

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の
構築と利用」

研究課題「高次細胞機能構造体観察・制御技術の
開発」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者： 藤吉 好則
(京都大学大学院理学研究科、教授)

1 研究実施の概要

新しい試料傾斜機構付き極低温電子顕微鏡、及び、4次元ポルスコープ光学顕微鏡(特殊な偏光顕微鏡システム)という2つの顕微鏡システムを開発して、高次細胞機能構造体観察技術を確立することで、神経細胞などの情報伝達ネットワークの構築に関する分子的基础原理を理解すること、そして将来的には脳における神経システムの構築や修復、記憶制御などの機構を分子レベルで解明することを目的として研究を進めた。本研究構想で目指したのは、光学顕微鏡と電子顕微鏡という2つの“観る”技術の狭間として残されてきた領域へ2つの顕微鏡技術を広げて、新しい“観る”技術を確立することである。これを実現するために、光学顕微鏡はコントラストを向上させて、電子顕微鏡は、電子線損傷を軽減させると共に厚い試料の立体像を構築できるようにする。この新しい技術の開発で、複雑なソフトナノマシンともいえる神経細胞の形態とその機能を分子レベルから理解することを目標とする。そして例えば、脳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。

細胞は、増殖し分化するとともに互いに連携して複雑な組織を形成することができる。このようにして、ヒトという驚異的に複雑な機能構造体をも作り上げている。特に神経細胞は、複雑な情報をしかるべく伝達して、筋肉などの動きを制御すると共に、脳での記憶などの機能を掌っている。神経細胞は、しかるべく自己組織化するのみならず、外界からの刺激などによって神経細胞間の接合やその様式と強さを変化させて LTP や LTD という可塑性を実現している。近年、膜蛋白質の構造研究を含む構造生物学の進展で、神経細胞についても分子間相互作用などの詳細な構造と機能の研究が現実の研究対象となりつつある。しかし、脳組織や神経細胞の研究と構造生物学研究の間をうめる上で必須な、高次細胞機能構造体を分子レベルで議論できる立体的な構造の観察技術は欠落していると思われる。また、これら神経細胞の機能は、細胞の動的な形態変化と密接に結びついているので、細胞の動的な形態変化を観察する新しい技術の開発が望まれている。それゆえ、本プロジェクトでは、この細胞や組織の形態や構造を分子レベルで議論できる極低温電子顕微鏡を用いた高分解能の立体構造観察方法を開発すると共に、神経細胞のスパイン(棘突起)などの形態変化を詳細に直接観察できる技術の開発を目指す。受容体やチャネル等の膜蛋白質構造の解析や膜蛋白質を局在させる足場蛋白質に関するこれまでの研究基盤の上に、電子線と光の新しい顕微鏡システムを活用することで、足場タンパク質などの分子構造と機能研究から、シナプスの形態変化などの研究を行った。

Rudolf Oldenbourg 博士らによって開発された LC-PolScope は偏光を用いることでアクチンフィラメントや微小管などの分子的配向性を持った細胞骨格を固定・染色することなく高コントラストで観察できることが特徴である。本研究ではその特徴を利用して、2つの興味深い成果を得た。

その第1は、成長円錐における cAMP シグナル受容部位の特定である。最近の生化学的、あるいは遺伝学的研究によって神経発生過程において機能している様々なガイドンス因子が同定されてきている。こうしたガイドンス因子は成長円錐表面の受容体を活性化し、局所的な細胞内シグナル伝達を引き起こす。細胞内シグナル伝達を担う分子の一つである cAMP は、成長円錐ガイドンスに関わる重要分子とされてきた。さらに、生理的ガイドンス因子が神経細胞内で一過的な cAMP 上昇を引き起こすことも確認されている。そこでケージド cAMP を LC-PolScope による観察下で光刺激することで局所的に cAMP に変換して上昇を誘起し、cAMP 濃度の感知機構が成長円錐の中でどこに局在しているかの解析を目指した。この様に、cAMP 依存的な神経細胞の成長円錐の伸長の研究を行うために、高分解能の光学顕微鏡に Oldenbourg 博士が開発したポルスコープを装備し、その装置にケージド cAMP を1ミクロン以下の限られた位置で cAMP に変換できる UV 照射システムを開発した。

その結果、cAMP 濃度変化の感知機構は成長円錐のフィロポディア先端部に局在していることが明らかになった。ケージド cAMP を用いた解析では、フィロポディア先端部での光(cAMP)刺激に対してアクチン束長増加が見られた。一方、フィロポディア基部やラ

メリポディア部分での光刺激では同様の現象は観察されなかった。この結果は cAMP 濃度変化の感知機構がフィロポディアの先端部分にあることを示唆しており、生体内においてわずかな接触にも敏感に応答する成長円錐のセンシング機構の一端を明らかにしたといえる。この成果の特色は局所的なケーシング解除 (uncaging) と、細胞骨格の挙動を非侵襲的に可視化できる LC-PolScope とを同時に使用した点である。この実験は、LC-PolScope システムと、ラット海馬神経細胞成長円錐内の微細領域を刺激できるほどの局所性を持った UV 照射システムとを Shinya スコープと呼ばれる大型高性能偏光顕微鏡に組み込むことによってはじめて実現できた。

第2の研究は、CalyculinA というプロテインフォスファターゼの阻害剤の作用機構に関するものである。この CalyculinA により、神経細胞の縮退が起こることが知られているが、その縮退機構の詳細をポルスコープを用いて解明することが出来た。すなわち、神経突起縮退において、ミオシンフォスファターゼ阻害によるミオシン軽鎖のリン酸化の亢進とアクトミオシンの活性化が関与するという新しい機構を提案することが出来た。

また、脳の興奮性のポストシナプスに存在するタンパク質をプロテオミクスの方法を用いて同定した。興奮性のシナプスには足場タンパク質等が蜜に集積していることが知られている。ラットの前脳からシナプス後肥厚を精製し、マスマスペクトル装置を用いて解析した結果、興味深い28個の新規タンパク質を選別した。このような解析で明らかになった新規タンパク質の中で、最も特徴的であったタンパク質について機能解析を行った。例えば、プロリンリッチ配列を有するタンパク質に注目して解析し、これを新たに PRR7 と命名した。PRR7 は、既知のタンパク質との相同性はきわめて低く、しかも極めて特徴的な2次構造を有すると期待される。抗体を用いた解析によって、PRR7 を発現している部位は、大脳海馬のみであり、生後の神経発達に伴って増加すること、ラットの海馬神経細胞内においては、PSD-95 との共局在が確認された。免疫沈降の実験から、NMDA 受容体のサブユニットである NR1 と NR2B との相互作用が認められた。また、PSD-95 との結合も確認したが、それは PSD-95 の3番目の PDZ ドメインとの結合によることを確認した。さらに、PRR7 について翻訳後修飾の解析を行い、セリン68がリン酸化されることを同定した。

代表的な足場タンパク質 PSD-95 は、NMDA 受容体を始めとする重要な膜タンパク質と相互作用して、記憶学習を始めとするシナプスの可塑性との重要な関連が知られている。それゆえ、PSD-95 の構造と機能解析を行った。PSD-95 の PDZ ドメインを単純に除いて発現すると、PSD-95 の構造が大きく変化するためと考えられるが、この足場タンパク質の機能を正確に研究することが出来なかった。そこで、これまでに構造解析された PDZ ドメインの構造に基づいて、第1番目の PDZ ドメイン (PDZ1) と第2番目の PDZ ドメイン (PDZ2) の受容体等への結合能をなくした変異体の組み合わせを変えて、いろいろな変異体を作製した。PSD-95 は、PDZ1 と PDZ2 によって、NMDA 受容体と結合するが、その結合活性を減ざると、シナプスの形状や数に大きな影響が生ずることが明らかになった。

本研究課題の中心の1つであるポルスコープの開発について、Rudolf Oldenbourg 博士を中心に、4次元ポルスコープの開発を行い、染色を行うことなく、立体的に、しかも動的に微小管などの動きを細胞内で観察できるシステムを完成させた。詳細については、以下で詳しく説明するが、このシステムを用いた今後の解析を期待している。

これまで独自に開発した極低温電子顕微鏡は、氷に包埋した試料を極低温に冷却して観察できるので、電子線損傷を桁違いに軽減して高分解能の構造情報を取得することが出来る。それゆえ、膜タンパク質の高分解能の構造解析に大きな力を発揮してきた。実際に、脳に存在する水チャネル、アクアポリン-4 (AQP4) の構造を解析して、それまで知られていなかった細胞接着の機能を発見し、確認することが出来た。この AQP4 は水チャネルでありながら細胞接着の機能を有するので、新たに adhenel と命名することにした。この様に、水を透過するチャネル機能と細胞接着の機能が1つの分子に実現されることによって、 $1+1=2$ というよりははるかに複雑な生理的機能を担うことが出来ると考えられる。具体的には今後の研究の発展を待たなければならないが、神経細胞の分化や、ドーパミンによる制御機構との関わりも判りつつあるので、この adhenel ファミリータンパク質は大いに興味もたれる。また、AQP4 は脳浮腫との関連では、大

変注目されており、このチャンネルの水透過性を阻害できると、脳が損傷を受けた場合の浮腫を防ぐことが出来る可能性がある。我々の構造に基づいてこの水チャンネルを阻害する薬剤を検討している。

古くからギャップ結合において、重要な機能を担っていることが知られているギャップ結合タンパク質は、このadhennelファミリーのタンパク質と考えられる。このギャップ結合チャンネルの構造を解析して、新しいプラグゲーティングモデルを提唱した。これは、重要なチャンネルの構造やゲーティング機構において、教科書を書き換えるような大きな成果であると考えている。特に重要なチャンネルでありながら、ギャップ結合チャンネルはゲーティング機構などにおいて、混乱した状況が続いていた。この状況を大きく変える成果であるので、今後さらに注目されることになるであろう。複雑なゲーティング制御機構が知られているので、今後の研究の発展も期待できる。

藤吉が開発した極低温電子顕微鏡は、試料を極低温に冷却した状態で2 Åを超える高い分解能の像を撮影できるという長所を有しているが、電子線トモグラフィーのように、1つの視野をいろいろな傾斜角度に傾けて像を撮影することは出来なかった。神経細胞などを始めとする複雑な細胞の立体構造を解明するためには、外部から制御して試料を傾斜できる安定な高分解能極低温電子顕微鏡の開発が待たれていた。しかし、その開発は容易ではないのでこれまで実現してこなかった。ところが、研究課題からの強い要請があり、傾斜機構付き極低温電子顕微鏡の開発は不可欠である。それゆえ、今回その困難な課題に挑戦することとした。詳細は後の記述に譲るが、幸いにして、傾斜機構付きトップエントリー型極低温電子顕微鏡システムを開発することが出来た。この結果は、これまでの極低温電子顕微鏡の歴史を変える大きな成果であると自負している。操作性について、まだ問題を残してはいるが、基本的な性能においては、試料を90度まで傾斜できて、2 Åの分解能を達成することが出来た。また、自動試料交換機構により、氷包埋した試料をボタンを押すだけで凍ったまま試料交換できるすばらしい性能を実現した。さらに、高性能SSCCDカメラを装着し、トモグラフィー像を効率よく記録できるシステムを完成させた。また、 Ω フィルター装置を装着しており、厚い試料からの非弾性散乱電子を除いて弾性散乱電子だけでコントラストのよい像を記録できるようなシステムとすることが出来た。

以上のように、本プロジェクトでは、1) 傾斜機構付き極低温電子顕微鏡(第6世代の極低温電子顕微鏡)と2) アクチン束などを染色しないで直接高いコントラストで動的に観察できる光学顕微鏡システムである“3次元(時間軸も含めて4次元)ポルスコープ”を開発した。これらは、広い分野の研究者に利用される装置となることが期待できる。また同時に、これら2種類の装置を活用することで、細胞の構造を立体的にかつ動的に高い分解能で観察する技術においても世界をリードできることが期待される。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本プロジェクトで進めることを計画した研究の具体的内容は以下の4項目である。

なお、第1)の課題はMarine Biological LaboratoryのOldenbourg博士を中心として実施した。第2)、第3)、第4)の課題は、適宜Oldenbourg博士と協力、共同して研究を実施したが、主には京都大学藤吉のグループで実施した。

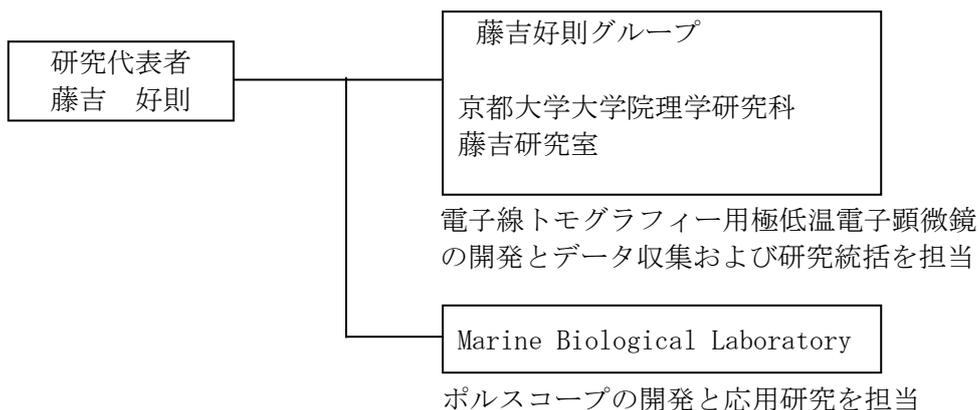
- 1) 海外の研究者、Oldenbourg博士を中心として、立体的なポルスコープを開発すると共に、時間変化にともなう3次元ポルスコープ像の変化(4次元顕微鏡像)を記録できる光学顕微鏡システムを開発した。Oldenbourg博士はポルスコープの開発者で、すでに3次元ポルスコープの試作を行い、中心体から伸びる微少管の3次元像の鮮明な観察に成功した。スパイン等におけるアクチンの動きを直接観察するには、安定な高分解能光学顕微鏡が必要で、高分解能3次元ポルスコープシステムを開発することを目指した。
- 2) 独自に開発してきた極低温電子顕微鏡をさらに発展させて、神経細胞や海馬の切片を高分解能観察し、立体構造を再構築できるシステム(電子線トモグラフィーに適したシス

テム)を開発した。藤吉が開発した極低温電子顕微鏡をトモグラフィーに適したシステムとするには、外部制御可能な傾斜機構を開発する必要がある。分解能や装置の操作性をそれほど低下させないで、60度以上に試料を傾斜できるヘリウムステージを備えた極低温電子顕微鏡を開発した。大画素の SSCCD(スロースキャン CCD)カメラを備えることが必要であるが、これは Tiez 社に開発を依頼した。また、非弾性散乱電子によるノイズを低減するためにエネルギーフィルターを備えた極低温電子顕微鏡システムを装備した。なお、この電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡は、第6世代の極低温電子顕微鏡として完成した。

