

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 高次細胞機能構造体観察・制御技術の開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

藤吉 好則 (京都大学大学院理学研究科 教授)

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究課題全体の研究内容

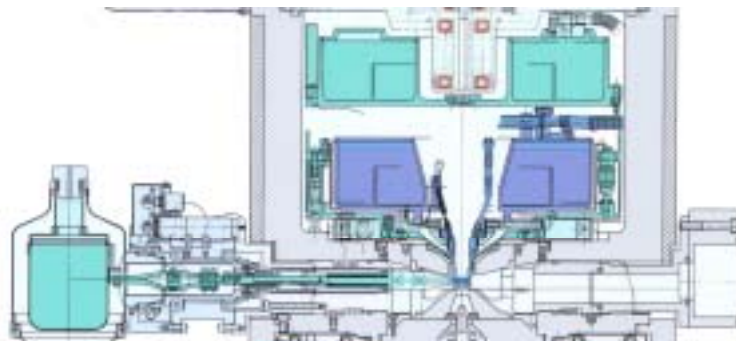
新しい試料傾斜機構付き極低温電子顕微鏡、及び、4次元ポルスコープ光学顕微鏡(特殊な偏光顕微鏡システム)という2つの顕微鏡システムを開発して、高次細胞機能構造体観察技術を確立することで、神経細胞などの情報伝達ネットワークの構築に関する分子的基础原理を理解すること、そして将来的には脳における神経システムの構築や修復、記憶制御などの機構を分子レベルで解明することを目的として研究を進めた。本研究構想で目指したのは、光学顕微鏡と電子顕微鏡という2つの“観る”技術の狭間として残されてきた領域へ2つの顕微鏡技術を広げて、新しい“観る”技術を確立することである。これを実現するために、光学顕微鏡はコントラストを向上させて、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した。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した。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。

3 - 2. 研究成果

観察技術開発とそれによる生体システムの構造・機能研究で大きな成果がある。

### 観察技術

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。(図) 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を装備している。



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。

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。

## 生体システムの構造・機能研究

脳のシナプス後肥厚 (PSD) に集積するタンパク質の研究

- (a) 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。その結果、PSD は NMDA 受容体や PSD-95, shank, GKAPなどを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。この様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。中でも、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。Q-ToF 型のマス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 が後シナプスに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。
- (b) 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 は NMDA 受容体と結合する。その結合活性を減ずるとシナプスの形状や数に大きな影響が生ずる。
- (c)  $\text{Ca}^{2+}$ イオンの制御に関わるER膜に存在する  $\text{IP}_3$  受容体の構造を、単粒子解析法で解析した。 $\text{IP}_3$  受容体は、 $\text{IP}_3$  や  $\text{Ca}^{2+}$ イオンを始めとして複雑な制御機構を受けて  $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度を変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。

Adhennel ファミリータンパク質の構造と機能

- (a) 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 分解能で解析することで、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。
- (b) 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。
- (c) ギャップ結合チャン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ンネル、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。構造解析の結果、このチャンネルの内部にこれまで考えられてこなかったプラグ(栓)様構造が存在することが分った。コネキシンの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、その部分がチャンネルの膜貫通部分にまで入り込んでいる。それゆえ、狭い部分は6 程度と水和したイオンの径8 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。

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、神経細胞の成長円錐を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。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 はプロテインホスファターゼ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。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、calyculin A が海馬初代培養神経細胞に与える効果を研究した。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 を用いた研究で、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ていることが示唆された。今回の実験結果は 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が明らかになった。

#### 4. 事後評価結果

##### 4 - 1. 外部発表、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

外部発表件数

論文発表		著作物		招待講演		口頭発表		ポスター発表		特許	
国内	国際	国内	国際	国内	海外	国内	海外	国内	国際	国内	国際
0	19	1	9	36	45	0	1	6	3	2	0

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という2つの顕微鏡を開発して、高次細胞機能構造体の観察技術を確立するという計画は完全に実現された。海馬のシナプス結合変化については、研究代表者のゴールを実現したとは言えないが大きな進展があった。その一方でチャンネルの構造については予想を上回る成果をあげている。Nature を含めインパクトの大きな論文が多数発表されており、また国際会議での招待講演も多い。

##### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

世界的に脚光をあびた膜タンパク質の構造決定はこのグループの開発した極低温電子顕微鏡での構造解析によるものが多く、他に追随を許さない世界的評価を得ている。また、4次元ポルスコープの開発はこれまで観察が難しかった細胞内の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。

アセチルコリン受容体の構造解析によって、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。水チャンネルAQP4の構造解析により、この水チャン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、AQP4 は脳浮腫と関係しており、このチャン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医学的寄与を行える可能性もある。ギャップ結合チャンネルは発生や、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。そのゲーティング機構を解明した成果は、今後の生物学医学の発展に貢献が期待される。これらの知見は創薬など応用も含めた展開が期待される。

##### 4 - 3. その他の特記事項

極低温電子顕微鏡の開発では一部、科学研究費補助金 特別推進研究、H16～H20 年度、からの資金も充当されている。

###### 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」

クルージュナポカ医科薬科大学 名誉博士 (2005年10月5日)

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」

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」

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」

紫綬褒章 受章 (2006年11月3日)

「構造生理学研究功績」