

「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

兵庫県立大学大学院生命理学研究科・教授

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

細胞内分子標識法としてメタロチオネイン (3MT) を用いた種々のタンパク質の電子線トモグラフィー観察に向けて、神経細胞の樹状突起スパインの F-アクチン、および神経筋接合部の rapsyn に対して 3MT 標識の検討を行った。まず、精製 F-アクチンの電子顕微鏡観察に向けて、大腸菌を用いた 3MT 標識 β -アクチンの発現検討を行った。同時に、細胞内の F-アクチンの観察に向けて、神経細胞の固定条件などを決定した。また、アセチルコリン受容体の足場タンパク質である rapsyn にも 3MT タグを応用するため、培養筋細胞での Cd の処置濃度と発現検討を行った。さらに、3MT 標識をクライオ電子線トモグラフィーへ応用するために、3MT 標識した目的タンパク質を発現した細胞の凍結切片の作製と観察を開始した。今後、3MT 標識を凍結切断レプリカ法へも応用して 3MT 融合 rapsyn を観察するため、これらの手法を用いた培養筋細胞の観察を開始した。

ヒト血小板において、保持状態の非常に難しい活性化状態を、PMA で刺激後瞬時に非晶質氷層中に固定することで、ヒト血小板の凍結試料のクライオ電子線トモグラフィーに成功した。また、血小板の *in situ* でのアクチン構造を、その構成単位が識別できる分解能で解析、さらに、修飾脂質を使用して細胞接着分子ネクチンの接着様式を凍結試料にて観察した。これと並行した相関顕微鏡観察により、シナプスにおける接着分子複合体ニューレキシン・ニューロギン複合体を明らかにした。

システム開発の観点からは、3次元画像処理システムの開発を進めた。特に、GPGPU、3D 等の最近の計算機の発展に応じて、ソフトウェアの展開を進めている。また、汎用ソフトウェアの開発に鑑み、商用ソフトウェアとの連携を強め、これまで開発してきたアルゴリズムやノウハウを提供した。

§ 2. 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(兵庫県立大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・金属結合タンパク質標識の種々タンパク質への応用
- ・金属結合タンパク質標識の凍結切断レプリカ法、クライオ電子線トモグラフィーへの応用

(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と解析方法の探索
- ・再現性ある CEMOVIS 作製方法の改良

(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(九州工業大学大学院、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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1)「分子ラベル開発」グループ

3MT を用いた細胞内分子標識法の種々生体内タンパク質への応用の一つとして、興奮性神経細胞のスパインに存在する繊維状タンパク質である F-アクチンの 3MT 標識の検討を行っている。精製した F-アクチンのコントラストが 3MT によって増強されることを確認するために、本年度は 3MT 融合 β -アクチンの発現検討を行った。3MT 融合 β -アクチンを組み込んだコールドショック発現系のベクターと、シャペロンタンパク質を発現するベクターの両者で大腸菌を形質転換し、低温での大腸菌培養を行った。その結果、3MT 融合 β -アクチンの可溶性画分を増やすことに成功した。今後は発現した 3MT 融合 β -アクチンを精製し、電子顕微鏡で観察する予定である。また、神経細胞内に発現した F-アクチンの電子顕微鏡観察に向け、化学固定による F-アクチンの崩壊を低減させる固定条件の検討を行った。固定剤にアクチン重合を安定化させる phalloidin やタンニン酸を添加する、あるいは加圧凍結した後アルデヒド系固定剤を用いずに凍結置換した場合、神経スパイン内の F-アクチンネットワークが電子顕微鏡で観察できることを確認した。そこで、組み換え用アデノウイルスを用いて 3MT 融合 F-アクチンを発現させ、塩化カドミウムを処置した海馬初代培養細胞を、電子染色を行わない条件で電子顕微鏡観察を行った。その結果、繊維状構造を確認するには至らなかったが、塩化カドミウム由来であると考えられる電子密度を持つ領域が観察された。今後、試料調製法をさらに改良し、繊維状構造の観察を目指す。

また、rapsyn への 3MT 標識の検討を開始した。rapsyn はニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)の足場タンパク質であり、神経筋接合部の分化・成熟に伴って nAChR とクラスターを形成する。クラスターの形成は神経筋伝達に重要で、分化に伴うクラスターの形成過程は光学顕微鏡で観察されてきたが、電子顕微鏡での解析例はない。そこで、rapsyn の C 末端に 3MT タグを融合したコンストラクト(rapsyn-3MT)を作製し、レトロウィルスを用いて rapsyn-3MT 遺伝子を筋原細胞の染色体に導入して rapsyn-3MT を安定的に発現できる筋原細胞を作製した。この細胞を筋管へ分化させ、光学顕微鏡での観察の結果、rapsyn-3MT は内在性の nAChR と共にクラスターを形成することが確認できた。また、筋管細胞に対して、3MT 標識のために必要な Cd の処置濃度と時間の検討を行った。

