

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

細胞内標識を用いた生物分子トモグラフィーの応用と、実用化を目指し、下記の研究を行ってきた。まず、3MT 標識を凍結試料に応用するために、海馬初代培養細胞および筋管細胞の凍結切片作製方法を検討し、クライオ電子顕微鏡での観察を行った。PSD-95-3MT-Cd をポストシナプスに発現させた海馬初代培養細胞で電子密度の高い領域が観察された。また、電子線トモグラフィーの撮影方法について、電子顕微鏡のゴニオメーターの精度の低さから生じる傾斜角度の設定値と、実際の値とのずれに注目し、その定量化を行い画像解析に及ぼす影響と実測による改善方法を示した。さらに、生物トモグラフィーによる生物分子の三次元像を効率的かつ精密に得ることを目的として、各種ソフトウェアを開発・公開し、日本顕微鏡学会と合同ワークショップを実施した。今後、トモグラフィーシステムとして統合化し、またSIRTを用いた3次元再構成法の精密化する見通しである。

次に、タンパク質一分子検出を目標として、標識用金属の検討を開始した。これまで多量体やクラスターを形成するタンパク質の電子顕微鏡標識に用いてきたカドミウムよりも原子散乱因子の大きな 13 種の金・白金化合物について検討し、シス-ジアミンジクロロ白金およびトランス-ジアミンジクロロ白金の細胞内取り込みを確認した。さらに、3MT 標識を走査型電子顕微鏡法に応用するための検討や、細胞内標識法の相関顕微鏡法へ適用も検討しており、蛍光顕微鏡の観察領域とまったく同一の視野を電子顕微鏡により高分解能観察する手法を、実際に神経細胞接着分子の構造解析に応用する。

最後に、本課題が最終的に目指している細胞機能の理解へと近づけるため、電顕以外のアプローチである磁気共鳴の標識開発のグループを 12 月よりチームに加えた。それぞれの手法を補完し、展開させ、細胞機能の理解へ貢献できる電子顕微鏡の計測法を探る。

§ 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生命理科学研究科、教授)

② 研究項目

- ・CEMOVIS(非晶質氷法埋試料の低温電子顕微鏡観察)における分子標識の解析
- ・細胞内 1 分子観察のための他の標識用金属の検討
- ・凍結切断法、走査型電子顕微鏡法への3MT 標識の応用

(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 (大阪大学蛋白質研究所、准教授)

② 研究項目

- ・低温電子顕微鏡を用いたクライ電子顕微鏡およびクライオトモグラフィー撮影条件と解析方法の探索
- ・CEMOVIS 法の検証
- ・相関顕微鏡法の開発と応用

(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情報工学研究院、教授)

② 研究項目

- ・生物分子トモグラフィーシステムの開発

(4)「光検出磁気顕微鏡開発」グループ

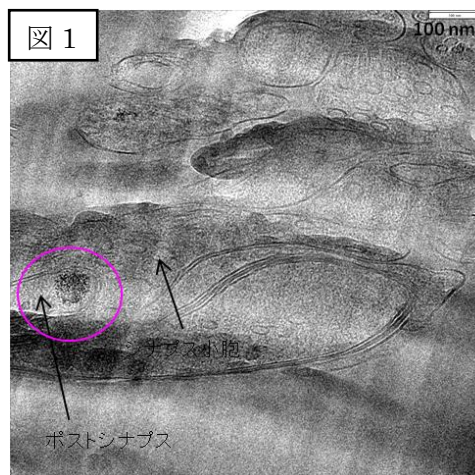
① 研究分担グループ長:白川 昌宏 (京都大学大学院工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・三軸電磁石システムの導入と検証
- ・ダイア粒子の運動性評価と実生体試料を用いた動態リアルタイム計測の実施
- ・高周波照射ならびに光照射のパルス化

