

2. 戦略的方法論研究領域

2-1 ナノ形態生理

永山 國昭 (教授)

1) 専門領域：生物物理学，電子顕微鏡学

2) 研究課題：

位相差電子顕微鏡の開発と生物学，医学への応用

- a) 蛋白質構造解析
- b) ウィルス構造解析
- c) 細胞構造解析
- d) 脳組織形態解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

電子顕微鏡像が物質を通過するとき吸収はほとんどなく散乱が起こる。この散乱は電子波の位相変化となって空間伝播する。位相変化を顕微鏡像に変換する手法として，電子顕微鏡ではボケを意識的に導入するデフォーカス位相差法が実現されてきた。この方法は低周波成分を回復できないためコントラストが弱いという欠点を持ち，現実には固定，染色という試料調整法で解決してきたが，無染色“生”試料の観察が望ましい。われわれは，光学顕微鏡に対応する2つの位相差法を位相板を空間フィルターとして対物レンズ後方に挿入することで実現した。このことにより“生”の試料（急速凍結試料）が無染色で観察できるようになり，生物試料や有機物試料（Furuhata et al, *J. Nanosci. Nanotech.*, Yui et al., *Langmuir*）への応用の道が拓かれた。

2008年度は，位相差法およびトモグラフィー法専用の200kV電顕を導入し，新規軸を開きつつある。

a) 位相差手法の開発

電子顕微鏡の応用の1つに蛋白質構造解析がある。特に結晶を必要としない単粒子解析法は，蛋白質やその複合体の粒子1個1個の実像を解析するので，現場感がある。しかもいろいろな方向の粒子像を集めることで3次元立体構造が構成できる。しかし，従来法では画像が低コントラストのため解析が難しかったが，位相差法の高コントラスト像は，この長年の問題点を解決するものである。今年度は，海外から客員研究員を招き，共同研究を行い種々のサンプルについて，位相差法の定量解析を行った（Danev & Nagayama, *J. Str. Biol.*, Danev et al, *Ultramicroscopy*）。さらに標準サンプル GroEL につき，初めて位相差トモグラフィーを実現した。

b) 蛋白質構造解析

客員教授の飯田氏と共同研究を行い，植物由来の機械センサー膜蛋白質，Mca_o, Mca_r の単粒子解析を行った。

c) ウィルス構造解析

ウィルスの観察は電子顕微鏡の永遠のテーマである。昨年引き続き，ウィルスモデル（Sasaki et al, *Anal. Bioanal. Chem.*）とインフルエンザウィルス（Yamaguchi et al., *J. Str. Biol.*）の構造解析を行った。これら単粒子解析の結果は目覚ましいものであるが，観測される全ての粒子が同一構造を持っているという前提を必要

とする。そこで、インフルエンザウイルス、T4 ファージにつき単独粒子の立体像を再構成する位相差トモグラフィを行った。

d) 細胞内 DNA 形態解析

細胞内の DNA の形態と挙動は原核生物、真核生物を問わず、まだ未知な部分が多い。ヒルベルト微分法の応用として、シアノバクテリアの細胞内 DNA につき BrU の取り組みで高コントラスト化して直接観察した。その結果、DNA 分子がポリリン酸体周辺に局在していることを見だした (Nitta et al., *J. Microsc.*)。

e) 脳組織の凍結切片試料に関し、無染色での高コントラスト電子顕微鏡像に世界で初めて成功し、位相法の新しい応用の地平を切り拓いた (Fukuda, Dissertation)。

4) 学術論文

R. Danev and K. Nagayama, "Single Particle Analysis Based on Zernike Phase Contrast Microscopy", *J. Struct. Biol.*, **161**, 211-218 (2008).

M. Furuhashi, R. Danev, K. Nagayama, Y. Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori and Y. Mitani, "Decaarginine-PEG-Artificial Lipid/DNA Complex for Gene Delivery: Nanostructure and Transfection Efficiency", *J. Nanosci. Nanotech.*, **8**, 1-8 (2008).

