

細胞内における蛋白質複合体の挙動を直接捉えるための光学／電子顕微鏡基盤技術の開発

チームリーダー 片山栄作 (東京大学医科学研究所・教授)

Keyword

顕微鏡観察、3次元再構成、標識蛋白質、構造解析、構造差分検出法、精製用タグ、蛍光蛋白質

開発課題名 細胞内蛋白質統合検出システム

■ 参画機関名：工学院大学、順天堂大学、国立精神・神経センター、(独)産業技術総合研究所

■ 開発期間：平成17～20年度(予定)

課題概要

細胞内で機能している蛋白質分子構築の立体構造を高分解能で検出するための構造解析法を開発し、生命科学者の夢、「1分子の構造生物学」の実現を目指す。既に構築済みの急速凍結レプリカ電子顕微鏡画像からの3次元再構成法を発展させ、さまざまな条件における生体試料の立体構造解析を可能にする。また、高精度、多機能の特異的標識法などを組み合わせた統合検出システムにより、一般の研究者が通常の機器を用いて生体分子構築の高分解能構造情報を得ることが可能となる。

得られた開発成果の概要

■ 開発の背景／経緯

われわれは、生きた細胞の動態をそのまま捉えられる光学顕微鏡法と、高分解能で個々の分子の直接画像が得られる電子顕微鏡法の利点を組み合わせ、細胞や分子構築の構造変化の時系列を記録しながらある一瞬に固定し、ほぼ同一の視野を電子顕微鏡で観察する手法を開発している。

■ 開発の成果

まず、「アポダイズド位相差光学系」を開発した。これは既に市販の顕微鏡に採用され、好評を博している。並行して、蛍光

および特徴的な棒状構造により顕微鏡下で認識される標識を開発した。この標識は、蛋白質の精製に便利なアフィニティタグを内包するため、局在部位を確認した対象やそれを含む分子構築をそのまま高純度に精製できる。これまで膜蛋白質と細胞骨格の研究に使用しているが、薬物などの受容体の探索への応用も可能であろう。

急速凍結した生体試料中では対象の立体構造が保たれ、同一視野の連続傾斜電子顕微鏡像を撮影すれば任意の対象の3次元構造を再構成できる。われわれは従来の逆投影法とは全く異なる新たな再構成法を開発して電子線トモグラフィの最大の難点であるゴースト像の出現を完全に回避することに成功

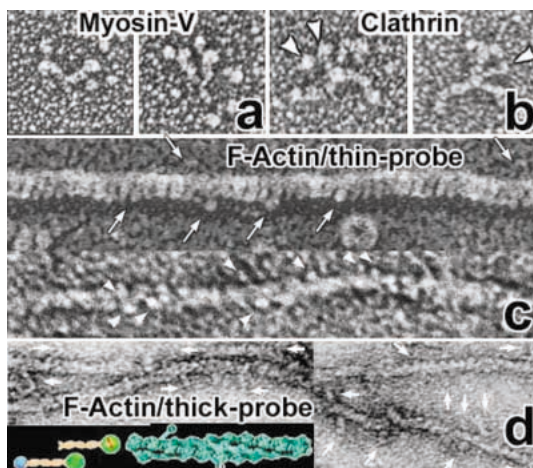


図1 蛍光／電子顕微鏡兼用の標識モジュール融合蛋白質の例
標識先端の球状部位はGFPなどの蛍光蛋白質で構成され、蛍光顕微鏡を用いて明瞭に観察できる。

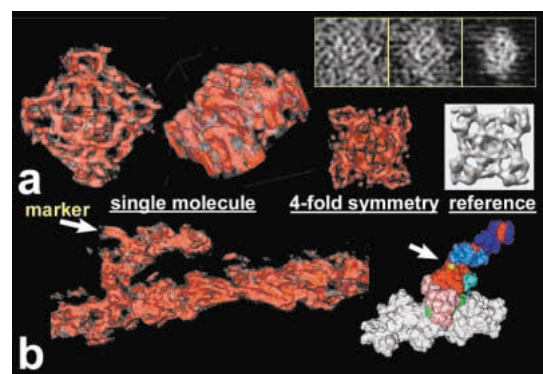


図2 ネガティブ染色した蛋白質1分子の像から新たなトモグラフィ法により再構成した例
a：リアンジン受容体、b：アクトSI複合体。矢印はN端の棒状標識。

した。また、従来法よりはるかに少数の傾斜画像から高精度の再構成が可能となった。このソフトウェアは既に商品化した。より広範囲の材料や試料作成法にも対処できるよう、さらに改良中である。急速凍結レプリカ試料の電子顕微鏡像は極めてコントラストが高く、蛋白質表面の凹凸を直接検出することが可能である。その特長を生かし、視野中の蛋白質1分子の画像をその原子モデルから作成した多数のシミュレーション画像と

