

電子顕微鏡法のための細胞内 分子標識法の開発

宮澤 淳夫^a

^a 理化学研究所放射光科学総合研究センター構造生理学
研究グループ, JST・CREST

キーワード: 電子顕微鏡法, 分子標識, 可視化, 金属結合タンパク質, 遺伝子組み換え

1. はじめに

現在, 光学顕微鏡の分野では「1分子細胞生物学」と呼ばれ, 生きている細胞内の1分子を直接観察する研究が隆盛を極めている。これはGFPを始めとする蛍光分子を標的タンパク質の遺伝子に組み込んだ1分子蛍光プローブと, エバネッセント照明を利用した全反射蛍光顕微鏡の開発に端を発したもので, これ以前に行われてきた光学顕微鏡による観察手法に革命をもたらした。すなわち, 1分子蛍光プローブを用いることにより, 細胞を破壊せずに, 生きたままの細胞の局所における, タンパク質1分子ごとの動きの情報が得られるようになったのである。

一方, 電子顕微鏡を用いた組織・細胞の観察においては, 近年になって急速凍結による固定技術を基に, 細胞が生きていた時に近い状態を目指した試料調製法が開発されてきた。さらに最近では生体内の状態に非常に近い急速凍結・無染色試料を用いたクライオ電子線トモグラフィーが開発されている。このように, 電子顕微鏡による試料観察では, 薄い組織切片の観察といった二次元情報から一歩進んで, より生体内に近い状態における細胞内の空間配置と生体分子の三次元構造情報を得るための研究に大変な努力が払われている。そこで, 今後最も大きな問題になってくるのが, 細胞内で分子を確実に同定するための分子標識法である。

一般的な薄切切片やレプリカ試料を用いた免疫電子顕微鏡法では, 分子標識に抗体を用いているため, 組織の固定操作により抗原性が弱められたり, 抗体の非特異的な結合の可能性が払拭できなかったりすることがある。また, 電子線トモグラフィーにおいては, 試料を通常よりも比較的厚い切片(数百nm, 超高圧電子顕微鏡では2~3 μ m)を用いること

が多いため, 染色剤や標識用プローブが切片内部まで浸透できなくなる問題が発生する。その結果, アクチンフィラメント¹⁾や粗面小胞体²⁾などの特徴的な形態を持ったものならば容易に識別できるが, 実際の細胞では非常に多くの同じサイズの分子が組織の三次元構造の中に重なってしまうために, 分子標識無くしては特定分子の識別は不可能である。

こうした問題点を解決するために, 光学顕微鏡法に用いられるGFPなどの蛍光分子標識と同様な特徴を備えた, 電子顕微鏡用の分子標識法の開発に取り組んでいる。すなわち, 標識を標的タンパク質の遺伝子に組み込んで, 融合タンパク質として細胞内で発現し, 標的タンパク質の立体構造と生理機能に影響を与えずに100%確実に共存する, 電子顕微鏡で観察可能な標識法の開発である。

何らかの標識分子を標的タンパク質のDNAに直接組み込んだ融合タンパク質を, 電子顕微鏡で観察し, 同定することは非常に困難である。電子顕微鏡で高いコントラストで観察できるのは原子散乱因子の大きな原子, 言い換えれば原子番号の大きな原子(ウランや金など)であり, これらの重原子を組織の電子染色や免疫コロイド金法による標識に用いてきた。しかし, 重金属を標的タンパク質の遺伝子に組み込み, 標識として細胞内で発現させることができず, 電子顕微鏡で観察できる遺伝的にコードされた標識は直接的には不可能である。そこで, 金属と結合するタンパク質やペプチドを標的タンパク質に遺伝的に融合させたタンパク質として発現させ, そこに細胞内に存在する金属が結合したクラスターを形成させることができれば, 電子顕微鏡での分子観察が可能になるのではないかと考えた。

これまで, 生体内に存在する金属イオンや, タンパク質の金属結合モチーフによる金属クラスターを電子顕微鏡で観察した例^{3,4)}はあるが, タンパク質の分子標識に応用した研究は全くない。そこで, このような金属クラスターを細胞内において形成する金属結合タンパク質の1種であるメタロチオネイン(MT)⁵⁾を, 図1に示すように直列につないだMTタグを作製し, 細胞内で発現させた融合タンパク質における分子標識としての可能性を検討した。

