

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22121004

研究課題名(和文)シグナル制御複合体の構造と細胞内局在の電子顕微鏡解析

研究課題名(英文)Electron microscopy of structure and localization of signal processing complexes

研究代表者

佐藤 主税(Sato, Chikara)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：00357146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 79,300,000円

研究成果の概要(和文)：シグナルを制御するタンパク質複合体で、結晶を作り難い複合体を対象に、電子顕微鏡による単粒子解析法を開発して適用範囲を広げ構造を決定する。これら構造に、X線による部分構造を当てはめSecDFなどの構造解釈を行った。

また、複合体の細胞内での局在と離合集散機構を高分解能観察するために、大気圧電子顕微鏡法(ASEM)を開発した。ASEMは薄膜窓越しに水中を観察し、ハイスループットで高分解能である。水中での高効率な免疫ラベル法を開発し、トリニパ球中でのSTIM1の超複合体形成を観察した。また、微小な3次元結晶の観察法を確立し、X線結晶作製に貢献した。同時に、ASEMを8窓に多窓化し観察効率を向上させた。

研究成果の概要(英文)：Protein complexes are essential for various kinds of physiological functions in the human body. By developing single particle analysis (SPA) using Transmission electron microscopy (TEM), the three-dimensional (3D) structure of signal processing protein complexes. Further, these structures including SecDF are interpreted by docking partial structure determined by X-ray crystallography.

The new atmospheric scanning electron microscope (ASEM) observes samples through electron-transparent film. Therefore, samples can be set in solution under an open atmosphere. Using this system, immuno-ASEM was successfully developed, and we have observed intracellular super-molecular-complex formations, including accumulation of STIM-1 in response to Ca²⁺ store depletion. Moreover, the observation method of small protein crystals are developed, and contributed to X-ray crystallography. Further, by multi-windowing ASEM, the observation efficiency was improved.

研究分野：構造細胞生物学

キーワード：シグナル伝達 分子複合体 電子顕微鏡 タンパク質構造 イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

本研究の開始当初は、電子顕微鏡単粒子解析・大気圧電子顕微鏡(ASEM)による観察は未だに限られていた。単粒子解析法では、分子量 200kDa 以下のタンパク質、特に膜タンパク質の構造決定は容易ではなかった。さらに、対称性の低い分子は難しい。例えば、SecDF は、mRNA からの分泌タンパク質や膜タンパク質の翻訳生産において、翻訳ペプチド鎖の小胞体膜透過の効率を上げるといふ普遍的で重要な役割を果たす、分子量は 100kDa 強の膜タンパク質である。このような生理的機能を果たすために、SecDF タンパク質は、2つの構造をとることが X 線結晶解析により示唆された。すなわち、SecDF 全体の最安定構造が解かれ、さらに部分構造を X 線結晶解析することで、第 2 の構造を取り得ることが判明した。部分構造は SecDF の準安定構造を反映すると思われるが、準安定構造の全体構造は未だ解かれていなかった。その理由の一つとして、SecDF が 200kDa より小さな非対称膜タンパク質で、単粒子解析が難しかったことが挙げられる。また、ASEM に関しても、水中を高分解能観察できる点で画期的であるが、その適応対象は繊維芽細胞など、主に一部の培養細胞に限られている。免疫電顕も行われていない。また、結晶化溶液中のタンパク質結晶を、光顕以上の高分解能で観察する方法はなかった。