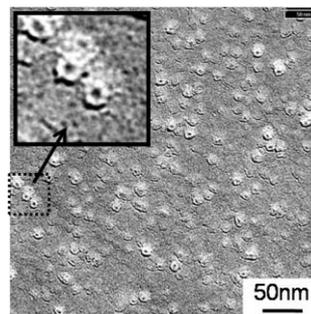


図 1：凍結切断法を用いて観察した筋管細胞表面。左上は拡大写真。

さらに、3MT 標識の凍結切断レプリカ法への応用のための準備を開始した。薄切切片では主に細胞膜を横から見た状態での観察になるが、凍結切断レプリカ法では、細胞膜を垂直方向から見るにより個々の膜タンパク質を観察することができる。rapsyn-3MT クラスターと個々の nAChR 分子を同時に観察することを目的とし、筋管細胞で凍結切断レプリカ膜を作製して、nAChR の観察を開始した(図1)。

3MT 標識のクライオ電子線トモグラフィーへの応用へ向けて、凍結切片の作製、観察を開始した。クライオ電子線トモグラフィーは生きているときに近い状態での細胞内タンパク質の立体構造を解析できる手法とし注目を集めている。我々の開発した 3MT タグを用いれば、標識のための抗原抗体反応を初めとした一切の化学反応を試料作製過程で行う必要がなく、凍結試料、凍結切片へも応用できる。凍結試料内で遺伝的に標識した細胞内タンパク質を検出できるかどうかを確かめるために、まず、GroEL-14(3MT)を発現させ、Cd 処置した大腸菌を加圧凍結し、凍結切片を作製した。無固定・無染色の凍結切片内で大腸菌の内膜、外膜それぞれの脂質二重膜や鞭毛が観察され、細胞質中には精製した GroEL-14(3MT)+Cd を氷包埋し、極低温電子顕微鏡で観察したものと同様の黒い粒が見られた(図 2)。しかし、大腸菌内には GroEL と同じ程度の大きさの生体分子(たとえば、リボソーム等)も存在しており、GroEL-14(3MT)+Cd

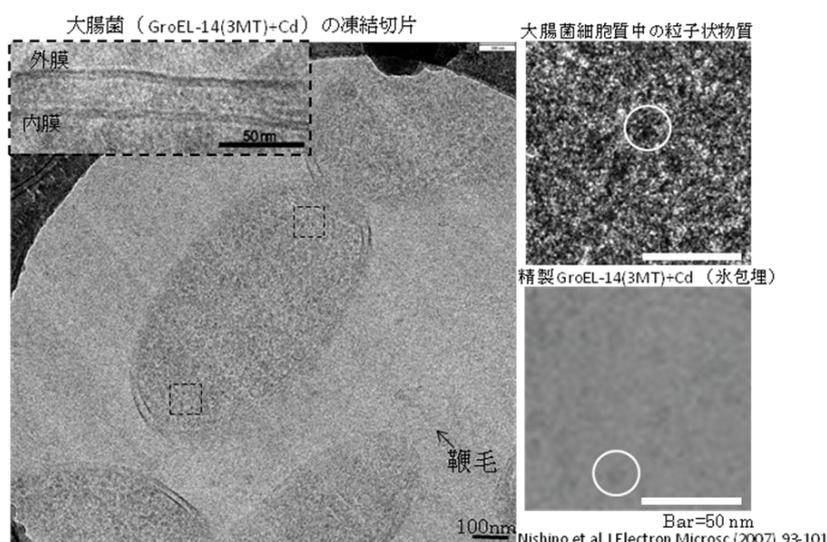


図 2：無固定・無染色状態にある大腸菌の凍結切片の低温電子顕微鏡像。

が本当に検出できたか確かめるために、コントロールの大腸菌の凍結切片の観察やクライオ電子線トモグラフィーによる立体構造解析などの更なる解析が必要だと考えられる。

(2)「電子線トモグラフィー観測」グループ

クライオ電子線トモグラフィーや、スルーフォーカス技術を用いて、組織の分子分解能に成功した。具体的には、ヒト血小板を用いて *in vivo* でアクチンのフィロポディアにおける三次元配列と単位構造、そしてアクチン繊維を結ぶ架橋蛋白質を初めて可視化した(執筆中)。よって、分子分解能を達成するという当グループの目的の第一段階は達成した。さらに様々な細胞・組織についても CEMOVIS とあわせて挑戦することが今後の課題であるが、蛋白研には、クライオ電顕がないため、すぐに処理をしなければならない生ものを扱いながら、他部局・他大学の電顕を予約して研究を進行することは困難を極めることが予測される。

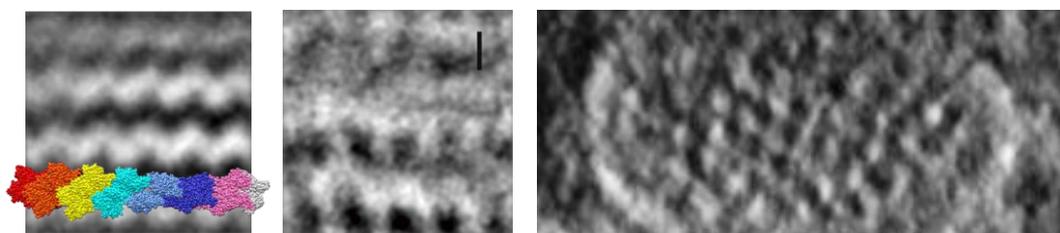


図3:クライオ電子顕微鏡およびクライオ電子線トモグラフィー観察によって明らかになった活性化血小板偽足先端部におけるアクチン繊維。左図:原子構造との比較。中図:アクチン繊維間に別のコントラストが見える。右図、アクチン束の断面図。六方格子状に並んでいる。

