

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」

平成14年度採択研究代表者

藤吉 好則

(京都大学大学院理学研究科 教授)

「高次細胞機能構造体観察・制御技術の開発」

1. 研究実施の概要

細胞の動的な構造を高い分解能で解析するという生物学的に重要な問題を解明することを目指して、電子顕微鏡と光学顕微鏡の両方の技術を開発・改良することを目的としている。現在、Rudolf Oldenbourg博士が開発した2次元ポルスコープを基に、走査斜入射照明光を持つ偏光顕微鏡（3次元ポルスコープ）を開発しつつあり、複屈折物体3次元配向の画像化に成功したことが確認できている。そして神経細胞等を動的に観察するために必要な立体的ポルスコープの開発を進めている。また、独自に開発してきた極低温電子顕微鏡をさらに発展させて、外部制御可能な傾斜機構を開発するために必要な8k×8kという大きな画素数を有するスロースキャンCCDカメラシステム開発の基本設計を行ったので、高性能画像記録システムを用いたコンピュータ制御機構を開発する予定である。今後さらに、海馬から取得した錐体細胞の初代培養を用いて、いろいろな細胞生物学的な実験と蛋白化学的な解析を行う予定であり、最終的には、電子線トモグラフィーを用いて神経細胞など、細胞の立体構造を詳細に解析する予定であるが、さらに、これらの電子顕微鏡を用いた構造研究のための計算機プログラムも開発・改良する予定である。

2. 研究実施内容

膜を介した情報伝達の分子機構解明を目指して研究してきたが、脳や神経の機能は個々の膜蛋白質の構造解析だけでは理解できない。それゆえ、シナプス後肥厚の足場蛋白質の研究や、錐体細胞の光学顕微鏡観察を行っている。成長円錐のアクチン束をも直接可視化できる4次元ポルスコープを完成させて、神経刺激等に応じたスパインの形態変化をアクチン等の動きと併せて観察したい。また、膜蛋白質の構造解析のために開発した極低温電子顕微鏡を、トモグラフィーに適した極低温電子顕微鏡システムに改変して、神経組織や細胞の立体構造を再構築することを目指したい。

両システムを活用すると共に、個々の膜蛋白質や足場蛋白質の構造解析技術、遺伝子改変マウスや錐体細胞初代培養技術、組換え遺伝子技術、免疫電顕法や解剖学等を駆使することによって、神経細胞の可塑性と膜蛋白質や足場蛋白質との関係の解明を目指す。

神経細胞や組織における情報伝達の分子機構を理解することによって、例えば、脳の記憶の仕組みや、神経細胞が損傷を受けたときにこれを修復する機構の理解などに役立てたい。

トモグラフィ用極低温電子顕微鏡の開発は、申請した予算とは大きく異なる予算になったために、他のプロジェクトの計画と合わせて進めることになったが、ポルスコープの開発研究はこの研究プロジェクトの中心課題として進めている。これまでに、米国 Woods Hole Marine biological laboratoryの井上信也先生が開発されたShinyaScopeに Rudolf Oldenbourg博士が開発したLC-PolScopeを搭載したシステム (PolShinyaScope) を、図1の様に設置した。これを用いて、神経細胞の成長円錐も図2の様に、傾向染色などの処理をすることなく高いコントラストで観察することが出来るようになった。