2. 研究の目的

シグナルを制御するタンパク質複合体で、結晶を造り難い複合体に焦点を合わせて、透過電子顕微鏡による単粒子解析法を開発して適用できるタンパク質の範囲を広げる。特に 200kDa 以下の小さな非対称膜タンパク質の構造決定を可能にする。さらに、実際に 200kDa 以下の生理的に重要な非対称膜タンパク質の構造を決定する。また、これらの構造に、X 線による部分構造を当てはめ構造解釈をする。また、複合体の細胞内での局在と離合集散機構を高分解能で観察するために、大気圧電子顕微鏡法(ASEM)を、さらに開発する。ASEM は、薄膜窓越しに水中を観察する、ハイスループットで高分解能な顕微鏡である。特にタンパク質局在の解明のために、水中での細胞に対する高効率な免疫ラベル法を開発する。また、ASEM の高い分解能を利用し、微小な 3 次元結晶の観察法を確立し、X 線結晶解析を大幅に加速する。同時に、ASEM を多窓化し観察の効率を向上させる。

3. 研究の方法

本研究では、(i)精製タンパク質の透過電子顕微鏡(TEM)画像から情報学的再構成により立

体構造を導き出す単粒子解析法と、(ii)細胞を水溶液中で化学固定するだけで走査電顕と蛍光顕微鏡で同時観察できる大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)を開発する。特に、単粒子構造解析法を柔軟な情報処理を用いて開発し、シグナリング複合体を選んで全体複合体構造を高分解能で決定する。ASEM 用の水中ラベルは、光顕と走査電顕の両方で用いられるように、蛍光ナノゴールドを抗体につけてラベルし、後から金析出で粒径を大きくする。これらの方法は単独で研究に用いられるだけではなく、目的に応じて相互に組み合わせで適用し解析する。

4. 研究成果

(i)単粒子画像解析法:柔軟な情報処理を取り入れてその高精度化を進めた。確率分布に基づく高精度な粒子拾い上げプログラム(Microscopy 2013)と、焼きなまし法(SA)を用いてラセン構造を高分解能決定するプログラム(J Structural Biol 2014)を独自に開発した。分解能は最高で 7.7Å に達した。Signal peptide (SP)を切断する膜タンパク質である SP peptidase(SPP) は C 型肝炎ウイルスやマラリアの増殖などに関わる生理的に重要なタンパク質である。SPP は、4 量体で活性を持ち、4 回対称の弾丸様構造であることが単粒子解析法により解明された。膜貫通部位の内部には、親水性環境の隙間があり、ペプチドの切断反応に水分子が必要であることと良く一致する。その外壁には薄い部分が存在し、基質となるペプチド鎖の導入・排出口と考えられる (JBC 2011)。

また、microtubule は GTP により、離合・伸長が決定される動的な複合体である。さらには細胞内輸送におけるレールになり、microtubule 上での輸送によっても、その構造が制御される。GTP analog 結合による中間体の構造変化を 8Å 台の高分解能で解析し、柔軟な微小管単独で初めて α -tubulin と β -tubulin が区別できた。X 線構造との fitting により α -helix のダイナミックな動きを解明した(JCB 2012)。さらに、輸送モーター KIF5 との結合構造の詳細解明にも成功した(EMBO J 2015)。

画像分類ソフトの開発により、水溶液を用いて、個々のタンパク質を電顕撮影することで、異なる 2 構造を持つ Mg23 イオンチャンネルの混合 2 状態の同時構造決定にも成功した。3 回膜貫通ペプチドによるサブユニットが 6 個と 36 個からなる 2 種の複合体が混在することが判明した (Biochemistry 2011)。

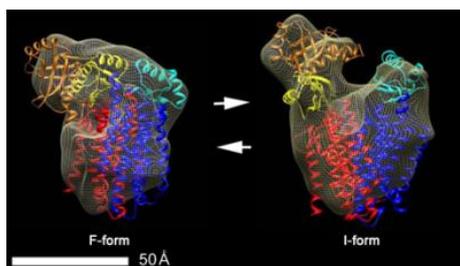


図1 HAADF-STEMによるSecDFの単粒子構造解析。

翻訳時の膜を越えたペプチド鎖の分泌に重要なSecDFも、そのクレーン状の動きを反映する2状態を、暗視野走査TEM(HAADF-STEM)を用いたトモグラフィ解析と単粒子解析を組み合わせることにより決定した(図1: JSFG 2014)。他にも、B型肝炎ウイルス殻等の解析等も行った。

