

遺传的標識法を用いた細胞内 PSD-95 クラスターの電子顕微鏡解析

2014年9月

平林 愛

兵庫県立大学生命理学研究科

Publication List

本学位論文は以下の原著論文について、公表済みまたは公表予定

1. Ai Hirabayashi, Yuko Fukunaga and Atsuo Miyazawa
Structural analysis of the PSD-95 cluster by electron tomography and CEMOVIS: a proposal for the application of the genetically encoded metallothionein tag
Microscopy, **63** (2014) 227-234
2. Yuko Fukunaga, Ai Hirase, Hyeji Kim, Natsuko Wada, Yuri Nishino and Atsuo Miyazawa
Electron microscopic analysis of a fusion protein of postsynaptic density-95 and metallothionein in cultured hippocampal neurons
Journal of Electron Microscopy, **56** (2007) 119-129

本学位論文に含まれない原著論文

1. Nguyen Tien Huy, Yusuke Shima, Atsushi Maeda, Tran Thanh Men, Kenji Hirayama, Ai Hirase, Atsuo Miyazawa and Kaeko Kamei
Phospholipid membrane-mediated hemozoin formation: the effects of physical properties and evidence of membrane surrounding hemozoin
PLoS One, **8** (2013) e70025
2. Takeshi Noda, Yukihiro Sugita, Kazuhiro Aoyama, Ai Hirase, Eiryō Kawakami, Atsuo Miyazawa, Hiroshi Sagara and Yoshihiro Kawaoka
Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus
Nature Communications, **3** (2012) 639-644
3. Kazuhiro Aoyama, Tomoko Takagi, Ai Hirase and Atsuo Miyazawa
STEM tomography for thick biological specimens
Ultramicroscopy, **109** (2008) 70-80

4. Ai Hirase, Takahiro Hamada, Tomohiko J Itoh, Teruo Shimmen and Seiji Sonobe
n-Butanol induces depolymerization of microtubules in vivo and in vitro
Plant Cell Physiology, **47** (2006) 1004-1009

5. 平瀬愛、宮澤敦夫、[STEMトモグラフィーにおける電子線損傷の定量]、顕微鏡、
Vol144、No. 4、特集 [STEM と電子線トモグラフィーの出会い]、p248-251,
2009

目 次

第 1 章	序論	
1-1	足場タンパク質 PSD-95	6
1-2	電子顕微鏡法のための遺伝的コード化タンパク質標識法	7
1-3	本研究の目的と意義	8
1-4	略語	9
第 2 章	遺伝的標識法を用いた細胞内 PSD-95 の電子顕微鏡観察	
2-1	材料と方法	11
2-2	精製 PSD-95 の電子顕微鏡観察	15
2-3	細胞内 PSD-95 の電子顕微鏡観察	15
2-4	PSD-95 の局在と結合機能への遺伝的標識法の影響	17
2-5	内在性メタロチオネイン	17
2-6	考察	18
第 3 章	細胞内 PSD-95 の電子線トモグラフィ解析	
3-1	材料と方法	28
3-2	細胞内 PSD-95 クラスターの立体構造解析	28
3-3	考察	28
第 4 章	細胞内 PSD-95 の CEMOVIS 解析	
4-1	化学固定と凍結固定	34
4-2	材料と方法	35
4-3	海馬初代培養細胞の加圧凍結・凍結置換	36
4-4	CEMOVIS による細胞内 PSD-95 解析	37
4-4	考察	38
第 5 章	結論	47
	参考文献	49
	謝辞	52

第1章 序論

1-1 足場タンパク質 PSD-95

神経細胞が他の神経細胞や筋などの標的細胞に情報を伝達する場である神経シナプスには、神経活動に関与する多種多様のタンパク質が集まっている。これらのタンパク質は、それぞれの持ち場で相互作用しながら個々の機能を発揮し、シナプスの機能を制御している。シナプスの形成、可塑性の分子メカニズムを明らかにするためには、これらシナプスタンパク質の構造や機能の研究が必要であり、このメカニズムを明らかにすることは、記憶、学習などの高次脳機能の解明につながると考えられる。また、シナプスの異常が原因となっている疾患の病因解明や創薬にも貢献すると考えられる。

