

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 18 年度採択研究代表者

宮澤 淳夫

独立行政法人理化学研究所 放射光科学総合研究センター
グループディレクター

細胞内標識による生物分子トモグラフィー

1. 研究実施の概要

生物試料を観察対象とした電子線トモグラフィーのためには、細胞内に存在するタンパク質分子の同定、生きた状態に近いクライオ観察、および生体分子に特化した画像情報解析を同時に行える環境を整えることが不可欠である。そこで、分子ラベル開発グループでは、電子顕微鏡で検出可能な標識法の開発のため、金属結合タンパク質を用いて遺伝的にコード化された標識法の検討を行った。標的タンパク質として、ホモ 14 量体を形成する GroEL や、神経シナプス後肥厚部(PSD)において集積する性質を持つ PSD-95 に、金属結合タンパク質の 1 種、メタロチオネインを融合させたコンストラクトを用いて、細胞内で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、カドミウム結合メタロチオネイン標識は、世界初の電子顕微鏡用の遺伝的コード化標識として有用であることを示した。また、電子線トモグラフィー観測グループでは、培養細胞や、組織切片における生体分子のクライオトモグラフィーの実現、および高分解能撮影条件の最適化を検討し、再現性よく非晶質切片を得ることに成功した。これに至る一連の実験より、重要な点は切削技術ではなく、加圧凍結時の溶液組成にあることが判明した。さらに、システム開発グループは、国産の電子顕微鏡に対し、クライオトモグラフィーに必要なモジュールの1つである、低電子線量撮影システムを完成させた。傾斜シリーズ撮影モジュールに関しては、概要の設計が終り、実装を開始した。3次元再構成に関しては、1 軸、および2軸傾斜共に分子レベルのトモグラフィーが可能なパッケージを作成した。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

<分子ラベル開発グループ>

光学顕微鏡における蛍光標識 GFP のように「観察したいタンパク質の遺伝子に組み込んで、生きた細胞内で融合タンパク質として発現でき、電子顕微鏡で検出可能な」標識法の開発を試みた。電子顕微鏡で観察できるのは原子散乱因子の大きな重金属により形成されるクラスターである。そこで、このような金属クラスターを分子内に形成する金属結合タンパク質として知られているメタロチオネイン(MT)3分子をタンデムにつないだもの(3MT)を標識として、大腸菌 14 量体シャペロンタンパク質である GroEL の各サブユニットに遺伝子レベルで融合させた。この3MT 融合 GroEL の 1 分子(GroEL-14(3MT))を大腸菌体より精製し、電子顕微鏡で観察したところ、ネガティブ染色像からは、GroEL の特徴的な 14 量体構造が保持されていることが確認できた。一方、無染色像においては、GroEL-14(3MT)が、電子密度を持った黒いスポットとして検出された。さらに、氷包埋したタンパク質を極低温電子顕微鏡で観察した場合も、GroEL-14(3MT)は、3MT を融合していない GroEL と比較して平均 1.6 倍高いコントラストを持った粒子として検出することができた(原著論文 1)。

また、生体分子の細胞内局在の観察は、主に免疫電子顕微鏡法によって検討されている。3MT を用いた標識法が、電子顕微鏡で観察が可能な、「遺伝子レベルで融合させた標識」であることを確認するために、神経細胞の足場タンパク質である postsynaptic density-95 (PSD-95)に 3MT を融合し(PSD-95-3MT)、細胞切片の観察を行った。海馬初代培養細胞にアデノウイルスを用いて PSD-95-3MT の cDNA を遺伝子導入し、MT にカドミウムを結合させるため培養液に CdCl_2 を添加し培養した。細胞をアルデヒド系固定剤及びオスミウムで固定した後、脱水し、EPON812 に包埋した。薄切片をウランと鉛で電子染色し、観察を行った。PSD-95-3MT を遺伝子導入し、 CdCl_2 を添加した神経細胞では、ポストシナプスに電子密度の高い領域が観察された。この領域は、培養液に CdCl_2 を添加していない細胞や、PSD-95-3MT を遺伝子導入していない細胞では認められなかった。また、シナプスのマーカー分子であるシナプトフィジンとの共染色により、PSD-95-3MT が、PSD-95 と同様に、シナプスに局在することを確認した。更に、免疫沈降によって、PSD-95-3MT が、PSD-95 と同様に、NMDA 型グルタミン酸受容体、カリウムチャンネル、および神経型一酸化窒素合成酵素と結合することを確認した。これらのことから、カドミウム結合3MT は、PSD-95 の局在や機能に影響を及ぼすことなく、細胞内で発現した PSD-95 の TEM 観察を可能にする標識として利用できることが示された(原著論文2)。