§3. 研究実施内容

3MT 標識のクライオ電子線トモグラフィーへの応用に向けて、凍結切片内で 3MT 融合タンパク質クラスターの検出を検討した。まず、化学固定した海馬初代培養細胞内で検出できる事が確認されている PSD-95-3MT-Cd(平成 18 年研究報告書参照)を凍結試料内で検出することを目指した。これまでの報告でも大腸菌や浮遊培養細胞、脳組織などの凍結切片の報告はあるが、今回、凍結切片の作製を試みた海馬初代培養細胞は神経突起を網目状に伸ばしている単層培養細胞で、従来の方で凍結し、切削することができなかった。そこで、この細胞の凍結切片の作製方法の検討を行った。脳組織の凍結切片作製に用いられていたクライオプロテクト(人工脳脊髄液にデキストランとシュークロースを加えたもの)を細胞が生えているディッシュに加え、スクレイパーでシート状に剥がし、加圧凍結装置 EMPACT2 のフラットキャリアーに入れて凍結した。これをクライオウルトラミクローム内にクライオグルー(メタノール:2-プロパノール=1:2)で固定し、凍結切片を作製し、クライオホルダーを用いて観察した。細胞中に微小管の 13 個のチューブリン等が観察でき、シナプス小胞を含むプレシナプス、およびポストシナプスには 3MT-Cd 由来と思われる電子密度の高い領域が観察された(図 1)。また、筋管中の rapsyn-3MT-Cd クラスターについて



も凍結切片を用いた観察を行うために、凍結切片作製方法の検討を行った。筋管は接着細胞として、筋原細胞から分化させて培養することが可能であるが、ディッシュから剥がすと容易に収縮してしまい、本来の細胞の状態を観察することができない。そこで、接着状態を保ったままの筋管の凍結切片を作製する方法を検討した。その結果、小さなプラスチックシート上で筋管細胞を培養してシートごと加圧凍結することにより、シートに接着した状態のまま筋管を凍結切削することが可能となった。これまでの研究で、カドミウムを用いた 3MT 標識によって、多量体や細胞内タンパク質クラスターの電子顕微鏡観察が可能になることを示してきた。本年度、3MT 標識用金属としてカドミウムよりも原子散乱因子が大きい金属を用いて、最終目標であるタンパク質一分子検出に向けた検討を開始した。細胞内に標識用金属を適用するため、4 種の金化合物と 9 種の白金化合物について COS7 細胞と初代培養神経細胞に与える毒性を確認した。その結果、全ての金化合物と白金化合物において塩化カドミウムよりも毒性が低いことが分かった。さらに、白金化合物であるシス-ジアミンジクロロ白金およびトランス-ジアミンジクロロ白金を処置した細胞抽出液中白金含量を定量し、細胞内に取り込まれていることを確認した。今後、これら白金化合物を用いて、GFP-3MT 一分子の電子顕微鏡観察を目指す。こうした透過型電子顕微鏡法における細胞内分子標識は、クライオ走査型電子顕微鏡法(SEM)にも応用できるのではないかと期待される。そこで、通常型 SEM システムを立ち上げ、筋管のクライオ SEM 観察に向けた予備検討を開始した。クライオ SEM では凍結切削した細胞の断面観察が