2. ホモオリゴマータンパク質(GroEL)の観察⁶⁾

電子顕微鏡によるタンパク質1分子の観察においてMTによる標識の有効性を詳細に検討するため, MT融合タンパク質として, (1)細胞内で集積せず, (2)単分散して存在し, (3)数多くのサブユニットから形成されるホモオリゴマー分子, などの条件を満たす大腸菌のホモ14量体シャペロンタンパク質であるGroELを用いて実験を行った。GroELの各サブユニットに0~5個のMTを融合させたコンストラクトを作製し, CdCl₂(0.2mM)含有培地中の大腸菌で発現させた。それらをカラムにより精製したところ, 各サブユニットに融合させたMTの分子数が増えるほど, GroELの14量体形成が阻害され, 単量体の割合が増加することが分かった。また, 14量体GroELのCd含有量を測定したと

Atsuo Miyazawa: Development of the molecular labeling for electron microscopy

^a 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

TEL: 0791-58-1824; FAX: 0791-58-1826

E-mail: atsuo@spring8.or.jp

2007年11月7日受付

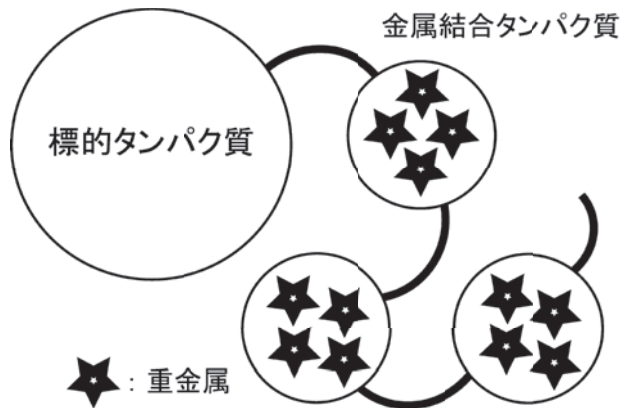


図1 金属結合タンパク質標識のモデル図. 標的タンパク質のC末端側に遺伝的にコードされたメタロチオネイン (MT) が融合し, その分子内に金属クラスターが形成されることにより電子顕微鏡用の分子標識となる.

ころ, MT の数が増えるほど, MT1 分子内の Cd 含有率が減少することが分かった. これらは, MT の分子数が増えるほど大きな標識タグとなるが, 逆にこれが GroEL のオリゴマーの形成を阻害してしまうこと, および大腸菌体内において MT が正しくフォールディングされず Cd と十分結合できなくなることが, 原因として考えられる. そこで, 14 量体 GroEL1 分子当たりの Cd 結合量が最も多かった MT3 分子 (3MT) を融合させたコンストラクト (GroEL-14(3MT)) に関して, カーボン膜上および氷包埋中での詳細な電子顕微鏡観察を行った.

まず, ホモ 14 量体を形成している標識のない GroEL と, 標識タグ (3MT) を融合させた GroEL-14(3MT) を, カーボン膜を貼ったグリッドにアプライし, 電子顕微鏡を用いて電子染色および無染色条件下で観察した (図 2). その結果, Cd クラスター由来と思われる粒子状のコントラストが, 無染色で検出された (図 2 (d)).

さらに, マイクログリッドにアプライした同様のサンプルを急速凍結法により非晶質氷に包埋し, 極低温電子顕微鏡を用いて観察した. その結果, 3 μm アンダーフォーカスで撮影したものでは, 3MT を融合していない GroEL でも位相コントラストにより 1 個 1 個の分子を認識することができるが (図 3 (a)), そのコントラストは GroEL-14(3MT) のほうが強かった (図 3 (b)). また, 1.5 μm アンダーフォーカスでは GroEL-14(3MT) 分子を検出することが可能であるが, 標識のない GroEL では 1 分子を見分けることは非常に困難であった.

次に, 3 μm アンダーフォーカスで撮影したイメージをデジタル化し, GroEL および GroEL-14(3MT) の各粒子像の平均ピクセル強度を計算することにより, ヒストグラムを製作した (図 4). それぞれの粒子像のピクセル強度の平均値を算出した結果, GroEL-14(3MT) 粒子像の平均強度 9.78 ± 2.60 は, 標識のない GroEL の粒子像の平均強度 6.01 ± 1.70 よりも約 1.6 倍高いことが確認できた.