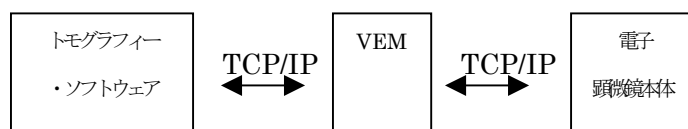
<電子線トモグラフィー観測グループ>

培養細胞や、組織切片における生体分子のクライオトモグラフィーの実現、および高分解能撮影条件の最適化を目指し、以下の実験を計画し実行した。(1)傾斜機能付きヘリウムステージを備えた極低温電子顕微鏡を用いた、手動による傾斜シリーズ像撮影条件の探索。(2)CEMOVIS(非

晶質切片)を再現性よく作製するための条件の探索。大腸菌を非晶質層に氷包埋し、極低温電子顕微鏡によって 4K-20K に試料室温度を保ちつつ、傾斜像を撮影したところ、手動により、表示倍率3万倍にて、電子線損傷による気泡の発生を抑えて 61 枚の画像を得ることに成功した。これにより、制御システムが完成するまでの、分子分解能を目指した最低限の撮影条件が確保できることがわかった。CEMOVIS の作製では、本年度において初めて再現性よく非晶質切片を得ることに成功した。これに至る一連の実験より、重要な点は、切削技術ではなく、加圧凍結時の溶液組成にあることが判明した。

<システム開発グループ>

日立社製電子顕微鏡(H-9500SD)に対して、クライオトモグラフィーに必要なモジュールの一つである、低電子線量撮影システムを完成させた。これにより、電子線損傷の少ない、クライオ撮影が可能となった。傾斜シリーズ撮影モジュールに関しては、概要設計が終り、実装を開始した。本 CREST の開発対象である日本電子社製電子顕微鏡(JEM-2100)の納品が年度末において完了し、現在、CCD カメラを含め、クライオトモグラフィーシステムを整備している。上記システムにおいて、仮想的な電子顕微鏡システム(VEM)を作成することで、異なる電子顕微鏡機器の違いを吸収し、共通のクライオトモグラフィー・ソフトウェアとして実行できるシステムとして設計した。各ソフトウェア間は、TCP/IP のソケットにより通信を行うことで、計算機そのものもネットワーク上から使用できるものとした(下図参照)。



また、3次元再構成に関しては、1 軸、2軸傾斜共に分子トモグラフィーが可能なパッケージを作成した(原著論文3)。トモグラフィーのための3次元再構成法に関して、重み付けの方法を改良し、コントラスト変調関数の補正を行うことができるようにした。また、簡易 GUI を作成できるための Visualmake と呼ばれるソフトウェアを開発し、ユーザビリティを向上させた。

3. 研究実施体制

(1)「分子ラベル開発」グループ

- ① 研究分担グループ長:宮澤 淳夫(理化学研究所、グループディレクター)
- ② 研究項目
 - ・細胞内分子標識法の開発

- ・電子顕微鏡で観察可能な金属結合タンパク質を利用した金属クラスター形成の基礎研究
- ・金属結合タンパク質を融合したタンパク質の発現・精製と構造解析
- ・金属結合タンパク質標識したタンパク質の細胞内での局在の観察と三次元構造解析

(2)「電子線トモグラフィー観測」グループ

① 研究分担グループ長:岩崎 憲治(大阪大学、准教授)

② 研究項目

- ・極低温電子顕微鏡を用いたクライオトモグラフィー撮影条件の探索
- ・再現性ある CEMOVIS 作製方法の開発

(3)「システム開発」グループ

① 研究分担グループ長:安永 卓生(九州工業大学、准教授)

② 研究項目

- ・標識タンパク質を用いた新規トモグラフィー・アルゴリズムの探索
- ・生物分子トモグラフィーのための電子顕微鏡制御システムの開発

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Yuri Nishino, Takuo Yasunaga and Atsuo Miyazawa, A genetically encoded metallothionein tag enabling efficient protein detection by electron microscopy, *Journal of Electron Microscopy*, 56(3), 93-101, 2007
2. Yuko Fukunaga, Ai Hirase, Heyji Kim, Natsuko Wada, Yuri Nishino and Atsuo Miyazawa, Electron microscopic analysis of a fusion protein of postsynaptic density-95 and metallothionein in cultured hippocampal neurons, *Journal of Electron Microscopy*, 56(4), 119-129, 2007
3. 安永卓生、「電子顕微鏡画像解析ソフトウェア統合環境 Eos の試み」、*顕微鏡*, 42 巻 3 号、2007
4. Takuo Yasunaga, Takeyuki Wakabayashi, Evaluation of a 2k CCD camera with an epitaxially-grown CsI scintillator for recording energy-filtered electron cryo-micrographs, *Journal of Electron Microscopy*, 2008, accepted

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:1件(CREST 研究期間累積件数:1件)