在、高速 AFM-HILO ハイブリッドシステムを用いて膜構成成分の光回折限界を超えたイメージングに取り組んでいる。

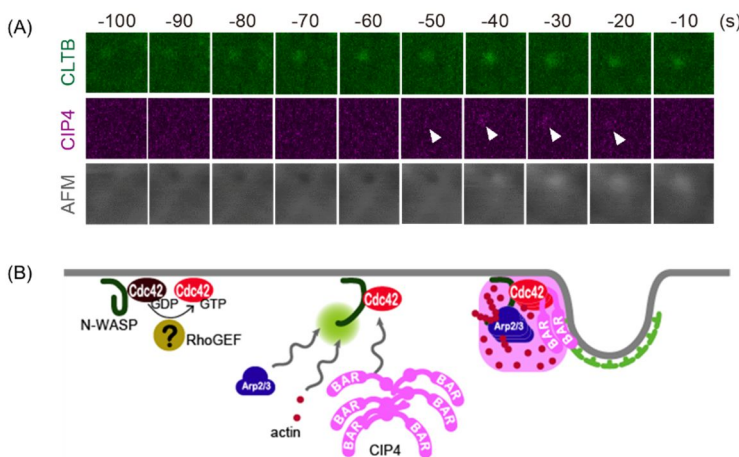


図 2 クラスリン依存性エンドサイトーシスの閉口過程。(A) 蛍光顕微鏡と高速 AFM のハイブリッド観察。膜変形活性を持つ CIP4 は、閉口時にピット近傍に集積し、細胞膜の隆起 (bulge) を引き起こす。(B) CIP4 による非対称的閉口過程のモデル図。Cdc42 依存性的に CIP4 は膜近傍に集合する。CIP4 は、Cdc42 により活性化された N-WASP と協働して、アクチン集積と重合を促進する。ピット近傍に非対称的にアクチンが重合することで、膜が隆起する。

フェーズ 3: ハイブリッド顕微鏡を用いた膜融合過程の可視化・解析

研究分担者である植村との共同研究により、エキソサイトーシス過程での膜融合に関するタンパク質 (SNARE および VAMP2) に蛍光タンパク質を融合させたものを培養細胞に発現させ、超解像顕微鏡と高速 AFM との相関イメージング法の確立に取り組んだ。シロイヌナズナの膜融合制御因子である VAMP721/VAMP722 に蛍光タンパク質を融合させた形質転換体を用いて超解像ライブイメージング観察をおこない、ポストゴルジ膜交通の分岐点として機能する重要なオルガネラであるトランスゴルジ網には、分泌輸送と液胞輸送を担う領域「ゾーン」が存在することを明らかにした (図 3)。また、VAMP721 は、分泌輸送ゾーンから小胞に積み込まれ、細胞膜へと運ばれ、膜融合を制御していることが示唆された。現在、SNAP-33 の SNARE モチーフに CFP と YFP を融合させ、SNARE 複合体形成が行われると FRET を引き起こすような 1 分子プローブを開発中であり、超解像と高速 AFM とのハイブリッドシステムによる観察を視野に入れたシステムの構築が進行中である。

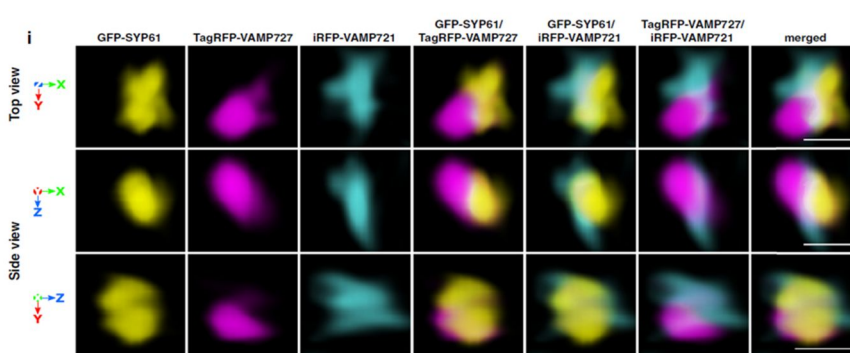


図 3: シロイヌナズナの分泌経路で機能する VAMP721 と液胞輸送経路で機能する VAMP727 に異なる蛍光タンパク質を融合させた形質転換体を用いた超解像ライブイメージング観察。お互いが異なる領域に局在している様子が分かる。