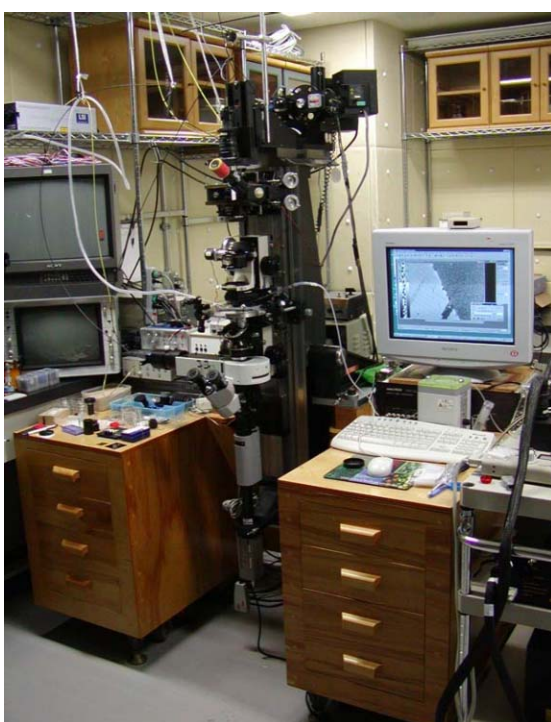


図1 PolShinyaScope

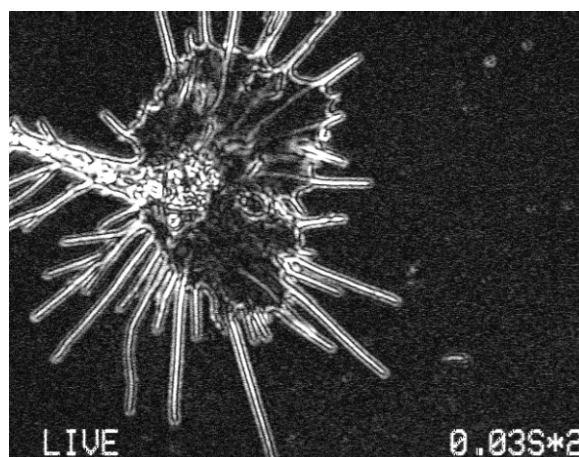


図2 PolScopeで観察された成長円錐

ここで、PolScopeの原理を簡単に解説する。

直交する直線偏光子を用いた一般の偏光顕微鏡は、観察したい複屈折物体の配向に応じて非対称のコントラストを示すことになる。すなわち、物体の光強度は複屈折およびその光軸の方位の正弦自乗に比例するが、もし方位が偏光子のなかの1つと平行な場合には複屈折物体を見ることができなくなる。Oldenbourg博士は、複屈折物体の主軸方位に関係なく画像を得るため、液晶補償器と円偏光子からなる偏光顕微鏡(LC-PolScope)を開発した。LC-PolScopeにより分離した画像は試料の焦点面上での複屈折、つまり複屈折位相差(リターダンス)と遅相軸の主軸方位の分布を示す。しかしながら、測定された(現れた)複屈折位相差は、まだ結晶軸と照明光の光軸角度に依存する。もし、照明光が

光軸に対し平行に近ければ、測定された複屈折位相差は急激に減少し、2つの軸が平行の場合には0となる。

3次元空間に方位づけられた複屈折物体の記述には、主複屈折位相差および傾斜角度の2つのパラメータを新たに導入する必要がある。その際、試料が一軸性の屈折率楕円体であると考え、主軸方位もそれらと共に、試料の複屈折性を完全に特徴付けるとする。これらの仮定によって、試料を移動させずに3つの複屈折パラメータを測定する新しい技術を開発しつつある。新技術はLC-PolScope技術に基づいており、面外複屈折を調べるために新しく液晶マスクとして動作する空間光変調器を追加した。図3に絞りを走査する機構をもつ偏光顕微鏡を示す。マスクは、コンデンサーレンズの絞り面に設置する。コンデンサーレンズの絞りの部分的オクルージョンは、試料上に集まる円錐上の光線の中心線を変化させるため、異なる光線のセットを用いれば、リターデーションおよび方位角の画像を得ることができる。今回の手法では、フルオープンマスクを1つの照明セットで使い、1/4開くマスクを4つの照明セット使用している。

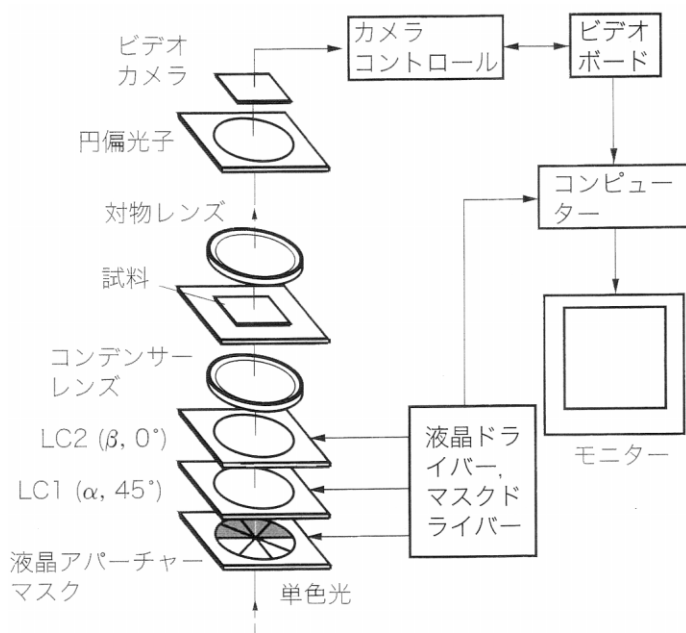


図3 照明系中に液晶補償器をもつLC-PolScopeの概略図。液晶アパーチャーマスクは、2枚の平行直線偏光子の間に挟まれた放射状のセグメント位相子からなる。ここで、 α と β はそれぞれ遅相軸が 45° および 0° 方位角をもつ液晶プレートLC1およびLC2の複屈折位相差。