ポストシナプス膜直下には受容体やその機能を制御する足場タンパク質が集まっており、透過型電子顕微鏡で観察すると電子密度が高くなっている様子が観察できることから postsynaptic density (PSD) とよばれる (図 1-1)。PSD-95 は PSD の主要な構成成分であり、グルタミン酸受容体の足場タンパク質として PSD に集積し、受容体の制御に重要な役割を担っていることが知られている (図 1-2)。その一つである NMDA 型グルタミン酸受容体について、PSD-95 を遺伝的に欠損させたマウスでは NMDA 型グルタミン酸受容体は発現するが、LTP (long-term potentiation) の異常や学習障害が見られることから [1]、PSD-95 の働きによって NMDA 型グルタミン酸受容体が細胞内シグナル伝達物質と結合する事はシナプス可塑性を保つ上で重要であることが分かっている [2]。近年、PSD-95 はパルミトイル化されることで PSD に集積することが明らかにされ、パルミトイル化が阻害されると、PSD-95 のクラスター化が阻害され、脳内興奮性シナプスの重要な神経伝達物質受容体である AMPA 型グルタミン酸受容体が仲介する神経伝達が弱まる事から、PSD-95 のパルミトイル化に伴うクラスター化がシナプス機能の調整に重要であることが分かってきた [3]。電子顕微鏡分野では、免疫電子顕微鏡法によって、ポストシナプス膜からの PSD-95 の局在範囲が示されている [4]。また、同じく免疫電子顕微鏡法によって、PSD 以外に局在する PSD-95 の存在が示され、それらはスパインアパラタスというスパイン頸部に存在する膜構造に結合していることも報告されている [14]。しかし、PSD には受容体や足場タンパク質、細胞骨格などが高密度に集積しており、PSD-95 クラスターのみを観察するのは難しく、その形状やクラスター形成の詳細は明らかにされていない。本研究では遺伝的標識法を用いて神経シナプスの機能調整に重要な役割を担っている PSD-95 クラスターを電子顕微鏡で観察し、その形状や詳細な局在を明らかにすることを目指した。

1-2 電子顕微鏡法のための遺伝的コード化タンパク質標識法

細胞内タンパク質は個々で機能を果たしているものもあるが、その多くはある一定の形や大きさをもつクラスターとして機能している様子が見られ、その集積状態は通常の機能や外部からの刺激に応じて変化している。本研究の研究対象である PSD-95 もその一つであり、細胞質に局在する PSD-95 がパルミトイル化修飾によって PSD に集積し、グルタミン酸受容体の足場タンパク質として機能するようになると報告されている [5]。よって、細胞の機能を明らかにするためには、個々のタンパク質の研究を行うと共に、分子複合体としての構造と機能を研究していく必要がある。これまで、電子顕微鏡での組織や細胞の観察にはオスミウム、ウラン、鉛などでの染色や金粒子で目的タンパク質を標識する免疫電子顕微鏡法などが使われてきた。染色によって、細胞内小器官や細胞骨格など、比較的大きく、特徴的な形状のものが観察され、また、免疫電子顕微鏡によって個々のタンパク質が同定されてきた。免疫電子顕微鏡法では金粒子によって、細胞内タンパク質の局在場所を示すことは出来るが、細胞骨格のように特徴的な形をしているか、あるいは、電子密度が非常に高いタンパク質でないものについては、クラスターの構造を正確に捉えることは非常に難しい。そこで、当研究室では光学顕微鏡分野でタンパク質標識に用いられている GFP のように、目的タンパク質の遺伝子に融合させて、発現する電子顕微鏡用の遺伝的標識の開発を行ってきた。電子顕微鏡では密度の高いものが検出しやすいので、重金属であるカドミウム (Cd) と結合する金属結合タンパク質であるメタロチオネイン (MT) を標識に用いることにした。この遺伝的標識法を用いれば、免疫反応や化学固定、染色操作を行わずに、目的タンパク質を観察する事が可能となる。これまで、GroEL を観察対象にして研究が行われ、MT3 分子をつないだ 3MT が Cd の取り込みもよく、タンパク質の複合体形成に影響しないことが分かり、3MT によって GroEL を電子顕微鏡で検出することができた。よって 3MT 標識法が電子顕微鏡用のタンパク質標識法として有用であることが示された [6]。そこで、本研究では PSD-95 を遺伝的標識法、3MT でラベルし、これまで、明らかにされていない、クラスターの構造や形成様式を観察することを目指した。

