

# 研究系

## Research Activities of the Institute

### 分子生理研究系

## DEPARTMENT OF MOLECULAR PHYSIOLOGY

#### ●概要

分子神経生理研究系は3つの研究部門(神経機能素子研究部門, 分子神経生理研究部門, ナノ形態生理研究部門)から成り立っており, 生理学研究所「研究の5本の柱」のうち, 主に「機能分子の動作・制御機構の解明」を担当している。また, ナノ形態生理研究部門を中心に「四次元脳・生体分子統合イメージング法の開発」にも参加している。

#### ●Outline

Department of Molecular Physiology constitutes of 3 Divisions (Division of Biophysics and Neurobiology, Division of Neurobiology and Bioinformatics, and Division of Nano-Structure Physiology) and is mainly involved in "Clarification of Function and Regulation of Bioactive Molecules", which is one of the five major projects settled in our institute. Also it is actively involved in the project "Development of integrated 4 dimensional imaging of brain structure and bioactive molecules".

#### <目次>

神経機能素子研究部門 P.23  
分子神経生理研究部門 P.26  
ナノ形態生理研究部門 P.29  
(戦略的方法論研究領域)

Division of Biophysics and Neurobiology P.23  
Division of Neurobiology and Bioinformatics P.26  
Division of Nano-Structure Physiology P.29  
(Department of Strategic Methodology)

## 神経機能素子研究部門 Division of Biophysics and Neurobiology

### 職員 (Staff)



#### 教授 久保 義弘

東京大学医学部卒, 同医学系研究科博士課程修了, 医学博士。カリフォルニア大学サンフランシスコ校・ポスドク, 東京都神経科学総合研究所・副参事研究員, 東京医科歯科大学医学部・教授を経て, 平成15年12月から現職。

専攻: 分子生理学, 神経生物学。

#### Professor: KUBO, Yoshihiro, MD, PhD

1985 Graduated from University of Tokyo, Faculty of Medicine. 1989 Completed the doctoral course in Medical Science, University of Tokyo. 1989-2000 Researcher, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience. (1991-1993: Post-doc, University of California, San Francisco). 2000 Professor, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine. 2003 Professor, NIPS.

Specialty: Biophysics, Neurobiology



#### 准教授 立山 充博

東京大学薬学部卒, 同大学院修了, 薬学博士。順天堂大学助手, 米国コロンビア大学博士研究員, CREST 研究員を経て, 平成16年6月から現職。

専攻: 薬理学, 生理学。

#### Associate Professor: TATEYAMA, Michihiro, PhD

1990 Graduated from University of Tokyo, Faculty of Pharmacology. 1995 Completed the doctoral course in Pharmacology, University of Tokyo. 1995-2000 Assistant Professor, Juntendo University School of Medicine. 2000-2002 Research Fellow, Columbia University. 2002-2004 Research Fellow, CREST. 2004 Associate Professor, NIPS.

Specialty: Pharmacology, Physiology



#### 助教 中條 浩一

東京大学教養学部卒, 同大学院修了, 博士(学術)。井上フェロー, 生理学研究所非常勤研究員を経て, 平成17年4月から現職。

専攻: 分子生理学, 生物物理学。

#### Assistant Professor: NAKAJO, Koichi, PhD

1997 Graduated from University of Tokyo, College of Arts and Sciences. 2002 Completed the doctoral course in Life Science, University of Tokyo Graduate School of Arts and Sciences. 2002 Inoue Research Fellow. 2004 Research Fellow, NIPS. 2005 Assistant Professor, NIPS.

Specialty: Molecular Physiology, Biophysics



#### 日本学術振興会外国人特別研究員 KECELI, Mehmet Batu

Hacettepe 大学医学部卒, 同修士課程修了, 総研大博士後期課程修了, 博士(理学)。平成21年10月から現職。

専攻: 分子生理学, 生物物理学。

#### JSPS Postdoctoral Fellow: KECELI, Mehmet Batu, MD, PhD

1999 Graduated from Hacettepe University Faculty of Medicine (Turkey), 2001 Military Obligation, 2002 General Practitioner, Kocaeli Emniyet Hospital, 2003 Research Assistant, Hacettepe University Faculty of Medicine, 2004 Completed the master course, Hacettepe University, 2009 Completed the doctoral course, SOKENDAI.

Specialty: Molecular Physiology, Biophysics

### 研究内容

イオンチャネル, 受容体, G 蛋白質等の膜関連蛋白は, 神経細胞の興奮性とその調節に重要な役割を果たし, 脳機能を支えている。本研究部門では, これらの神経機能素子を対象として, 生物物理学の興味から「その精妙な分子機能のメカニズムと動的構造機能連関についての研究」に取り組み, また, 神経科学的興味から「各素子の持つ特性の脳神経系における機能的意義を知るための脳スライス・個体レベルでの研究」を目指している。

具体的には, 分子生物学的手法により, 神経機能素子の遺伝子の単離, 変異体の作成, 蛍光蛋白やマーカーの付加等を行い, 卵母細胞, HEK293 細胞等の遺伝子発現系に再構成し, パッチクランプ等の電気生理学的手法, 細胞内  $Ca^{2+}$  イメージング・全反射照明下での FRET 計測等の光生理学的手法, 細胞生物学的手法により, その分子機能を解析している。また, 外部研究室との連携により, 構造生物学的アプローチ, 遺伝子改変マウスの作成も進めている。

研究課題は以下の通りである。

- (1) 内向き整流性  $K^+$  チャネルの構造機能連関と, 異なるサブファミリーに属するサブユニットのヘテロ会合
- (2) 代謝型グルタミン酸受容体の多価陽イオン感知機能の分子基盤と生理的意義, およびマルチパスシグナリングの調節機構
- (3) 膜機能蛋白のサブユニット会合および動的構造変化の FRET 法による光生理学的解析
- (4) KCNQ1 チャネルと KCNE サブユニットの会合による膜電位センサーの動きの変化, および会合のストイキオメリーの単一分子蛍光ブリーチ法による解析
- (5) イオンチャネル型 ATP 受容体 P2X<sub>2</sub> の膜電位依存性ゲートの分子基盤
- (6) 膜電位一細胞長変換素子プレスチンの機能複合体の分子同定と動的構造変化の解析
- (7) マウス TRPA1 チャネルのカフェインに対する感受性の質的

種間差異の分子基盤

- (8) 小脳プルキンエ細胞のGABA<sub>B</sub>受容体刺激により活性化するCs<sup>+</sup>透過型K<sup>+</sup>チャンネルの分子同定
- (9) 代謝型 Orphan 受容体 Prrt3 の発現パターンの解析と機能同定
- (10) G 蛋白質調節因子 RGS の機能解析
- (11) P2X<sub>2</sub> チャンネルおよびプレスティンのレコンビナント蛋白の精製と単一粒子構造解析

Research works

Ion channels, receptors and G proteins play critical roles for the excitability and its regulation of neurons. We focus on these molecules which enable brain function. From the biophysical point of view, we study structure-function relationships, regulation mechanisms and dynamic structural rearrangements of ion channels and receptors. We also study the functional significance of specific features of ion channels and receptors in the brain function by making knock-in mice and by studying their abnormalities in the synaptic transmission and whole animal behavior. Specific themes of research projects currently running are as follows.