定量的に比較してそれらの異同を検出し、特定の粒子の向きやコンフォメーションを決定する「構造差分検出法」を開発した。この手法においては「回転式モルフォロジー・フィルター」による画像処理が重要な役割を果たすが、画像中に含まれる微妙な形態情報を抽出して分かりやすく提示する「モルフォロジー処理」は、医学・生命科学に留まらず、物理学や天文学など一般の科学画像にも広く適用できる優れた汎用手法である。

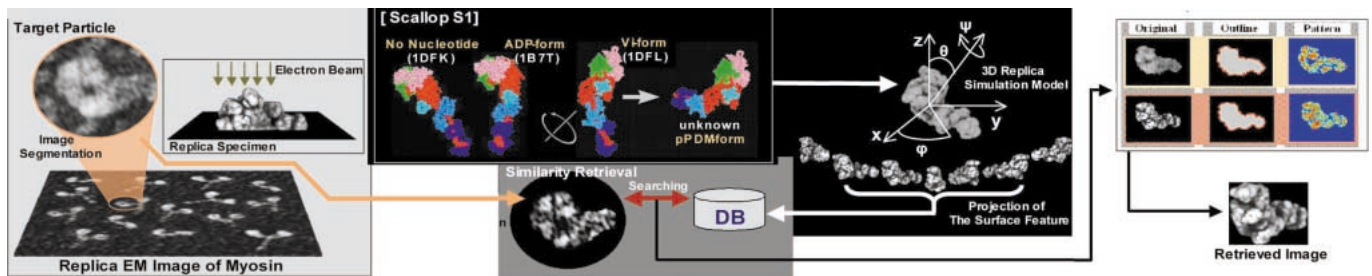


図3 構造差分検出法の概要
急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡法で観察される蛋白質分子表面の凹凸を、その3次元空間内のあらゆる方向に回転した原子モデルと比較照合し、最も類似度の高いものを探すことにより、その分子のコンフォメーションと投影方向を決定する。

細胞内における蛋白質複合体の立体構築の観察を可能に

■ 生命科学研究への貢献

アポダイズド位相差光学系は(株)ニコンの位相差顕微鏡シリーズの一つとして、また電子線トモグラフィのソフトウェアは(株)日立ハイテクノロジーズの透過電子顕微鏡のオプションとして製品化された。われわれの要素技術は、生命科学の新たな解析手法として有用である。

■ 「分子モーター」の解析への適用

構造変化が非常に大きくその動きも確率的で、従来の解析法では対処が困難であった「分子モーター」の作動機構を探るため、実際に滑り運動中のアクトミオシンの画像に上記の「構造差分解析法」を適用した結果、反応中

間体とみられる新たな構造を見出した。この構造を想定すればこれまで謎であったさまざまな現象を合理的に説明でき、その構造は実際の滑り運動において重要な役割を果たすものと想定される。

■ 医学・生命科学の研究への貢献

類似の目標を目指す要素技術も最近いくつか提案されたが、われわれのように生命現象に関わる蛋白質分子の構造解析まで目標に含めた例はない。個々の手法や装置はいずれもユニークで、単独でも非常に性能の良いツールである。全ての要素が完成すれば、医学・生命科学の研究に使える強力な統合システムとなるであろう。

上記成果の科学技術的根拠

【出願特許】

1. 国際公開番号 W02006/062/32、「立体画像再構成法装置、立体画像再構成方法及び立体画像再構成プログラム」、出願人：東京大学、(株)東京大学 TLO
2. 特開 2006-343207、「顕微鏡解析用プローブ及び顕微鏡解析方法」、出願人：東京大学
3. 国際公開番号 W02008/069232、「回転式モルフォロジー・フィルター及びそれを用いた画像処理法」、出願人：東京大学
4. 特願 2006-332530、「分子モジュール」、出願人：東京大学、順天堂大学

【発表論文等】

1. Kimori Y., Oguchi Y., Ichise N., Baba N. and Katayama E. "A procedure to analyze surface profiles of the protein molecules visualized by quick-freeze deep-etch replica electron microscopy", Ultramicroscopy, 107, 25-39. (2007)
2. Baba N. and Katayama E. "A novel "ghost"-free tomographic image reconstruction method applicable to rotary-shadowed replica specimens", Ultramicroscopy, 108, 239-255. (2008)
3. Noguchi T. Q. P., Kanzaki N., Ueno H., Hirose K. and Uyeda T. Q. P. "A novel system for expressing toxic actin mutants in Dictyostelium and purification and characterization of a dominant lethal yeast actin mutant", J. Biol. Chem. 282, 27721-27727. (2007)