電子線トモグラフィーは、試料内部の情報も得ることができる透過型電子顕微鏡の利点を生かし、生物試料の三次元構造を解析する手法として用いられてきた。しかし、電子線トモグラフィーに適用できる分子標識法がなく、細胞では、極めて多数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いるため、電子線トモグラフィーにおいて観察された分子が何であるのかを同定するのは難しい。また、低温電子顕微鏡法は、化学固定や脱水の操作がなく、生きている時に近い状態で細胞内タンパク質を観察できる手法として注目されているが、

この方法では通常の化学固定で行う、四酸化オスミウムや酢酸ウラン、クエン酸鉛での染色作業を行わないので、コントラストは低くなり、凍結した状態のまま観察しなければいけないので、常温の電子顕微鏡よりも電子線量を低くする必要があるので、S/N比が低くなる。よって、細胞内で目的のものを同定するのが難しくなる。これらの問題を解決する方法としても固定操作を必要とせず、目的タンパク質を直接標識できるこの遺伝的標識法は有用であると考えられる。そこで、本研究では電子線トモグラフィーと低温電子顕微鏡法を用いて、遺伝的標識法でラベルした PSD-95 の解析も行った。

1-3 本研究の目的と意義

1-1 で述べたように、PSD-95 は神経シナプスのグルタミン酸受容体の動態制御に重要な役割を担っており、足場タンパク質として受容体と結合することで、シナプス可塑性において重要な役割を果たしている。よって PSD-95 クラスターの集積の様子を明らかにする事はシナプスの形成や分子メカニズムを明らかにするために必要であると考えられる。PSD には多くの分子や細胞骨格が集まっており、従来の電子染色だけでは個々のタンパク質を検出するのは難しい。免疫電子顕微鏡法を用いる事によって、これまで PSD に集積する個々のタンパク質の同定が行われ、局在は明らかにされてきたが [4]、PSD-95 のみのクラスターの構造は捉えられていない。そこで、本研究ではこの遺伝的標識法を用いて神経シナプス受容体の足場タンパク質である PSD-95 について、クラスターの構造や詳細な局在を明らかにすることを目指した。まず、PSD-95 がこの遺伝的標識法で検出できるかを *in vitro* の実験で確認し、その後、細胞内の局在やクラスター構造を観察した。

PSD-95 の三次元構造を捉える事は先に述べたようにシナプスの形成や可塑性のメカニズムの解明に重要であると考えられる。PSD-95 についてはこれまで、免疫電子顕微鏡法によって、その局在が明らかにされてきたが [4]、[14]、PSD-95 クラスターの三次元構造については明らかにされていない。そこで、本研究では遺伝的標識法を用いて、細胞内 PSD-95 クラスターの電線トモグラフィーを行い、その三次元構造を観察することを目指した。

これまで、電子顕微鏡分野では主に、アルデヒド固定が用いられてきた。しかし、タンパク質は化学固定によって容易に変化してしまう事が報告され [7]、固定や脱水操作を行わない低温電子顕微鏡法はより生きている時に近い状態で細胞内タンパク質を観察するのに適した方法として注目されている。PSD-95 はこれまで、免疫電子顕微鏡法によって局在が明らかにされてきたが [4]、[14]、PSD-95 はシナプス活動や外部刺激によってその動向が常に変化していると考え