- (1) Structure-function relationship and heteromultimeric subunit assembly of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels.
- (2) Molecular mechanisms and functional significance of the Ca<sup>2+</sup>/Gd<sup>3+</sup> sensing function and multiple path signaling switching of the metabotropic glutamate receptor.
- (3) Analysis of the dynamic structural rearrangements of ion channels and receptors by FRET measurement under evanescent field illumination.
- (4) Changes of the voltage-sensor movement of KCNQ1 channel by assembly of KCNE subunit and analyses of the stoichiometry of assembly by single molecule imaging.
- (5) Voltage-dependent gating of ATP receptor channel P2X<sub>2</sub>.
- (6) Molecular identification and functional analysis of prestin complex, a motor protein of the outer hair cell.
- (7) Identification of the molecular determinant of TRPA1 channel for the species dependent difference of the caffeine sensitivity.
- (8) Molecular identification of the Cs<sup>+</sup> permeable K<sup>+</sup> channel in the cerebellar Purkinle cells activated by GABA<sub>B</sub> receptor stimulation.
- (9) Analyses of the expression pattern and function of an orphan metabotropic receptor Prrt3.
- (10) Functional analysis of RGS family, regulators of G protein signaling.
- (11) Purification of recombinant proteins of P2X<sub>2</sub> channel and Prestin toward single particle structure analysis.

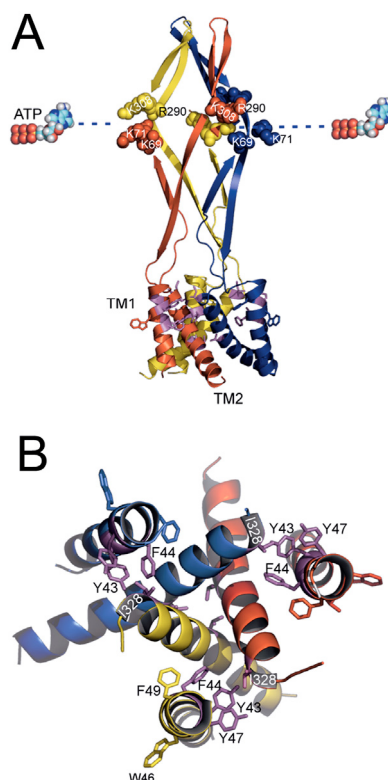


図1 ATP受容体チャンネルP2X<sub>2</sub>の膜電位と[ATP]に依存するゲート機構の構造基盤の同定。変異体解析により同定した重要なアミノ酸残基を、P2X<sub>4</sub>の結晶構造(Kawate et al., 2009)に基づいたP2X<sub>2</sub>のホモロジー構造モデル上にマップした。

Fig. 1. Functional and structural identification of amino acid residues of the P2X<sub>2</sub> receptor channel critical for the voltage- and [ATP]-dependent gating.. (Keceli and Kubo, J. Physiol., 2009)

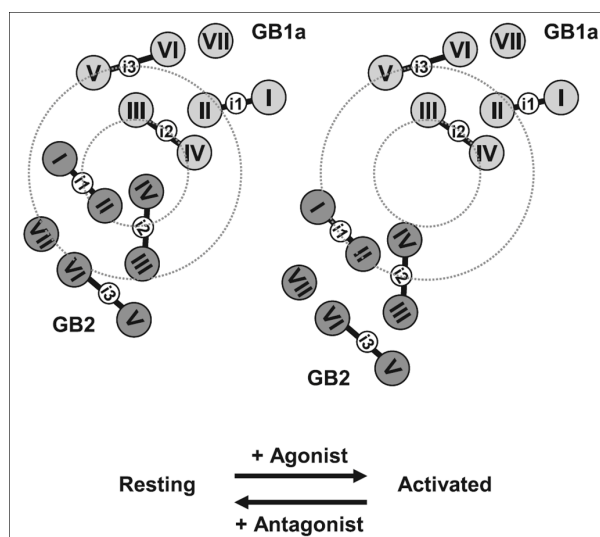


図2 GABA<sub>B</sub>受容体のリガンド結合に伴うサブユニット配置の変化。Fig. 2. Ligand-induced rearrangements of the GABA<sub>B</sub> receptor revealed by fluorescence resonance energy transfer (Matsushita, Nakata, Kubo and Tateyama, J. Biol. Chem., 2010)

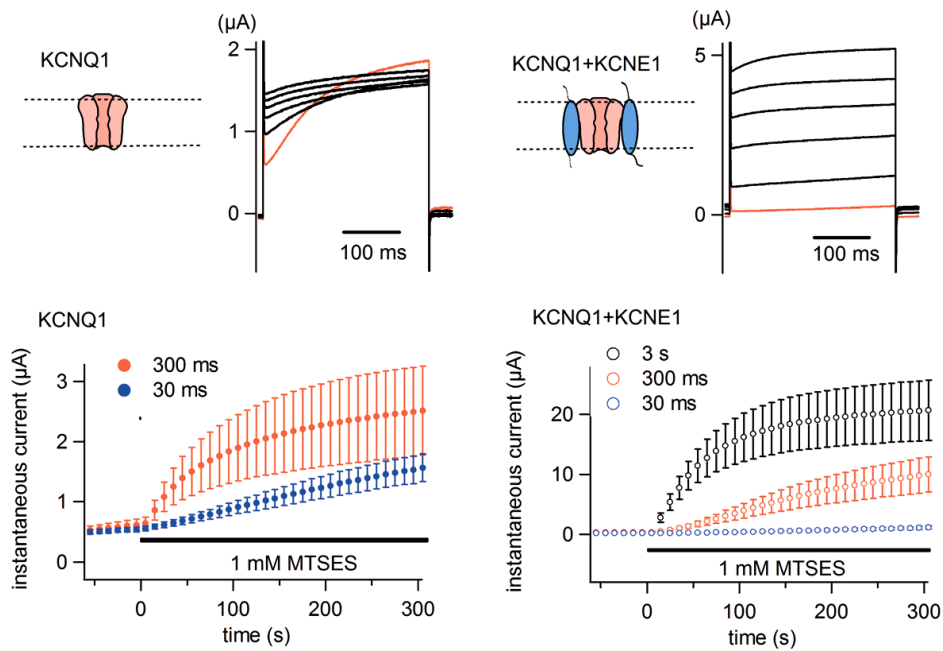


図3 KCNE サブユニット結合による KCNQ1 チャンネル電位センサードメインの動きの制御の MTSES accessibility による解析。

Fig. 3. KCNE1 and KCNE3 stabilize and/or slow voltage sensing S4 segment of KCNQ1 channel. (Nakajo and Kubo, J. Gen. Physiol., 2007)