- 3) 以上、光学顕微鏡と電子顕微鏡の2つの新たに開発するシステムを用いて、海馬錐体細胞を中心とする神経細胞の形態変化を膜蛋白質(mGluR, AMPAR, K⁺-channel, NMDA, Stargazin, IP₃R 等)や足場蛋白質分子(Homer, Shank, PSD-95, GRIP 等)との関係で観察し解析した。神経細胞にある膜蛋白質や足場蛋白質の構造は、電子線結晶学、X線結晶学、そして極低温電子顕微鏡による単粒子解析法によって解析を進めた。また、組換え遺伝子技術などと細胞生物学、蛋白質化学的研究による研究も進める。錐体細胞などの培養技術を駆使すると共に、正統的な免疫電子顕微鏡法や解剖学の技術も活用した。
- 4) 膜蛋白質を含む神経細胞関連蛋白質の構造解析が進んでいるので、細胞内での構造や形態に、これらの構造をフィッティングする。電子線トモグラフィーで解析された立体構造に原子分解能の構造をフィッティングして、細胞の詳細なモデルを作製するには、グラフィックスシステムを活用して各種プログラムを作製した。また、チャネルや足場蛋白質に GFP などを付加してした系を作製して、ポルスコープ観察技術と合わせる事によって、神経細胞などの動的な分子機構をそれぞれの分子レベルで観察を可能にした。

以上の4項目の研究課題をプロジェクト期間内にやり遂げるために、装置開発など、時間を要する困難な挑戦的課題ではあったが、初年度から効率的に研究を推進することができて、以下に述べる結果を得た。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 サブテーマ1:電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発とデータ収集、および、研究統括(京都大学 藤吉好則グループ:京都大学大学院理学研究科)

(1)研究実施内容及び成果

基本的なすべての研究を実施した。それゆえ「研究目的および内容」は「研究構想」と同じ。ただし研究員一人を Marine Biological Laboratory (MBL 米国) に派遣して立体的なポルスコープを開発すると共に、時間変化にともなう3次元ポルスコープ像の変化(4次元顕微鏡像)を記録できる光学顕微鏡システムの開発を進めた MBL での研究支援を行った。

本プロジェクトを進めることを計画した研究の具体的内容は以下の4項目であるので、それぞれの項目の成果を報告する。

1) 海外の研究者、Oldenbourg 博士を中心として、立体的なポルスコープを開発すると共に、時間変化にともなう3次元ポルスコープ像の変化(4次元顕微鏡像)を記録できる光学顕微鏡システムを開発するという課題は、サブテーマ2で報告する。

2) 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、トモグラフィーに適したシステムとするには、外部制御可能な傾斜機構を開発する必要があった。分解能や装置の操作性をそれほど低下させないで、60 度以上に試料を傾斜できるヘリウムステージを備えた極低温電子顕微鏡の開発を行った。大画素の SSCCD(スロースキャン CCD)カメラを備えることが必要であるが、これは Tiez 社に依頼して開発した。また、非弾性散乱電子によるノイズを低減するためにエネルギーフィルターを備えた極低温電子顕微鏡システムを装備した。この電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡は、予定通りにこれらの研究がすべて進捗して、**第6世代の極低温電子顕微鏡システムとして外部傾斜制御機構と高性能 SSCCD カメラを装着し、エネルギーフィルターを備えたシステムを完成させたので以下詳細を報告する。**

予算の都合から、外部制御可能な傾斜機構を備えた極低温電子顕微鏡は、別の予算(振興調整費)のサポートを受けて開発した。しかし、大画素の SSCCD(スロースキャン CCD)カメラなどを含む電子線トモグラフィー用システムとして、本予算で完成させ活用することが出来た。

試料を液体ヘリウム温度にまで冷却できて、しかも安定に像を観察することが出来る高分解能極低温電子顕微鏡とするために、傾斜機構を付加するには一般に不利であると考えられてきたトップエントリー方式を採用することとした。トップエントリー方式の試料ステージでありながら、外部制御可能な傾斜機構を達成するために図1に示すように、藤吉が開発したトップエントリータイプの液体ヘリウムステージに、ジンバルでつないだ傾斜機構をポールピースの上極と下極の間から挿入して傾斜する機構を設計した。試料ステージの温度を1.5Kまで冷却できるように、その傾斜機構を図2に示すように液体窒素で冷却するように設計した。非常に薄い試料ホルダーを設計して、ステージを90度回転させた状態で試料交換する SET システムと名づけたシステムを開発することによって、大きな傾斜角度を実現すると共に、安定な傾斜機構付き極低温試料ステージを開発できた。

G6 He Pot & Specimen Tilt Holder

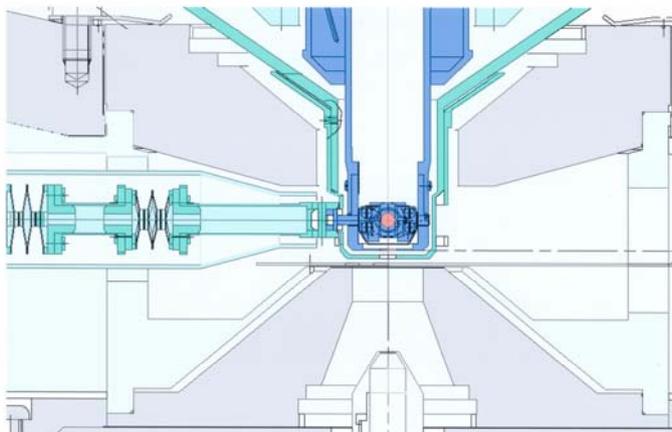


図1 外部制御可能なトップエントリー型傾斜機構。ボールピースの極の間から傾斜機構用棒が挿入されて、モータ駆動により傾斜する。この駆動棒はジンバル方式で3次元的な自由度を保ちながら、回転運動を伝えることが出来る機構とした。

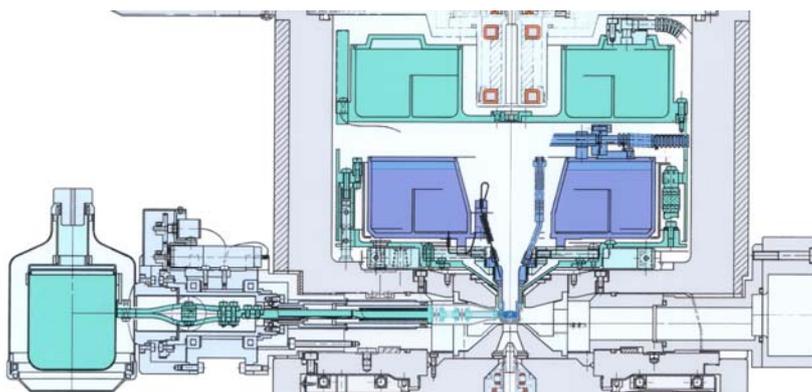


図2 傾斜機構とヘリウムタンク（濃い青色）、液体窒素タンク（薄い青色）、それと傾斜機構を冷却するための窒素デュアーを示す図。

基本的に液体ヘリウムタンクと液体窒素タンクは、藤吉が開発したステージの構成を用いた。画像記録のために、高分解能CCDカメラを設置して、効率の良い画像記録が可能なシステムとした。極低温電子顕微鏡全体の写真を図3に示す。加速電圧300kVで Ω フィルターを装備しているの、かなり大きな装置となっている。ボタンを押すだけで、自動で試料を交換する、新たに開発したクライオトランスファー装置も装備している。



図3 第6世代の極低温電子顕微鏡。自動試料交換機構と傾斜機構、高性能高分解能CCDカメラなどを装着している。トモグラフィー用の電子顕微鏡像を撮影することが出来る（本体は別予算で開発）。

第6世代の極低温電子顕微鏡を用いて、図4のように2 Åを超える分解能を傾斜機構付き極低温電子顕微鏡で達成した。

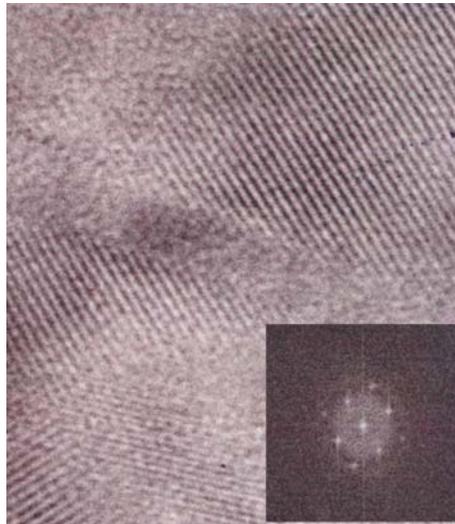


図4 第6世代の傾斜機構付き極低温電子顕微鏡で撮影された金の格子像。2 Åを超える分解能の格子像が観察される。また、フーリエ変換でそれが確認できる。

温度や浸透圧、グルコースのセンシングを行うと考えられている視床下部のグリアルラメラ部分を固定し、染色した試料から得られたトモグラフィーの像は図5に示すように膜が接着している部分の他に離れた部分も観察される。これは、3)において報告する水チャンネルの研究との関連で重要な知見である。

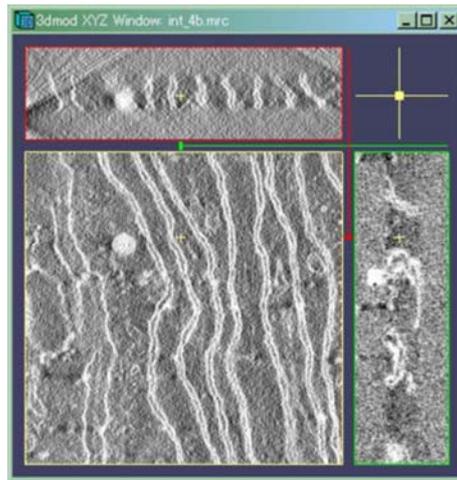


図5 視床下部のグリアルラメラのトモグラフィ解析から得られた像。

脳の組織の急速凍結試料の超薄切片を作製してトモグラフィ像を作製するには、凍結切片を作製する方法の開発が必要である。現状では、世界的に見ても水の含量が多い脳の凍結超薄切片を作製することはできていない。それで、シナプス部分を単離してトモグラフィ観察を行って、ギャップ結合やシナプス結合のトモグラフィ像を得ることができた。神経伝達物質を含むベシクルや神経細胞膜を脂質2重膜が分離できる分解能で観察できた。また、固定し染色した試料を用いた超薄切片試料からのトモグラフィ像の解析を行った。

3) 光学顕微鏡と電子顕微鏡の2つの新たに開発したシステムも活用して、海馬錐体細胞を中心とする神経細胞の形態変化を膜蛋白質 (mGluR, AMPAR, K^+ -channel, NMDA, Stargazin, IP_3R 等) や足場蛋白質分子 (Homer, Shank, PSD-95, GRIP 等) との関係で観察し解析した。神経細胞にある膜蛋白質や足場蛋白質の構造は、電子線結晶学、X線結晶学、そして極低温電子顕微鏡による単粒子解析法によって解析を進め、組換え遺伝子技術などと細胞生物学、蛋白質化学的研究による研究も進めた。錐体細胞などの培養技術を駆使すると共に、正統的な免疫電子顕微鏡法や解剖学の技術も活用することによって研究を進めた。以下に成果を要約する。

・ 脳のシナプス後肥厚 (PSD) に集積するタンパク質

興奮性のポストシナプスに存在する膜タンパク質をプロテオミクスの方法を用いて同定した。興奮性のシナプスには図6に模式的に示すようなタンパク質等が蜜に集積していることが知られている。ラットの前脳からシナプス後肥厚を精製し、マススペクトルを用いて解析した結果、300を超えるタンパク質を同定した。しかし、PSD 以外のタンパク質も混在することが考えられたので、精製途中に得られるシナプトソーム画分に対しても解析を行い、PSD 画分の解析と比較検討することによって、シナプスに存在するタンパク質に対してのプロファイリングを実現した。このような方法によって、PSD 画分に存在するタンパク質群を解析した。その結果、PSD は NMDA 受容体や PSD-95, shank, GKAP など主成分とするタンパク質群からなり、40を超えるシグナル伝達系のタンパク質を含むことを明らかにした。その中から興味深い28個の新規タンパク質を選別した。このような解析で明らかになった新規タンパク質の中で、PSD 画分への濃縮の程度、既知タンパク質との相同性、配列の新規性などの点から、最も特徴的であったタンパク質について、機能解析を行った。例えば、プロリンリッチ配列を有するタンパク質に注目して解析し、これを新たに PRR7 と命名した。PRR7 は、既知のタンパク質との相同性はきわめて低く、しかも極めて特徴的な2次構造を有すると期待される。抗体を作製して、生科学的な機能解析によって、PRR7 は、界面活性剤に対しても強い不溶性を示

す典型的な PSD タンパク質であることが明らかになった。また、PRR7 を発現している部位は、大脳の海馬のみであり、生後の神経発達に伴って増加すること、ラットの海馬神経細胞内においては、PSD-95 との共局在が確認された。免疫沈降の実験から、NMDA 受容体のサブユニットである NR1 と NR2B との相互作用が認められた。また、PSD-95 との結合も確認したが、それは PSD-95 の 3 番目の PDZ ドメインとの結合によることを確認した。

さらに、Q-ToF 型のマスペクトル装置を用いて、PRR7 について翻訳後修飾の解析を行い、セリン68がリン酸化されることを同定した。セリン68は Erk1 (MAP キナーゼ)、cdk5 などの基質になることがアミノ酸配列から予測され、PRR7 が後シナプ스에局在する多彩なシグナル伝達物質によってリン酸化されることが推測される。

• PSD-95 の構造と機能解析

図6に示すように、NMDA 受容体を始めとする重要な膜タンパク質と相互作用して、記憶学習を始めとするシナプスの可塑性との重要な関連が知られている PSD-95 の構造と機能解析を行った。PSD-95 の PDZ ドメインを単純に除いて発現すると、PSD-95 の構造が大きく変化するためと考えられるが、この足場タンパク質の機能を正確に研究することが出来なかった。それゆえ、これまでに構造解析された PDZ ドメインの構造に基づいて、第1番目の PDZ ドメイン (PDZ1) と第2番目の PDZ ドメイン (PDZ2) の受容体等への結合能をなくした変異体の組み合わせを変えて、いろいろな変異体を作製した。PSD-95 は図6に示すように、PDZ1 と PDZ2 によって、NMDA 受容体と結合する。その結合活性を減ざると、図7のようにシナプスの形状や数に大きな影響が生ずる。

