

「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。Rudolf Oldenbourg 博士を中心に、3次元ポルスコープを開発した。このシステムで星状体等の3次元配向の画像化に成功した。速い画像記録のために、新しい Real-Time PolScope とソフトウェアも開発した。一方、独自に開発してきた極低温電子顕微鏡を基に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（本予算とは異なる別予算で実施）が、その性能試験を行うことで改良すべき点を明らかにし、それに基づいて装置の改良を行い、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確立しつつある。また、電子線結晶学などの手法で膜タンパク質の構造と機能の解析も進めている。単粒子解析法等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ってきたが、さらにこの研究課題も推進する。

## 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次元ポルスコープが完成した。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す。

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  $\mu\text{m}$  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。これを用いて、フィロポディアの先端の cAMP 濃度を上昇させるとそれが伸張することを確認した。なお、成長円錐のほかのどの部分の濃度を上昇させても、大きな変化は見られない。

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

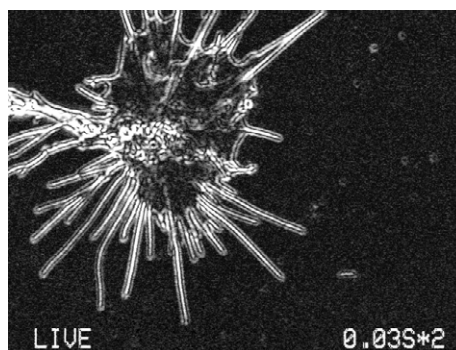


図 1 PolShinyaScope で観察された成長円錐。アクチンバンドルや脂質膜、ベシクル等が高いコントラストで観察される

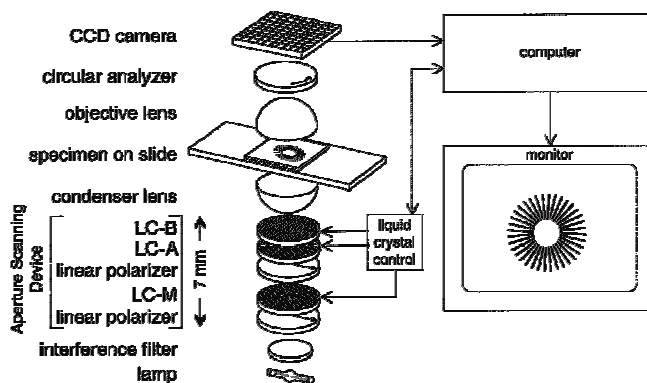


図 2 走査絞りポルスコープ (Scanned Aperture Pol-Scope) の模式図

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。

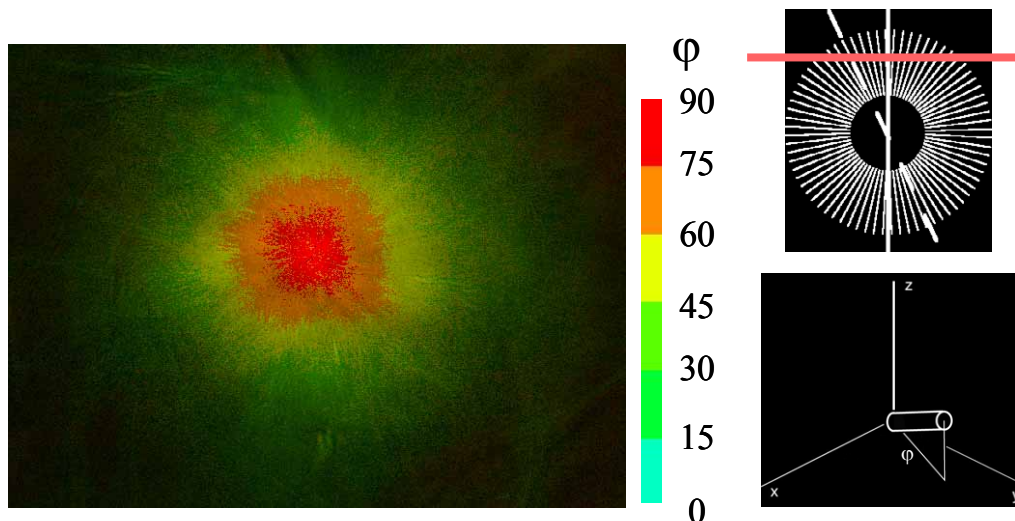


図3 PolScope で観察された成長円錐の3次元データ

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。

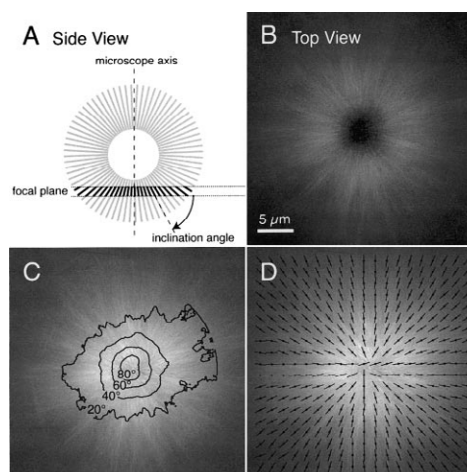


図4 走査絞りポルスコープ (Scanned Aperture Pol-Scope) による星状体の観察

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(別予算)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た結果、予備的ではあるがトモグラフィー像を撮影し、解析した。

また、電子線結晶学を用いて、Gap Junction channel (Cx26)の構造解析に成功して、

教科書を変えるような gating 機構を提案した。また、単粒子解析法で、TRPC3 の構造を解析した。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「藤吉好則」グループ

##### ①研究者名

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

#### (2)「Rudolf Oldenbourg」グループ

##### ①研究者名

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. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

- P. J. Holm, P. Bhakat, C. Jegerschold, N. Gyobu, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, R. Morgenstern and H. Hebert  
Structural Basis for Detoxification and Oxidative Stress Protection in Membranes.  
*J. Mol. Biol.*, **360** (5), 934-945 (2006).
- T. Hige, Y. Fujiyoshi and T. Takahashi  
Neurosteroid pregnenolone sulfate enhances glutamatergic synaptic transmission by facilitating presynaptic calcium currents at the calyx of Held of immature rats.  
*Eur. J. Neurosci.*, **24** (7), 1955-1966 (2006).
- K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka and Y. Fujiyoshi  
Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity.  
*Biochim. Biophys. Acta.*, **1768** (3), 688-693 (2007)
- K. Mio, T. Ogura, S. Kiyonaka, Y. Hiroaki, Y. Tanimura, Y. Fujiyoshi, Y. Mori and C. Sato  
The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas.  
*J. Mol. Biol.*, **367** (2), 373-383 (2007)

#### (2) 特許出願

平成 18年度特許出願:1 件(CREST 研究期間累積件数:2 件)