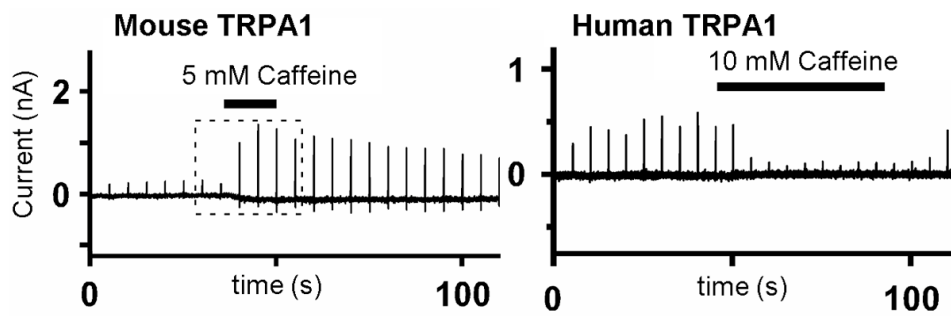


図4 マウス TRPA1 チャンネルはカフェインにより活性化され、ヒト TRPA1 チャンネルは抑制される。

Fig. 4. Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels. (Nagatomo and Kubo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008)

## 分子神経生理研究部門 Division of Neurobiology and Bioinformatics

### 職員 (Staff)



#### 教授 池 中 一 裕

大阪大学理学部卒，同大学院理学研究科修了，理学博士。大阪大学蛋白質研究所助手，助教授を経て，平成4年11月から現職。  
専攻：分子神経生物学。

#### Professor: IKENAKA, Kazuhiro, PhD

1975 Graduated from Faculty of Science, Osaka University. 1980 Graduated from the doctoral course at Osaka University, PhD. 1980 Instructor at Institute for Protein Research, Osaka University. 1991 Associate Professor at Institute for Protein Research, Osaka University. 1992 Professor, NIPS.  
Specialty: Molecular Neurobiology

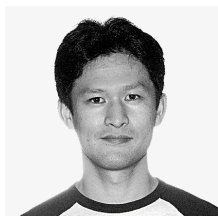


#### 准教授 等 誠 司

東京大学医学部卒，臨床研修および神経内科トレーニングの後，同大学院医学系研究科博士課程修了，医学博士。理化学研究所基礎科学特別研究員，カナダ・トロント大学ポスドク，東京大学医学部助手を経て，平成15年9月から現職。  
専攻：神経発生学，臨床神経学。

#### Associate Professor: HITOSHI, Seiji, MD, PhD

1988 Graduated from Faculty of Medicine, University of Tokyo. MD. 1993 Board-certified neurologist by Japanese Society for Neurology. 1997 PhD from Graduate School of Medicine, University of Tokyo. 1997 Special Postdoctoral Researcher at the Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN). 1999 Postdoctoral Fellow at University of Toronto. 2003 Assistant Professor at University of Tokyo. 2003 Associate Professor at NIPS.  
Specialty: Developmental Neurobiology, Neurology

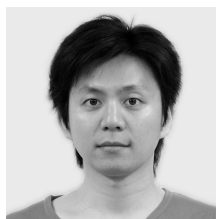


#### 助教 田 中 謙 二

慶応義塾大学医学部卒，同大学院病院精神神経科研修医修了，同大学院医学研究科博士課程修了。医学博士。生理学研究所リサーチ・アソシエイトを経て，平成16年6月から現職。  
専攻：神経生化学，精神神経生物学。

#### Assistant Professor: TANAKA, Kenji, MD, PhD

1997 Graduated from Keio University, School of Medicine. 1997-1999 Resident in Department of Neuropsychiatry, Keio University, School of Medicine. 2003 Completed the doctoral course in Keio University. 2003 Research Associate, NIPS. 2004 Assistant Professor, NIPS.  
Specialty: Neurochemistry, Biological psychiatry

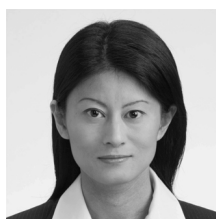


#### 特任助教 吉 村 武

九州大学農学部卒，奈良先端科学技術大学院大学を経て，名古屋大学大学院医学系研究科博士課程修了，医学博士。日本学術振興会特別研究員を経て，平成20年11月から現職。  
専攻：分子生物学，神経科学。

#### Project Assistant Professor: YOSHIMURA, Takeshi, PhD

2000 Graduated from Kyushu University, School of Agriculture. 2002 Graduated from NAIST, Graduate School of Biological Sciences. 2005 Graduated from Nagoya University, Graduate School of Medicine, PhD. 2005-2008 Postdoctoral Fellow, Nagoya University. 2008 Assistant Professor, NIPS.  
Specialty: Molecular Biology, Neuroscience



#### 研究員 稲 村 直 子

京都工芸繊維大学繊維学部卒，神戸大学自然科学研究科修士課程を経て，大阪大学理学研究科博士課程にて学位取得(理学)。  
平成19年10月より現職。

#### Postdoctoral Fellow: INAMURA, Naoko, PhD

Graduated from Kyoto Institute of Technology, Department of Applied Biology. Graduated from the master course in Kobe University, School of Science and Technology. Graduated from the doctoral course in Osaka University, School of Science, PhD. Postdoctoral Fellow, NIPS.  
Specialty: Neural Development

### 研究内容

(1) 神経系の発生過程において，神経系を構成する多くの細胞は共通の前駆細胞である神経上皮細胞から発生・分化してくる。分子神経生理部門では，神経上皮細胞からどのようにして種々の細胞種への分化決定がなされるのか分子・細胞生物学的に研究している。その中でも，グリア細胞の系譜については，未だ不明の点が多く，遺伝子改変マウスの作製，免疫組織学的手法や *in situ hybridization* 法並びにレトロウイルスによる細胞系譜解析を駆使して解析を進めている。また，再生医療を目指して神経幹細胞移植により脱髄マウスを治療することを試みている。

