2023 年度年次報告書
細胞の動的・高次構造体
2021 年度採択研究代表者

李 勇燦

横浜市立大学 大学院生命医科学研究科
助教

物質吸収を担う刷子縁膜の高次構造動態とその破綻メカニズムの解明

研究成果の概要

本研究の最終目標は、電子顕微鏡によるクライオトモグラフィ法 (Cryo-ET) を用いて、刷子縁膜内部の構造体を高分解能で可視化することである。2023 年度は、グリッド上に培養した上皮細胞を高圧凍結法によりガラス化 (Vitrify) することに成功し、FIB による切削と Cryo-ET 観察によって、in situ 刷子縁を撮影することに成功した。

前年度の結果から、プランジ凍結法では、再現良く上皮細胞を保存することが困難であると判断されたため、代替案として高圧凍結法を検討した。本手法の適用に先立って、培養条件や抗凍結剤を検討した。その結果、Leica EM ICE を用いれば、抗凍結剤の有無にかかわらず、分化に用いたものと同じ培地のまま試料を凍結保存できることを見出した。この方法で凍結した試料氷は厚みが従来の 10 倍程度の 50 μm にもなることから、切削を工夫する必要がある。そこで、最近発表された切削ワークフロー (Kelley et al., Nat Commun, 2022) を導入し、段階的かつ効率的に試料加工を行う手順を確立した。高圧凍結した試料は、SEM 観察ではほぼ平らに見え、目的物の判別が困難であることから、アクチンを蛍光標識した後、一体型蛍光顕微鏡 (iFLM) を利用することで、目的位置を浮かび上がらせることとした。最終的に、2 日間で 10 個以上のラメラを半自動的に切削することが可能になった。

これらの試料から Cryo-ET 撮影を行うことで、刷子縁膜の傾斜シリーズを取得した。AreTomo を用いて三次元トモグラムを再構成したところ、微絨毛の横断面や、長軸を完全に含む三次元再構成像を得ることができた。さらなる解析から、微絨毛内部のアクチン繊維が一定の規則を持って並んでいることが確認できた。現在、RELION-5-beta によるサブトモグラム平均化を試行しており、高分解能平均像の取得とクラス分けにより、微絨毛を構成するアクチン繊維の高次構造を明らかにできると期待される。

並行して、小腸の刷子縁膜に存在する二糖分解酵素を可視化するため、各分子に対する抗体を発現、調製した。また、腎臓の刷子縁膜に存在する輸送体群に関して、精製タンパク質の単粒子解析を行い、構造を決定した。