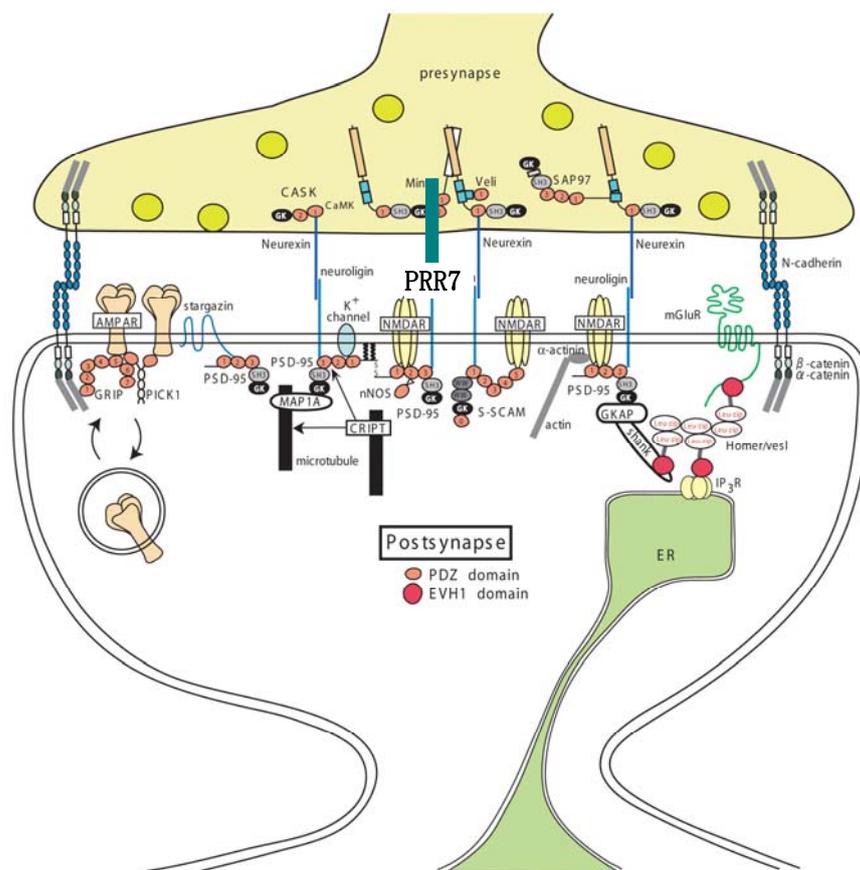


図6 興奮性シナプスの模式図。現在までに判っているタンパク質の全てが書きこまれているわけではない。

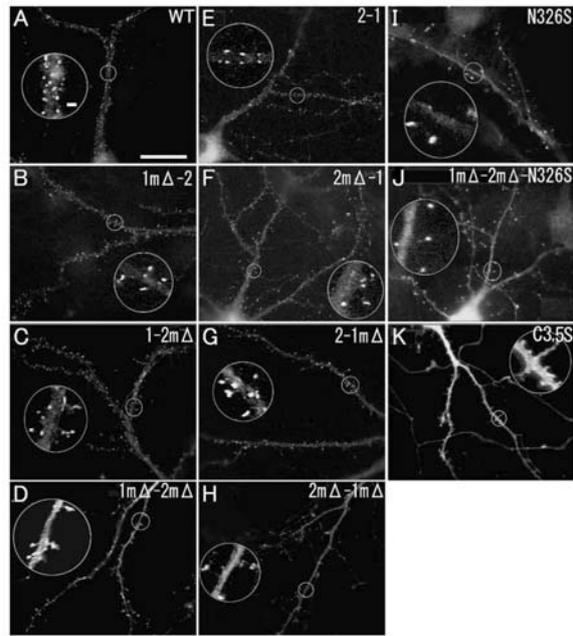


図7 各 PSD-95 には、GFP が付加されており、それにより各種変異を導入した PSD-95 の分布とシナプスの形状を見ることができる。変異によって、シナプスの形状がAに示すワイルドタイプの PSD-95 が発現されるときとは大きく異なることがわかる。

・ IP₃ 受容体の構造解析

図6に示すように、Ca²⁺イオンの制御に関わるER膜に存在する IP₃ 受容体の構造を、単粒子解析法で解析した。IP₃ 受容体は、IP₃ や Ca²⁺イオンを始めとして複雑な制御機構を受けて Ca²⁺イオン濃度を变化させる脳機能などにとって重要な受容体である。この分子量は1252kDaにも及ぶとされる非常に大きくて複雑な膜タンパク質であるので、構造解析は困難であった。極低温電子顕微鏡を用いて氷包埋法で像を撮影すると共に、単粒子解析で立体構造を解析した結果、図8に示すような構造が明らかになった。

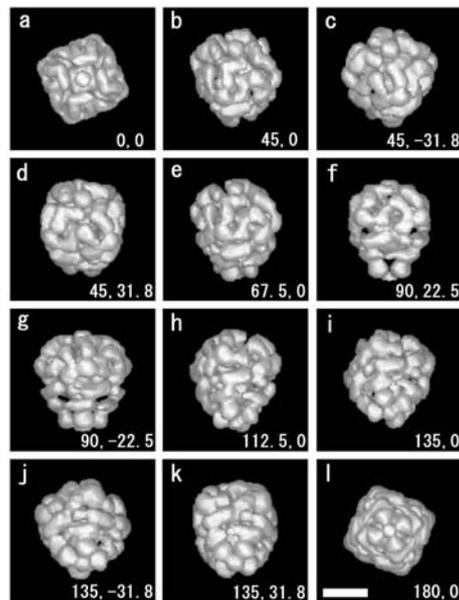


図8 IP₃ 受容体の立体構造をいろいろな方向から示した図。

この IP_3 受容体と相互作用するイオンチャネルで、温度をはじめ複雑なセンサーの役割が知られてきている TRPC3 チャンネルの構造を示すと図9のようになる。

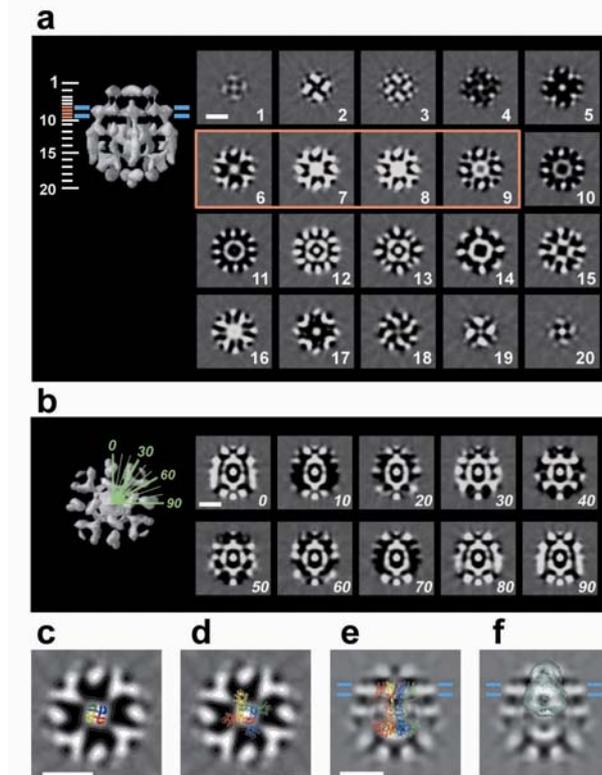


図9 TRPC3 の内部構造をスライスにして示す図。a に表示する1～20の位置でのそれぞれのスライスが右に示されている。bには縦のスライスが示され、c～fにはいくつかのイオンチャネルの構造との関係が示されている。

また、単粒子解析法によって、構造解析された IP_3 受容体と TRPC3 との相互作用を予測した図を図10に示す。

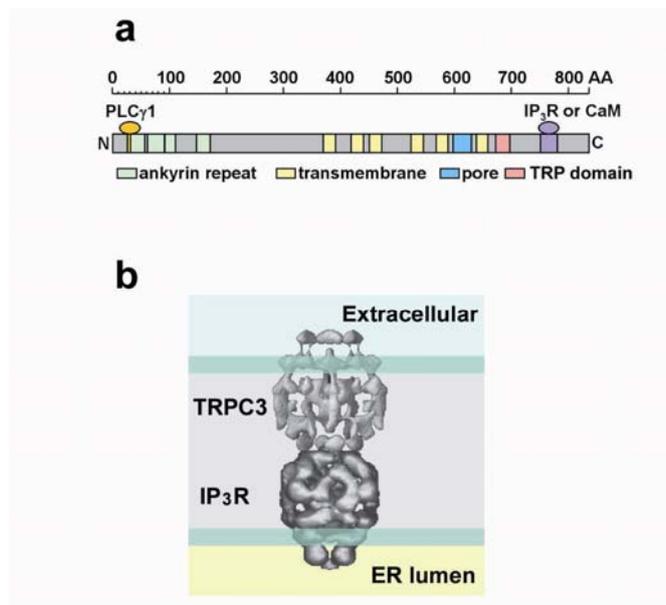


図10 TRPC3 の1次構造を a に示す。また、 IP_3 受容体と TRPC3 との相互作用を予測して示した図を b に示す。

・ Adhennel ファミリータンパク質の構造と機能

この様な、イオンチャンネルの機能を有しながら、接着性の機能を有するチャンネルを adhesive (接着性) 機能を有する channel という意味で、adhennel ファミリータンパク質と名づけた。

水チャンネルでありながら、レンズファイバー細胞を接着して水晶体(レンズ)を形成するアクアポリン-0 (AQP0) の構造を1.9 Å分解能で解析することで、図11に示すように、水チャンネル内外の水分子と膜を形成している脂質分子のすべての構造を解析することができた。

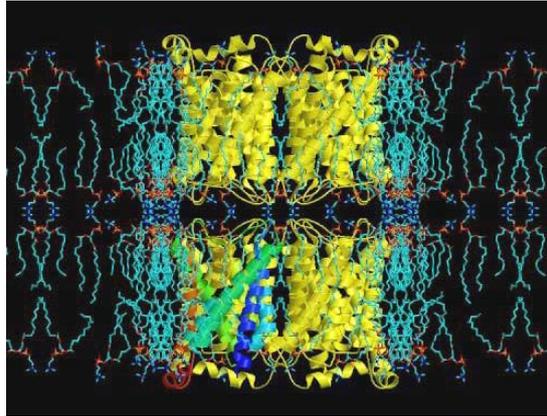


図 1 1 電子線結晶学で解析された AQP0 とその 2 次元結晶内の脂質分子の構造。2 枚の膜が接着した構造を示しており、上下それぞれに 4 量体の AQP0 分子が示されているが、それらの隣の分子は除かれている。

同じ水チャンネルであるが、脳に多くの発現が観察されているアクアポリン-4 (AQP4) の構造も電子線結晶学で解析された。その結果、AQP4 分子がオーソゴナルアレイと呼ばれる格子状構造体を取る分子間相互作用機構とともに、細胞を接着する新たな機能を解明することができた。構造解析から解明されたオーソゴナルアレイ構造を安定化する相互作用を図12に示す。

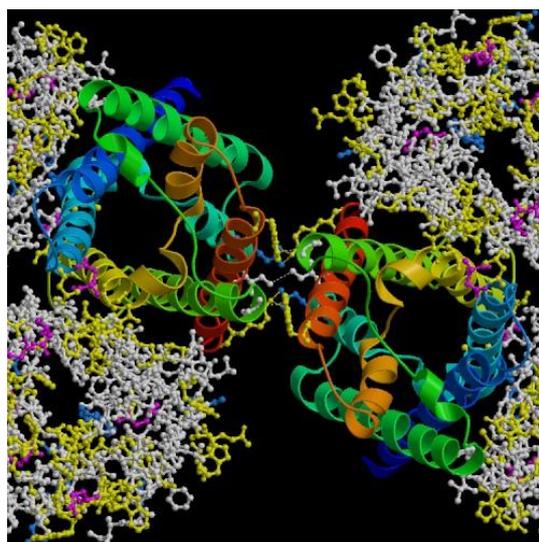


図 1 2 AQP4 のアレイ構造を安定化する分子間相互作用。細胞質側のアルギニンとチロシンの相互作用が AQP4 に特徴的な安定化機構。

電子線結晶学による構造解析によって発見された、水チャネル AQP4 の新しい機能、細胞接着機能の構造的基礎を図13に示す。

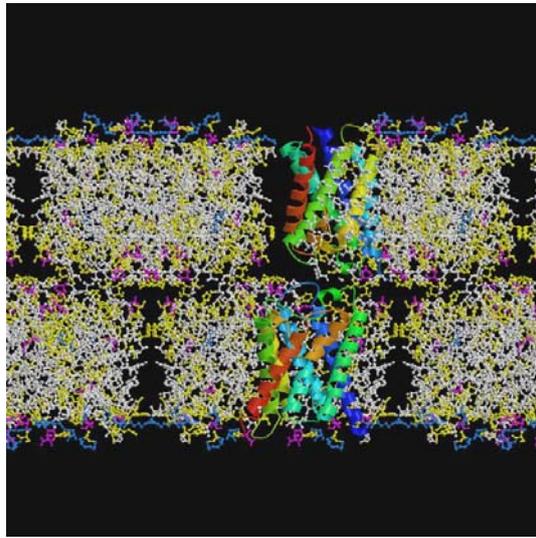


図 1 3 2層の膜が接着した AQP4 の構造。上下2層の中にあるそれぞれ1つのサブユニットだけをリボンモデルで示す。

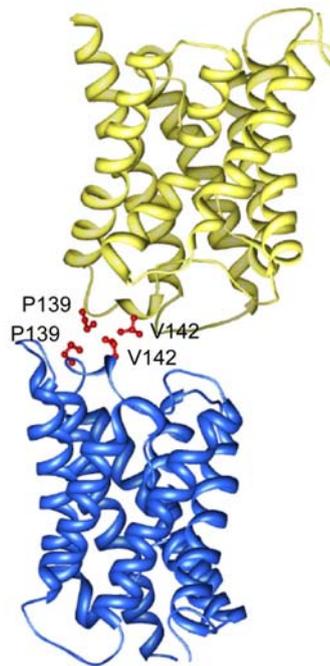


図 1 4 2層の膜にあって互いに接着する構造の詳細を示す。互いの 3_{10} ヘリックスに存在するプロリンとバリンによって接着構造が形成されている。上下2つの層の AQP4 分子を異なる色で示す。

2層の向かい合う膜を接着する構造は、図14に示すように AQP4 分子に存在する 3_{10} ヘリックスによって形成されているが、その接着は強くない。実際、2次元結晶を用いた構造解析を行うときに、図13の様なきちんとした接着構造を有していた結晶は、特に高い結晶性を有する結晶の中でも70%程度であった。さらに、この接着構造が2次元結晶化による人為的効果ではなく生理的意味のある構造であるかを確かめるために

行った、繊維芽細胞(L-cells)を用いた実験でも、接着力は弱いことが確認された。それゆえ、AQP4分子がオーソゴナルアレイ構造という結晶性のアレイ構造を形成しないときには、図15に示すように、どれか1つのサブユニット同士でしか、接着の相互作用が形成されない。

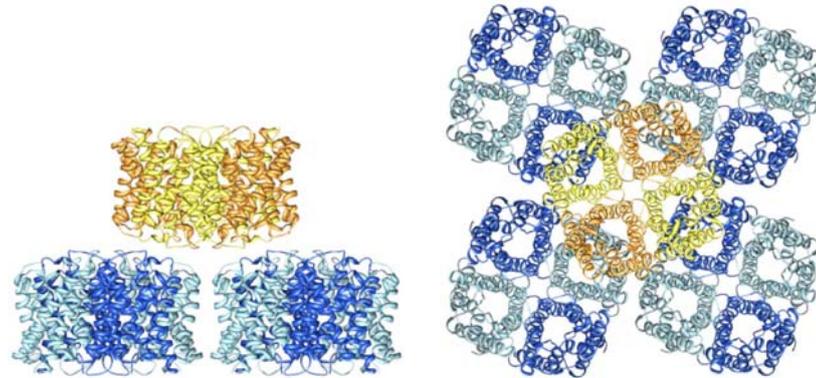


図15 上下2つの層のAQP4分子4量体を異なる色で示している。この図のように、青色で示す下の層が結晶性のアレイ構造を形成している時には、上下のAQP4分子は4つのサブユニットすべてで接着構造を形成するが、下の層が結晶性のアレイ構造を形成しないと、上下の分子の接着は、1つのサブユニットだけでしか接着構造を形成できない。