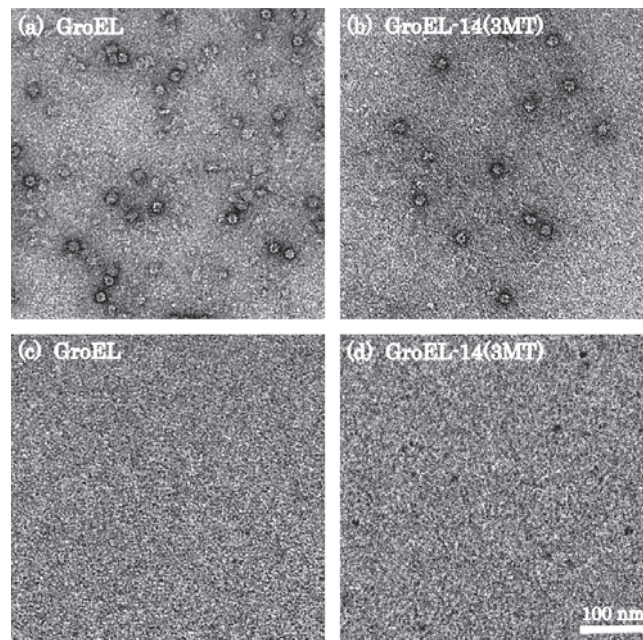


図2 カーボン膜上の GroEL および GroEL-14(3MT) の電子顕微鏡イメージ. カーボン膜上で電子染色した GroEL (a) および GroEL-14(3MT) (b) と, 無染色状態の GroEL (c) および GroEL-14(3MT) (d) について電子顕微鏡観察を行った. その結果, 3MT タグに形成された Cd クラスター由来と思われる粒子状のコントラストが, 無染色条件下にて検出された (d).

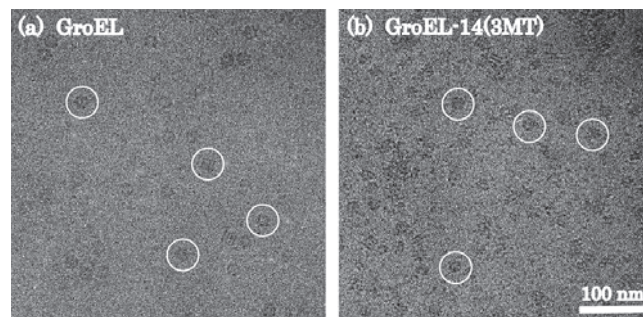


図3 氷包埋した GroEL および GroEL-14(3MT) の極低温電子顕微鏡イメージ. 急速凍結法により GroEL および GroEL-14(3MT) を非晶質氷に包埋し, 極低温電子顕微鏡を用いて 3 μm アンダーフォーカスで撮影した. 3MT を融合していない GroEL (a) でも位相コントラストにより 1 個 1 個の分子を認識することができるが, そのコントラストは GroEL-14(3MT) (b) のほうが強かった. 図中に明瞭に確認できる GroEL 分子, および GroEL-14(3MT) 分子を, 白丸で囲ってある.

3. 細胞内集積タンパク質 (PSD-95) の観察⁷⁾

神経細胞のポストシナプスに局在する足場タンパク質である PSD-95 を標的タンパク質として, 3MT を融合させたコンストラクト (PSD-95-3MT) の観察を行った. PSD-95-3MT は, COS7 細胞を用いて CdCl_2 (20 μM) を含む培地で培養することにより大量発現させることができた. その細胞から PSD-95-3MT を精製し, 原子吸光度法により PSD-95-3MT 分子中に含まれる Cd 含有量を定量した. その結果,

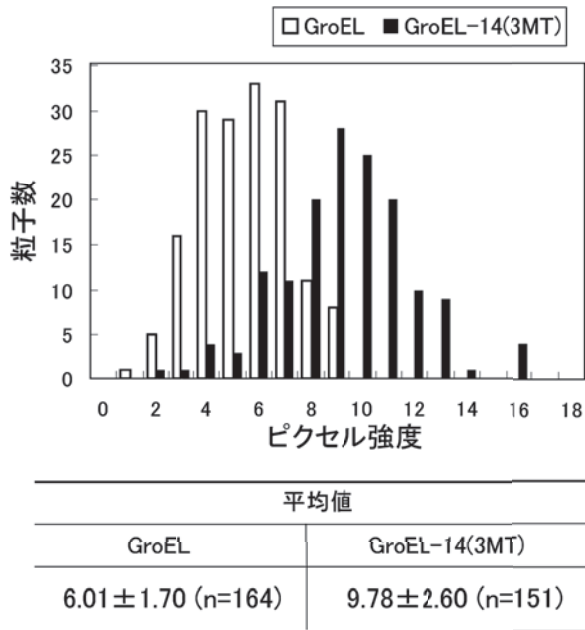


図4 GroEL および GroEL-14(3MT) のコントラスト分布. GroEL および GroEL-14(3MT) の各粒子像の平均ピクセル強度のヒストグラムを作製した. GroEL-14(3MT) 粒子像のピクセル強度の平均値 9.78 ± 2.60 は, 3MT 標識のない GroEL の粒子像の平均強度 6.01 ± 1.70 よりも約 1.6 倍高かった.

