

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：

- a) 位相差電子顕微鏡の開発と応用
- b) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発と応用
- c) LINAC-HVEMの開発
- d) 細胞内膜系の生理機能とメカニズム

3) 研究活動の概略と主な成果：

a) 位相差電子顕微鏡の開発と応用

無帯電位相板の作成法は一応確立したが，新たな困難が生まれた。すなわちたとえ一見良い無帯電位相板ができて氷包埋試料に電子線を当てると水と有機物がバーストし，試料直下10mm程度の所にある位相板を汚し帯電させることである。この原因については現在2説あり，1つは位相板材料である炭素膜自体が水蒸気下で酸化し帯電するとする説，もう1つは炭素膜上の微小汚れが酸化するとする説である。後者の場合のみこの問題は解決可能である。現在この最後の難関を突破するべく研究を続けている。こうした帯電問題を抱えつつも，位相板を大量に作り帯電したら新品に次々に変えて行くことで，極めて良質の高コントラスト高解像度の電顕像が撮られるようになった。最新の結果として Structure 誌に発表され epsilon 15 フェージ [Murata et al. 2010] および J. Virology 誌に発表されたヘルペスウイルス [Rochat et al. 2010] の高解像度立体構造がある。この他膜蛋白質 TRPV4 の立体構造解析にも応用された [Shigematsu et al. 2010]。

3次元構造をおこすトモグラフィー（立体断層法）でも位相差法は有効性を発揮する。今まで DNA-脂質複合体，蛋白質複合体 [Hosogi et al. 2011]，ウイルス [Danev et al. 2010]，培養神経細胞 [Fukuda et al. 2009] などに応用されてきたが，やはり位相差法独自の高コントラストトモグラムが観察されている。トモグラフィーは平均像でなく真に1個の蛋白質，ウイルス細胞について立体像を起こすので，多数の粒子の平均像に依拠する1粒子解析法より位相差の長所がより生かされる。

b) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発と応用

CRESTの支援を受け開発したのが蛍光顕微鏡と電子顕微鏡を完全一体化し生物試料について同一視野を同一時間で“観”ることを可能とする，電子・光子ハイブリッド顕微鏡である。開発の動機は2つあった。1つは電顕は高分解能だが“観”たい所を観れないことである。電顕は蛍光顕のような特異的ラベルが苦手な上，視野が極めて狭いからである。例えば細胞中に潜むウイルス1匹を探すのはほとんど不可能であった。2つめは蛍光顕と電顕が一体化されれば Google Earth のように自由に“観”たい所を飛び回りかつクローズアップができる自由度が得られるからである。ハイブリッド顕微鏡装置は2009年春に組み上がり，生物学的応用が

現在も続いている。特に蛍光蛋白質発現培養細胞 (PtK2) で YFK-actin の局在が蛍光で特異的に電顕像で高解像度に同時観察できた。

c) LINAC-HVEM の開発

位相差法では電子線が炭素膜がささざるため散乱による多少の像損失が起こり、S/N 比が若干悪化する。この傾向は加速電圧が高くなると改善される。その意味で 500kV 以上の超高圧電子顕微鏡 (HVEM) が位相差と相性が良い。補正予算を受け 500kV 位相差電顕の開発を行った。500kV 電顕は通常 10 億円以上するがそのコストを半減させるため新規のデザインによる電顕を作成した。汎用型で最も性能が安定し多彩な付属機器を持つ 200kV 電顕に線型加速器 (LINAC) 技術を導入し 500kV にアップグレードした。対物レンズ上方に加速器、後方に減速器を置き、対物レンズと試料部分のみ 500kV 加速になるようにした。具体的には 100kV (400kV 加速) 500kV (300kV 減速) 200kV の加減速を行った。現在最終調整に入っている。

d) 細胞内膜系の生理機能とメカニズム

エンドサイトーシス経路やゴルジ体などの細胞内膜系のメンブレントラフィックによる細胞の増殖・分化、組織・形態形成におけるシグナル統合機構を明らかにする事を目的として研究をすすめてきた。たとえばエンドサイトーシス経路は、細胞の環境応答の前線となっているメンブレントラフィック経路であり、ゴルジ体や細胞膜への外向き輸送と、消化器官であるリソソームへの内向き輸送間を選別し、細胞内膜系の分子の運命を決定する。このようなエンドサイトーシス経路の作用は、細胞のシグナル伝達、極性形成などにおいて重要な役割を果たしているが、その機能、メカニズムの詳細はわかっていない。

以前より上皮系細胞の特定の細胞内膜系のオルガネラに局在し、極性細胞の形態形成シグナルを制御する因子の探索同定を、FL-REX (fluorescence localization-based retrovirus-mediated expression cloning) 法を介して進めてきた。極性上皮細胞から cDNA-GFP 融合ライブラリーを構築し、上皮細胞株に発現させ、エンドソーム-ゴルジ細胞内膜系様の局在を示す細胞をクローン化した。得られた GFP 融合蛋白質を解析したところ、これらはもともとなった細胞の cDNA ライブラリー内容を反映すると考えられる特徴的な膜蛋白質群からなり、特定の GFP 融合ライブラリーからは、発生における形態形成シグナル制御に関わっていることが既知である複数の膜蛋白質も得られた。また、特定の膜オルガネラに局在するいくつかの機能詳細不明の蛋白質を同定した。

これまでに、強制発現やアンチセンスモルフォリーノオリゴを用いた機能解析実験の結果、FL-REX 法によりエンドソーム-ゴルジ系に局在することの判明した膜蛋白質の中から、初期発生に関与する新たな機能分子の候補を挙げることに成功した。また、これらの蛋白質の作用メカニズムを解明するため、蛋白質への変異導入により、エンドソーム-ゴルジへの局在シグナルとその制御についての解析をすすめ、複数の翻訳後修飾シグナルによる重層的な局在制御メカニズムを明らかにしつつあり、その役割の解明に取り組んでいる。