それゆえ、このAQP4分子がアレイ構造を形成する生理的意味は、2つの膜を接着する強さを、スプライズバリエーションによって制御することにあるのではないかと考えられる。この水チャネルAQP4は、図16に示すように脳での発現が確認されており、血流制御や、視床下部での浸透圧センサーなどの重要な生理的機能を担っていることが考えられる。

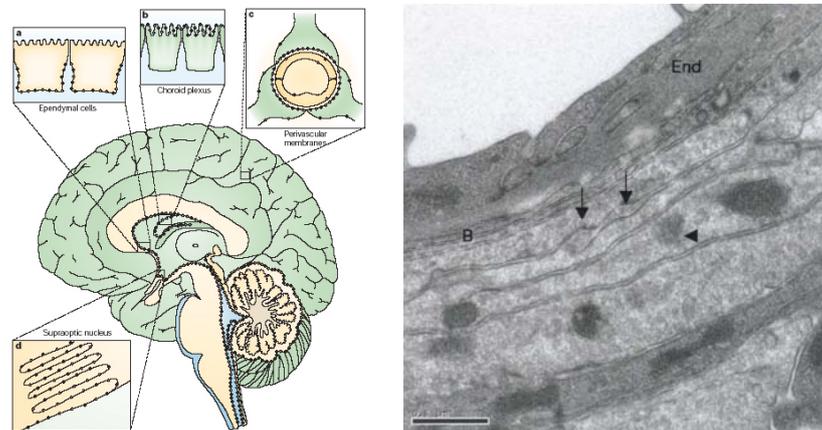


図16 脳におけるAQP4分子の発現分布 (M.A. Moghaddam, O.P. Ottersen, *Nature Rev. Neurosci.*, **4**, 991-1001(2003)から転載) とAQP4が多く発現されている視床下部のグリアラメラの超薄切片法による電子顕微鏡像。視床下部では、AQP4分子がグリア細胞が重なってラメラ構造を形成している。その膜が接着した部分(矢じり)の中に、接着が離れている部分(矢印)が観察されている。

図16に示すように、浸透圧や、温度、糖のセンシングを行っていると考えられている視床下部にグリア細胞が重なったグリアラメラが存在し、そこにAQP4が多く発現され

ている。弱い接着性を示す AQP4 分子がこれらのセンシング機構に関わっていることが考えられる。

また、詳細は不明であるが、水チャネル AQP4 が高次の脳機能と関わっていることが示唆されている。例えば、躁うつ病などで自殺した方の脳には AQP4 分子の発現が多いとか、神経伝達物質であるドーパミンにより AQP4 の水透過が減少するなど注目すべき結果が示唆されてきている。また、AQP4 が K^+ イオンのアプテークに強く関わるというモデルも議論されている。それゆえ、水チャネルでありながら、細胞を接着する機能も有する adhenel のファミリーに属する AQP4 の研究の重要性はますます大きくなってきている。

ギャップ結合を形成するチャネルも adhenel ファミリーと考えるが、ギャップ結合チャネルの構造を研究するために、ヒト由来のギャップ結合チャネル、コネキシン26 (Cx26) を昆虫細胞に発現し、2次元結晶を作製して、構造解析した。

解析の結果、作製された2次元結晶は、驚くべきことに図17に示すように3層の膜からなることが明らかになった。

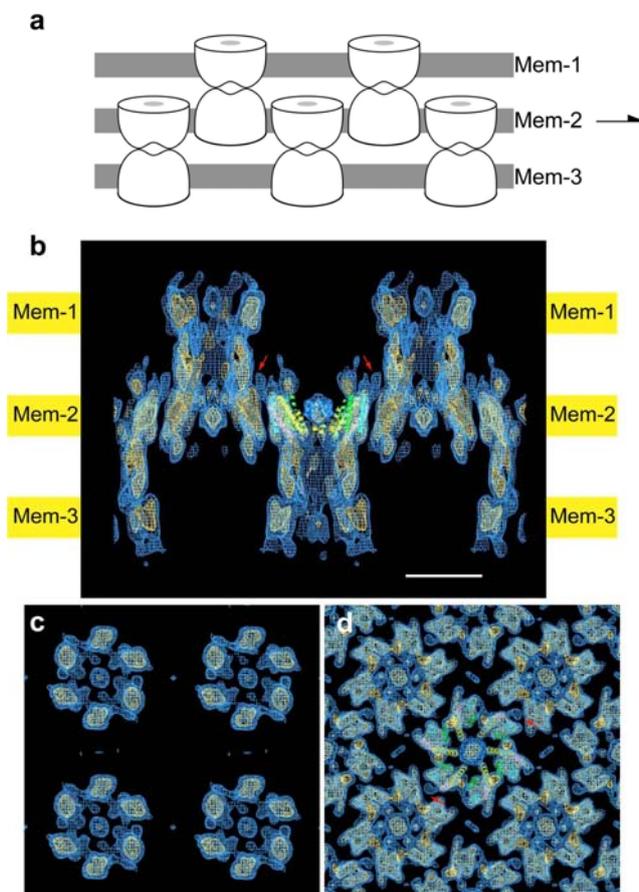


図 1 7 3 層の膜から形成された Cx26 の 2 次元結晶。第 1 と第 3 の膜 (Mem-1, Mem-3) は Cx26 分子が蜜にはパッキングしていないが、真ん中の膜 (Mem-2) には Cx26 のヘミチャネルが蜜にパッキングしている。

図17に示すように、3層からなる2次元結晶は、Cx26 分子の細胞質側の構造が大きいので、第1と第3の膜に分子が入ることができないために形成されていると思われる。すなわち、ギャップ結合を形成する Cx26 分子の細胞質側の相互作用距離より、Cx26 分子の細胞質側の構造が高いために両側の膜に分子が蜜に入ることができないことによって、このような珍しい3層膜からなる2次元結晶が形成されている。外側の分子は、

細胞質側が電子顕微鏡用支持膜や水表面などで歪む可能性が高く、実際構造解析の時に極低温電子顕微鏡用試料作成法では、結晶性を劣化させないような工夫が必要であった。それでも図17bに観られるように、第1と第3の膜に存在するCx26分子の構造は歪んだ結果を示している。しかし、幸いなことに、真ん中の第2の層のCx26分子の構造は、2つの外の膜に守られているので、歪みの少ない構造であることが期待される。

このような、ギャップ結合チャネルの構造解析の結果、このチャネルの内部にこれまで考えられてこなかったプラグ(栓)様構造が図18のように観察された。

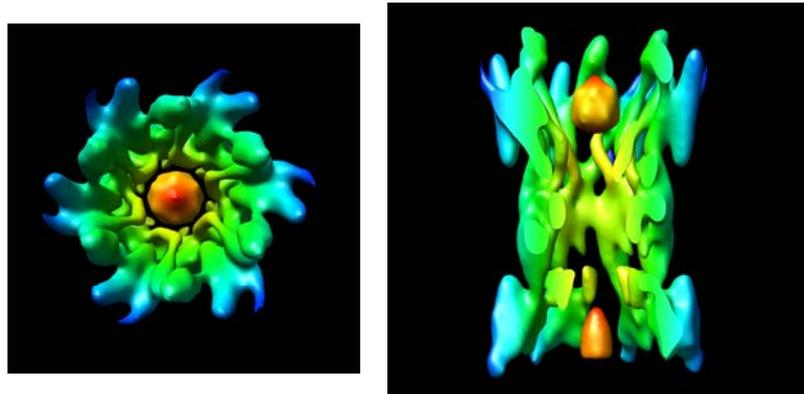


図18 ギャップ結合チャネル(Cx26)の構造。チャネルの中の膜貫通部分に相当する位置にプラグ(栓)様構造が観察された。

ギャップ結合チャネルのゲーティング機構を説明するこれまでのモデルは、図19の様にサブユニットが回転して、チャネルの径を変化させるとするものであった。

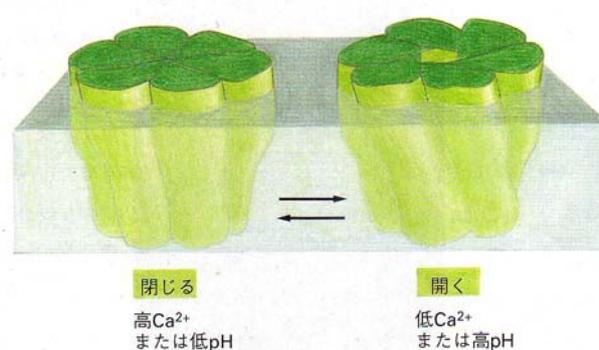


図19 教科書に記述されてきたギャップ結合チャネルのゲーティングモデル。サブユニットが回転することによって、チャネルを開閉するとするモデル。

しかし、ギャップ結合チャネルは、免疫機構において、分解したウイルスのペプチドを隣の細胞にまで送って抗原として提示するので、1.8kDにまで及ぶペプチドをも透過する大きな“穴”を有すると考えられるし、電気シナプスのようにミリ秒より速い応答速度でイオン透過の開閉を行っている。これらをきちんと説明するには、今回の構造解析で解明されたように、コネクシンのN末端が形成するヘリックスが6本集まって、プラグを形成し、その部分がチャネルの膜貫通部分にまで入り込んでいる。それゆえ、図20の2の位置に示すように、狭い部分は6Å程度と水和したイオンの径8Åより小さくなっているため、イオンを通さない閉じた構造を形成できる。

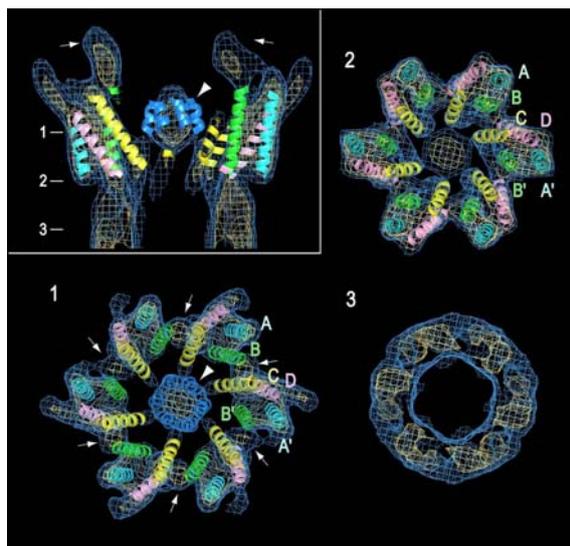


図 2 0 膜面に垂直方向の断面の構造とそこに示す 1～3 の位置の膜面に平行な断面図。

この構造解析から、図21に示すように、プラグゲーティングモデルを提案した。

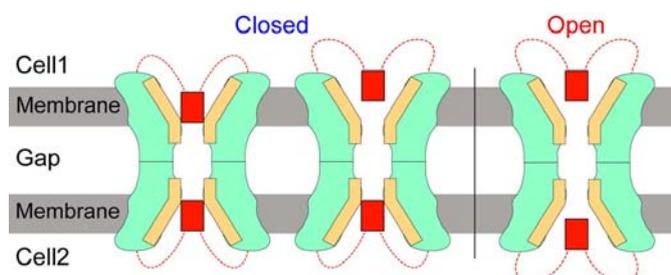


図 2 1 プラグゲーティングモデルを示す模式図。

このプラグゲーティングモデルでは、大きな分子の透過も可能で、しかも速いゲーティングを説明できるのみならず、電圧感受性のゲーティング機構も説明できる。図21に示すように、ギャップ結合チャンネルの1方のヘミチャンネルが開いた状態でも他方のヘミチャンネルが閉じる独立なゲーティングも可能である。また、ループ部分が、2-3のループと相互作用することにより、pHやCa²⁺イオンなどによるゲーティングも説明できる。この結果は教科書を書き換えることになると期待される成果である。

4) 膜蛋白質を含む神経細胞関連蛋白質の構造解析が進んでいるので、細胞内での構造や形態に、これらの構造をフィッティングした。電子線トモグラフィーで解析された立体構造に原子分解能の構造をフィッティングして、細胞の詳細なモデルを作製するには、グラフィックスシステムを活用して各種プログラムを作製する必要があった。また、チャンネルや足場蛋白質にGFPなどを付加してした系を作製して、ボルスコーブ観察技術と合わせる事によって、神経細胞などの動的な分子機構をそれぞれの分子レベルで観察できるようにした。

単粒子解析法によって、図8に示したようにIP₃受容体の構造解析を行ったが、これまでにX線結晶構造解析によってIP₃結合ドメインの構造が解析されていた。この単粒子解析を行ったIP₃受容体はCa₂₊イオンもIP₃も結合していない構造であり、そのままIP₃が結合したIP₃結合ドメインの構造を当てはめることはできなかった。生理的な機能を

含んでこれまでに得られて知識を総合的に考慮して、コンフォメーション変化を与えることによって単粒子解析の構造へのはめ込みを行った。それを図22に示す。

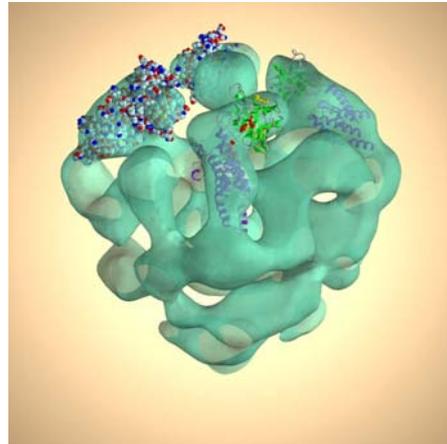


図 2 2 IP₃ 受容体の立体構造に、X 線結晶学によって構造解析された IP₃ 結合ドメインの構造をはめ込んだ図。

このように、極低温電子顕微鏡を用いて単粒子解析やトモグラフィー法で解析された比較的低い分解能の立体構造に、電子線結晶学や X 線結晶学で構造解析された高い分解能の構造をはめ込むことによって、より複雑な立体構造を擬似的ではあるが、原始モデルを用いて議論できる可能性が出てきた。

・ 電子線トモグラフィーによる神経細胞接合の観察

シナプス結合などの神経細胞における接合を、今回開発した第6世代の極低温電子顕微鏡を用いて、電子線トモグラフィー法により観察するために、興奮性のポストシナプスに存在するタンパク質をプロテオミクスを用いて同定した方法と類似の手法でシナプトソームを作製した。この試料を急速凍結法により氷包埋して、いろいろな傾斜角度で極低温電子顕微鏡像を撮影した。これらの像の電子線トモグラフィー法によるコンピュータ解析を行うことによって、神経細胞接合のトモグラフィー像を解析した。その1例を図23に示す。神経細胞の脂質2重膜が分離して観察されるのみならず、神経伝達物質を包んでいるシナプティックベシクルも2重膜が分離して観察される(図23右図)。この接合部は、2つの神経細胞を蜜に接着したギャップ結合と考えられ、比較的周期的な膜タンパク質分子の配列が観察される(図23左図)。