られ、より生きている時に近い状態で、瞬時に固定が完了する低温電子顕微鏡での解析は有用であると考えられる。遺伝的標識法は化学固定や染色操作を行う事なく、目的タンパク質を標識することができるので、低温電子顕微鏡法にも応用できると考えられた。よって、本研究では遺伝的標識法を低温電子顕微鏡法に応用し、細胞内 PSD-95 を観察することを目指し、研究を行った。

1-4 略語

CEMOVIS Cryo-electron microscopy of vitreous sections

GLA Glutaraldehyde

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

LTP Long-term potentiation

MT Metallothionein

MAP2 Microtubule Associated Protein

n-NOS neuronal nitric oxide synthase

OsO₄ Osmium tetroxide

PBS Phosphate buffer saline

SDS Sodium dodecyl sulfate

PSD Postsynaptic density

SDS PAGE SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

PFA Paraformaldehyde

図1-1 神経シナプスの電子顕微鏡写真

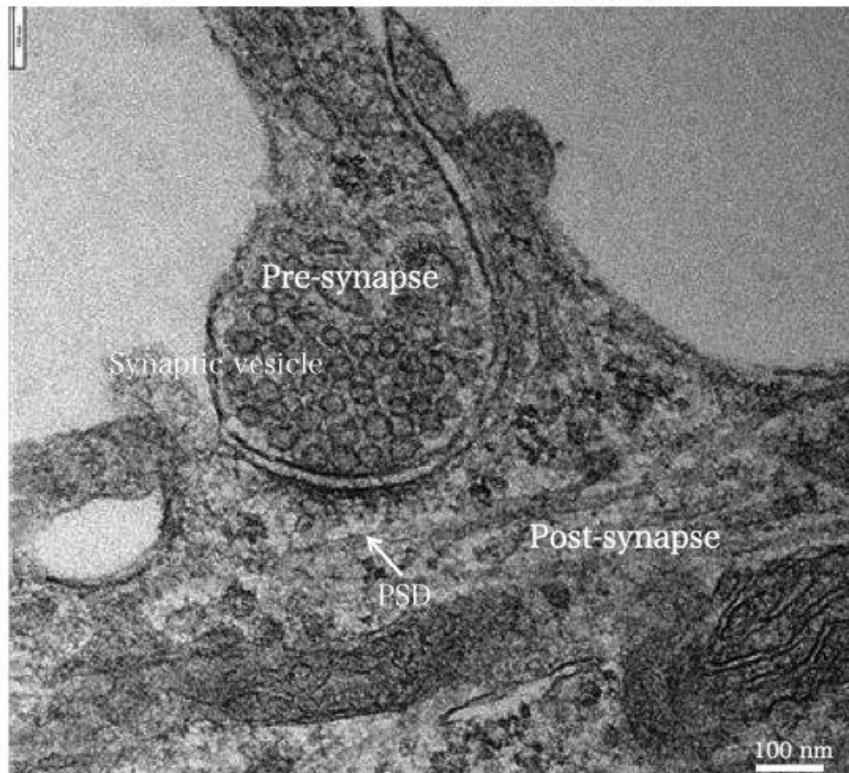
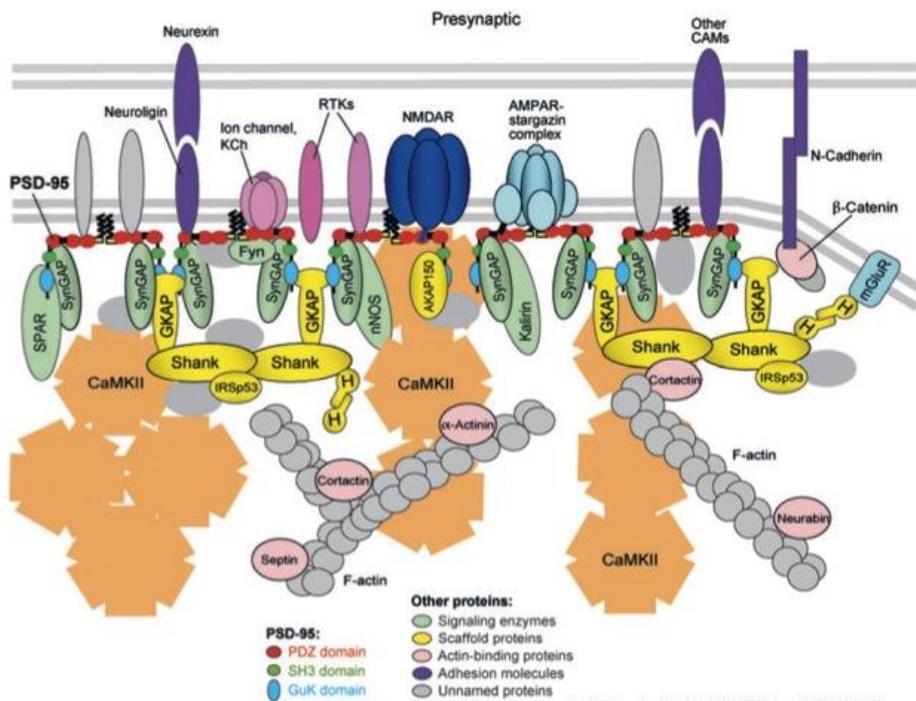