(2) 神経上皮層で増殖し分化の方向の決まった細胞は，機能する部位に向かって移動することが知られている。神経系で見られる細胞移動は，大脳や小脳の皮質形成過程でみられるニューロンの放射状移動については詳細に調べられているが，比較的長距離を移動する正接方向への移動やグリア前駆細胞の移動に関しては，不明な点が多い。このような細胞の移動様式や制御機構を明らかにするために，発達途上の脳内に様々な遺伝子を導入して，形態学的に解析している。

(3) 神経幹細胞は，脳を構成する全ての神経細胞・アストロサ



イト・オリゴデンドロサイトの前駆細胞である。発達期の胎仔脳のみならず成体脳にも存在し、成体脳の特定の部位における神経細胞の新生に関与している。神経幹細胞の発生から、増殖・維持・分化さらに老化に至るまでを制御している分子機構を解明し、神経幹細胞の生体内での挙動を明らかにすることを目指している。

(4) 脳の発達段階における糖蛋白質糖鎖構造を独自に開発した方法を用いて解析したところ、個人間で極めてよく保存されていることが明らかとなった。現在、脳の領域化や癌の発生・転移におけるN-結合型糖鎖の重要性について研究している。

(5) 以上の研究において開発した神経系における遺伝子導入技術を利用して遺伝子治療の基礎的研究を行っている。

## Research works

During the course of formation of the mammalian central nervous system, neuroepithelial cells differentiate into various kinds of cells to make a fine three-dimensional network. Our goal is to understand genetic control over these processes. As a first step, we have cloned several genes that are specifically expressed in a certain type of brain cells and are investigating their role on cell fate determination. Neural cells are known to leave the ventricular zone after their commitment, and migrate towards destinations. While radial neuronal migration has been studied extensively in the developing cerebral and cerebellar cortices, mechanisms underlining tangential migration of neuronal and glial progenitors remains unclear. We are employing in ovo or in utero electroporation method to introduce exogenous genes in developing central nervous system, and studying mode and mechanisms of neural cell migration.

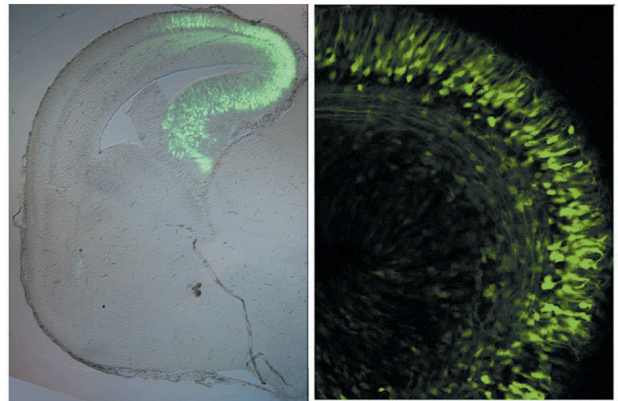
We are making use of hereditary mutant mice that exhibit abnormal development of the nervous system. We also use in situ hybridization and immunohistochemical technique to study cell lineages during development of the nervous system.

Neural stem cells, which are ultimate lineage precursors to all neurons and glia in the mammalian brain, are present not only in embryonic but also in adult brains, and contribute to adult neurogenesis. We are investigating molecular mechanisms underlying the generation, proliferation, maintenance, differentiation, and senescence of the neural stem cells, which will clarify their in vivo kinetics and function.

An automated system to analyze N-linked sugar chains was developed to study their biological roles during development and tumorigenesis.

New retroviral vectors are also constructed for efficient gene delivery, which will be used for cancer gene therapy.

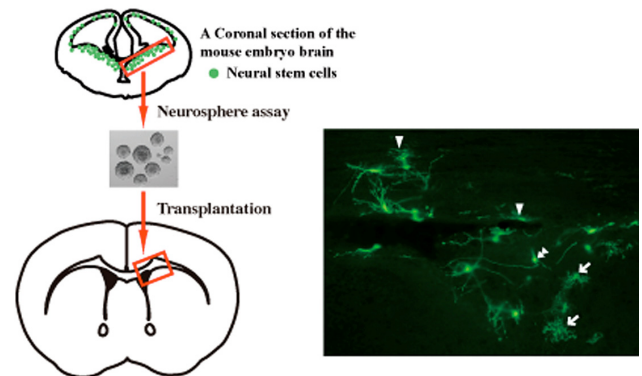
A)



A) エレクトロポレーション法によるマウス胎仔脳への遺伝子導入  
マウス脳室内に緑色蛍光遺伝子(GFP)発現ベクターを注入した後、エレクトロポレーションを行った胎仔脳の限局した領域に効率よく遺伝子導入できることが分かった。

A) In utero electroporation was carried out for plasmid DNA transfer. Green fluorescent protein (GFP) expression vector was injected into lateral ventricle and electroporated in utero. The cells in the restricted region were observed to express GFP

B)



