

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：細胞内標識による生物分子トモグラフィー

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

宮澤 淳夫 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科 教授)

主たる共同研究者

岩崎 憲治 (大阪大学蛋白質研究所 准教授)

安永 卓生 (九州工業大学大学院情報工学研究院 教授)

白川 昌宏 (京都大学大学院工学研究科 教授) (平成 22 年 12 月～平成 24 年 3 月)

3. 研究実施概要

生命現象の解明には、様々な細胞機能を担う生体分子が生きた状態に近い環境で、しかも機能を発現している状態において解析することが重要である。現在、細胞内に存在する分子複合体や繊維状構造体などの三次元構造解析には、電子線トモグラフィーが有効な手法である。しかし、細胞内では特定の生体分子の同定が困難であり、また非生物系の試料を対象とした電子線トモグラフィーを生物試料にそのまま適用しても、電子線による損傷や試料ドリフトなど生物試料特有の問題のために、生体分子の構造を分子レベルの高い分解能で解析することは非常に困難である。

そこで、本研究では細胞内の分子の形が観察できて、それが何であるか同定することを可能にする「細胞内標識による生物分子トモグラフィー」の実現を目指した。本課題の柱の一つである電子顕微鏡用遺伝的標識法への取り組みとして 3MT タグの開発があげられる。3MT タグは金属結合タンパク質であるメタロチオネイン (MT) を 3 分子連結したもので、細胞内において電子顕微鏡で観察可能な標識となる金属クラスターを形成することができる。3MT タグの基礎的検証のため、ホモ 14 量体を形成する大腸菌シャペロンタンパク質 GroEL や、神経ポストシナプス肥厚部に集積する足場タンパク質 PSD-95 に 3MT タグを遺伝的に融合して細胞内で発現させ、そこに形成された金属クラスターの電子顕微鏡観察を行った。その結果、3MT タグは世界初の電子顕微鏡用の遺伝的コード化標識として細胞内タンパク質の標識に有用であることを示した。さらに標識の効率化、検出感度の向上を目指したモデルタンパク質として、単量体蛍光タンパク質 GFP に 3MT タグを融合させたタンパク質を作製した。この電子顕微鏡観察を行うと共に、システム開発グループを中心に開発した画像解析システムを適用し、観察手法と解析手法の両面から同時に検討を行うことにより 3MT 標識による一分子レベルの検出が可能であることを示した。

本研究課題のもう一つの柱は、生物分子トモグラフィー技術の確立である。透過型電子顕微鏡の利点は、標識された目的分子だけでなく、周辺要素も同時に観測(ブラウジング)でき、かつ、ナノメートルの分解能でそれら分子構造も観察できることである。この利点を活かし、尚かつ、生きている状態に近い水和した試料の観測を可能にする生物分子トモグラフィー技術の開発に取り組んだ。得られた成果としては、クライオ電子線トモグラフィー実データの取得や、非晶質凍結切片法(CEMOVIS)、光・電子相関顕微鏡法の立ち上げ、ならびに、独自の電子顕微鏡制御システムと画像解析システムの構築である。クライオ電子線トモグラフィーの実現では、これまでの切片観察では不可能だった天然状態の超分子構造の観測ができることを示した。活性化血小板では、これまでの報告とは異なるアクチン構造を示し、ウイルス感染宿主細胞では、細胞内のウイルス粒子およびその伝搬装置ともいべきチューブ構造解明に関して、顕著な成果をあげた。CEMOVIS では、最も難易度の高い CEMOVIS のクライオ電子線トモグラフィーという技術的な面の進展から、ミドリシの光センサー器官解明という成果まで残すことができた。光・電子相関顕微鏡観察では、神経シナプスにおける接着装置解明という重要な結果に貢献することができた。

ここで構築してきた電子顕微鏡画像処理、クライオ電子線トモグラフィー・システムの成果を受け、統計的画像処理により、軸糸内でのダイニン重鎖の配置を明らかにした。また、これらのプログラムは、グループ外研究室

にも提供され、共同研究を通して Cell 誌等にアクチンフィラメント、ダイニン等の構造解析として報告された。

これら二本柱の成功を受け、これらをまとめて生物の動きなどの生物機能に係わる鞭毛に適用した。ここでは、ダイニンの中でも結合部位が未知であり、鞭毛の制御に重要であるサブユニットを 3MT 標識し、鞭毛内におけるダイニンでのサブユニット構造のクライオ電子線トモグラフィーによる解析を進めた。その結果、鞭毛内での 3MT 標識をクライオ電子線トモグラフィーで観察することに成功し、外腕ダイニン上での結合位置が明らかになった。メタロチオネインが光-電子相関顕微鏡の標識としても有効である可能性が示唆された。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

