

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06594

研究課題名（和文）「その場」でのビジュアルプロテオミクスによる成長円錐の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of growth cone by in situ visual proteomics

研究代表者

福田 善之（Fukuda, Yoshiyuki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任講師

研究者番号：60571099

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）：クライオ電子顕微鏡技術の発展により、細胞内のタンパク質複合体を直接検出し、その機能状態を示す空間分解能で構造の解析が可能である、「その場」でのビジュアルプロテオミクスが開発された。本研究課題では、マウス海馬由来初代培養神経細胞のトムグラムを、「その場」でのビジュアルプロテオミクスを行ったところ、神経突起内にポリソームと思われる構造が確認された。また、使用している装置のアップデートに伴い、本研究計画への応用を目的としてクライオリフトアウト法の導入を行い、高圧凍結したマウス精子をテスト試料としてリフトアウト法の立ち上げに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画は本来の研究計画を変更して、クライオFIB-SEMを用いたラメラの作製およびクライオリフトアウト法の確立に多くの時間を費やした。世界的に見て、クライオFIB-SEMは構造生物学における最先端技術の一つである。しかしながら、日本国内においては、クライオFIB-SEMの装置は導入されているものの、使用者できる研究者が少ないという問題がある。そのため、本研究計画において、クライオFIB-SEMの手法開発を行ったことで、国内におけるクライオFIB-SEM使用者の裾野を広げ、構造生物学分野の活性化に貢献できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：Due to the advances in the technology and methodology of cryo-EM, in situ visual proteomics has been developed to analyze the structure and functional state of intracellular macromolecular complexes. In this research project, the polysome-like structure was visualized in neuronal processes derived from plunge frozen primary cultured neuronal cells by the in situ visual proteomics. Accompanied by the update of cryo-FIB-SEM, the installation of the cryo-liftout method was carried out to apply to this research project. With a high-pressure frozen mouse sperm cells specimen, the cryo-liftout method could be installed.

研究分野：構造生物学

キーワード：ボルタ位相差クライオ電子線トムグラフィー 初代培養神経細胞 成長円錐 クライオFIB-SEM サブトムグラム平均化 リフトアウト法

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の機能において、特定のタンパク質が単独で作用しているという事例は少なく、多くの場合において、タンパク質は別のタンパク質との相互作用、もしくは複合体の形成により、目的の細胞機能を果たしている。そのため、細胞内における、タンパク質間の相互作用およびタンパク質複合体形成機構の解明は、細胞機能の理解に重要である。一方、これまでの解析方法では、直接もしくは間接的な結合がないタンパク質間の相互作用の解析は困難であった。しかし、申請者のこれまでの研究から、「その場」でのビジュアルプロテオミクスを用いることで、直接的な結合のない 26S プロテアソームと TPP が空間的相関を持つことが明らかになった。そのため、タンパク質の空間的相関関係に着目して細胞機能を解析することで、従来の生化学的解析とは異なる、新たな知見が得られると期待されている。

クライオ電子線トモグラフィー (Cryo-ET) は、生理的状态に近似した環境で保存された細胞を、数ナノメートルの空間分解能で 3 次的に観察することが可能である。そのため、Cryo-ET を用いて細胞内タンパク質の直接観察が行われている。しかし、電子線の透過性の問題により、Cryo-ET で観察できる領域は細胞の辺縁部のみに制限されていた。この電子線の透過性による観察領域の制限をなくすために、集束したイオンビームを用いて凍結試料の微細加工を行うクライオ集束イオンビーム装置 (Cryo-FIB-SEM) が開発された。この Cryo-FIB-SEM は形態学における最先端手法の一つである。

### 2. 研究の目的

本研究課題の核心をなす学術的な「問い」として、「タンパク質の空間的相関関係は、細胞機能の制御機構として機能するか？」を設定する。本研究課題では、こうした学術的「問い」に答えるため、細胞機能を、関連する分子の空間的相関関係の観点からの解析を試みる。具体的には、軸索誘導因子の刺激により、成長円錐の局所タンパク質合成およびユビキチン プロテアソーム系 (UPS) を対象として、以下の 3 点の解明を目的とする。1) Cryo-ET による、成長円錐の三次元形態解析、2) 局所タンパク質合成における軸索誘導因子特異的な翻訳制御機構についての解明、3) 転向運動における局所タンパク質合成および分解の空間的相関の解明を本研究課題本来の目的としていた。

しかしながら、研究活動の開始後、Cryo-FIB-SEM の手法の改善が必要となったため、研究目的 1) で予定していた Cryo-FIB-SEM を用いた成長円錐の切削における試料加工法の改善を研究目的の 1 つとして行った。

### 3. 研究の方法

#### 1) Cryo-FIB-SEM を用いた凍結試料加工法の改善

炭素薄膜を貼った電子顕微鏡用試料グリッドに出芽酵母の懸濁液を載せて液化エタン・プロパン混合ガスに浸漬することで、細胞を急速凍結する。そして、凍結した酵母を Cryo-FIB-SEM に挿入して、集束ガリウムイオンビームを用いて微細加工を行う。