MT を融合させていない PSD-95 分子からは Cd はほとんど検出されなかったのに対して, PSD-95-3MT では, 1 分子あたり平均して約 15 個の Cd 原子が含まれていることが確認できた. 1 分子の MT が取り込むことができる Cd 原子数は最大で 7 個⁸⁾ であることから, PSD-95 に融合させた MT が効率良く COS7 細胞内で Cd を取り込んで Cd クラスターを形成していることが確認できた.

次に, 細胞内で発現しポストシナプス集積した Cd 結合 PSD-95-3MT の電子顕微鏡観察を試みた. PSD-95-3MT の遺伝子を導入するための組み換えアデノウイルスを作製し, ラット海馬初代培養神経細胞に感染させた. 感染 3 日目に CdCl_2 ($5 \mu\text{M}$) を培地に添加し, 添加 20 時間後の細胞を観察用のサンプルとした. 定法に従って, 細胞を 2% パラホルムアルデヒド-2.5% グルタルアルデヒド (カコジル酸緩衝液) にて固定, 脱水後エポン 812 に包埋し, 薄切 (80nm) して電子顕微鏡で観察した. 図 5 (a) に示すように, Cd を処置した PSD-95-3MT 発現細胞を電子染色して観察したところ, 電子密度の非常に高い領域をシナプス小胞を特徴とするシナプス終末 (図 5 中の T) に対峙するポストシナプス側に確認することができた. この電子密度の高い領域は, 神経細胞における内在性 PSD-95 の一般的に知られている集積・局在部位と一致するポストシナプス肥厚部 (PSD) の部分^{9,10)} (図 5 (a) の矢印) と共に, サブシナプス領域 (図 5 (a) の矢じり) にも見られた. サブシナプス領域には, これまで免疫染色による PSD-95 の存在¹¹⁾ や, 未成熟なシナプスにおいて高い電子密度が見られること^{12,13)} などが, 報

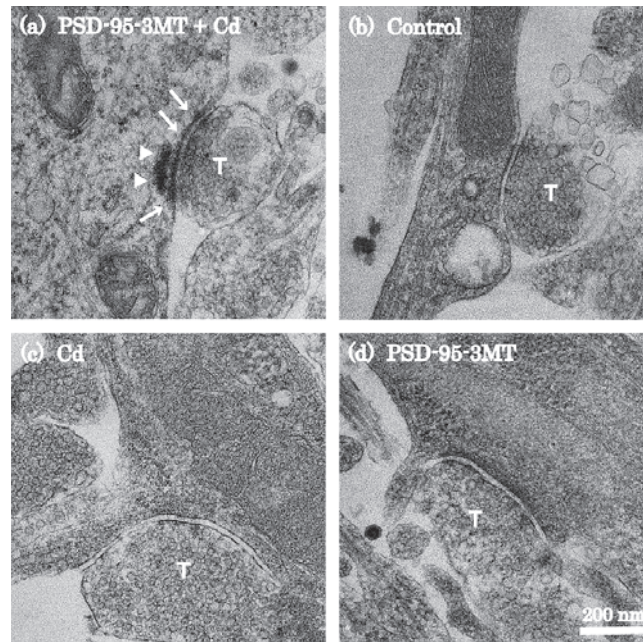


図5 ラット海馬初代培養神経細胞の電子顕微鏡イメージ. (a) Cd 添加 PSD-95-3MT 発現細胞を電子染色して観察したところ, 電子密度の非常に高い領域を細胞内に確認できた. この電子密度の高い領域は, 神経終末 (T) に対峙するポストシナプスの, PSD (矢印) とサブシナプス領域 (矢じり) に存在していた. 無処置 (b), CdCl_2 処置のみ (c), PSD-95-3MT 発現のみ (d) の培養神経細胞には, (a) に見られるような電子密度が全く認められなかった.

告されている. また無処置 (図 5 (b)), Cd 処置のみ (図 5 (c)), PSD-95-3MT 発現のみ (図 5 (d)) の細胞では, このような電子密度の高い領域は, 全く認められなかった. これらのことから, PSD-95-3MT+Cd の細胞で認められた電子密度の高い領域は, PSD-95-3MT に結合した Cd クラスターに起因するものであることが示された. 以上の結果は, 細胞内に発現した PSD-95 に融合している 3MT タグが Cd と結合することで, 電子顕微鏡で観察することが可能になることを示している. このことは, 金属結合タンパク質により細胞内で形成される金属クラスターが, タンパク質の電子顕微鏡用標識として利用できることを意味している.