H. Yui, H. Minamikawa, R. Danev, K. Nagayama, S. Kamiya and T. Shimizu, "Growth Process and Molecular Packing of a Self-assembled Lipid Nanotube: Phase-contrast Transmission Electron Microscopy and XRD Analyses", *Langmuir*, **24**, 709-713 (2008).

M. Yamaguchi, R. Danev, K. Nishiyama, K. Sugawara and K. Nagayama, "Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus", *J. Struct. Biol.*, **162(2)**, 271-276 (2008).

D. Minkov and K. Nagayama, "Chemical Changes of Evaporated a-C Films upon UV Ashing, Hydration and Drying", *Z. Phys. Chem.*, **12**, 1-2 (2008).

K. Sasaki, K. Kogure, S. Chiaki, Y. Nakamura, R. Moriguchi, H. Hamada, R. Danev, K. Nagayama, S. Futaki and H. Harashima, "An artificial virus-like nano carrier system: enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives", *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 2717-2727 (2008).

I. Hossain, H. Iwasaki, Y. Okochi, M. Chahine, S. Higashijima, K. Nagayama and Y. Okamura, "Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish VSPs", *J. Biol. Chem.*, **283**, 18248-18259 (2008).

R. Danev, R. Glaeser and K. Nagayama, "Practical factors affecting the performance of a thin-film phase plate for transmission electron microscopy", *Ultramicroscopy*, doi:10.1016/j.ultramic.2008.12.006 (2008)

K. Nitta, K. Nagayama and Y. Kaneko, "Visualization of BrdU incorporating DNA in cyanobacterial cells by Hilbert Differential Contrast Transmission Electron Microscopy", *J. Microscopy*, in press (2009).

5) 著書, 総説

山口正視, 岡田仁, ダネフ ラドスティン, 西山清人, 菅原敬信, 永山國昭, "位相差電子顕微鏡によるウイルス観察", *顕微鏡*, Vol. 43, No2. 115-120 (2008).

嶋田睦, 末次志郎, 白水美香子, 永山國昭, 横山茂之, "EFC/F-BARドメインの構造機能解析—エンドサイトーシスにおける細胞膜陥入機構", *日本結晶学会誌*, **50**, 161-168 (2008).

K. Nagayama, “Development of Phase Plates for Electron Microscopes and their Biological Application”, *Euro. Biophys. J.*, 37, 345-358 (2008).

K. Nagayama and R. Danev “Phase contrast electron microscopy development of thin-film phase plates and biological applications”, *Phil. Trans. R. Soc.*, **B363**, 2153-2162 (2008).

永山國昭, ダネフ ラドステイン, “位相差電子顕微鏡－問題解決のヒントは論文のなかにあった!”, *化学 (化学同人)*, Vol. 63, No. 10: 48-50 (2008).

永山國昭, “ナノバイオロジーを切り拓く位相差電子顕微鏡”, *パリティ*, Vol.23, No.10, 30-40 (2008).

6) 国際会議発表リスト

K. Nagayama, “Phase Contrast Electron Microscopy - A Rich Blend of Physics and Biology”, Science in Japan Forum 2008, Washington (USA), (2008.6).

R. Danev, A. Fujikawa and K. Nagayama, “The Structure of Helicobacter pylori VacA by Zernike Phase Contrast TEM”, Gordon Research Conference on Three Dimensional Electron Microscopy, Lucca (Italy), (2008.6).

K. Nagayama, “A Submicron Design for Aharonov-Bohm Effect Hilbert Differential Phase Plate”, Janelia Workshop on Physically Allowed Possibilities in CRYO-EM, Ashburn (USA), (2008.9).

R. Danev, “In-focus phase contrast will lead to a major expansion of what cryo-EM can contribute to structural biology”, Janelia Workshop on Physically Allowed Possibilities in CRYO-EM, Ashburn (USA), (2008.9).

K. Nagayama, “An Aharonov-Bohm Effect Design for Hilbert Differential Phase Plate”, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), Jeju (Korea), (2008.11).