電子線トモグラフィーのための新しい発想の分子標識法として、標的タンパク質の遺伝子に融合できる金属複合タンパク質として 3MT を見出し、その有用性を確認した。生きている状態に近い水和した試料の観測を行うために、CEMOVIS およびクライオ電子線トモグラフィー・システムを開発し、高分解能撮影条件の検討や、ホルダーの改良を行った。また電子線トモグラフィーのためのソフトウェア開発も同時に行った。その結果、電子顕微鏡法のための標識法を確立、GFP-Cd-3MT の Cd を Pt に置換することによる検出感度と効率の向上、電子線トモグラフィーによるウイルス粒子の可視化、CEMOVIS によるミドリムシ体内の光センサー器官の解明など、新しい結果を得た。また Q ドットを用いることにより光学顕微鏡と電子顕微鏡の相関顕微鏡も可能とした。既存の電子顕微鏡をベースにした開発は目標とした「細胞内標識による生物分子トモグラフィー」の実現に大きく貢献した。ただ、この標識法の普及が進んでいないのは残念である。

発表論文は決して多いとは言えない。しかし、GFP に相当する電子顕微鏡法における細胞内タンパク質の 3MT タグによる標識法の開発、CEMOVIS 法の独自開発、クライオ電子線トモグラフィーと、いずれも困難な課題に挑戦したことを勘案すれば、形態科学分野においてはそれなりの被引用度もあり、妥当であると思われる。他の課題に比べ国際発表の割合が少ないのが気になる。特に世界的な普及が望まれるところである。

特許に関しては、国内出願1件のみ。出している一件は、割合良い知的財産権ではないかと思う。3MT を用いた分子標識法はもちろん、種々の電子顕微鏡に関する改良等も出願しておくべきではなかったか。

研究の進め方については、細胞内標識による生物分子トモグラフィーの課題のもとに、それぞれの研究チームが有機的かつ相補的に研究を推進した。研究代表者のリーダーシップは非常に優れていたと考えられる。細胞内の分子イメージングの目標達成のために光検出磁気顕微鏡開発のグループを加え新たな展開を拓き、グループの研究も大きな進展を示したが、チームとしてその成果を出すまでには至らなかった。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

生命現象の解析に資する新たな計測・分析に関する基盤的技術の創出という目標に対し、本研究は細胞内タンパク質分子の局在を、通常の標本作製法で生じるアーチファクトをクリアできるクライオ電子線トモグラフィーにより、超微形態を保存したままで解析できる優れた技術であり、生体分子の作用機構の解析にもつながっていくものと思われる。より廉価で購入できる電子顕微鏡の開発、凍結技法である CEMOVIS 法の普及などのハードルが高い課題があるが、生体内分子の動態をあるがままの状態、ナノスケールで詳細に解析できる極めて魅力的なプロジェクトであると思われる。

3MT タグを用いた細胞内タンパク質標識法を世界に先駆けて開発したことは高く評価できる。今後これを基盤に、さらにより良い標識化に取り組むと共に関連分野の研究者に広く宣伝をして使ってもらう事を考えて欲しい。遺伝的コード化標識が普及することにより、生体分子の電子顕微鏡観察の質が向上し、細胞内での生体分子観察など応用が広まることが期待される。また CEMOVIS、クライオ電子線トモグラフィーの有用性を実証した。今後、この分野の研究進展に貢献すると思われる。

本研究は国内ではトップレベルと思われるが、世界を大きくリードしているというわけではない。クライオ電子顕微鏡の装置開発にも取り組んだが、新しく国内に導入・稼働された外国製のクライオ電子顕微鏡を使うこととなった。外国製の装置を使わざるを得ないという状況は、このグループの責任とは必ずしも言えないが、今後、国内メーカーと共同体制で一体となって電子顕微鏡技術が開発されることが大いに望まれる。一方、海外の

他の研究グループにも本研究の技術をもっと使ってもらえるよう努力してほしい。

開発した画像処理プラットフォームをより広く適用するため、次段階へ進めるべく JST の別プロジェクトにも採択され、研究が継続されており、その成果にも期待できる。

領域目標に関しては、本研究に対して高い期待がある。細胞内の生体分子の研究にはなくてはならない技術であり、日本を牽引する研究であるが、現状ではまだ生命現象解明に向けた成果は見えてきていない。本標識法が生命現象を理解するための計測技術として使われ、ひいては我が国のクライオ電子顕微鏡の技術革新を促進するようになることを希望している。真の意味で生物分子トモグラフィーの実現に向けて、本研究の成果はその基礎となるよう、研究を積み上げてほしい。

4-3. 総合的評価

細胞内での構造など分子の情報を得ることは、生命現象解明にとって重要な突破口となる課題である。本研究では細胞内の分子複合体の構造、機能解析のために、遺伝的標識法と電子線トモグラフィー技術の開発を進めた。これにより生物を対象とした電子顕微鏡法の進展に大きく貢献し、目標とした「細胞内標識による生物分子トモグラフィー」の実現に一步近づけた。電子顕微鏡法により細胞の分子レベルでの理解が進んでいくものと思われる。本研究がその要素技術を開発したということで、今後更にこの技術を展開してゆくことで大きな進展を期待したい。日本から世界へ発信できるような成果が望まれることを期待したい。