(ii) ASEM:シグナル制御複体の複合体形成と局在とを理解するため、金・蛍光ラベル2次抗体を使った免疫ラベル法を開発してASEMにより8nm分解能での観察を行った。本方法では、水溶液中で抗原が保護されるため、幅広い抗体・抗原の組み合わせによる免疫電顕が可能になった。

本方法を用いて、離合集散を繰り返す複合体である細胞骨格のチューブリン・Actin形成と、ORAIイオンチャンネル複体のCa濃度センサーStim1がER内のCa²⁺枯渇により凝集する様子の観察に成功した(図2: JSB 2012)。

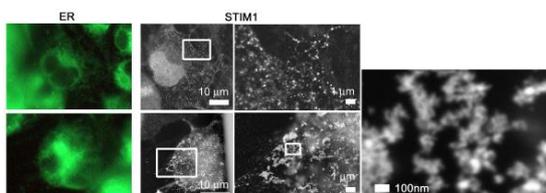


図2. Stim1の免疫電顕.通常分布(上)とER内のCa²⁺枯渇による超複合体形成(下).

さらに、領域内で千田等と連携して、タンパク質の超微結晶のASEMによる観察法の開発を行った。結晶化溶液中で、極めて微小な3次元結晶が直接無染色で観察できた(図3: IJMS 2012)。本法により、より結晶化の初期の段階を捉えることが可能になり、X線結晶解析を大幅に加速することが期待される。

さらに、植村等と協力して、脳神経細胞をASEM dish上で初代培養し、軸索伸長やシナプス形成を高分解能で観察することが可能になった。さらに、プレシナプス形成を誘導するGluR52のN末端領域を、磁気ビーズ表面にコートすることで、ASEM dishの任意

の場所で前シナプスを形成させ詳細構造を観察できた。免疫ラベルとの組み合わせにも成功している

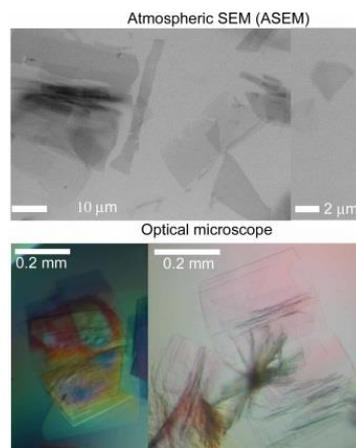


図3. TAF1-β結晶の観察

(Ultramicroscopy 2014)。

また、ASEMを用い、マイコプラズマ(Mycoplasma mobile)の迅速観察法の開発に成功したことは、診断面への応用の可能性を拓いた。マイコプラズマは大腸菌の1/25の体積しかなく、感染初期はもとより、診断は全般的に難しい。抗生物質耐性菌が増えているため、迅速な診断法の開発が求められる。ここでは、固定と金属染色により少ない手間ですぐに観察でき、細胞内に特徴的な構造が見られた(図4: BBRC, 2012)。細菌感染症の診断全般等への応用が期待される。

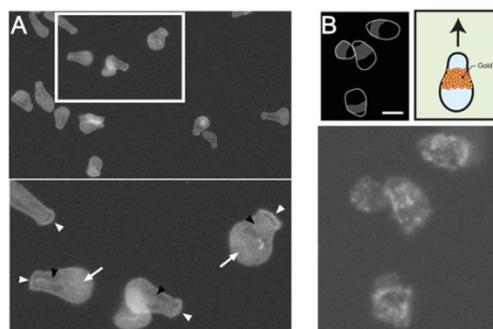


図4 ASEMによるマイコプラズマ観察.染色(左)と足複合体の免疫ラベル(右).