R. Danev, A. Fujikawa and K. Nagayama, “The Structure of Helicobacter Pylori VacA by Zernike Phase Contrast TEM”, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), Jeju (Korea), (2008.11).

M. Yamaguchi, H. Okada, R. Danev, K. Nishiyama, K. Sugawara and K. Nagayama, “Zernike Phase Contrast Electron Microscopy of Ice Embedded Influenza A Virus”, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), Jeju (Korea), (2008.11).

Y. Kaneko, K. Nitta, and K. Nagayama, “Observation of Polyphosphate Bodies and Newly Synthesized DNA in Cyanobacteria by HDC-TEM”, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), Jeju (Korea), (2008.11).

H. Shigematsu, K. Nitta, R. Danev, Y. J. Kim and K. Nagayama, “Direct Observation of Ice-Embedded Cyanobacteria by Using High Voltage Electron Microscope Equipped with Zernike Phase Plate”, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), Jeju (Korea), (2008.11).

K. Nagayama, “A Submicron Design for an Aharonov-Bohm Effect Hilbert Differential Phase Plate”, 39th NIPS International Symposium/ 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging”, Okazaki (Japan), (2008.11).

R. Danev, “Zernike Phase Contrast for Single Particles and Cryotomography”, 39th NIPS International Symposium/ 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging: Synergy of the Advanced Techniques”, Okazaki (Japan), (2008.11).

A. Loukanov, N. Kamasawa, R. Danev, R. Shigemoto and K. Nagayama, “Membrane Proteins Immunolocalization with High Spatial Resolution by STEM-EDX on Freeze-Fractured Replica”, 39th NIPS International Symposium/ 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging”, Okazaki (Japan), (2008.11).

Y. Fukuda, Y. Fukazawa, R. Danev, R. Shigemoto and K. Nagayama, “Tuning of Zernike Phase plate for

Visualization of Detailed Ultrastructures in Complex Biological Specimens”, 39th NIPS International Symposium/ 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging”, Okazaki (Japan), (2008.11).

7) 招待講演

K. Nagayama, “Phase Contrast Electron Microscopy - A Rich Blend of Physics and Biology”, Science in Japan Forum 2008, Washington (USA), (2008.6).

R. Danev, A. Fujikawa and K. Nagayama, “The Structure of Helicobacter pylori VacA by Zernike Phase Contrast TEM”, Gordon Research Conference on Three Dimensional Electron Microscopy, Lucca (Italy), (2008.6).

K. Nagayama, “A Submicron Design for Aharonov-Bohm Effect Hilbert Differential Phase Plate”, Janelia Workshop on Physically Allowed Possibilities in CRYO-EM, Ashburn (USA), (2008.9).

R. Danev, “In-focus phase contrast will lead to a major expansion of what cryo-EM can contribute to structural biology” Janelia Workshop on Physically Allowed Possibilities in CRYO-EM, Ashburn (USA), (2008.9).

K. Nagayama, “A Submicron Design for an Aharonov-Bohm Effect Hilbert Differential Phase Plate”, 39th NIPS International Symposium/ 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging”, Okazaki (Japan), (2008.11).

R. Danev, “Zernike Phase Contrast for Single Particles and Cryotomography”, 39th NIPS International Symposium/ 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging: Synergy of the Advanced Techniques”, Okazaki (Japan), (2008.11).

8) 学会および社会的活動

日本生物物理学会 (理事)

国際純粋・応用生物物理学連合 (IUPAB) (会長)

アジア生物物理学連合 (ABA) (会長)

日本顕微鏡学会 (理事)

日本物理学会

日本蛋白質科学会

科学技術振興機構科学技術理解増進事業統括

岡崎商工会議所情報文化部講演会

群馬県立高崎高等学校スーパーサイエンスハイスクール授業

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

藤田保健衛生大学客員教授

11) 外部獲得資金

CREST, 「ns-nm 分解能電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発」, 永山國昭 (代表) (2006年-2009年).