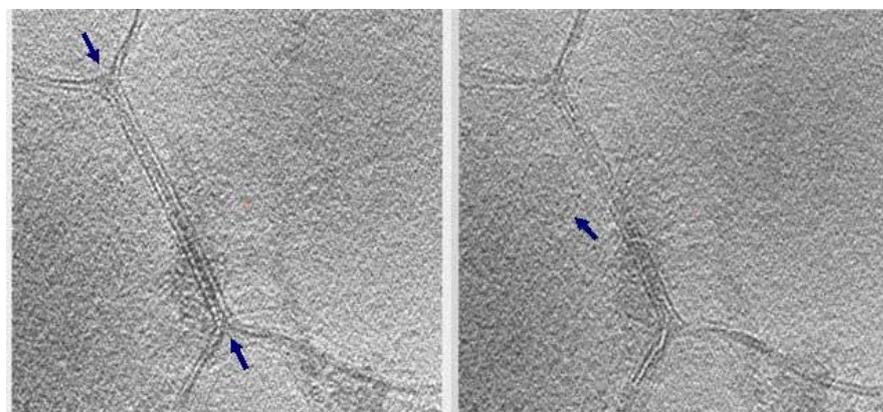


図 2 3 神経細胞接合部のトモグラフィーの立体像を異なる高さでスライスした像。

・ 動的機能構造観察

さらに、動的な機能を解析するために、1)の課題で開発を進めたポルスコープ(サブテーマ2に記述)や非常に安定な光学顕微鏡である Shinyascope などを用いて研究を進めた。

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、3)に記述したように、シナプス後肥厚の足場蛋白質の研究を行うと共に、錐体細胞の光学顕微鏡観察を行っている。サブテーマ2に報告するように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開発した。この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、ShinyaScope に、Rudolf Oldenbourg 博士が開発した LC-PolScope を搭載したシステム (PolShinyaScope) を開発し設置した(図24)。

これを用いて、神経細胞の成長円錐も図25の様に、蛍光染色などの処理をすることなく、アクチンフィラメントやベシクルを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。

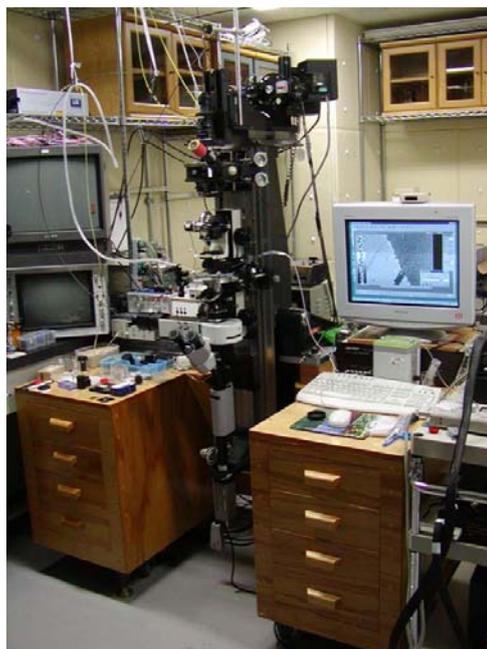


図24 ShinyaScope と LC-PolScope を一体にした PolShinyaScope。

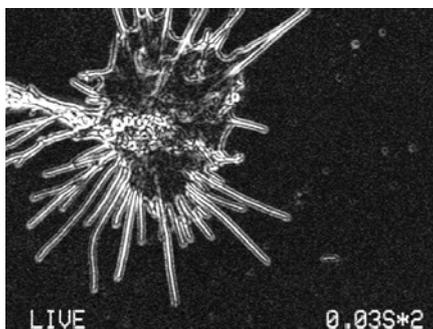


図25 PolShinyaScope で観察された成長円錐。アクチンバンドルや脂質膜、ベシクル等が高いコントラストで観察される

解析例：成長円錐における cAMP シグナル受容部位の特定

神経細胞に成長円錐のフィロポディアが cAMP 濃度依存的にその伸長を行う機構を解明するために、1 μm 程度の領域に UV 光を照射して、ケイジド化合物(図26に化学構造を示す)を活性化するシステムを開発設置した。PolShinyaScope とこのシステムを利用して、局所的な cAMP 濃度を変えたときのフィロポディアの変化を動的に観察できるようにした。これを用いて、フィロポディアの先端の cAMP 濃度を上昇さ

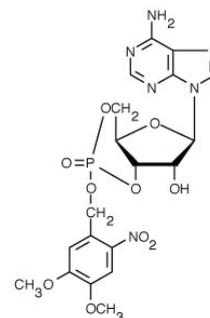


図26 ケイジド cAMP の化学構造。これに UV 光を当てると分解して cAMP が生成する。

せるとそれが伸張することを確認した (図 2 7)。なお、成長円錐の伸長が見られるのは、フィロポディアの先端の濃度を増加させたときであり、その他のどの部分の濃度を上昇させても、大きな変化は見られない。

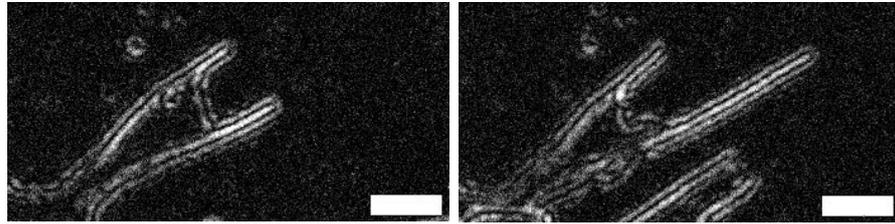


図 2 7 左に示す成長円錐の下側のフィロポディアの先端部分の cAMP 濃度を上昇させると、上下両方のフィロポディアは伸び縮みを繰り返すが、最終的には右図のように先端部分の cAMP 濃度が上げられたフィロポディアが伸びることが確認された。

解析例：LC-PolScope を用いた Calyculin A による神経突起縮退現象の解析
 神経細胞から伸びる神経突起は各種ガイダンス分子により誘引・反発されることで正確な経路を選択する。この際に起こる神経突起の挙動は、伸長・縮退という 2 つの素過程のバランスによって制御されている。calyculin A は海綿の一種 *Discodermia calyx* から分離・精製された、プロテインホスファターゼ PP1, PP2A の強力な阻害剤であり、神経細胞から伸長している神経突起を縮退させることが報告されている (Reber and Bouron, 1995)。そこで、この縮退現象とガイダンス因子による縮退現象との関連について調べ、軸索縮退の素過程解明を目指すため、calyculin A が海馬初代培養神経細胞に与える効果を研究した。

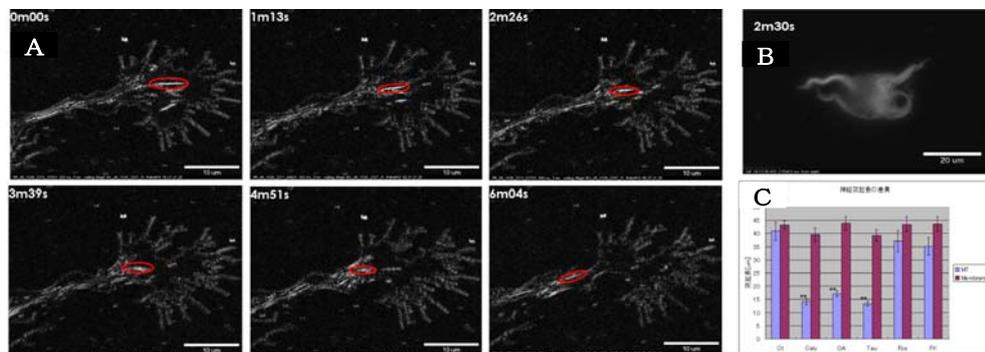


図 2 8

先行研究では、calyculin A による神経突起の縮退の主要原因は PP2A の阻害による微小管関連タンパク質 tau のリン酸化とそれに伴う微小管の脱重合であるとされてきた (Merrick et al., 1997)。しかし、LC-PolScope を用いたライブイメージングでは、細胞骨格分子が重合状態を保ち、細胞中心方向に強い力がはたらいっていることが示唆され (図 2 8 A)、以下の calyculin A の効果に関する実験結果もそれを支持した。

- ① 細胞膜を染色する DiO を用いた解析により、細胞膜が縮退せずその場に存在していることが確認された。
- ② 免疫染色により、微小管だけでなく F アクチンも神経突起から細胞体へと縮退していることが確認された。→微小管の脱重合だけでは説明できない。
- ③ Tubulin tracker を用いた蛍光ライブイメージングにより、縮退過程での微小管の屈曲が観察された (図 2 8 B)。→微小管を折り曲げるほどの強力な力の

存在を示唆+縮退過程でも微小管重合状態は維持。

さらに、阻害剤等を用いてモータータンパク質の縮退現象への関与を調べた結果、以下のことが分かった。

① calyculin A による縮退はキネシンファミリーEg5 の阻害剤(monastrol)では阻害されない一方、

ミオシン II の阻害剤(blibbistatin)で阻害された→アクトミオシン活性化の関与。

② calyculin A と同様の縮退効果はオカダ酸、tautomycin (PP1 阻害剤) には見られたが、fostriecin, cantharidin (PP2A 阻害剤)、FK-506, cyclosporine A (PP2B 阻害剤)では見られなかった(図 2 8 C)。→PP1 に分類されるミオシンホスファターゼ阻害の関与。

③ リン酸化抗体を用いた免疫染色では calyculin A 投与後リン酸化が亢進していた。→ミオシン軽鎖リン酸化によるアクトミオシン活性化の関与。

これらの実験結果は calyculin A による神経突起縮退において、ミオシンホスファターゼ阻害によるミオシン軽鎖リン酸化の亢進とアクトミオシン活性化が関与するという新しいメカニズムを提起するものである(図 2 9)。

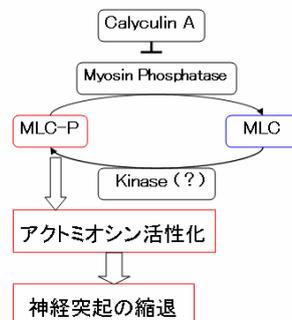


図 2 9

LC-PolScope を使用したライブイメージング解析により、縮退時に細胞膜が残存している様子や細胞骨格全般が細胞中心へと引っ張られる様子が明瞭に映像化され(図 2 8 A)、その後のメカニズム解明につながっている。※赤丸で囲んだ部分はあるアクチン束の先端を示しており、軸索中を細胞中心方向へ移動している。

(2)研究成果の今後期待される効果

独自に開発してきた極低温電子顕微鏡を基にして、膜タンパク質などの高分解能構造解析を電子線結晶学を用いて進めたり、単粒子解析で複雑な受容体などの構造を解析した。例えば、図 3 0 に示すようなアセチルコリン受容体の構造解析によって、重篤な病気である筋無力症や、麻酔薬、アルコールなどの作用機構やある種の癲癇の分子的な理解が進むことが期待される。

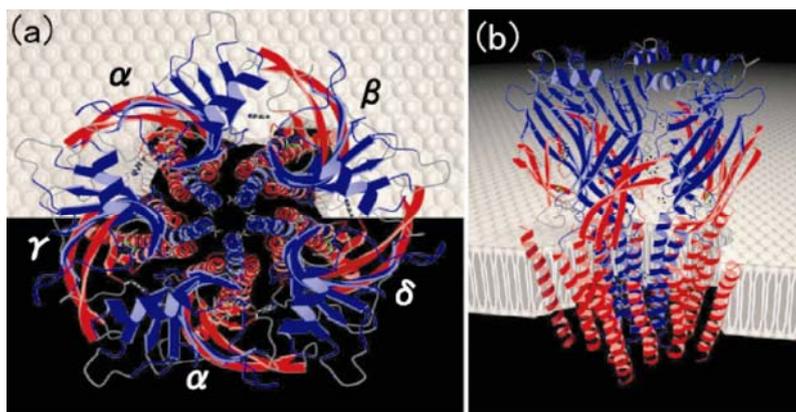


図30 アセチルコリン受容体の構造。シナプス側から見た構造 (a) と膜面に水平方向や上部から見た構造 (b)。脂質膜をこの受容体の半分まで描いている。

おなじように、水チャネル AQP4 の構造解析により、この水チャネルと高次の脳機能との関連が解明される可能性がある。また、このチャネルは脳浮腫と関係しており、このチャネルの水透過性を防ぐ薬剤を開発できれば、脳浮腫を最少に抑えるなど重要な医学的寄与を行える可能性もある。

ギャップ結合チャネルは発生や、心臓、免疫などをはじめ多くの生理的・生物学的機能を関連があるので、この構造を解析し、そのゲーティング機構を解明した結果は、今後の生物学医学の発展に貢献し、ひいては社会的にも大きな貢献が期待される。

また、極低温電子顕微鏡をさらに発展させて、傾斜機構付き極低温電子顕微鏡を開発できたので、電子線トモグラフィーを始め新しい電子顕微鏡観察に道を開くことになると期待する。特に、凍結切片法が開発されれば、脳をはじめとする複雑な構造を立体的に解明することができるようになると期待される。

このように、高次細胞機能構造体を分子レベルの分解能で立体的に観察する技術を開発した。分子構造と細胞形態をつなぐ事ができる詳細な立体構造観察と動態観察は、これまで残された困難な研究課題であった。極低温高分解能電子顕微鏡に加えて次に示すポルスコープを用いて新しい細胞観察の方法が開発されたので、新しい電子顕微鏡と光学顕微鏡システムを販売されるようになるだけでなく、神経細胞の可塑性などを、形態学的、構造学的視点から解明する新しい手法が開発されることになるであろう。

各国に導入されつつある極低温電子顕微鏡システムをさらに前進させることになったので、さらに多くの研究者に興味を持たれるシステムを開発できると期待する。

今回進めた研究は、分子構造や細胞の詳細な形態変化から、脳などの生理的な機能を理解しようとするもので、今後さらに研究を進めることによって社会への貢献も期待できる課題であり、目指した成果を得たと信じている。

3.2 サブテーマ2:ポルスコープの開発と応用研究(京都大学 藤吉好則グループ:Marine Biological Laboratory)

(1)研究実施内容及び成果

立体的なポルスコープを開発すると共に、時間変化にともなう3次元ポルスコープ像の変化(4次元顕微鏡像)を記録できる光学顕微鏡システムを開発と、これを用いた細胞の動的な観察を行った。

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、サブテーマ1で記述したように、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開発する研究を行った。

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仮定する。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31に絞りを走査する機構をもつ偏光顕微鏡を示す。

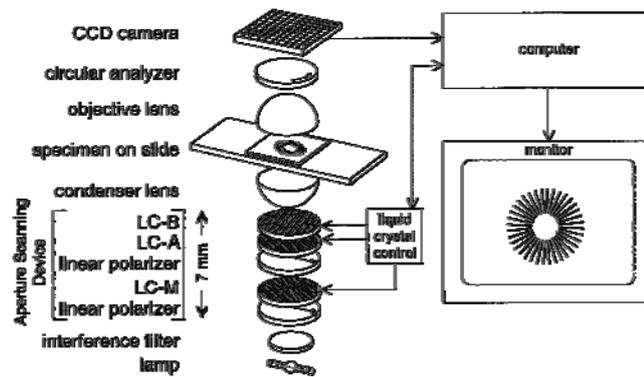


図31 走査絞りポルスコープ (Scanned Aperture Pol-Scope) の模式図。

LC-PolScope は図32に示すように典型的には5つの像を記録する。これらを統合して計算するのは、1秒以内に行うことができる。

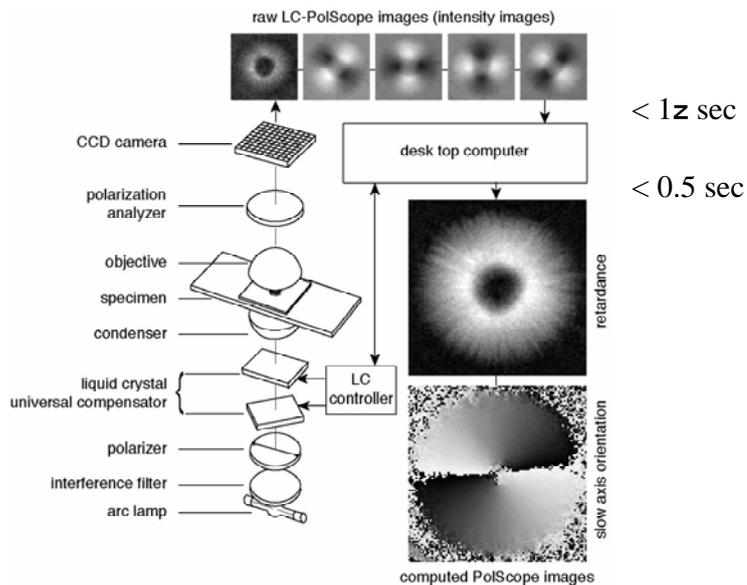


図32 LC-PolScope で得られる複屈折像。

LC-PolScope は非常に高いコントラストで試料を観察できる。例えば、1本の微小管でも LC-PolScope で観察できるので、それを図 3 3 に示す。