若手育成に関する成果

コロナ禍以前の 2019 年 12 月に、研究分担者吉田が米国細胞生物学会に参加および口頭発表をおこなった。ハイブリッド顕微鏡によるクラスリン依存的エンドサイトーシス過程の観察に関する研究成果であるが、ポスターから口頭発表に選ばれ、国際舞台で英語での口頭発表をおこなったことは大きな成果である。2020 年度は、参加予定であった多くの国際学会がコロナ禍により中止となった。2021 年度には、ようやく開催された国際学会（ハイブリッド形式）で 2 件の発表（植村）をおこない、有意義な議論をすることができた。

国際交流に関する成果

2019 年 6 月に、海外共同研究者である Jonas Ries (欧州分子生物研究所)を招聘し、セミナーを開催するとともに、高速原子間力顕微鏡に超解像光学系を導入する設計に関して 2 日間にわたり議論した。2020 年以降は、コロナ禍により海外渡航が不可能になったため、おもに zoom を用いて情報共有、議論を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Duic Ivana, Tadakuma Hisashi, Harada Yoshie, Yamaue Ryo, Deguchi Katashi, Suzuki Yuki, Yoshimura Shige H, Kato Hiroki, Takeyasu Kunio, Fujita Takashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step conformational changes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11664 ~ 11674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Itsuki, Yoshimura Shige H., Katoh Hironori	4. 巻 295
2. 論文標題 High cell density increases glioblastoma cell viability under glucose deprivation via degradation of the cystine/glutamate transporter xCT (SLC7A11)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6936 ~ 6945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Wanzhen, Watanabe Ryuji, Konishi Hide A., Fujiwara Takahiro, Yoshimura Shige H., Kumeta Masahiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Redox-Sensitive Cysteines Confer Proximal Control of the Molecular Crowding Barrier in the Nuclear Pore	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108484 ~ 108484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 H. Yamazaki, H. Kosako and S.H. Yoshimura	4. 巻 1868
2. 論文標題 Quantitative proteomics indicate a strong correlation of mitotic phospho-/dephosphorylation with non-structured regions of substrates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom.	6. 最初と最後の頁 140295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2019.140295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 H.A. Konishi and S.H. Yoshimura	4. 巻 34
2. 論文標題 Interactions between non-structured domains of FG- and non FG-nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 1532-1545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901669R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 K. Fumoto, H. Takigawa-Imamura, K. Sumiyama, S.H. Yoshimura, N. Maehara, A. Kikuchi	4. 巻 132
2. 論文標題 Mark1 regulates distal airspace expansion through pneumocyte flattening in lung development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs235556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.235556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Nishimura, Y. Johmura, K. Deguchi, Z. Jiang, K.S.K. Uchida, N. Suzuki, M. Shimada, Y. Chiba, T. Hirota, S.H. Yoshimura, K. Kono and M. Nakanishi	4. 巻 10
2. 論文標題 Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains cortical tension during metaphase, which regulates inactivation of the spindle assembly checkpoint at anaphase onset.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-08957-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maarof ND, Kumeta M, Yoshimura SH.	4. 巻 561
2. 論文標題 Modulation of actin-binding and -bundling activities of MISP/Caprice by multiple phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 128-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yiming Yu , Shige H Yoshimura	4. 巻 134
2. 論文標題 Investigating the morphological dynamics of the plasma membrane by high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs243584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.243584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoko Hasegawa, Thais Huaranca Reyes, Tomohiro Uemura, Anirban Baral, Akari Fujimaki, Yongming Luo, Yoshie Morita, Yasushi Saeki, Shugo Maekawa, Shigetaka Yasuda	4. 巻 34
2. 論文標題 The TGN/EE SNARE protein SYP61 and the ubiquitin ligase ATL31 cooperatively regulate plant responses to carbon/nitrogen conditions in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1354-1374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 *Uemura, T., Nakano, R. T., Takagi, J., Wang, Y., Kramer, K., Finkemeier, I., Nakagami, H., Tsuda, K., Ueda, T., *Schulze-Lefert, P. and Nakano, A.	4. 巻 179