主となるため、凍結切削の方法を検討し、細胞断面を通常型の SEM で観察することができた。

また、細胞内分子の同定と構造解析のためには、なるべく分解能の高い画像取得が必要になる。このためには、現在の電子顕微鏡用カメラの性能から高倍率での試料撮影が必須となる。しかし、高倍率での撮影は、その後の画像解析に使用しているアライメント用マーカの十分な数の確保を困難にする。このようなとき、マーカを使用しない解析方法—相関関数の計算に基づいた解析方法等—が試されることになる。これらの方法は、必ずしも良い結果をもたらす訳ではないが、複数の未知のパラメーターを全て取得画像から導くことになる。非晶質試料のクライオ電子顕微鏡写真では、シグナル/ノイズ値が非常に小さくなり、よりこれらの計算を不確かなものにしてしまう原因になっている。そこで、できるだけ未知パラメーターを少なくし、計算精度を高める目的で、角度情報について試料ステージの実測を行った。京都工芸繊維大学・陣内浩司博士のアドバイスにより液封入容量式の高精度角度測定器を購入し、大阪大学・超高压電子顕微鏡センターの H9500SD 透過型サイドエントリー式電子顕微鏡のゴニオメーター外側に取り付けた。実際に金コロイドをカーボン膜に吸着させた試料を撮影しながら、傾斜角の測定を行った。角度値のみについて本実測値を用い、他のアライメントは相関法で計算した結果を従来の相関法やマーカを用いた解析方法の結果と比較した。得られたトモグラムの Z 方向の断面（電子線と平行方向の断面）を比較したところ、実測値を用いた場合は、全て相関法に基づいて計算した時と比べて明らかにマーカである金コロイド粒子の虚偽像の減少による改善が認められた。また、低角領域では、マーカ法では、非常に不正確な傾斜角度値を算出しており、実測値を用いた方が良いことが示唆された。一方、本年度は、これまで大腸菌で行った CEMOVIS(非晶質切片)とクライオ電子線トモグラフィーの結果を報告し¹⁾、更に本技術を推し進め、ミドリムシの細胞内における光受容部位 paraflagella body(PFB)の結晶状態観察に成功し、これまで行った PFB 構成成分光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC)の単粒子解析の結果を用いてその周期的な配列を合理的に説明す



図 2

ることに成功した⁴⁾。本年度から生命機能研究科に納入された FEI 社の TitanKrios を用いて、非常に効率よくかつ再現性よくクライオ電子線トモグラフィーを得ることができるようになり、その中でらせん状の蛋白質・DNA 複合体の立体構造を得ることに成功した(図 2)。

さらに、分子標識した試料に対応できるように、トモグラフィーに関して、3次元再構成のためのソフトウェアの精密化、効率化を実施した。また、三次元再構成法 SIRT に関して、CTF 補正を含めた SIRT 法を開発した。更に、その高度化のための調査を行った。並行して、複数のトモグラフィーソフトウェアの評価を行い、問題点等を開発企業に伝え、解析に反映するよう依頼した。また、分子モデルとドッキングのためのソフトウェアの開発も実施した。今後、システム統合を行い、全体のトモグラフィーシステムを構築する。本 CREST 研究で開発されたソフトウェアは、公開され、また、単粒子ワークショップでのデモ等を行った。その結果、複数の研究室で使用されるようになった。また、複数の研究室との共同研究が開始した。そのうち、本 CREST 研究で作成したソフトウェアのうち、CTF 補正、クラスター解析等の手法を用いて、高崎(博士後期課程学生、CREST 支援)、

金、安永は、神谷ら(東京大学)と共同研究を行い、ダイニンの軸糸内のアーキテクチャを解明し、*Cytoskeleton* 誌に発表した⁶⁾。また、安永は、村上、若林ら(帝京大)と共同研究を行い、本 CREST で開発した3次元再構成法に関わる各種ソフトウェアを用いて、アクチンフィラメントの高分解能構造解析の支援を行い、その成果を *Cell* 誌に発表した⁷⁾。分子標識とトモグラフィー・システム開発の観点から、本グループでも、導入された FEI 社製により、鞭毛の氷包埋試料の傾斜シリーズの撮影を実施し、成功した。そこで、鞭毛内のダイニンのサブユニットにメタロチオネイン標識を導入し、その金属標識の有効性を検証した。導入したメタロチオネインの発現チェックを蛍光抗体顕微鏡法とウェスタンブロットにより確認した。金属結合した標識による氷包埋撮影を行い、メタロチオネインに由来すると思われる高い強度のピークを見いだした。これに並行して、メタロチオネインを融合した GFP に関しても、EF-2000(日立社製)により観察し、どのように観察できるべきかを確認した。強度の高いピークが一部に観察され、メタロチオネインに由来する可能性が示唆された。今後、さらに、像質等を改善し、その確度を挙げ、氷包埋試料でのメタロチオネインの見え方を検討する。