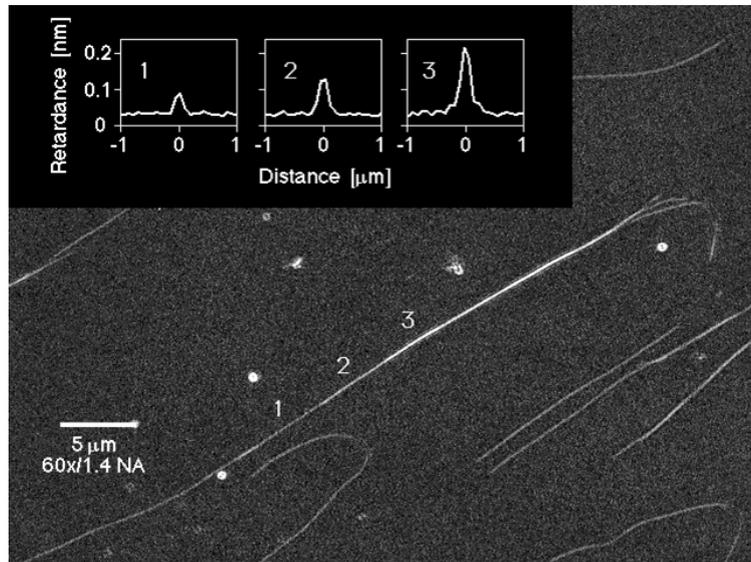


図 3 3 LC-PolScope の性能を示す図。1本の微小管も観察でき、2本、3本と区別できる。

細胞の中で微小管がどのように観察されるかを図 3 4 に示す。

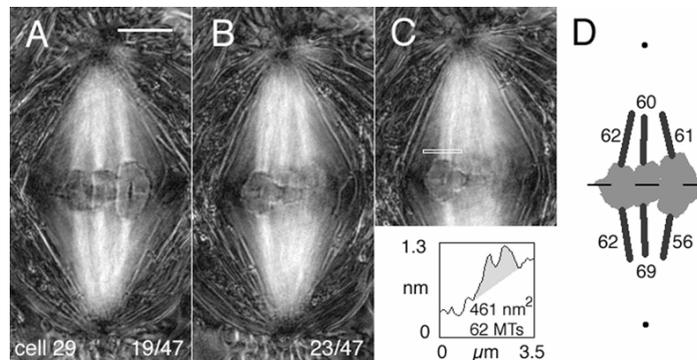


図 3 4 ガガンボの精母細胞の細胞分裂。動原体の繊維に存在する微小管の数を測定した。

さて、4次元ポルスコープを開発するために、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つの照明セットで使用している。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。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せられて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。1つの例を図 3 5 に示す。

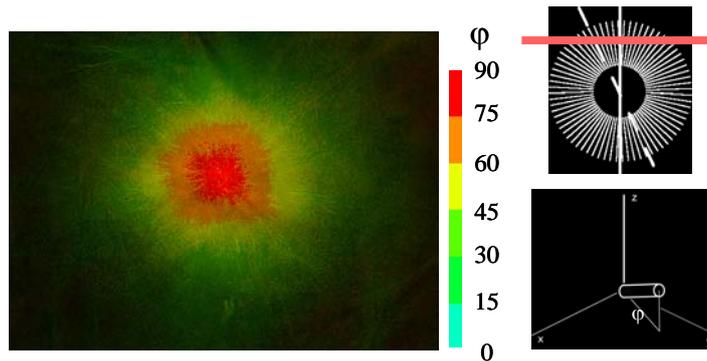


図 3 5 PolScope で観察された星状体の 3 次元データ。

図 3 5 と基本的に同じであるが、立体的な像を得ることをより明確に示すために、図 3 6 を用いて解説する。

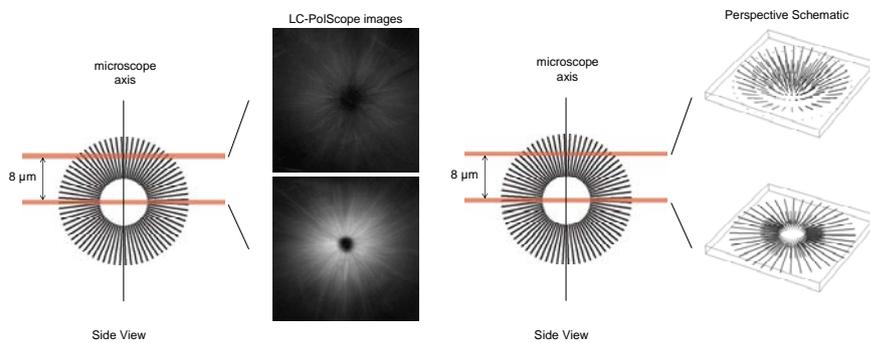


図 3 6 立体的なポルスコープを実現するための 2 つの焦点位置での像の形成機構。

実験的検証については、星状体を用いたが、これ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微小管からなる。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 3 7 は、星状体の微小管の測定結果で、A は B の平面像の焦点位置と傾斜角の定義を示す模式図、C は 20 度ごとの傾斜角によるリターダンスを示す。D は焦点面における偏光軸の表示。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。

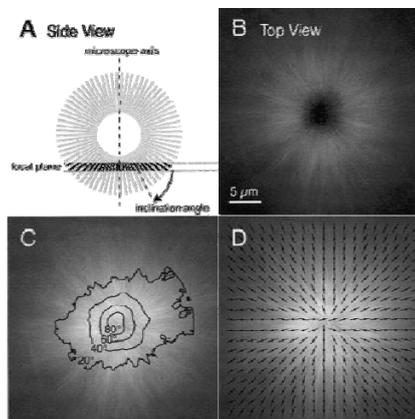


図 3 7 走査絞りポルスコープ (Scanned Aperture Pol-Scope) による星状体の観察

なお、PolScope は速い動的な観察には適していないが、このような速い動的な観察を実現するために、Real-Time PolScope の開発も進展している。また、マイクロレンズを導入することによって、図 3 8 に示すように、複屈折軸を正確に決めることができるようなシステムを開発した。

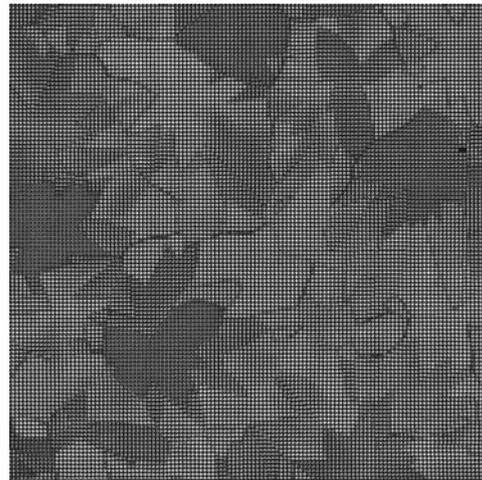


図 3 8 ミクロレンズを導入することによって、複屈折軸を正確に決定するシステムを開発した。方解石を用いた像の例。

(2)研究成果の今後期待される効果

アクチンフィラメントなどは、蛍光ラベルによって、その機能が変化するおそれがある。しかし、4次元ポルスコープを用いるとラベルなしで、アクチンフィラメントや、微小管を高いコントラストで直接動的に観察することが可能となった。これまで観察が不可能である動的構造変化を直接観察できるので、神経細胞の研究や細胞分裂などをはじめとする生物学研究に対する大きな貢献が期待される。

4 研究参加者

①藤吉好則グループ(電子線トモグラフィー用極低温電子顕微鏡の開発とデータ収集およびポルスコープの開発と応用研究)

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|-------|--------------|-----|----------------------|------------------------------|
| 藤吉 好則 | 京都大学大学院理学研究科 | 教授 | 極低温電子顕微鏡の開発をプロジェクト統括 | 平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月 |
| 光岡 薫 | 産業技術総合研究所 | 研究員 | コンピュータシステム開発 | 平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月 |
| 土井 知子 | 京都大学大学院理学研究科 | 准教授 | 神経細胞の研究 | 平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月 |

| | | | | |
|-------------------|------------------------------|-----------|----------------|--------------------------|
| Rudolf Oldenbourg | Marine Biological Laboratory | 研究員 | ポルスコープの開発 | 平成 14 年 11 月～平成 20 年 3 月 |
| 田中 三恵 | 京都大学大学院理学研究科 | CREST 技術員 | コンピュータによる画像解析 | 平成 14 年 11 月～平成 19 年 3 月 |
| 廣明 洋子 | 京都大学大学院理学研究科 | CREST 研究員 | 電子顕微鏡を用いた研究 | 平成 15 年 4 月～平成 20 年 3 月 |
| 加川 友己 | Marine Biological Laboratory | 研究員 | ポルスコープを用いた研究 | 平成 15 年 10 月～平成 17 年 3 月 |
| 野中 美応 | 京都大学大学院理学研究科 | 院生 | 神経接合制御の研究 | 平成 16 年 4 月～平成 16 年 9 月 |
| 亀川 亜希子 | 京都大学大学院理学研究科 | CREST 研究員 | 電子顕微鏡を用いた研究 | 平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月 |
| Barry Mather | Marine Biological Laboratory | 研究員 | ポルスコープを用いた研究 | 平成 17 年 4 月～平成 17 年 7 月 |
| Alex Valm | Marine Biological Laboratory | 研究員 | ポルスコープを用いた研究 | 平成 17 年 11 月～平成 20 年 3 月 |
| 大嶋 篤典 | 京都大学大学院理学研究科 | CREST 研究員 | ギャップジャンクションの研究 | 平成 18 年 9 月～平成 19 年 3 月 |

5 招聘した研究者等

| 氏名(所属、役職) | 招聘の目的 | 滞在先 | 滞在期間 |
|-----------|-------|-----|------|
| | | | |

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 19 件)

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).

- N. Gyobu, K. Tani, Y. Hiroaki, A. Kamegawa, K. Mitsuoka, and Y. Fujiyoshi
Improved Specimen Preparation for Cryo-Electron Microscopy using a Symmetric Carbon Sandwich Technique.
J. Structural Biol., **146**, 325–333(2004).
- J. R. LaFountain Jr and R. Oldenbourg
Maloriented bivalents have metaphase positions at the spindle equator with more kinetochore microtubules to one pole than to the other.
Mol. Biol. Cell, **15**, 5346–5355 (2004).
- Y. Murata, T. Doi, H. Taniguchi, and Y. Fujiyoshi
Proteomic analysis revealed a novel synaptic proline-rich membrane protein (PRR7) associated with PSD-95 and NMDA receptor.
Biochem. Biophys. Research Communications, **327**, 183–191 (2005)
- T. Kodama, H. Imai, T. Doi, O. Chisaka, Y. Shichida and Y. Fujiyoshi
Expression and localization of an exogenous G protein-coupled receptor fused with the rhodopsin C-terminal sequence in the retinal rod cells of knockin mice.
Experim. Eye Res., **80**, 859–869 (2005).
- E. K. Iwasaki, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, K. Sekiguchi and T. Yamada
Electron tomography reveals diverse conformations of integrin α IIb β 3 in the active state.
J. Structural Biol., **150**, 259–267 (2005).
- T. Gonen, Y. Cheng, P. Sliz, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, S. C. Harrison and T. Walz
Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals.
Nature, **438**, 633–638 (2005).
- M. Nonaka, T. Doi, Y. Fujiyoshi, S. Takemoto-Kimura and H. Bito
Essential Contribution of the Ligand-Binding β B/ β C Loop of PDZ1 and PDZ2 in the Regulation of Postsynaptic Clustering, Scaffolding, and Localization of Postsynaptic Density-95.
J. Neurosci., **26**, 763–774 (2006).
- E. Barry, Z. Hensel, Z. Dogic, M. Shribak, and R. Oldenbourg
Entropy-driven formation of a chiral liquid-crystalline phase of helical filaments.
Phys. Rev. Lett., **96**, No. 018305 (2006)
- C. Gerle, K. Tani, K. Yokoyama, M. Tamakoshi, M. Yoshida, Y. Fujiyoshi and K. Mitsuoka
Two-dimensional crystallization and analysis of projection images of intact *Thermus thermophilus* V-ATPase.
J. Structural Biol., **153**, 200–206 (2006).
- Y. Hiroaki, K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, K. Nishikawa, H. Suzuki, T. Walz, S. Sasaki, K. Mitsuoka, K. Kimura, A. Mizoguchi and Y. Fujiyoshi
Implications of the Aquaporin-4 Structure on Array Formation and Cell Adhesion.
J. Mol. Biol., **355**, 628–639 (2006).
- P. J. Holm, P. Bhakat, C. Jegerschold, N. Gyobu, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, R. Morgenstern and H. Hebert
Structural Basis for Detoxification and Oxidative Stress Protection in Membranes.
J. Mol. Biol., **360**, 934–945 (2006).

T. Hige, Y. Fujiyoshi and T. Takahashi
Neurosteroid pregnenolone sulfate enhances glutamatergic synaptic transmission by facilitating presynaptic calcium currents at the calyx of Held of immature rats.
Eur. J. Neurosci., **24**, 1955–1966 (2006).

K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka and Y. Fujiyoshi
Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity.
Biochim. Biophys. Acta., **1768**, 688–693 (2007).

K. Mio, T. Ogura, S. Kiyonaka, Y. Hiroaki, Y. Tanimura, Y. Fujiyoshi, Y. Mori and C. Sato
The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas.
J. Mol. Biol., **367**, 373–383 (2007).

M. A. Janicke, L. Lasko, R. Oldenbourg and J. R. LaFountain, Jr
Chromosome malorientations after meiosis II arrest cause nondisjunction.
Mol. Biol. Cell, **18**, 1645–56 (2007).

A. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and G. E. Sosinsky
Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule.
PNAS, **104**, 10034–10039 (2007).

T. Hirai, K. Mitsuoka, A. Kidera and Y. Fujiyoshi
Simulation of charge effects on density maps obtained by high-resolution electron crystallography.
J. Electron Microsc., **56**, 131–140 (2007).

H. Suzuki, K. Nishikawa, Y. Hiroaki and Y. Fujiyoshi
Formation of aquaporin-4 arrays is inhibited by palmitoylation of N-terminal cysteine residues.
Biochem. Biophys. Acta., (2008) in press.