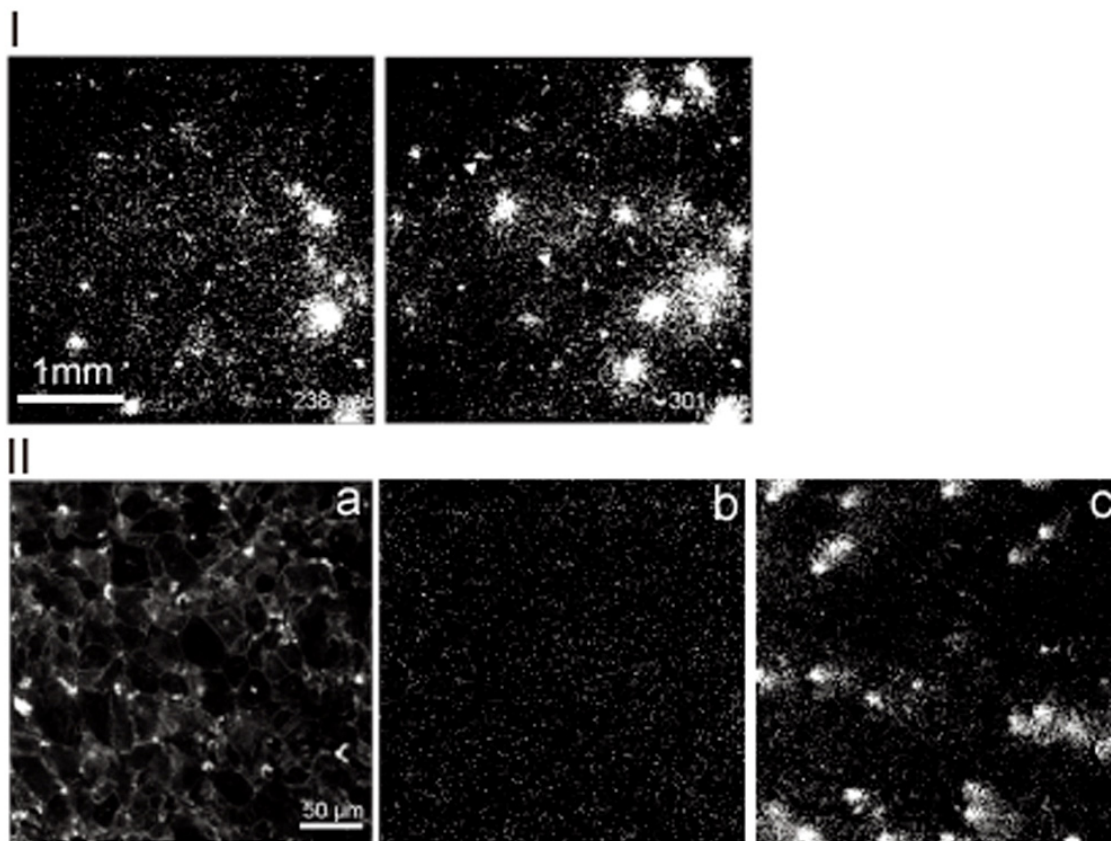
B) 神経幹細胞の成体脳への移植

全身で GFP を発現するマウス胎仔脳より神経幹細胞を培養・単離し、成体脳へ移植した。移植から4週間後の脳において GFP 陽性細胞が観察され、形態からアストロサイト(矢印)・オリゴデンドロサイト(矢頭)・神経細胞(2重矢頭)へ分化したことがわかる。

B) Transplantation of neural stem cells into the adult brain

Neural stem cell-derived neurospheres which are cultured from GFP<sup>+</sup> mouse embryos are transplanted into mouse adult brains. Four weeks after the transplantation, GFP<sup>+</sup> astrocytes (arrows), oligodendrocytes (arrow heads) and neurons (double arrow heads) are present in the adult brain.

C)



C) ATPとグルタミン酸放出の可視化

I) 培養アストロサイト低浸透圧ストレス負荷時に観察される ATP の放出。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光を利用して ATP の局在が可視化できる。

II) 同じく低浸透圧ストレス負荷時に観察されるグルタミン酸の放出。Glutamate optic sensor を細胞膜上に固定し(a), グルタミン酸濃度変化に依存した蛍光強度の変化を求めた。正常状態(b)ではグルタミン酸放出は観察されないが、低浸透圧下(c)ではグルタミン酸放出が一つ一つの白い固まりとして可視化出来る。

C) Imaging of ATP and glutamate release.

I) ATP was released from astrocytes by hypotonic stimulation. ATP was released from astrocytes during about 100~200 sec.

II) Glutamate optic sensor was immobilized onto membrane of astrocytes.

Glutamate was released from astrocytes by hypotonic stimulation (a). To visualize glutamate release the change in the fluorescent intensity was observed (b and c). Before hypotonic stimulation, astrocytes did not release glutamate (b). After the stimulation, glutamate was released from astrocytes during around 10~20 sec (c).

**ナノ形態生理研究部門**  
**Division of Nano-Structure Physiology**

**岡崎統合バイオサイエンスセンター**  
**戦略的方法論研究領域**

**Department of Strategic Methodology,**  
**OKAZAKI INSTITUTE FOR**  
**INTEGRATIVE BIOSCIENCE**

**兼務**

**職員 (Staff)**



**教授 永山 國昭**  
 (生理学研究所兼務)

東京大学理学部卒, 同大学院修了, 理学博士。日本電子(株)生体計測学研究室長, 科学技術振興事業団プロジェクト総括責任者, 東京大学教養学部教授, 生理学研究所教授を経て平成13年2月から現職。  
 専攻: 生物物理学, 電子線構造生物学, 生理現象の熱統計力学。

**Professor (concurrent, NIPS): NAGAYAMA, Kuniaki, PhD**  
 1968 Graduated from University of Tokyo. 1973 Completed the doctoral course in Science, University of Tokyo. 1974 Research Associate, University of Tokyo. 1984 Director, Biometrology Lab, JEOL Ltd. 1990 Project Leader, Nagayama Protein Array Project, ERATO, JRDC. 1993 Professor, The University of Tokyo. 1997 Professor, NIPS. 2001 Professor, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (OIB).  
 Speciality: Biophysics, Electron Microscopy



**准教授 村上 政隆**  
 (生理学研究所より出向)

京都府立医科大学卒, 医学博士。大阪医科大学助手, 生理学研究所助教授を経て平成15年4月から現職。  
 専攻: 分子生理学, 外分泌腺分泌機構とエネルギー供給, 傍細胞輸送。

**Associate Professor (NIPS): MURAKAMI, Masataka, MB, M.D.**  
 1976 Graduated from Kyoto Prefectural University of Medicine. 1976 Research Associate, Osaka Medical College. 1981 Doctor of Medicine in Physiology of Osaka Medical College. 1983 Postdoctoral Fellow, Department of Physiology, University of Sydney. 1985 Associate Professor, NIPS. 2003 Associate Professor, OIB (Seconded from NIPS).  
 Speciality: Physiology of exocrine glands, Energy metabolism and transport of electrolyte and water, Paracellular Transport



**助教 大橋 正人**

京都大学理学部卒, 同大学院修了, 理学博士。ドイツ, ハイデルベルク大学研究員, 生理学研究所助手を経て平成15年7月から現職。  
 専攻: 細胞生物学。

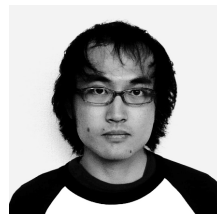
**Assistant Professor: OHASHI, Masato, PhD**  
 1986 Graduated from Kyoto University, Faculty of Science. 1992 Completed the doctoral course in Science, Kyoto University. 1992 Postdoctoral Fellow, Department of Neurobiology, University of Heidelberg. 1996 Assistant Professor, NIPS. 2003 Assistant Professor, OIB.  
 Speciality: Cell Biology