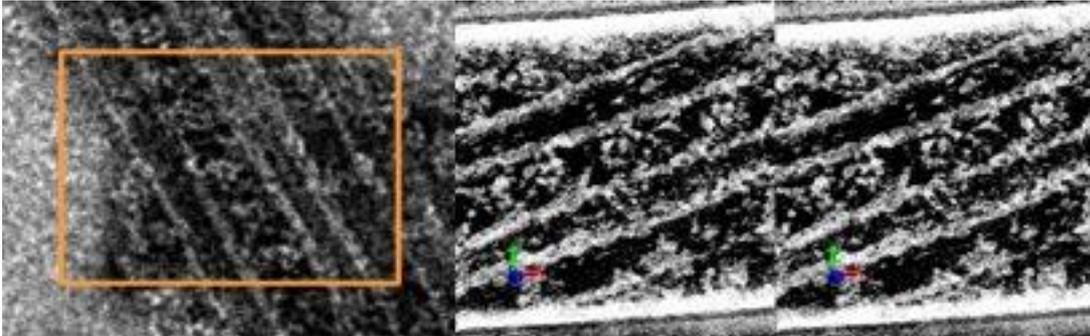
今後の研究に繋がる大きな成果としては、相関顕微鏡法の立ち上げに成功したことである。蛍光顕微鏡により、標的分子の存在を確認し、尚かつ全く同じ場所を電子顕微鏡で観察する方法により分子形態まで観察する例は国内ではない。実際は、神経シナプスにおける接着分子ニューレキシナーニューロリギン複合体の解析に、相関顕微鏡が威力を発揮した。ニューレキシナーとニューロリギンのフラグメントをそれぞれ異なる細胞に発現させ、どちらが発現しているかを用いた蛍光標識で確認し、形成された接着面を電子顕微鏡により観察した。膜間に観察された強いコントラストと結晶構造を比較することにより、その集合形態のモデルを提唱するに至った。



図4:左図、ニューレキシナーおよびニューロリギンをそれぞれ発現させた細胞の蛍光顕微鏡による観察。右図、蛍光顕微鏡で観察された両分子の局在部分(白色部位)を電子顕微鏡で観察したもの。

(3)「システム開発」グループ

システム開発グループでは、CTF を考慮した SIRT 法などの開発に成功している。また、GPGPU を始めとする計算機環境の急速な進展に伴い、開発行程を高速化にシフトした。また、これまで開発してきた三次元再構成システムを用いて、トモグラフィーシステムの改良を進めた。現在、商用ソフトウェア TEMography では解析不可能であったダイニンの画像に成功し、CTF の補正も含めれば、IMOD 等の海外ソフトウェアと同等以上の画像の取得に成功した。



これに加えて、作成したプログラム等の公開を進め、商用ソフトウェア(TEMography, AVIZO)との連携を強めた。日立電子顕微鏡における傾斜シリーズ撮影に関しては、イメージシフトを用いたスポットスキャン撮影+MDS(最小電子線量撮影)のシステムの完成度を高め、現在、連続傾斜像の撮影に取り組んでいる。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Tanaka, H., Kato, K., Yamashita, E., Sumizawa, T., Zhou, Y., Yao, M., Iwasaki, K., Yoshimura, M. and Tsukihara, T. (2009). The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science* 323, 384-388. DOI: 10.1126/science. 1164975
2. Wada, K., Sumi, N., Nagai, R., Iwasaki, K., Sato, T., Suzuki, K., Hasegawa, Y., Kitaoka, S., Minami, Y., Outten, W., F., Takahashi, Y. and Fukuyama, K. (2009). Molecular dynamism of Fe-S cluster biosynthesis implicated by the structure of SufC₂-SufD₂ complex. *J. Mol. Biol.*, 387, 245-258. DOI: 10.1016/j.jmb. 2009.01.054
3. Frederico F. Miranda, Kenji Iwasaki, Satoko, Akashi, Koji Sumitomo, Mime Kobayashi, Ichiro Yamashita, Jeremy R. H. Tamae, and Jonathan G. Heddle. (2009). A self-assembled protein nanotubule with high aspect ratio. *Small*, 5, 2077-2084. DOI:10.1002/sml.200900667

4. Wei, T., Ichiki-Uehara, T., Miyazaki, N., Hibino, H., Iwasaki, K. and Omura, T. (2009). Association of Rice gall dwarf virus with microtubules is necessary for viral release from cultured insect vector cells. J. Virol.,83, 10830–10835. DOI: 10.1128/JVI.01067-09

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)