標識法の開発においては, 標識のために融合させた分子が標的タンパク質の機能を阻害しないことが必要条件の 1 つとなる. 今回, 標的タンパク質として用いた PSD-95 は, 神経細胞においてポストシナプスに集積し, 神経伝達に関わる受容体やイオンチャネル, あるいは細胞内情報伝達分子を産生する酵素などと結合する性質を持っている^{14~16)}. そこで, 3MT タグを融合した時の PSD-95 の機能について検討を行った. Cd を処置した神経細胞に発現した PSD-95-3MT は, プレシナプスのマーカーであるシナプトフィジンと共局在し, 内在性 PSD-95 と同様の分布を示した. 続いて PSD-95 と結合することが知られているシナプス局在タンパク質 (NMDA 受容体 NR2B サブユニット, Kv1.4 および神

経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) との結合を免疫共沈降法により調べたところ, Cd 結合 PSD-95-3MT は, PSD-95 と同様に NR2B, Kv1.4 および nNOS と共沈した. これらの結果より, Cd 処置や 3MT との融合が, PSD-95 のシナプスターゲティングやシナプス局在タンパク質との結合を阻害しないことが明らかとなり, Cd 結合 3MT 標識が, 標的タンパク質の機能を阻害しないという標識分子としての条件を満たすことが示された.

4. おわりに

これまで電子顕微鏡の分野では, 顕微鏡観察の基本ともいえる分子の確実な同定, そのための 1 分子標識技術が十分開発されないまま現在に至ってしまった. その結果, 光学顕微鏡に比べて分解能は格段に高いにもかかわらず, 1 分子計測においては圧倒的な遅れをとっているのが現状である. 電子顕微鏡で観察できる分子標識法が開発されれば, 現在の光学顕微鏡法に匹敵するような, 電子顕微鏡観察が可能になると期待している. そして, 原子レベルの構造解析から, 分子・細胞・組織レベルの三次元観察に至るまで, 非常に広範囲な分解能に渡って正確な計測が可能になり, 新たな細胞機能の発見やタンパク質間の相互作用の解明につながるなど, 生命科学研究において大きな貢献をすることは間違いない.

- 1) Kurner, J., Medalia, O., Linaroudis, A.A. and Baumeister, W.: *Exp. Cell Res.*, **301**, 38–42 (2004)
- 2) Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A. and Hajnoczky, G.: *J. Cell Biol.*, **174**, 915–921 (2006)
- 3) Yamaguchi, M. and Hirano, T.: *Cell Struct. Funct.*, **12**, 131–134 (1987)
- 4) Mercogliano, C.P. and DeRosier, D.J.: *J. Mol. Biol.*, **355**, 211–223 (2006)
- 5) Kagi, J.H. and Schaffer, A.: *Biochemistry*, **27**, 8509–8515 (1988)
- 6) Nishino, Y., Yasunaga, T. and Miyazawa, A.: *J. Electron Microsc.*, **56** (3), 93–101 (2007)
- 7) Fukunaga, Y., Hirase, A., Kim, H., Wada, N., Nishino, Y. and Miyazawa, A.: *J. Electron Microsc.*, **56** (4), (2007) in press
- 8) Nielson, K.B., Atkin, C.L. and Winge, D.R.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 5342–5350 (1985)
- 9) Kim, E. and Sheng, M.: *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 771–781 (2004)
- 10) Boeckers, T.: *Cell Tissue Res.*, **326**, 409–422 (2006)
- 11) El-Husseini, A.E., Craven, S.E., Chetkovich, D.M., Firestein, B.L., Schnell, E., Aoki, C. and Brecht, D.S.: *J. Cell Biol.*, **148**, 159–171 (2000)
- 12) Tachibana, M., Wenthold, R., Morioka, H., Petralia, R.S.: *J. Comp. Neurol.*, **344**, 431–454 (1994)
- 13) Meng, H., Walker, N., Su, Y. and Qiao, X.: *Brain Res.*, **1124**, 197–207 (2006)
- 14) Sheng, M. and Pak, D.T.: *Annu. Rev. Physiol.*, **62**, 755–778 (2000)
- 15) Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L.C., Watabe, A.M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M.F., Morris, R.G., Morrison, J.H., O'Dell, T.J. and Grant, S.G.: *Nature*, **396**, 433–439 (1998)
- 16) Tomita, S., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S.: *J. Cell Biol.*, **153**, F19–24 (2001)