T. Nishizawa, K. Abe, K. Tani and Y. Fujiyoshi
Structural analysis of 2D crystals of gastric H⁺,K⁺-ATPase in different states of the transport cycle.
J. Structural. Biol., (2008) in press.

A. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi and G. E. Sosinsky
Projection Structure of a N-terminal Deletion Mutant of Connexin 26 Channel with Decreased Central Pore Density.
Cell Communication & Adhesion, (2008) in press.

(2)その他の著作物（総説、書籍など）

藤吉好則「素人を惹きつけるDNA」
蛋白質 核酸 酵素（共立出版）Vol.48 No.6 pp676–677 (2003).

宮澤敦夫、藤吉好則「ニコチン性アセチルコリン受容体の構造と機能」
蛋白質 核酸 酵素（共立出版）Vol.49 No.1 pp1–10 (2004).

光岡薫、藤吉好則「膜タンパク質のナノバイオロジー チャネルの分子構造を機能」
ナノバイオロジー ナノテクノロジーによる生命科学（共立出版）第4章 pp37–47 (2004)

光岡薫、藤吉好則「極低温電子顕微鏡による蛋白質の立体構造解析」
蛋白質 核酸 酵素（共立出版）Vol.49 No.11 pp1794–1799 (2004).

藤吉好則 「チャンネルの構造と機能」 麻酔, 55 増刊号, (2006).

藤吉好則 「構造生理学の登場とその展望」 慶應医学, 83 (3), (2006).

藤吉好則 「基礎情報として医学分野に役立つ構造生理学を目指して」 慶應医学, 83 (4), (2006).

刑部伸彦、光岡薫 「電子線結晶構造解析によるミクロソームグルタチオン転移酵素の立体構造」 蛋白質 核酸 酵素 (共立出版) Vol.52 No.1 pp144-49 (2006).

刑部伸彦、光岡薫 「電子顕微鏡によるアクアポーリンの高分解能構造解析」 顕微鏡, 41, pp 64-67 (2006).

R. Oldenbourg 「Analysis of Microtubule Dynamics by Polarized Light」 Microtubule Protocols: Methods in Molecular Medicine」 183pages (Humana Press) (2007)

A. Engel, Y. Fujiyoshi, T. Gonen and T. Walz 「Junction-forming aquaporins」 *Current Opinion in Structural Biology*, **18**, (2008) in press

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 39 件、国際会議 48 件)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of channels analysed by cryo-electron microscopy」 Inauguration Symposium・Lund (2003.4.10)

土井知子 (日本電子(京大)) 「PSD-95 のクラスターリング機構の解析」 生理学研究所研究会・岡崎 (2003.5.29)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Two-dimensional crystallization and structural analysis of aquaporins」 International Symposium on Diffraction Structure Biology ・ Tsukuba (2003.5.31)

Y. Hiroaki (CREST (Kyoto Univ.)), K.Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, K. Mitsuoka and Y. Fujiyoshi 「Two-dimensional crystallization and structural analysis of aquaporins」 International Symposium on Diffraction Structure Biology 2003 ・ Tsukuba (2003.5.31)

藤吉好則 (京大) 「生命科学の研究における電子顕微鏡の特徴と限界」 理研シンポジウム「次世代の生命科学を拓くオングストローム X 線レーザー」・和光 (2003.6.30-7.1)

藤吉好則 (京大) 「Observation of functional details on membrane proteins through an electron beam」 科学研究費特定領域研究(B)「膜輸送ナノマシーンの作動・制御・疾患」・東京 (2003.7.25)

藤吉好則 (京大) 「チャンネルの構造と機能」 健康効果指標プロジェクト・京都 (2003.9.20)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of channels observed through an electron beam」 Seminar at Helsinki University of Technology・Helsinki (2003.10.1)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structural study of membrane proteins by cryo-electron microscopy」 Symposium 60 Years of Andreas Engel・Basel (2003.10.3)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and Function of Water and Ion Channels in Our Body」

First Symposium of Fukui Institute for Fundamental Chemistry•Kyoto (2003.11.19)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Postsynaptic function observed through light and electron beam」 第19回国際生物学賞記念シンポジウム•奈良 (2003.12.3-4)

廣明洋子 (京大)、谷一寿、亀川亜希子、刑部伸彦、土井知子、桑原道雄、佐々木成、光岡薫、藤吉好則 「外来遺伝子発現系を活用して解析した水チャネルのAQP4の原子モデル」 日本顕微鏡学会第48回シンポジウム•東京 (2003.12.6-7)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Cryo-electron microscopy for studying molecular functions of membrane proteins」 The Membrane Protein Workshop•Melbourne (2004.2.6)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of water and ion channels analysed by cryo-electron microscopy」

The 29th Lorne Conference on Protein Structure and Function•Lorne (2004.2.8-12)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and Function of a Water Channel Expressed in Brain」 The Third Waterfront Symposium of Human Genome Science•Tokyo (2004.2.24)

藤吉好則 (京大) 「脳のAQP4の構造と機能」

特定領域研究「アクアポリン」公開シンポジウム•東京 (2004.3.15)

藤吉好則 (京大) 「独自に開発した極低温電子顕微鏡を用いた膜蛋白質の構造解析」

第2回ナノテクノロジー総合シンポジウム•東京 (2004.3.16)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of water channels」

UK-Japan Structural genomics “Whither Structural Genomics?”•Oxford (2004.3.23-25)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Electron crystallography and single particle analysis of membrane proteins」

Workshop “Membrane, Membrane Proteins and Membrane Associated Molecular Machines” at the Howard Hughes Medical Institute•Chevy Chase (2004.5.5)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of water and ion channels analysed by cryo-electron microscopy」 第2回日本人プロテオーム学会•東京 (2004.5.20)

藤吉好則 (京大) 「構造から見た水とイオンチャネルの機能」

ニューロサイエンスプログラムNCU 第54回会合•名古屋 (2004.5.21)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of water and ion channels analysed by cryo-electron microscopy 低温電子顕微鏡法で解析された水とイオンチャネルの構造と機能」 第81回日本生理学会大会•札幌 (2004.6.2)

Y. Fujisyohi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of channels observed through an electron beam」 第16回国際解剖学会•京都 (2004.8.23)

K. Mitsuoka (AIST), Y. Hiroaki, K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu and Y. Fujiyoshi 「Atomic structures of aquaporins revealed by electron」

第16回国際解剖学会•京都 (2004.8.25)

Y. Hiroaki (CREST (Kyoto Univ.)) 「EM crystallography and quantitative electron diffraction」 13th European Microscopy Congress•Antwerp (2004.8.23)

藤吉好則 (京大) 「チャネルの構造と生理機能」
第77回日本生化学会大会・横浜 (2004.10.15)

Y. Fujisyoji (Kyoto Univ.) 「Structure and Function of a Water Channel Expressed in Brain」 第26回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム・東京 (2004.11.25)

光岡薫 (産総研)、廣明洋子、谷一寿、亀川亜希子、刑部伸彦、藤吉好則 「膜たんぱく質の電子線結晶解析の迅速化-水チャネル AQP4 の構造解析」
第27回日本分子生物学会年会・神戸 (2004.12.10)

藤吉好則 (京大) 「チャネルの構造生理学」 分子研研究会「物理化学から生命科学を展望する-分子組織体から細胞へ-」・岡崎 (2004.12.21)

Y. Fujisyoji (Kyoto Univ.) 「Structure and function of channels observed through an electron beam」 Skirball Seminar Series・New York (2005.1.21)

Y. Fujisyoji (Kyoto Univ.) 「Structure and function of water channels」
第7回国際麻酔メカニズム学会・奈良 (2005.2.25)

Y. Fujisyoji (Kyoto Univ.) 「Electron crystallography」
Workshop on Future CryoEM for Molecular and Cell Biology Structure Research,・Kyoto (2005.3.2)

藤吉好則 (京大) 「極低温電子顕微鏡の開発と膜タンパク質の構造解析」
京都大学低温物質科学研究センター -最先端医学・生物学と低温科学-・京都 (2005.3.4)

藤吉好則 (京大) 「Channel dynamics from a structural point of view 構造学的視点からみたチャネルのダイナミクス」 第82回生理学会大会・仙台 (2005.5.19)

藤吉好則 (京大) 「チャネルの構造と機能」
第9回蛋白質構造解析コンソーシアム総会記念講演会・東京 (2005.5.27)

藤吉好則 (京大) 「Structure and function of various water channels」
第2回日英構造プロテオミクスシンポジウム・横浜 (2005.5.28-30)

光岡薫 (産総研) 「pH 10.0 でのバクテリオロドプシンの立体構造とプロトン放出機構」
分子研研究会・岡崎 (2005.6.17)

藤吉好則 (京大) 「水とイオンチャネルの構造と機能」
生理学研究所研究会「分子複合体と神経・シナプス機能」・岡崎 (2005.6.23-24)

K. Mitsuoka (AIST) 「Electron microscopy studies of membrane proteins」
RRR workshop 2005 ・Yokohama (2005.7.30)

藤吉好則 (京大) 「新しい構造生理学を目指して」
第4回ナノサイエンスサマー道場・信州 (2005.8.17)

藤吉好則 (京大) 「構造生理学の展望と現状」
第2回インビトロジェンシンポジウム・湘南国際村 (2005.9.1-3)

藤吉好則 (京大) 「創薬の指針とするための膜タンパク質構造研究;その現状と展望
Whither study of membrane proteins for structure guided drug design ?」
BioJapan 2005・横浜 (2005.9.8)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「A new research field, Structure Physiology, and a prospect of it」、Cluj-Napoca International Symposium of Molecular Medicine, Society and Public Health on Structure Physiology• Cluj-Napoca (2005.10.5)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of water channels」
4th World Congress of Cellular and Molecular Biology•Poitiers (2005.10.9)

藤吉好則 (京大) 「水とイオンチャネルを中心とした構造生理学研究」
日本バイオイメーjing学会•東京 (2005.10.26-28)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「High Resolution CryoEM」
CryoEM Workshop at CIMBio(Center for Integrative Molecular biosciences)• La Jolla (2005.11.2-10)

藤吉好則 (京大) 「1.9 Å分解能の解析で見た水チャネルアクアポリン-0の機能」
特定領域研究「生体超分子構造」第2回公開シンポジウム•金沢 (2005.12.12-13)

藤吉好則 (京大) 「構造生理学の現状と展望」
岡崎統合バイオサイエンスセンター創設5周年記念シンポジウム•岡崎 (2006.2.8)

藤吉好則 (京大) 「水チャネルを中心とした構造生理学」
第260回CBI研究講演会「水と生命現象の科学」•東京 (2006.2.17)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Cryo-protection and cryo-electron microscopy」
Fourth International Workshop on X-ray Damage to Biological Crystalline Samples• Harima (2006.3.7)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of channels」
The 6th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan•Kyoto (2006.4.25)

藤吉好則 (京大) 「チャネルの構造生理学」
慶應義塾大学医学部講義•東京 (2006.5.15)

藤吉好則 (京大) 「チャネルの構造生理学」 OBI Monthly Lecture•大阪 (2006.5.16)

光岡薫 (産総研) 「アクアポリンの二次元結晶化と電子顕微鏡による結晶構造解析」
第5回ケモゲノミクス研究会•京都 (2006.5.20)

藤吉好則 (京大) 「構造生理学の現状と将来」(特別講演)
第1回バイオメンブレンカンファランス•神戸 (2006.5.27)

藤吉好則 (京大) 「チャネルの構造と機能」
日本麻酔科学会第53回学術集会•神戸 (2006.6.2)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Significance of multifunctional channels」
The 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB2006• Kyoto (2006.6.22)

藤吉好則 (京大) 「チャネルの構造と機能」
特定領域「膜インタフェイス」平成18年度公開シンポジウム「構造から探る生物学—膜タンパク質を中心として—」•京都 (2006.7.5)

藤吉好則 (京大) 「チャネルの構造生理学」(特別講義)
東京大学医学部共通講義VII 神経科学入門•東京 (2006.7.10)

藤吉好則 (京大) 「脳研究に挑戦したいと思った化学者の遠回り」
名古屋大学理学部化学教室セミナー・名古屋 (2006.7.21)

藤吉好則 (京大) 「チャンネルの構造生理学」
第18回高遠・分子生物学シンポジウム・長野 (2006.8.25)

藤吉好則 (京大) 「医学に役立つチャンネルの構造生理学を目指して」
第17回新潟分子病態・再生医学セミナー・新潟 (2006.9.1)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「High-resolution electron cryo-microscopy for the determination of membrane protein structures」
The 16th International Microscopy Congress-IMC16/IFSM pre-Congress School • Sapporo (2006.9.3)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structure Analysis of Membrane Proteins」
The 16th International Microscopy Congress-IMC16 (Roundtable:Multi-scale microscopy imaging and information techniques) •Sapporo (2006.9.6)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structure Analysis of Water Channel by Electron Crystallography」
The 16th International Microscopy Congress-IMC16 (Protein structure: Electron crystallographic analysis of membrane proteins) •Sapporo (2006.9.8)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of cell adhesive」
5th International NCCR Symposium on New Trends in Structural Biology •Zürich (2006.9.16)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Introduction for structure study of membrane proteins」
Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006•Brunnen (2006.9.19)

A. Oshima (CREST (Kyoto Univ.)) 「Projection Structure at 7 Å Resolution and initial 3D Map of a Human Connexin26」
Switzerland-Japan Symposium on Structural Biology 2006•Brunnen (2006.9.19)

藤吉好則 (京大) 「チャンネルの機能を構造から理解するために」
生理学研究所研究会「機能分子ダイナミクス of 分子機構解明に向けて」・岡崎 (2006.9.29)

藤吉好則 (京大) 「タンパク質やその複合体の構造研究における現状と展望の一面」
蛋白質科学に関するシンポジウム「ライフサイエンスと蛋白質科学」・東京 (2006.10.5)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structural physiology of multifunctional channels」
The 2nd Sapporo Conference 2006 New Trends in Structural Biology • Sapporo (2006.10.30)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「A new function of aquaporins: cell adhesion」
Keio Aquaporin Mini Symposium•Tokyo (2006.10.31)

R. Oldenbourg (MBL) 「Polarized light field microscopy for biology: The simultaneous recording of spatial (orthoscopic) and directional (conoscopic) polarized light images to analyze the birefringent fine structure of living cells」
The 9th International Conference on Optics Within Life Sciences • Taipei (2006.11.26-29)

藤吉好則 (京大) 「構造生理学研究の現状」
第6回システム生物医学研究会・箱根 (2006.11.30)

藤吉好則 (京大) 「装置開発、日本版EMBL研究所について」
日本学会会議 第2回科学・技術の発展のための知覚情報取得技術の強化に関する
検討分科会・東京 (2006.12.6)

大嶋篤典 (CREST(京大)) 「コネクシン 26 ギャップジャンクションチャネルのクローズ状
態から導かれたプラグゲーティングモデル」
日本顕微鏡学会生体構造解析分科会・大阪 (2006.12.21)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structural physiology of multifunctional channels」 (Keynote
lecture)
Joint International Symposium “Membrane Transport as a universal Biological
mechanism” ・Kyoto (2007.1.13)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Significance of multifunctional channels」
The SOKENDAI International Symposium “Electro-Chemical Signaling by Membrane
Proteins – Biodiversity and Principle” ・Okazaki (2007.3.14)

