「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、光学顕微鏡と電子顕微鏡の両技術を開発・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、３次元ポルスコープを開発しつつあり、星状体の３次元配向の画像化に成功した。神経細胞等を動的に観察するために必要なポルスコープの開発を進めている。また、速い画像記録が出来ないというポルスコープの弱点を克服するために、新しいソフトウェアを開発した。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を行った。今後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。単粒子解析法を用いて神経細胞の複雑な膜蛋白質の立体構造解析と電子線トモグラフィーを用いて神経細胞などの立体構造を詳細に解析するシステムも開発・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、血流の制御や温度、栄養、浸透圧のセンシング機構の理解などに役立てたい。
トモグラフィー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、蛍光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。

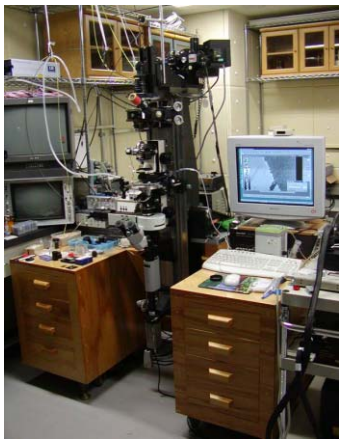

図１PolShinyaScope

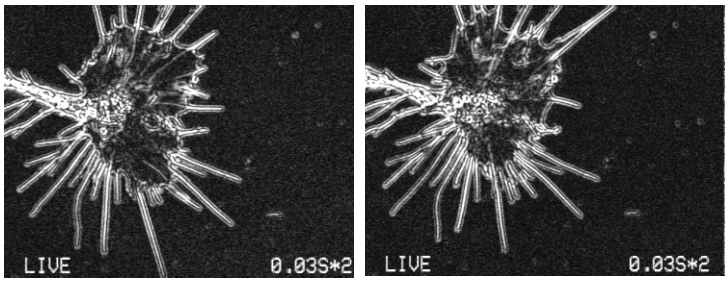

図２　PolScopeで観察された成長円錐

さらに１μm程度の領域に照射して、ケイジド化合物を活性化するシステムを開発設置したので、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などを観察できるようにした。

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つのパラメーター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ー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。

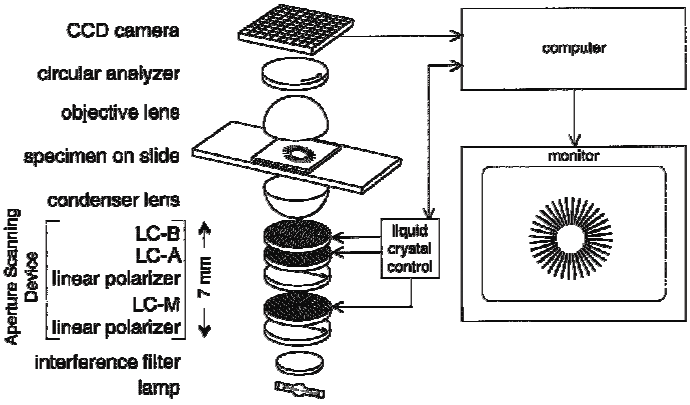

図３　走査絞りポルスコープ（Scanned Aperture Pol-Scope）の模式図

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、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４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

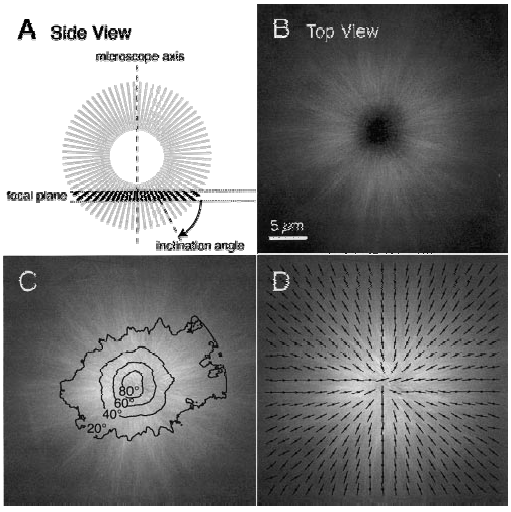

図４　走査絞りポルスコープ（Scanned Aperture Pol-Scope）による星状体の観察

に成功したことを示唆している。

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

(1) 論文発表

○ 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).

○ 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)