ASEMは組織の観察にも適用できる。切り出した組織ブロックを化学固定後にPTAなどで染色し、薄膜上に載せるだけで、ASEMにより水中で迅速に組織表面2-3μmを詳細に観察できた。胃などの消化管では粘膜細胞に様々な共生細菌が接着している様子が観察され、粘膜細胞と細菌の共生機構の研究やある種の発ガン機構研究への応用が期待される。さらに、乳ガンが転移した肺や脊髄を正常組織と比較観察したところ、ガン細胞は核が大きく明確に識別された(図5)。さらに、薄膜窓上で組織を滑らせながら、広視野観察も可能である。観察窓が200μm×200μmの1枚窓か

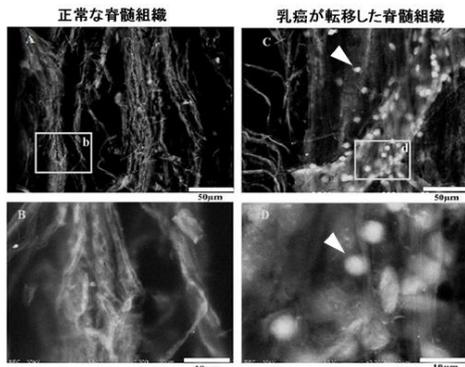


図5. ASEMによる正常脊髄と乳癌転移脊髄の観察. 癌細胞は大きな核で識別できる(白矢印).

ら、250 μ m \times 250 μ m サイズの窓8枚へと多窓化されたことで観察効率は大幅にアップした。従来の術中ガン迅速診断では、凍結後に時間がかかる薄切が必須であった。ここで開発された ASEM による迅速観察法は、凍結薄切が要らないため、ガン術中迅速診断へ応用されることが強く期待される (*International Journal of Oncology*, 2015)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 44 件)

- ① T. Osawa, H. Inanaga, C. Sato, and T. Numata, Crystal structure of the RNA silencing Cmr complex bound to a target analog, 査読有、Molecular Cell. 58、418-430, 2015、DOI: org/10.1016/j.molcel.2015.03.018
- ② M. Morikawa, H. Yajima, R. Nitta, S. Inoue, T. Ogura, C. Sato, N. Hirokawa, Mutual Conformational Changes of Kinesin and GTP-Microtubule Upon their Binding, 査読有、EMBO J. 34、1270-1286、2015、DOI: 10.15252/embj.201490588
- ③ N. Memtily, T. Okada, T. Ebihara, M. Sato, A. Kurabayashi, M. Furihata, M. Suga, H. Nishiyama, K. Mio And C. Sato、Observation of tissues in open aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy: applicability to intraoperative cancer diagnosis, 査読有、Int J Oncol、46、1872-1882、2015、DOI: 10.3892/ijo.2015.2905
- ④ T. Ogura, H. Yajima, R. Nitta, N. Hirokawa, C. Sato、New simulated annealing approach considering helix bending applied to determine the 8.8

A structure of 15-protofilament microtubules, 査読有、J Struct Biol、188、165-176、2014、DOI: org/10.1016/j.jsb.2014.08.009