そして、本年度 12 月より参画した白川グループは、生細胞において細胞膜、オルガネラ、タンパク質の運動性、構造等をナノメートルレベルで計測しうる光検出磁気顕微鏡(ODMM)の開発を目指している。この装置で得られると期待される細胞、細胞内分子の関する一粒子計測としての情報は *in-cell* NMR によって得られる細胞内タンパク質のアンサンブル計測と合わせて、細胞の生きた状態を定義付ける、構成分子の動的挙動の解明に繋がる。そのため本研究では ODMR 装置と計測・解析手法の開発に加えて、*in-cell* NMR による細胞内蛋白質の観察と *in vitro* における蛋白質の構造・物性変化についても研究を進めた。平成 22 年 12 月から平成 23 年 3 月の期間は ODMR については、下記の 2 項目について大きな進展が得られた。

【ダイヤモンド微粒子を用いた細胞膜の運動性リアルタイム計測】

ダイヤモンド微粒子を用いた細胞膜の運動性の解析手法を開発した。ODMR 顕微鏡によって数十ガウス以下の低磁場下における NVC の全 ESR スペクトル領域を測定することで比較的遅い運動を、特定領域のシグナル強度の変化から速い運動まで計測し得る事を示した。また全スペクトル測定の手法により線虫腸内のダイヤモンド微粒子の運動も追跡しうることも判った。

【電磁石システムの導入と検証】

直交する 3 つの電磁石を使って、任意方向へ最大 30 ガウスの磁場を発生することができるシステムを準備した。また、1kHz までの周波数で磁場方位を回転、または任意方向に静磁場をパルス的に発生できる事前試験運転で判った。また制御プログラムの構築、NVC を使った磁場強度の校正などの準備作業を進めた、平成 23 年度早々に光検出磁気共鳴顕微鏡への統合を完成させ、細胞・生体における運動性解析に取り掛かる予定である。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Kishimoto-Okada, A., Murakami, S., Ito, Y., Horii, N., Furukawa, H., Takagi, J. and Iwasaki, K., “Comparison of the envelope architecture of *E. coli* using two methods: CEMOVIS and cryo-electron tomography”, *J.E.M.*, Vol. 59, No. 5, pp. 419-426, 2010 (DOI: 10.1093)
2. Iwasaki, K. and Omura, T., “Electron tomography of the supramolecular structure of virus-infected cells”, *Curr.Opin.Struct.Biol.*, Vol. 50, No. 5, pp. 632-639, 2010 (DOI: 10.1016)
3. Yamamoto, Y., Mochida, S., Miyazaki, N., Kawai, K., Fujikura, K., Kurooka, T., Iwasaki, K., and Sakisaka, T., “Tomosyn Inhibits Synaptotagmin-1-mediated Step of Ca^{2+} -dependent Neurotransmitter Release through Its N-terminal WD40 Repeats”, *J. B. C.*, Vol. 285, No. 52, pp. 40943-40955, 2010 (DOI: 10.1074/jbc.M110.156893)
4. Miyazaki, N, Iseki, M., Watanabe, M., Hasegawa, K., Kobayashi, K., Fujiyoshi, Y. and Iwasaki, K. The IFSM international microscopy congress IMC17, Rio de Janeiro, Brazil, September 19-24, 2010, Edited by Guillermo Solórzano and Wanderley de Souza, DVD, L16.26. (proceeding)
5. Matsunaga, Y., Iwasaki, K. and Takagi, J. The IFSM international microscopy congress IMC17, Rio de Janeiro, Brazil, September 19-24, 2010, Edited by Guillermo Solórzano and Wanderley de Souza, DVD, L4.4. (proceeding)
6. Takazaki, H., Liu, Z., Jin, M., Kamiya, R., Yasunaga, T., “Three Outer Arm Dynein Heavy Chains of *Chlamydomonas reinhardtii* Operate in a Coordinated Fashion Both In Vitro and In Vivo”, *Cytoskeleton*, Vol. 67, No. 7, pp. 466-476, 2010 (DOI: 10.1002/cm.20459)
7. Murakami, K., Yasunaga, T., Noguchi, T., Gomibuchi, Y., Ngo. K.X., Uyeda, T., Wakabayashi, T., “Structural Basis for Actin Assembly, Activation of ATP Hydrolysis, and Delayed Phosphate Release”, *Cell*, vol. 143, No. 2 pp. 275-287, 2010 (DOI: 10.1016/j.cell.2010.09.034)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22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)