図1-2 PSDタンパク質



林康紀 シナプス後肥厚部 脳化学事典
<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/シナプス後肥厚> (2012)

第2章 遺伝的標識法を用いた細胞内 PSD-95 の電子顕微鏡観察

2-1 材料と方法

(1) 材料

*in vitro*系で PSD-95 を観察するために COS7 細胞を用いた。細胞内 PSD-95 の観察には海馬初代培養細胞を用いた。

(2) 細胞培養

(2)-1 COS7 細胞

COS7 細胞は DMEM medium に 10% Fetal bovine serum を添加した培地で培養した。トランスフェクションの 1 日前に細胞を 100 mm ディッシュに撒き、トランスフェクションするときに 80-90%コンフルエントになっているようにした。

(2)-2 海馬初代培養細胞

胎生 19 日目の Sprague-Dawley ラットから海馬の神経細胞を採取した。解剖した海馬をトリプシン処理によって分離した。神経細胞懸濁液を Poly-L-lysine とラミニンでコートしたカバーガラスやサファイアディスク、ディッシュに 2.5×10^4 cell/cm² (アデノウイルスによるトランスフェクション)、または 6×10^4 cell/cm² (リポフェクション) の密度で撒いた。Neurobasal medium に Glutamate と B27、Glutamax、Penicillin、Streptomycin を添加した培地を入れ、10% CO₂ のインキュベーターで培養を行った。培養 2 日目にグリア細胞の増殖を抑える目的で Arabinoside C を添加した。培養 3 日後に上記培養液を交換する事で Arabinoside C をのぞき、以降、一週間に一度、培養液の交換を行った。

(3) クローニングとプラスミド構築

pcDNA3.1(-)に入った murine PSD-95、pcDNA3.1(+)に入った Kv1.4、c-Myc tagged NR2B は京都大学の藤吉教授と、今村氏のご好意により提供を受けた。C-Myc tag (EQKLOSEEDL) は NR2B の 27 から 28 アミノ酸残基に組み入れた。pCR2.1 の nNOS クローンは国立がん研究センターの小倉教授のご好意により提供を受けた。PSD-95-3MT-Flag-pET21b は NheI と BlnI を用いて準備した [6]。PSD-95-Flag-pET21b は MT フラグメントを除くことで構築した。MT-Flag-pET21b は PSD-95-3MT-Flag-pET21b からベクターと結合した PSD-95 を除き、再び、ベ

