

細胞の動的・高次構造体
2021 年度採択研究代表者

2022 年度
年次報告書

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ー法(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。2022年度は、上皮細胞培養系を実際に構築し、各種手法により電子顕微鏡試料を作製し、実際にCryo-ET傾斜シリーズを測定した。またこれらのデータから、複数のソフトウェアを相互比較しつつ、トモグラム再構成およびサブトモグラム解析を行った。

細胞培養系に関しては、共焦点顕微鏡イメージングにより、Caco-2細胞の継続培養によって小腸上皮様の極性を持った細胞シートが形成されていることを確認した。この培養系を金グリッド上に再現し、凍結することで、収束イオンビーム(FIB)切削による試料加工を試みた。

グリッド上に形成した上皮細胞シートに関しては、FIB-SEM機器での観察の結果、氷が厚すぎるか、試料がろ紙によって破壊されてしまうというハードルが発覚した。そこで、細胞シートのアピカル面をグリッドに押し付けて刷子縁膜をはがすLift-off法を試みた。Lift-off法によって取得したグリッドをCryo-ET観察した結果、刷子縁膜の特徴である微絨毛が観察された。この試料調製法を改良することで、安定的にCaco-2微絨毛を撮影する系を確立した。

微絨毛の傾斜シリーズから、解析ソフトウェアIMODおよびAreTomoを用いて、トモグラム再構成を行った。いずれのソフトウェアもトモグラムを再構成できたが、Fiducial Marker非存在下での再構成においては、AreTomoがより簡便かつロバストであった。少数のトモグラムから、アクチン繊維をトレースし、単粒子解析ソフトウェアPEETおよびRELION-4.0によるサブトモグラム解析を行った。結果、RELION-4.0によるサブトモグラム解析によって2 nm分解能でin situアクチン構造を再構成した。

並行して、刷子縁膜に存在する二糖分解酵素に関して、精製タンパク質の単粒子解析を行い、2 Å分解能で構造を決定した。これをもって、トモグラムからのテンプレートマッチングを行うための参照構造を得た。