試料の焦点面での見かけの複屈折位相差および遅相軸方位を測定するためには、試料を円偏光で照明した画像1枚と楕円偏光で照明した4枚の画像を撮る必要がある。これらの画像を解析することで、見かけ上の複屈折位相差と遅相軸方位の写真が得られる。このようにして、各照明光のセットで複屈折位相差と主軸方位の画像のペアを得るが、これらの画像は、さらに主複屈折位相差および傾斜角を計算するために新しく開発したアルゴリズムで解析される。その結果、主複屈折位相差、傾向角度および遅相軸方位のデータは組み合わされて2枚のカラー写真となるが、その写真は、色が傾向角度および遅相軸方位を表し、明るさは主複屈折位相差を表す。

実験的検証については、アスターと呼ばれる生物学の試料を使用した。アスターは

並列の微小管アレーで、中心体と呼ばれる共通組織の中心から広がる堅い生体高分子からなる。試料は球対称で、複屈折配向の3次元分布を予想することができる。図4は、測定された微小管の傾向角または方位角を表わす色イメージを示している。測定された主複屈折位相差、傾向角および主軸方位の分布は、予想されるアスターの微小管の構造をうまくみせている。この実験結果は、新たに開発した偏光顕微鏡が複屈折物体の3次元配向を画像化し、とらえることに成功したことを示唆している。結論として、われわれは光軸を焦点面から傾けることで複屈折物体を視覚化するための偏光顕微鏡の開発に成功したと言えると思う。

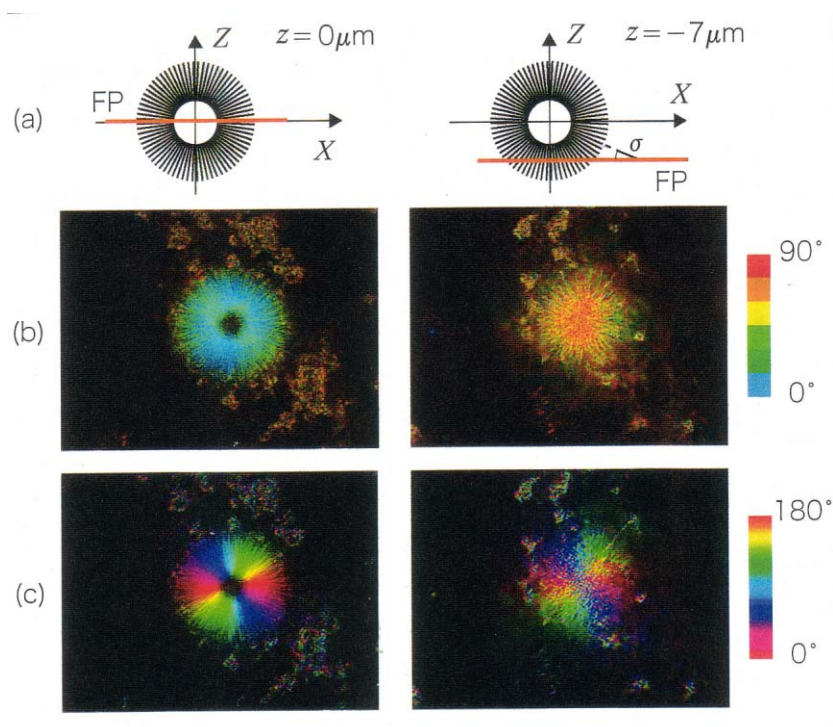


図4 (a) 顕微鏡の光軸とアスターの側面図。光学セクションはアスターの中心を通るものと顕微鏡軸に沿って $7\mu\text{m}$ 移動したものを2本のラインで表す。 σ は傾向角度。(b) 2つの焦点面における主複屈折位相差および傾向角度の画像。主複屈折位相差は明るさに比例。色は傾向角度を示す。傾向角度は右側のカラーバーに示す。(c) 2つの焦点面における主複屈折位相差および方位角角度の画像。(b)のように主複屈折位相差は明るさに比例する。色は主軸方位を示す。右側に主軸方位のカラーバーを示す。

3. 研究実施体制

藤吉 グループ

- ① 研究分担グループ長：藤吉 好則（京都大学大学院理学研究科、教授）
- ② 研究項目：単粒子解析やトモグラフィーに適した極低温電子顕微鏡の開発を海馬錐体細胞などの観察

Rudolf Oldenbourg グループ

- ① 研究分担グループ長：Rudolf Oldenbourg (Marine Biological Laboratory、研究員)
- ② 研究項目：4次元ポルスコープの開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi and N. Unwin
Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore.
Nature, **423**, 949-955 (2003).
- C. Sato, K. Hamada, T. Ogura, A. Miyazawa, K. Iwasaki, Y. Hiroaki, K. Tani,
A. Terauchi,
Y. Fujiyoshi and K. Mikoshiba
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor contains multiple cavities and L-
shaped ligand-binding domains.
J. Mol. Biol., **336**, 155-164 (2004).
- T. Yamaguchi, I. Arimoto-Tahara, Y. Fujiyoshi, T. Doi
Characterization and application of monoclonal antibodies against human
endothelin B receptor expressed in insect cells.
Biotechnology Letters, **26**, 293-299 (2004).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）