**助教 ダネフ ラドスチン**

ソフィア大学(ブルガリア)物理学部卒, 同大学修士課程修了, 総合研究大学院大学生命科学科修了, 理学博士。生理学研究所非常勤研究員, 日本学術振興会特任助教を経て平成20年4月より現職。  
 専攻: 電子線構造生物学。

**Assistant Professor: DANEV, Radostin, PhD**  
 1997 Graduated from Faculty of Physics, Sofia University, Sofia, Bulgaria. 2001 Completed the doctoral course in Science, The Graduate University for Advanced Studies, NIPS, Okazaki. 2001 Postdoctoral Fellow, NIPS. 2002 Research fellow, OIB. 2006 JST Assistant Professor, OIB. 2008 Assistant Professor, OIB.  
 Speciality: Solid State Physics, Electron Microscopy



**研究員 細木 直樹**

神戸大学農学部卒, 同大学院自然科学研究科修了, 博士(学術)。平成20年4月より現職。  
 専攻: 植物病理学, 植物細胞生物学。

**Postdoctoral Fellow: HOSOGI, Naoki**  
 2003 Graduated from University of Kobe, Faculty of Agriculture. 2008 Completed the doctoral course in Bioresource and Agrobiosciences, University of Kobe. 2008 Postdoctoral Fellow, OIB.  
 Speciality: Phytopathology, Plant Cell Biology



**研究員 香山 容子**

信州大学工学部卒, 名城大学院理工学研究科修了, 博士(工学)。平成20年7月より現職。  
 専攻: 材料工学。

**Postdoctoral Fellow: KAYAMA, Yoko**  
 1998 Graduated from Shinshu University, Faculty of Engineering. 2007 Completed the doctoral course in Science and Technology, Meijo University. 2008 Postdoctoral Fellow, OIB.  
 Speciality: Materials science





生理研研究員 福田 善之  
 神奈川大学理学部卒，総合研究大学院大学  
 生命科学研究所修了，博士(理学)。平成21  
 年4月より現職。  
 専攻：神経解剖学。

#### NIPS Postdoctoral Fellow: FUKUDA, Yoshiyuki

2004 Graduated from Kanagawa University, Faculty of science. 2009 Completed the doctoral course in School of Life science, the Graduate University for Advanced Studies. 2009 Postdoctoral Fellow, OIB. Speciality: Neuroanatomy

### 研究内容

新しい学問領域は、新しい方法論の発見・発明によりスタートすることが多い。例えば、現在医学の診断に幅広く使われている磁気共鳴イメージングは、もともと分光装置として誕生した磁気共鳴 (NMR) から生まれ、近年は機能イメージングとして脳研究にまで利用されている。

このように、各学問分野の急速な発展の裏には新しい方法論の発見がある。その方法論が、新しい分野を生み出すきっかけを与え、それがまた新しい方法論を次々に生む。こうした革新的方法論を戦略的方法論と呼ぶ。

統合バイオサイエンスという新しい学際領域は、領域間の単なる和では確立し得ない困難さを持っている。そこで、領域全体を引っ張る新しい方法論のブレークスルーが必要となる。すなわち、従来の方法では見えなかった1分子レベルの3次元構造解析、分子レベルの機能の入出力解析、細胞系その場の機能観測などを可能にする戦略的方法論が期待されている。

具体的には、以下の研究を行っている。

- (1) 位相差電子顕微鏡の開発と応用—位相観測を可能とする位相差電子顕微鏡(位相差法，微分干渉法，複素観測法)を応用し，蛋白質，ウイルス，オルガネラなどの *in vitro* 立体構造解析と細胞組織の *in vivo* 構造生物学を行う。特に“生”状態の神経細胞系の高分解能観察を行うため光頭と電頭の有機的統合手法，光頭—電頭相関法を開発している。
- (2) 物質輸送研究 I—水，イオン，基質の経細胞及び傍細胞輸送機構，開口分泌の分子機構とエネルギー供給の分子機構の研究を行う。
- (3) 物質輸送研究 II—エンドサイトーシスはゴルジ体への外向き輸送とリソソームへの内向き輸送間の選別装置として働き，細胞内膜系の分子の運命を決定する。このエンドサイトーシス経路をめぐる細胞内膜系の選別輸送の分子機構および細胞のシグナル伝達，極性形成などにおける役割を研究する。

### Research works

A novel methodology, when it is very informative, gives an aid to the opening of a novel scientific field. For example, MRI originally born from NMR in chemistry and primarily developed for diognoses has outgrown to cover almost all medical sciences. We call such a productive innovation, emerged from an old regime but creative to a new field, as a strategic methodology. Integration of biosciences might bring about such a difficulty that a simple sum of constituent disciplines never makes a good start. Fusion of different disciplines can be encouraged by novel breakthroughs in methodology. The expected are new methods for three-dimensional structural analysis of single biological molecules and *in situ* functional observation of complex biological systems.

This laboratory works on methodological themes by relying on the technical breakthrough of imaging methods such as electron microscopy.

(1) Development and application of electron-phase microscopy: Different kinds of phase observation schemes have been developed including the novel optical principle for the reconstruction of complex wavefunctions. They are expected to enhance the contrast of biological samples which is inherently very poor in electron microscopy. Applications are:

- i) direct visualization of protein molecules or cytoskeltons in the *in vivo* state of cells and tissues,
- ii) structural and functional analyses of membrane proteins and viruses with the aid of single particle analysis,
- iii) photon-electron hybrid electron microscopy to visualize intact neurons at a high resolution.

(2) Biological transports: Transcellular and paracellular mechanisms for transport of water, electrolytes, and substrates are investigated by laying much emphasis on molecular mechanism of exocytosis and energy supply for transport in the exocrine glands.

(3) Sorting in the endocytic pathway: The endocytic pathway functions as a sorting station for molecules that are destined either for lysosomes (a degradative pathway) or for recycling pathways, thereby determining the fate of endomembrane molecules. The physiological roles and the mechanisms of sorting in the endocytic pathway are investigated.