2. 論文標題 A Golgi-released subpopulation of the trans-Golgi network mediates protein secretion in Arabidopsis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiol.	6. 最初と最後の頁 519-532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.01228.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimizu, Y., Takagi, J., Ito, E., Ito, Y., Ebine, K., Komatsu, K., Sato M., Goto Y., Toyooka, K., Ueda, T., Kurokawa, K., *Uemura, T., and Nakano, A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cargo sorting zones in the trans-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 1901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22267-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 YU Y, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Correlative imaging of high-speed atomic force microscopy and fluorescence microscopy revealed asymmetric closing process of endocytosis.
3. 学会等名 EMBO workshop, Seeing is Believing (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 YU Y, DEGUCHI K, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Live-cell analysis of protein-mediated membrane deformation during clathrin-mediated endocytosis by High-speed atomic force microscopy
3. 学会等名 日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村成弘
2. 発表標題 ライブセル高速原子間力顕微鏡による細胞表層骨格の可視化とメカノセンシング機構の解明
3. 学会等名 日本生体医工学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ZHANG Y, YOSHIDA A, SAKAI N, UEKUSA Y, KUMETA M, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 In vivo dynamics of the cortical actin network revealed by fast-scanning atomic force microscopy.
3. 学会等名 第75回日本顕微鏡学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Protein-induced morphological changes of the plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis and its dependency on the membrane tension revealed by live-cell fast-scanning atomic force microscopy.
3. 学会等名 EMBO workshop, Physics and Chemistry of Endocytosis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KONISHI H, YAMAZAKI H, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Promiscuous interactions between non-structured domains of nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIDA A, YOSHIMURA SH, OHBA Y
2. 発表標題 Live-cell imaging and analysis of plasma membrane dynamics during clathrin-mediated endocytosis.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KONISHI H, YAMAZAKI H, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Promiscuous interactions between non-structured domains of nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIDA A, YOSHIMURA SH, OHBA Y
2. 発表標題 Live-cell Imaging and Analysis of the Plasma Membrane Dynamics During Clathrin-mediated Endocytosis by High-speed Atomic Force Microscopy.
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society for Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIMURA S.H.
2. 発表標題 How Clathrin-mediated Endocytosis Proceeds under Membrane Tension.
3. 学会等名 International Symposium on AMED “Mechanobiology” Project (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Non-invasive Live-cell Imaging of Plasma Membrane and Cortical Actin Dynamics in Endocytic Process by High-speed Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 第61回顕微鏡学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村成弘
2. 発表標題 ライブセル高速原子間力顕微鏡によるエンドサイトーシス膜変形過程の可視化解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Imaging morphological changes of the plasma membrane and protein assembly during clathrin-mediated endocytosis
3. 学会等名 FAOPS2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Morphological changes of plasma membrane https://www.youtube.com/watch?v=MbwfMo9kARE&t=84s

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	桑田 昌宏 (KUMETA Masahiro) (00582181)	京都大学・生命科学研究所・助教 (14301)	
研究分担者	吉田 藍子 (YOSHIDA Aiko) (70831288)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	パウデル サラド (PaudeI Sarad) (30793939)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植村 知博 (UEMURA Tomohiro) (90415092)	お茶の水女子大学・基幹研究院・准教授 (12611)	
研究分担者	岩根 敦子 (IWANE Atsuko) (30252638)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	マドリード大学			
ドイツ	マックスプランク研究所	欧州分子生物研究所		
米国	カリフォルニア州立大学サンディエゴ校	ジョンズホプキンス大学	イエール大学	他1機関
フランス	フランス国立科学研究センター			