藤吉好則 (京大) 「バイオ研究に生命を吹き込んだ低温観察技術」
シンポジウム「科学技術立国の礎」ー日本の“見る技術”を再興するー・東京 (2007.5.10)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of channels」
Albany 2007: The 15th Conversation・Albany (2007.6.22)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of aquaporins」 (Keynote lecture)
The 5th International Meeting of Aquaporin・Nara (2007.7.15)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structural physiology of multifunctional channels = Struggling
to study brain functions=」
Max-Planck-Institut für Biochemie, Molekulare Strukturbiologie ・Martinsried
(2007.10.10)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Structure and function of multifunctional channels」
Seminar at CMBN University of Oslo・Oslo (2007.10.29)

Y. Fujiyoshi (Kyoto Univ.) 「Specimen preparation techniques for high resolution
structural studies by cryo-EM」
Workshop on advanced Topics in EM Structure Determination・La Jolla (2007.11.11)

藤吉好則 (京大) 「ヒトの機能を分子レベルから理解するために」
ナノバーチャルラボ合同シンポジウム・東京 (2008.1.22)

藤吉好則 (京大) 「構造生理学研究の1例」
第32回構造生物応用研究会・東京 (2008.2.21)

藤吉好則 (京大) 「多機能性膜タンパク質の生理的意味」
千里ライフサイエンスセミナー<生命機能を支える生体超分子の高次構造と機能>・大阪
(2008.2.28)

② 口頭発表 (国内会議 0 件、国際会議 1 件)

Y. Hiroaki (CREST (Kyoto Univ.)), K.Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, T. Doi, S. Sasaki, K.
Mitsuoka and Y. Fujiyoshi 「Expression, two-dimensional crystallization and structure
analysis of aquaporin-4」

Gordon Research Conference on “Three dimensional electron microscopy”・New Hampshire (2003.6.22-27)

③ ポスター発表 (国内会議 7 件、国際会議 3 件)
野中美応 (京大)、田中彩子、土井知子、藤吉好則、竹本-木村さやか、尾藤晴彦「リガンド結合に依存した PSD-95 のクラスターリング機構と PSD のクラスターが神経機能に果たす役割」
第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本生物物理学会合同年会・新潟 (2003.9.24)

村田康信 (京大)、土井知子、谷口寿章、藤吉好則「Postsynaptic Density のプロテオーム解析から明らかになった、シナプス結合部位に局在する新規タンパク質の機能解析」
第 26 回日本分子生物学会年会・神戸 (2003.12.11)

光岡薫「電子顕微鏡による膜タンパク質二次元結晶からの高分解能構造解析」
第 5 回日本蛋白質科学会年会・福岡 (2005.6.30)

Yohei Kuramochi, Hiroshi Suzuki, Tomoko Doi, Yoshinori Fujiyoshi
「Expression and purification of receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide」
第 78 回日本生化学会大会・神戸 (2005.10.19-22)

谷村幸宏、西川幸希、亀川亜希子、廣明洋子、藤吉好則
「水チャネル AQP4 における格子状構造と二次元結晶の形成」
日本生物物理学会第 43 回年会・札幌 (2005.11.23)

谷村幸宏、西川幸希、亀川亜希子、廣明洋子、藤吉好則
「水チャネルアクアポリン-4 における結晶性アレイと二次元結晶の形成」
低温物質科学研究センター研究交流会・京都 (2006.3.1)

藤吉好則「トモグラフィー用極低温電顕システムとポルスコープの開発」
JST ナノバーチャルラボ成果報告会・東京 (2006.7.15)

A. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, G. E. Sosinsky 「Projection Structure at 7Å Resolution and Initial 3D Map of a Human Connexin26」
The American Society for Cell Biology 46th Annual meeting・San Diego (2006.12.9-13)

A. Oshima, K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, G. E. Sosinsky 「Plug gating model derived from a structure of a closed human connexin26 gap junction channel」
Biophysical Society 51st Annual Meeting・Maryland (2007.3.3-7)

廣明洋子、亀川亜希子、藤吉好則
「脳の水チャネルアクアポリン-4」
ナノバーチャルラボ合同シンポジウム・東京 (2008.1.22)

(4)特許出願

① 国内出願 (2件)

1. 名称: トップエントリ式試料ステージ傾斜装置
発明者: 藤吉好則・出口俊二
出願人: 国立大学法人京都大学・日本電子株式会社、
出願日: 平成 17 年 7 月 14 日
出願番号: 特願 2005-205558
2. 名称: 荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置
発明者: 藤吉好則・福田知久

出願人： 国立大学法人京都大学・日本電子株式会社、
出願日： 平成 19 年 3 月 30 日
出願番号： 特願 2007-094862

② 海外出願 (0 件)

(5) 受賞等

① 受賞

産学官連携功労者 科学技術政策担当大臣賞 (2005 年 6 月 26 日)
「「極低温電子顕微鏡装置」の開発・実用化及び膜たんぱく質の構造解析」
藤吉好則・成瀬幹夫

クルージュナポカ医科薬科大学 名誉博士 (2005 年 10 月 5 日)
藤吉好則

財団法人材料科学技術振興財団 山崎貞一賞 (2005 年 11 月 18 日)
「バイオサイエンス・バイオテクノロジー分野「膜蛋白質の構造と機能の解明」
藤吉好則

慶應義塾医学振興基金 慶應医学賞 (2005 年 12 月 6 日)
「極低温高分解能電子顕微鏡開発による膜蛋白質構造生物学の発展」
藤吉好則

財団法人島津科学技術振興財団 島津賞 (2006 年 2 月 20 日)
「極低温電子顕微鏡の開発と、水とイオンチャネル分子機構研究への応用」
藤吉好則

紫綬褒章 受章 (2006 年 11 月 3 日)
「構造生理学研究功績」
藤吉好則

② 新聞報道

2005 年 10 月 4 日、朝日新聞
「慶應医学賞に藤吉・京都大教授」

2005 年 11 月 9 日、讀賣新聞
「ひと 人抄 人の個性のナゾを解明したい」

2005 年 11 月 23 日、中日新聞
「この人 第 10 回慶應医学賞を受賞した藤吉好則さん」

2005 年 12 月 1 日、京都新聞
「体内で水だけ高速透過「水チャネル」 高精度で構造解析 水分子の動きも確認」

2005 年 12 月 1 日、讀賣新聞 「万華鏡？ 細胞膜の水チャネル」

2005 年 12 月 1 日、日本経済新聞
「白内障の発症に関係 たんぱくの構造 京大が観察成功」

2005 年 12 月 1 日、産経新聞 「目の水晶体「水の通り道」解析 白内障など発生解明へ」

2005 年 12 月 2 日、日刊工業新聞 「白内障治療に光 水晶体の線維細胞を解析」

2005 年 12 月 7 日、日本経済新聞 「島津賞に京大・藤吉氏 島津科学技術振興財団」

2005年12月14日、讀賣新聞
 「たんぱく質 生命をかたちづくるもの 第Ⅳ部
 極低温で“生きた姿” 解析困難だった膜たんぱく 構造研究に電子顕微鏡技術」

2005年2月21日、京都新聞 「傑出した研究に期待 島津賞 藤吉教授らを表彰」

- ③ その他
 特になし。

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

| 年月日 | 名称 | 場所 | 参加人数 | 概要 |
|-----|----|----|------|----|
| | | | | |

8 研究成果の展開

(1) 他の研究事業への展開

傾斜機構付き極低温電子顕微鏡(第6世代の極低温電子顕微鏡)を成功裏に開発できたので、その使いやすさを向上させる改変を行うことができる見通しができた。それゆえ、本装置のようにトップエントリーの傾斜機構付き高分解能電子顕微鏡をユーセントリックな傾斜機構を備えた第7世代の極低温電子顕微鏡開発へと展開できることになった。

(2) 実用化に向けた展開

国内特許出願を2件行っている。

すなわち、「トップエントリー式試料ステージ傾斜装置、藤吉好則・出口俊二、国立大学法人京都大学・日本電子株式会社、平成17年7月14日、特願2005-205558」と、「荷電粒子線装置の試料ステージ移動装置、藤吉好則・福田知久、国立大学法人京都大学・日本電子株式会社、平成19年3月30日、特願2007-094862」であるが、まだ、特許の実施許諾等はなされていない。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1) 領域内の活動とその効果

特筆すべきことはなし。

(2) 領域横断的活動とその効果

特筆すべきことはなし。

10 研究成果の今後の貢献について

(1) 科学技術の進歩が期待される成果

電子顕微鏡は、微細で詳細な構造を観察するのに適しているが、動的な構造を観察することは極めて困難である。一方、光学顕微鏡は生きた細胞の中の構造を動的に観察することに優れているが、その分解能が制限されており、詳細な立体構造を観察する点で弱点がある。こ

の両方の方法を発展させることによって、生物学における構造と機能研究を進める技術を開発することを基本的な目的として、研究を実施し、電子線トモグラフィ像を撮影できる傾斜機構付き極低温電子顕微鏡システムと、蛍光ラベルなどを行わないでアクチンフィラメントなどを高いコントラストで観察できる4次元ポルスコープの開発を行った。これらは、これまでの手法では観察が困難であった試料の観察に道を開くものであり、今後、この2つのシステムの活用によって、研究がさらに発展すると期待している。

(2) 社会・経済の発展が期待される成果

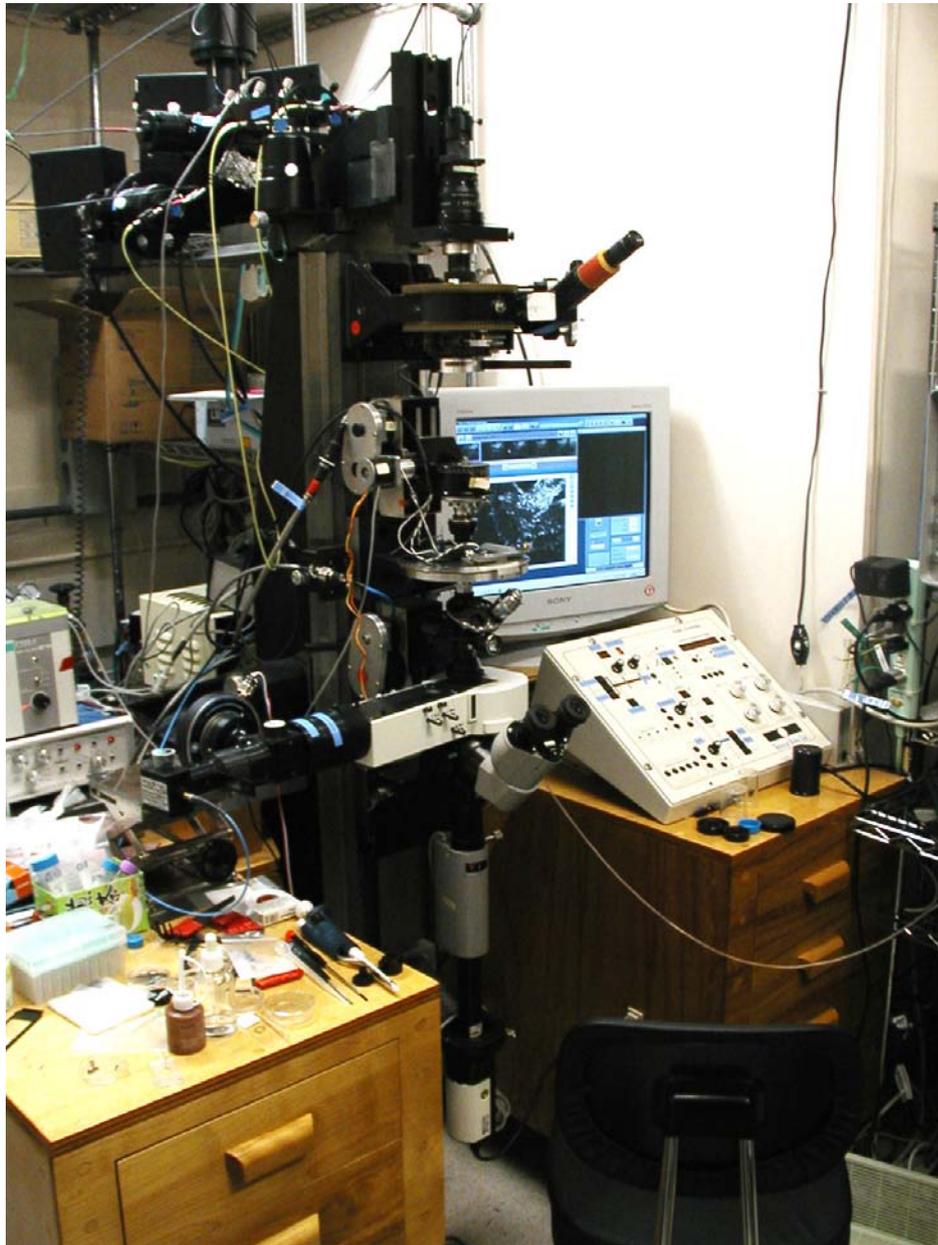
傾斜機構付き極低温電子顕微鏡システムは、今後電子線結晶学や単粒子解析法にも有効に活用できるだけでなく、今大きな注目を浴びつつある電子線トモグラフィのデータをより高い分解能で取得できるようになることが期待される。それゆえ、3億円を超えるような非常に高額な装置であるが、世界的に使用されるようになることを期待している。また、4次元ポルスコープは、蛍光ラベルなどの人為的な操作なしに、細胞内の構造を動的に観察できる光学顕微鏡であるので、このシステムも、世界的に活用されることが期待される。そして、今回解析したイオンチャネルや水チャネルの構造は、生物学的な基礎的理解を深めることに役立つのみならず、創薬のための重要なヒントとなると期待している。特に、脳や脊髄などの損傷時に浮腫を最少にして周りの神経細胞がダメージを受けないようにする技術に貢献できる可能性が出てきた。また、神経細胞の分化制御への重要な情報を与えることを期待する。

11 結び

当初目指した2つの装置システムの開発、すなわち、傾斜機構付き極低温電子顕微鏡システムと、4次元ポルスコープの開発というシステムの開発には成功し、興味を持って研究を続けてきた膜タンパク質、特に脳の水チャネルと、ギャップ結合チャネルの構造と機能研究では、目覚ましいといえるほどの成果を得たので、ほぼ満足いく結果であった。しかし、予算的な問題から極低温電子顕微鏡開発を別の予算で開発する必要があり、凍結切片を作製する新しい方法を開発する必要から、脳の微細構造を電子線トモグラフィを用いて解析するところには至っていない。この課題は非常に困難であり、世界的に観て誰もまだ成功していないが、今回の成果を基礎としてさらに発展させることによって、その高い目標を達成するよう努力したい。それゆえすなわち、達成度は95%程度であろう。このプロジェクトの研究員が水チャネルの新しい機能を発見する研究に成功すると共に、本プロジェクトの別の研究員がギャップ結合チャネルで教科書を書き換える成果を出すことができた。その意味でも、今回のプロジェクトは研究を大きく進めることになったので、本プロジェクトには深く感謝する。



傾斜機構の無い極低温電子顕微鏡（手前）と、傾斜機構付き極低温電子顕微鏡（奥）



ポルスコープを装着すると共に、複雑な実験を安定に行うことができる高分解能光学顕微鏡 PolShinyaScope。