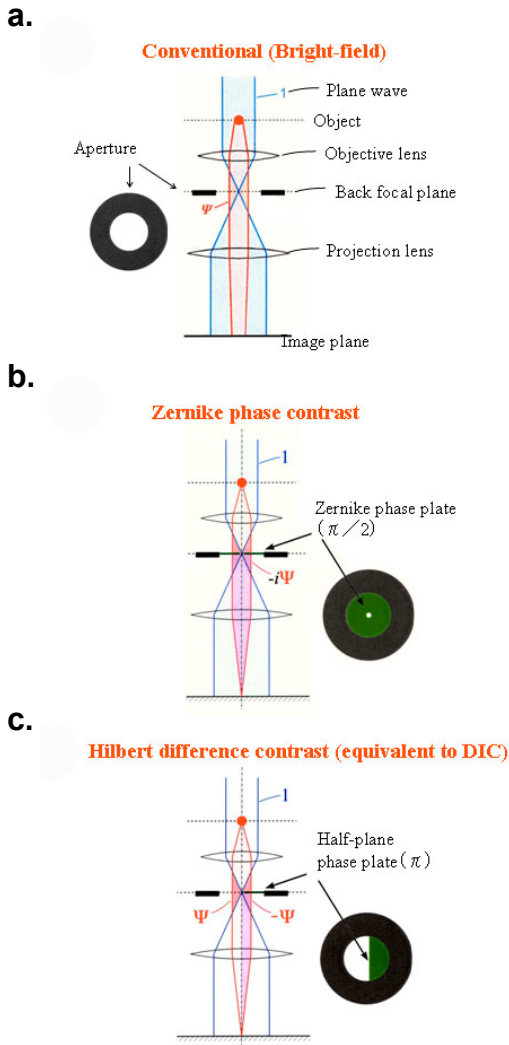


図1. 電子位相顕微鏡法の3種

- a. 焦点はずし(デフォーカス)を導入し、分解能を犠牲にしてコントラストを向上する通常法(明視野法)。
- b. ゼルニケ(Zernike)位相板( $\pi/2$ シフト)を対物レンズ後焦点面に挿入し、正焦点で高コントラストを回復するZernike位相差法。
- c. 半円位相板( $\pi$ シフト)を後焦点面に挿入し、微分干渉光学顕微鏡と同じような地形図的位相像を得るヒルベルト(Hilbert)微分法。

Fig. 1 Three kinds of schemes for electron-phase microscopy.

- a. Conventional (bright-field) method to enhance the image contrast at the expense of a deterioration of the spatial resolution by defocusing.
- b. Zernike phase-contrast method to enhance the image contrast under the just focus condition by inserting a Zernike phase plate to the objective back-focal plane.
- c. Hilbert differential method to obtain phase contrast images similar to light-microscopic DIC (Differential-Interference-Contrast) images by inserting a half-plane  $\pi$  phase plate to the objective back-focal plane. (adapted from *Biophys. Rev* 1 (2009)37)

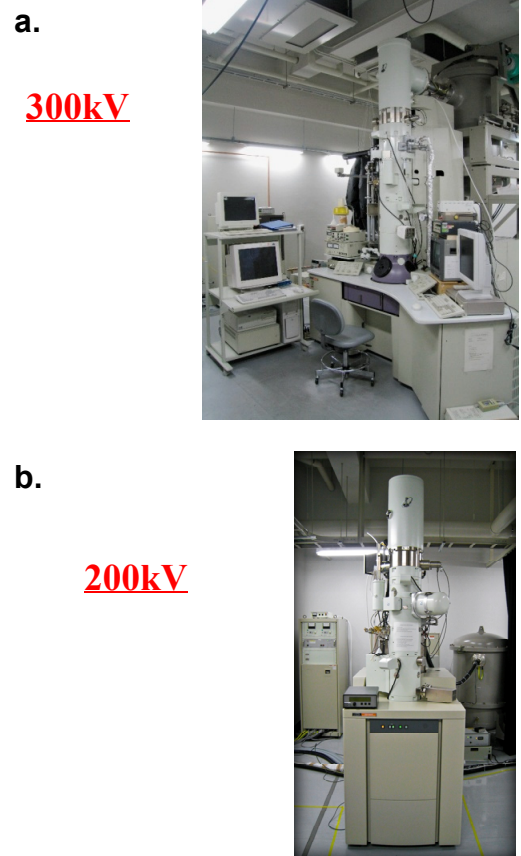


図2. 2つの電子位相顕微鏡装置

- a. 300kV 分析型極低温電子顕微鏡(FEG, He-ステージおよびエネルギーフィルター搭載)に薄膜位相板を挿入。
- b. 200kV 低温トモグラフィー用電子顕微鏡(FEG, N<sub>2</sub>-傾斜ステージ, エネルギーフィルター搭載)に薄膜位相板を挿入。

Fig. 2 Two kinds of electron-phase microscope models.

- a. 300kV analytical cryoelectron microscope (equipped with a FEG, a He-stage and an energy filter) with phase plates.
- b. 200kV tomography-dedicated cryoelectron microscope (equipped with a FEG, a tilting N<sub>2</sub>-stage and an energy-filter) with phase plates.

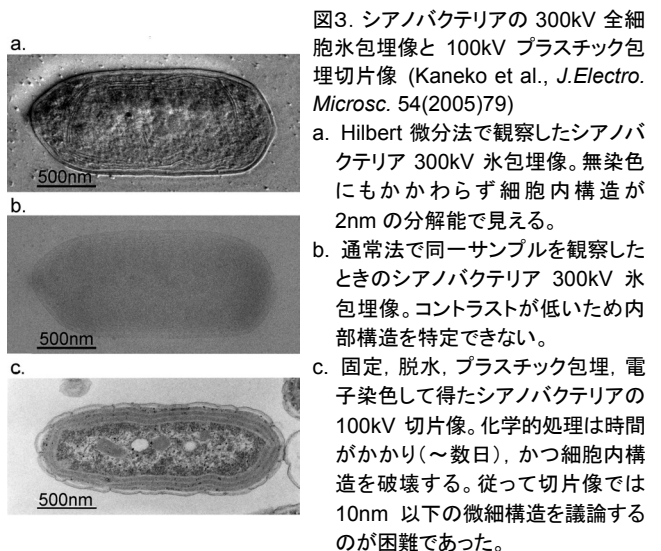
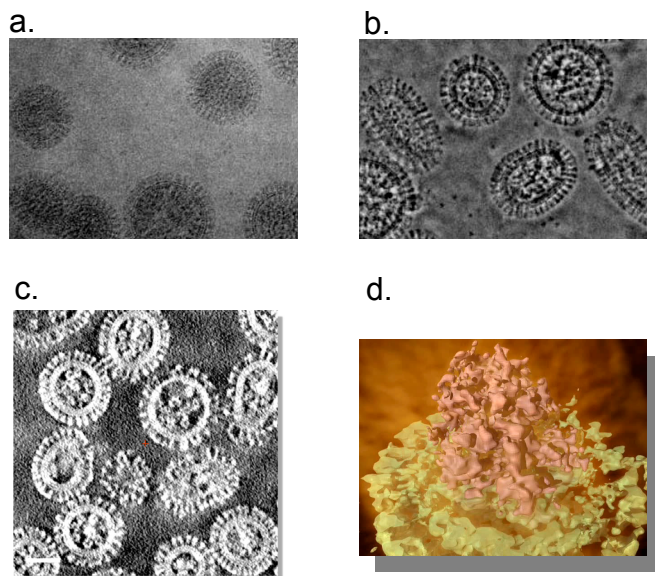