今後、引き続き、細胞内膜系のメンブレントラフィックと、細胞の極性形成や組織および個体の形態形成をつなぐ機能分子の探索を行い、その分子レベル、細胞レベル、形態形成レベルでの作用機構を、細胞生物学、分子生物学、生化学的手法を駆使して解析する。このことにより、分子、細胞、組織、個体レベルの各階層をつなぐ、形態形成シグナル制御の統合的理解を目指す。

4) 学術論文

Hideki Shigematsu, Takaaki Sokabe, Radostin Danev, Makoto Tominaga and Kuniaki Nagayama, "A 2.5nm Structure of rat TRPV4 Cation Channel Reveals a Hanging Gondola Shape with a Large Cavity in the Transmembrane

Region” *J. Biol. Chem.*, **285**, 11210-11218 (2010).

Alexandre R. Loukanov, Naomi Kamasawa, Radostin Danev, Ryuichi Shigemoto and Kuniaki Nagayama, “Immunolocalization of Multiple Membrane Proteins on a Carbon Replica with STEM and EDX”, *Ultramicroscopy*, **110**, 306-374 (2010).

Radostin Danev, Shuji Kanamaru, Michael Marko and Kuniaki Nagayama, “Zernike Phase Contrast Cryo-Electron Tomography” *J. Struct. Biol.*, **171**, 174-181 (2010).

Kazuyoshi Murata, Xiangnan Liu, Radostin Danev, Joanita Jakana, Michael F. Schmid, Jonathan King, Kuniaki Nagayama and Wah Chiu, “Zernike Phase Contrast Cryo-Electron Microscopy and Tomography for Structure Determination at Nanometer and Subnanometer Resolutions”, *Structure*, **18**, 903-912 (2010).

Naoki Hosogi, Hideki Shigematsu, Hiroyuki Terashima, Michio Homma and Kuniaki Nagayama, “Zernike phase contrast cryo-electron tomography of sodium-driven flagellar hook-basal bodies from *Vibrio Alginolyticus*” *J. Struct. Biol.*, **173**, 67-76 (2011).

Rochat R H, Liu X, Murata K, Nagayama K, Rixon F and Chiu W, “Seeing the Genome Packaging Apparatus in Herpes Simplex Virus type I (HSV-1) B-capsids” *J. Virology*, **85**, 1871-1874 (2011).

5) 著書, 総説

Kuniaki Nagayama, Radostin Danev, Hideki Shigematsu, Naoki Hosogi, Yoshiyuki Fukuda, Koji Nitta and Yasuko Kaneko, “Phase Contrast Enhancement with Phase Plates in Biological Electron Microscopy” *Microscopy Today*, **18**, 10-13 (2010).

Radostin Danev and Kuniaki Nagayama, “Phase Plates for Transmission Electron Microscopy” *Methods in Enzymology*, **481**, 343-369 (2010).

6) 国際会議発表リスト

K. Nagayama, “Phase Contrast Innovation and CLEM (Correlative Light-Electron Microscope)”, China-Japan Cryo-EM Forum 2010, Beijing (China), January 2010.

K. Nagayama, “Phase Contrast Electron Microscopy and Integrative Bioimaging”, The 3rd International Symposium for Bioimaging, Okazaki (Japan), January 2010.

K. Nagayama, “An Electron-Photon Hybrid Microscope for Real-time Correlative Microscopy”, Gordon Research Conference 2010: Three Dimensional Electron Microscopy, Il Ciocco (Italy), June 2010.

K. Nagayama, “Phase Plates Free from Contaminant Charging”, Microscopy & Microanalysis 2010, Portland (USA), August 2010.

K. Nagayama, “Phase Plate Electron Microscopy Opens a Novel Nano-Imaging from Protein to Brain”, The 4th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology, Shanghai (China), August 2010.

K. Nagayama, “Charge-free Phase Plate Electron Microscopy”, International Workshop of 3D molecular Imaging by Cryo-EM, Beijing (China), August 2010.

K. Nagayama, “On-line and Off-line Correlative Light-Electron Microscopy”, 6th International Conference on Structure Biology & Functional Genomics 2010, Singapore (Singapore), December 2010.

7) 招待講演

永山國昭「位相差電子顕微鏡と統合バイオイメージング」, 2009年度日本顕微鏡学会関西支部特別企画講演会, 岡崎, 2010年1月

永山國昭「[越境と出会い]で育まれる科学の精神性」, 第48回生物物理学年会, 仙台, 2010年9月

永山國昭「科学コミュニケーションを雑用にしないために」, 生物物理フォーラム, 第48回生物物理学年会, 仙台, 2010年9月

永山國昭「4次元イメージングで観る新しい自然像」, 大学共同利用機関シンポジウム「万物は流転する」, 東京, 2010年11月

永山國昭「IUPABの50年とこれから」, 日本生物物理学学会50周年記念講演会, 東京, 2010年12月

8) 学会および社会的活動

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) (理事)

日本生物物理学学会

日本顕微鏡学会

日本物理学会

日本化学会

日本学術会議 IUPAB 分科会委員長

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

12) 特許

発明者: 永山國昭, 飯島寛文, 寺川進, 新井善博

出願者: 自然科学研究機構, Nagayama IP Holdings, LLC, 日本電子 (株)

題目: 複合顕微鏡装置

出願番号: 特願 2010-88201

発明者: 永山國昭, 永谷幸則, 新井善博

出願者: 自然科学研究機構, Nagayama IP Holdings, LLC

題目: 電子顕微鏡用対物レンズ系

出願番号: 特願 2010-134729