クターと結合させる事で構築した。これら3つのコンストラクト(図1)をNheIとXhoIを用いて結合させ、挿入シーケンスをpcDNA3.1(-)の対応する領域に結合させた。クローニングとプラスミドのコンストラクトは*Escherichia coli* Top10F' で準備した。この論文ではPSD-95-3MT-FlagをPSD-95-3MTと略す。

(4) トランスフェクション

COS7細胞への遺伝子導入はLipofectamine 2000を使って、発現ベクターで行った。PSD-95、Kv1.4、NR2B、nNOSは1:1でトランスフェクションした。

PSD-95-3MT、PSD-95、MTの海馬初代培養細胞へのトランスフェクションは培養13~14日目に行った。CdCl₂はトランスフェクション後24時間で添加し、COS7細胞では20 μM、20時間、海馬初代培養細胞では5 μMで20時間処置した。

(5) 共免疫沈降

COS7細胞はPBSで洗浄し、免疫沈降溶液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40)で再懸濁し、氷中で5秒ソニクエーションした。4°C、40000×gで30分遠心し、得られた上清をanti-Flag M2と共に4°Cで一晩インキュベーションした。結合タンパク質をSDSで溶出した後、5分間煮沸し、SDSPAGEで分離し、その後、セミドライエレクトロブロットティングでニトロセルロースに転写した。rabbit anti-Flag抗体(1:500, Affinity BioReagents)、rabbit anti-Kv1.4抗体(1:1200, Chemicon)、rabbit anti-nNOS抗体(1:200, Santa Cruz Biotechnology)でプローブし、アルカリフォスファターゼと結合した2次抗体と発色基質で観察した。

(6) PSD-95-3MTの精製

Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl)に10 μg ml⁻¹ DNaseと10 μg ml⁻¹ RNase、1タブレット/100 mlのcomplete proteinase inhibitor mixを添加した溶液で細胞を懸濁し、ソニクエーションにより粉砕した。ライセートを4°Cで1時間インキュベートし、10000×g、4°Cで1時間遠心した。溶解したフラクションをTris bufferで平衡化したanti-Flag M2 affinity columnにアプライした。カラムをTris bufferで洗い、100 mM glycine、150 mM NaCl (pH 3.5)で溶出させた。溶出したものを500 mM Tris-HCl (pH 8.0)で素早く中和し、vivaspin100 (VIVASCIENCE)で0.05 μg ml⁻¹まで濃縮した。

(7) カドミウム容量の解析

精製したタンパク質中の CdCl₂ の濃度を誘導結合プラズマ解析 (Ok Engineering) で測定した。タンパク質濃度は SDS-PAGE のバンドをクマシーブルーで染色したものの濃さを比較することで決定した。この際、BSA をスタンダードとして用いた。

(8) アデノウイルスの作製と形質導入

PSD-95-3MT 発現コンストラクトを含むアデノウイルスは Vira Power Adenovirus Expression System (Invitrogen) を使って準備した。PSD-95-3MT を pENTER Directional TOPOcloning kit (Invitrogen) を使って pENTER/D-TOPO vector にサブクローニングした。次に cDNA インサートを LR Clonase を使って Gateway system で pAd/CMV/V50DEST に移し、できたプラスミドを PacI (New England Bio labs) で結合した。このプラスミドを opti-MEN 中で Lipofectamine2000 と混合し、サブコンフルエントの状態の 293A 細胞に入れた。293A を 10% Fetal calf serum 入りの DMEM で 2 日に 1 回メディウムを交換しながら 1-2 週間培養した。ほとんどの細胞の接着力がなくなったところで、細胞と培養液を一緒に回収し、凍結融解を 2 回行った後、遠心してアデノウイルスが含まれる上清を回収した。アデノウイルスを増殖させるために、この上清を新しい 293A 細胞に添加し、2, 3 日培養した。この作業を 2 回繰り返して得られた溶液をウイルスストックとした。ウイルス力価は 50%組織培養感染量で測定した (TCID₅₀=4.4×10⁷)。アデノウイルス溶液を培養 19 日目のアデノウイルスに添加し、ウイルスベクター適用後 3 日目に 5 μM の CdCl₂ を添加した。CdCl₂ 添加後 20 時間で免疫反応もしくは電子顕微鏡観察のための固定を行った。

