

「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、星状体等の 3 次元配向の画像化に成功した。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 Real-Time PolScope とソフトウェアを開発した。また、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付き極低温電子顕微鏡の開発を行ったが、その性能試験を行い、改良を行う予定である。この装置を基にして、電子線トモグラフィーを用いた立体構造解析システムを開発・改良する予定である。単粒子解析法を用いて神経細胞由来の複雑な膜蛋白質の立体構造解析を行う予定である。

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。＜なお、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。しかし、これを用いた生物学的研究は、本予算を使用して行いたい。＞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) を設置した。

これを用いて、神経細胞の成長円錐も図 1 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。

さらに 1 μm 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を動的に観察できるようにした。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 2 に絞りを走査する機構をもつ偏光顕微鏡を示す。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 に示す。

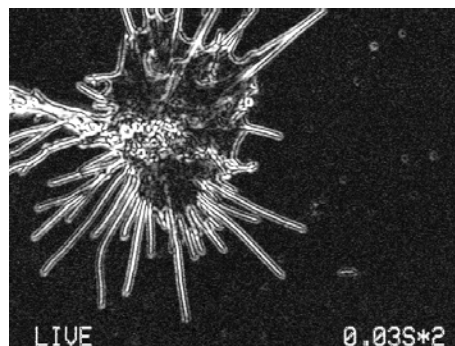


図 1 PolShinyaScope で観察された成長円錐。アクチンバンドルや脂質膜、ベシクル等が高いコントラストで観察される

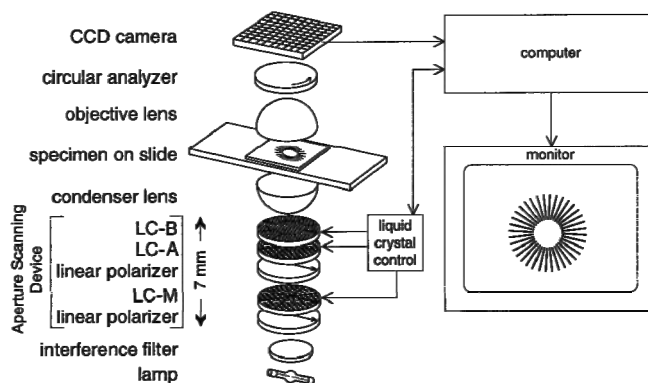


図 2 走査絞りポルスコープ (Scanned Aperture Pol-Scope) の模式図

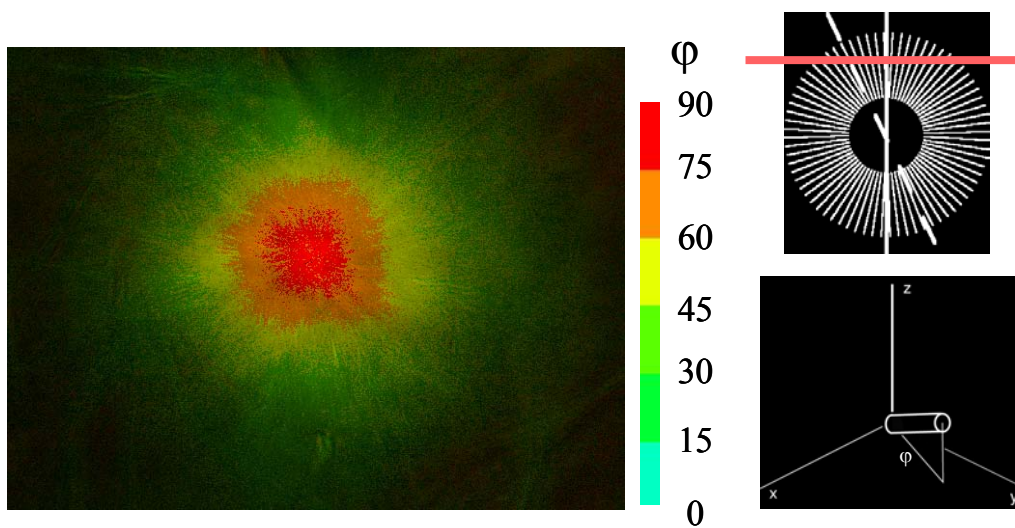


図3 PolScopeで観察された成長円錐の3次元データ

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、とらえることに成功したことを示唆している。

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、電子線トモグラフィーによって、神経細胞などの立体構造を解析するために、傾斜機構付き極低温電子顕微鏡の開発にも成功した。実際に、トモグラフィーによる解析を進めると共に、このタイプの極低温電子顕微鏡のさらなる改良を進める予定である。

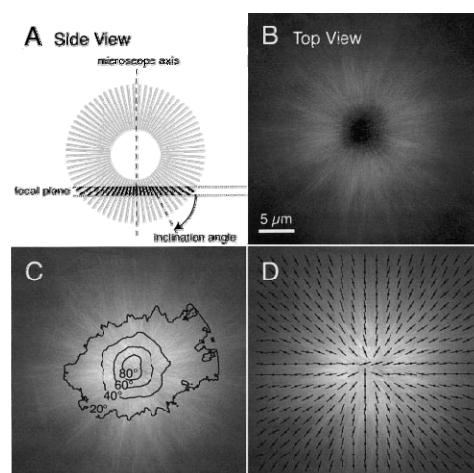


図4 走査絞りポルスコープ (Scanned Aperture Pol-Scope) による星状体の観察

3. 研究実施体制

「藤吉好則」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
- ・ 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（原著論文）発表

- 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).

- 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).