図3. シアノバクテリアの 300kV 全細胞氷包埋像と 100kV プラスチック包埋切片像 (Kaneko et al., *J. Electro. Microsc. 54*(2005)79)

- a. Hilbert 微分法で観察したシアノバクテリア 300kV 氷包埋像。無染色にもかかわらず細胞内構造が 2nm の分解能で見える。
- b. 通常法で同一サンプルを観察したときのシアノバクテリア 300kV 氷包埋像。コントラストが低いため内部構造を特定できない。
- c. 固定、脱水、プラスチック包埋、電子染色して得たシアノバクテリアの 100kV 切片像。化学的処理は時間がかかり(～数日)、かつ細胞内構造を破壊する。従って切片像では 10nm 以下の微細構造を議論するのが困難であった。

**Fig. 3 Comparison of 300kV and 100kV TEM images for ice-embedded and plastic-embedded cyanobacterial cells.**

a. A 300kV Hilbert differential image for an ice-embedded cyanobacterial whole cell, which holds a resolution sufficient enough to identify subcellular structures down to 2nm.  
 b. A 300kV conventional image shot for the same sample as shown in a., of which low contrast makes it difficult to identify subcellular structures.  
 c. A 100kV conventional image for a plastic-embedded and thin-sectioned cyanobacterial cell, which was prepared with a chemical fixation, dehydration and a heavy metal staining. Due to the harsh and lengthy chemical treatments, subcellular structures are heavily damaged making their morphological preservation hard.  
 (taken from Kaneko et al., *J. Electro. Microsc.* 54 (2005) 79)



**図4. インフルエンザ A ウィルスの 2 次元および 3 次元位相差電子顕微鏡像**

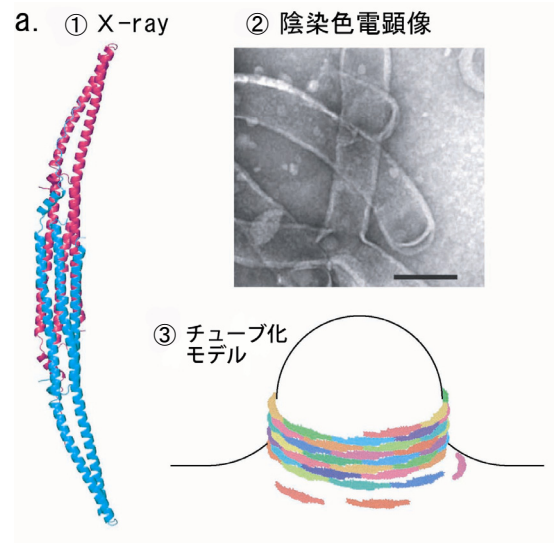
a. 通常 2 次元像 (300kV).  
 b. ゼルニケ位相差 2 次元像 (300kV)  
 c. ゼルニケ位相差トモグラム (3 次元像) の 1 断面図 (200kV)  
 d. ゼルニケ位相差トモグラムより再構成したインフルエンザゲノムの 3 次元像 (200kV)

(d. の 3 次元グラフィックスは自然科学研究機構イメージサイエンス研究分野武田隆顕氏製作)

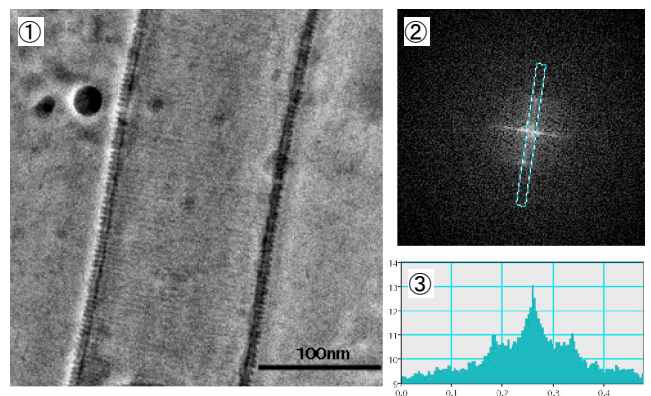
**Fig. 4 Electron micrograms and tomograms of Influenza A virus.**

a. A conventional microgram (300kV).  
 b. A Zernike phase-contrast microgram (300kV)  
 c. A slice of Zernike phase-contrast tomogram (200kV)  
 d. A 3D image of influenza genome reconstituted from Zernike phase contrast tomogram (200kV)

(a and b taken from Yamaguchi et al., *J. Struct. Biol.*, 162 (2008) 271, c and d taken from Danev et al., unpublished. 3D graphics shown in d. is credited to Takaaki Takeda of Imaging Science Research group, NINS)



**b. 位相差低温電顕像**



**図5. X 線結晶解析と通常電顕観察のギャップを埋める位相差低温電顕像**

a. 脂質相互作用蛋白質 PCH の EFC ドメイン 2 量体の X 線結晶解析から紐状構造が決定 (①)。PCH が脂質のチューブ化にかかわっていることが、陰染色の電顕観察から判明 (②)。この 2 つの知見をもとにチューブ化機構として③のようなモデルが提出された。

b. このモデルを証明する観察が位相差法の適用で明らかになった (①)。フーリエ変換の解析結果 (②, ③) から脂質に隙間なく巻きついた蛋白質の間隔は、4nm で、これは X 線構造からの推定値と符合した (Shimada et al., *Cell*, 129(2007)176)。

**Fig. 5 Phase contrast cryo-TEM fills the gap between X-ray crystallography and conventional TEM observation**

a. Lipid interacting protein, PCH, has a domain called EFC-domain assumed to be responsible for the liposome tubulation. X-ray crystallography revealed a thread structure (①) and conventional TEM observation with negative staining (②) showed a fixed size tubulation induced by the EFC-domain. From the two results a model as shown in (③) has been proposed.

b. The proposed model has been visually proven with the phase contrast cryo-TEM as shown in (①). The Fourier analysis (②, ③) tells us the spacing of adjacently wound EFC-domain polymers being 4nm, which is just expected from the X-ray structure shown in a-① (taken from Shimada et al., *Cell*, 129 (2007) 176).