(9) 免疫染色

カバーガラス上の神経細胞を 4%PFA/PBS で 20 分固定した後、10 mM Glycin/PBS で反応を停止し、0.5% NP-40 で 5 分間透過処理を行った。シナプス小胞に局在するタンパク質である Synaptophysin を検出する試料は PFA 固定の代わりに -20°C で 10 分間冷却した。固定後の神経細胞を [1%BAS, 10% Goat serum, 0.5% TritonX-100] で 1 時間ブロッキングし、それぞれの免疫反応の一次抗体と 4°C で一晩反応させた (rabbit anti-Flag antibody 1/2000, mouse monoclonal anti-Synaptophysin antibody 1/1000, mouse monoclonal anti-MT antibody 1/1000, rabbit polyclonal anti-MAP2 antibody 1/1000)。PBS で 3 回洗浄した後、2 時間、2 次抗体と反応させた (Alexa 488-conjugated antibodies 1/500, Alexa 543-conjugated antibodies 1/500)。3 回洗浄した後、Vectashield でマウントした。観察は LSM510 confocal laser-scanning microscopy (Carl

Zeiss) で行った。MT の蛍光強度を平均の蛍光強度として測定した。コンフォーカルのセッティング (レーザーの強さ、絞りの大きさ、ゲイン、オフセット) を一定にして複数のカバーガラスを観察した。決まった領域 ($460\ \mu\text{m} \times 460\ \mu\text{m}$) でバックグラウンドの 3 倍の蛍光強度を示した細胞を MT ポジティブとしてカウントした。MT ポジティブな神経細胞の数を MAP2 免疫反応神経細胞としてノーマライズした。

(10) 生存率の測定

細胞生存率は Calcein と Propidium iodide (PI) 二重染色キットである Cellstain (Dojindo) を用いて測定した。COS7 細胞と海馬初代培養細胞に Cd^{2+} を添加し、Cellstain kit の説明書どおりに染色した。ただし、Calcein と PI の濃度は実験に合わせて変更した。Calcein で染色される生細胞と PI で染色される死細胞をコンフォーカル顕微鏡を使って測定した。

(11) 電子顕微鏡用試料調整 (常温観察用化学固定)

電子染色あり：海馬初代培養細胞を 2%PFA+2.5%GLA/ 30 mM HEPES buffer (pH 7.2) で 2 時間固定した後、同緩衝液で洗浄し、1% OsO_4 / 0.1M Cacodylate buffer で後固定を行った。同緩衝液で洗浄後、エタノールでの脱水を行った (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% \times 2, 各 10 分)。Propyleneoxide に置換し (10 分 \times 2)、EPON812 樹脂の浸透を行った

(EPON812:Propyleneoxide=1:1, 18h)。その後 100% EPON812 に移し、6 時間後に熱重合 (60°C, 48hr) により硬化させた。硬化した試料をウルトラミクロトーム (UC6, leica microsystems) 内でダイヤモンドナイフ (Diatome) にて 80 nm の超薄切片にし、これを電子顕微鏡用のグリッドメッシュに乗せた。できた切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡 (JEM2100, JEOL) を用いて、加速電圧 200kV にて観察を行った。

電子染色なし：上記の方法のうち、 OsO_4 での後固定と切片の電子染色を行わずに試料調整し、(JEM2100, JEOL) にて加速電圧 100kV で観察を行った。