マウス精子を銅製の高圧凍結用キャリアーに載せ、HPM-010 を用いて高圧凍結を行う。高圧凍結したキャリアーは液体窒素中でへき開し、精子ブロックのある試料側キャリアーを Cryo-FIB-SEM に挿入して、クライオリフトアウト法を行う。

#### 2) 急速凍結した初代培養神経細胞の「その場」でのビジュアルプロテオミクス

炭素薄膜を貼った電子顕微鏡用試料グリッドにポリ L リジンコートを行い、マウス海馬由来神経細胞の培養を行う。初代培養神経細胞を液化エタン・プロパン混合ガスに浸漬して細胞の凍結を行う。凍結した神経細胞を直接もしくは Cryo-FIB-SEM で切削した試料を Cryo-TEM で傾斜系列像を撮影し、トモグラムの立体再構築を行う。データベースから取得したリボソームの構造データのテンプレートとして用い、神経細胞のトモグラムを対象にテンプレートマッチングを行う。Pytom ソフトウェアを用いてマッチしたサブトモグラムの平均化を行う。TOM-toolbox ソフトウェアを用いて、リボソーム平均化像をオリジナルのトモグラムに戻してその局在を解析する。

### 4. 研究成果

#### 1) Cryo-FIB-SEM を用いた凍結試料加工法の改善

クライオ FIB-SEM による切削条件の検討を急速凍結した酵母細胞を用いて行った。ボルタ位相差クライオ透過電子顕微鏡による切削した凍結試料の観察では、観察像がゆがみ、コントラストの改善が得られにくい。そのため、切削した試料の帯電問題を解決するために、プラチナを用いたスパッタリングを行い、薄片表面の導電性の改善を試みた。プラチナ粒子が必要以上の厚さであれば、電子線を遮蔽してしまい、不十分であれば、帯電問題が解決されないため、適切な厚

さで表面をコーティングする必要がある、適切な条件検討に当初予測した以上の時間を要してしまった。

クライオFIB-SEMによる切削条件の検討を急速凍結した酵母細胞を用いて行った。そして、時間はかかったもののクライオFIB-SEMを用いた急速凍結試料切削方法を確立することができた。この凍結試料切削条件を用いて急速凍結初代培養神経細胞の切削を行ったところ、神経細胞由来の突起の厚さにより、奥行の短い薄片しか作製できなかった。支援期間中に東京大学医学部に設置されているクライオFIB-SEMの大規模アップデートが行われた。この大規模アップデートにより、凍結試料の一部を切り出し、切り出したブロックを冷却したプローブで専用の試料グリッドに移動させるリフトアウト法が実行可能となった。そのため、このリフトアウト法を用いることで、高密度に培養した神経細胞から試料ブロックを切り出し、十分な奥行きを持つ薄片を作製できると考えた。このリフトアウト法は国内だけでなく海外においても、新しい技術であったため、まずリフトアウト法の立ち上げを行った。高圧凍結したマウス精子をテスト試料としてリフトアウト法の立ち上げに成功した。しかしながら、手法の立ち上げに想定以上に時間がかかってしまい、本研究期間中に初代培養神経細胞を試料としたリフトアウト法を行うことはできなかった。

## 2) 急速凍結した初代培養神経細胞の「その場」でのビジュアルプロテオミクス

この凍結試料切削条件を用いて急速凍結初代培養神経細胞の切削を行ったところ、神経細胞由来の突起の厚さにより、奥行の短い薄片しか作製できず、ボルタ位相差クライオ電子線トモグラフィーを行えるだけの視野は得られなかった。

そのため、クライオFIB-SEMを用いた試料切削の代案として、ボルタ位相差クライオ電子線トモグラフィーで直接観察できる厚さの神経突起の傾斜系列像の取得を試みた。傾斜系列像から立体再構成したトモグラムにおいて、微小管やミトコンドリアなどの構造に加えて、リボソームと思われる粒子が視認された。そのため、「その場」でのビジュアルプロテオミクスを用いて、これらの粒子の解析を試みた。

まず、テンプレートマッチング法を用いてこれらの粒子を抽出した。そして、サブトモグラム平均化法を用いて各粒子の平均化を行ったところ、リボソームの構造が得られた。「その場」でのビジュアルプロテオミクス法では、トモグラム内でのタンパク質粒子の局在情報を保持しているため、サブトモグラム平均化法により得られた平均化像をトモグラムのオリジナルの位置に戻したところ、神経突起内の小胞体においてポリソームと思われる構造が確認された。

本研究課題では、その支援期間中に目的としていた生物学的課題の解明を達成することはできなかった。しかしながら、支援期間中に、日本国内において、いまだ手法が一般的となっていないクライオFIB-SEMの手法確立を行うことができた。それにより、今後日本国内におけるクライオFIB-SEMの一般化につながる成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福田善之
2. 発表標題 クライオFIB-SEMを用いたクライオ電子線トモグラフィー試料の作製
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiyuki Fukuda
2. 発表標題 Workflow of cryo electron tomography
3. 学会等名 Cryo-Electron Microscopy Course at OIST（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiyuki Fukuda
2. 発表標題 Cryo electron tomography of cellular specimens
3. 学会等名 KSBMB International Conference 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------