- ⑤ H. Nishiyama, M. Koizumi, K. Ogawa, S. Kitamura, Y. Konyuba, Y. Watanabe, N. Ohbayashi, M. Fukuda, M. Suga and C. Sato、Atmospheric Scanning Electron Microscope System with an Open Sample Chamber: Configuration and Applications, 査読有、Ultramicroscopy、147、86-97、2014、DOI: 10.1016/j.ultramic.2014.06.001
- ⑥ T. Kinoshita, Y. Mori, K. Hirano, S. Sugimoto, K. Okuda, S. Matsumoto, T. Namiki, T. Ebihara, M. Kawata, H. Nishiyama, M. Sato, M. Suga, K. Higashiyama, K. Sonomoto, Y. Mizunoe, S. Nishihara and C. Sato、Immuno-Electron Microscopy of Primary Cell Cultures from Genetically Modified Animals in Liquid by Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM)、査読有、Microscopy and Microanalysis、20、469-483、2014、DOI: 10.1017/S1431927614000178
- ⑦ K. Hirano, T. Kinoshita, T. Uemura, H. Motohashi, Y. Watanabe, T. Ebihara, H. Nishiyama, M. Sato, M. Suga, Y. Maruyama, N. M. Tsuji, M. Yamamoto, S. Nishihara, C. Sato、Electron microscopy of primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM、査読有、Ultramicroscopy、143、52-66、2014、DOI: 10.1016/j.ultramic.2013.10.010
- ⑧ K. Mio, T. Tsukazaki, H. Mori, M. Kawata, T. Moriya, Y. Sasaki, R. Ishitani, K. Ito, O. Nureki and C. Sato、Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF、査読有、J Struct Funct Genomics、15、107-115、2014、DOI: 10.1007/s10969-013-9168-4
- ⑨ H. Nishiyama, K. Teramoto, M. Suga, and C. Sato、Positively Charged Nanogold Label Allows the Observation of Fine Cell Filopodia and Flagella in Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscopy、査読有、Microscopy Research and Technique、77:153-160、2014、DOI: 10.1002/jemt.22322
- ⑩ M. Kawata, C. Sato、Multi-reference-based multiple alignment statistics enables accurate protein particle pickup from noisy image、Microscopy、査読有、62、2013、303-315、DOI: 10.1093/jmicro/dfs075
- ⑪ M. Kikuchi, S. Iwabuchi, T. Kikkou, K. Noguchi, M. Odaka, M. Yohda, M. Kawata,

- C. Sato, O. Matsumoto, Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of hepatitis B virus core protein dimerized via a peptide linker containing an EGFP insertion、査読有、Acta Cryst. F69、942-945、2013、DOI: 10.1107/S1744309113019957
- ⑫ M. Kikuchi, S. Iwabuchi, T. Kikkou, K. Noguchi, M. Odaka, M. Yohda, M. Kawata, C. Sato, O. Matsumoto, Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of hepatitis B virus core fusion protein corresponding to octahedral particles、査読有、Acta Cryst. F69、165-169、2013、Doi: 10.1107/S1744309112052074
- ⑬ A. Kotake, G. Tajima, Y. Maruyama, J. Nakamura, C. Sato, Susceptibility test of two ca-atpase conformers to denaturants and polyols to outline their structural difference、査読有、J. Membr. Biol.、246, 141-149、2013、DOI: 10.1007/s00232-012-9513-8
- ⑭ Y. Maruyama, T. Ebihara, H. Nishiyama, M. Suga, C. Sato, Immuno EM-OM Correlative Microscopy in Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM)、J. Struct. Biol.、査読有、180、2012、259-270、DOI: 10.1016/j.jsb.2012.08.006
- ⑮ H. Yajima, T. Ogura, R. Nitta, Y. Okada, C. Sato, N. Hirokawa, Conformational changes in tubulin in GMPCPP and GDP-taxol microtubules observed by cryoelectron microscopy、査読有、J. Cell Biol.、198、315-322、2012、DOI: 10.1083/jcb.201201161
- ⑯ C. Sato, S. Manaka, D. Nakane, H. Nishiyama, M. Suga, T. Nishizaka, M. Miyata, Y. Maruyama, Rapid imaging of mycoplasma in solution using Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM)、Biochem. Biophys. Res. Commun.、査読有、2012、1213-1218、DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.111
- ⑰ K. Ohyama, Y. Sugase-Miyamoto, N. Matsumoto, M. Shidara, C. Sato, Stimulus related activity during conditional associations in monkey perirhinal cortex neurons depends on upcoming reward outcome、査読有、J. Neurosci.、32、17407-17419、2012、DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2878-12.2012
- ⑱ Y. Maruyama, T. Ebihara, H. Nishiyama, Y. Konyuba, M. Senda, T. Numaga-Tomita, T. Senda, M. Suga, C. Sato, Direct Observation of Protein Microcrystals in Crystallization Buffer by Atmospheric Scanning Electron Microscopy、査読有、Int. J. Mol. Sci. 13、10553-10567、2012、DOI: 10.3390/ijms130810553
- ⑲ M. Suga, H. Nishiyama, Y. Konyuba, S. Iwamatsu, Y. Watanabe, C. Yoshiura, T. Ueda, C. Sato, The Atmospheric Scanning Electron Microscope with open sample space observes dynamic phenomena in liquid or gas、Ultramicroscopy、査読有、111、2011、1650-1658、DOI: 10.1016/j.ultramic.2011.08.001
- ⑳ H. Miyashita, Y. Maruyama, H. Isshiki, S. Osawa, T. Ogura, K. Mio, C. Sato, T. Tomita, T. Iwatsubo, Three-dimensional structure of the signal peptide peptidase、J. Biol. Chem.、査読有、286、2011、26188-26197、DOI: 10.1074/jbc.M111.260273
- 21 E. Venturi, K. Mio, M. Nishi, T. Ogura, T. Moriya, S. J. Pitt, K. Okuda, S. Kakizawa, R. Sitsapesan, C. Sato, H. Takeshima, Mitsugumin 23 Forms a Massive Bowl-Shaped Assembly and a Conducting Channel、Biochemistry、査読有、50、2011、2623-2632、DOI: 10.1021/bi1019447
- 22 K. Mio, Y. Maruyama, T. Ogura, M. Kawata, T. Moriya, M. Mio, C. Sato, Single particle reconstruction of membrane proteins: A tool for understanding the 3D structure of disease-related macromolecules、査読有、Prog. Biophys. Mol. Biol. 103、122-130、2010、DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.03.001
- 23 K. Mio, M. Mio, F. Arisaka, M. Sato, C. Sato, The C-terminal coiled-coil of the bacterial voltage-gated sodium channel NaChBac is not essential for tetramer formation, but stabilizes subunit-to-subunit interactions、査読有、Prog. Biophys. Mol. Biol. 103、111-121、2010、DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.002
- [学会発表] (計 57 件)
- ① C. Sato, Electron microscopy of proteins and cells in water and ice、12th International Conference on X-Ray Microscopy 2014、2014/10/30、Melbourne (Australia)
- ② C. Sato, Atmospheric scanning electron microscopy (ASEM) of axonal segmentation in neurons and phagocytosis of dendritic cells. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine、2014/10/11、

- Athens (Greece)
- ③ S. Sugimoto, K.-I. Okuda, M. Sato, C. Sato, Y. Mizunoe. Fine structures of biofilms in solution visualized by atmospheric scanning electron microscopy. 9th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine, 2014/10/11, Athens (Greece)
 - ④ C.Sato、 The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes Axonal Segmentation and Synaptic Induction in Solution、 M&M2014、 2014/08/05、 Hartford (USA)
 - ⑤ N. Memtily, K. Mio, M. Sato, T. Ebihara, C.Sato. Observation of Tissues in Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM). M&M2014、 2014/08/05、 Hartford (USA)
 - ⑥ C.Sato、 The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes the Critical Moment of Platelet Generation from Megakaryocytes in Solution. M&M2013、 2013/08/08、 Indianapolis (USA)
 - ⑦ C.Sato、 Rapid Observation with an Atmospheric Scanning Electron Microscope、 MICROSCOPY & MICROANALYSIS 2011、 2011/08/08、 Nashville (USA)

[その他]

ホームページ等

<http://staff.aist.go.jp/ti-sato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 主税 (SATO, Chikara)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ
メディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：00357146

(3) 連携研究者

川田 正晃 (KAWATA, Masaaki)

独立行政法人産業技術総合研究所・人工知
能研究センター・主任研究員

研究者番号：20356843