結果

2-2 精製 PSD-95 の電子顕微鏡観察

(1) COS7 細胞における Cd²⁺の細胞毒性と PSD-95-3MT の発現確認

Cd²⁺は細胞毒性があり、ネクロシスやアポトーシスを誘導することが分かっている [10]、[11]。PSD-95-3MT を精製するために、COS7 細胞を用いたので、COS7 細胞に影響がない Cd²⁺処置条件の検討を行った (図 2-2 左グラフ)。COS7 細胞を 20 もしくは 40 μ M CdCl₂ で 30 時間処置、40 μ M CdCl₂ で 20 時間処置したときに生存率は減少したが、20 μ M CdCl₂ で 20 時間処置したときには生存率は減少しなかった。金属含有測定を行うと、20 μ M CdCl₂ で 20 時間処置した COS7 細胞から精製した PSD-95-3MT は Cd²⁺と結合していた(データなし)。また、PSD-95-3MT を遺伝子導入し、この条件で Cd²⁺処置した COS7 細胞では、PSD-95-3MT を発現していた (図 2-2 右写真)。よって COS7 細胞への Cd²⁺処置条件は 20 μ M、20 時間に決定した。

(2) 精製 PSD-95-3MT の電子顕微鏡観察

COS7 細胞に PSD-95-3MT をコード化したプラスミドで遺伝子導入し、20 μ M CdCl₂ で 20 時間処置ありまたはなしの条件で培養し、anti-Flag M2 affinity 樹脂を用いて細胞溶解液から PSD-95-3MT を精製した (図 2-3)。電子染色をして観察したところ、図の上の 2 枚の写真のように、Cd ありでもなしでも同様の粒子が観察され、カドミウムの有り無しに関係なく、PSD-95-3MT が発現・精製できていることが確認できた。また、このサンプルを染色なしで観察したところ (図 2-3)、Cd なしでは何も検出されず、カドミウムを処置したサンプルにのみ、黒い粒を観察することができた。よって、PSD-95 がカドミウムを取り込んだ 3MT によって電子顕微鏡で検出できると事がわかった。

2-3 細胞内 PSD-95 の電子顕微鏡観察

(1) 海馬初代培養細胞における Cd²⁺の細胞毒性と PSD-95-3MT の発現確認

細胞内での PSD-95-3MT の観察を行うために、海馬初代培養細胞の培地に添加するカドミウム濃度と処置時間の検討を行った。まず、神経細胞の形態への影響を調べるために、培養 13 日目の神経細胞に、それぞれ、0, 5, 10, 20 μ M のカドミウムを処置し、神経細胞のマーカーとなる抗 MAP2 (Microtubule Associated Protein) 抗体で免疫染色した (図 2-4 上)。10 μ M, 20 μ M では樹

状突起が数珠状になってしまい、神経細胞に何らかの影響がある事が分かった。次に生存率への影響を調べるために、同じく、培養 13 日目の海馬初代培養細胞に、5 または 10 μ M のカドミウムを 10, 20, 30 時間処置し、生細胞 (Calcein-AM) と死細胞 (Propidium iodide) の染め分けを行った (図 2-4 下)。10 μ M の Cd では 20 時間から生細胞の割合が減少し始めたが、5 μ M では 30hr でも減少しなかった。これら 2 つの結果より、カドミウムの処置条件は神経細胞の形態や生存に影響を及ぼさない、5 μ M、20 時間に決定した。次に PSD-95-3MT を遺伝子導入した海馬初代培養細胞を決定した条件でカドミウム処置し、PSD95-3MT が海馬初代培養細胞で発現しているかどうかを確かめた (図 2-5)。左が神経細胞のマーカーである MAP2 抗体で染色したもので、神経細胞全体が染色されていることがわかる。中央が Flag 抗体で染色したもので、PSD-95-3MT が発現していることが確認できた。一番右はマージ像で、中央の神経細胞では MAP2 と PSD-95-3MT-Flag の局在が一致しており、PSD-95-3MT が神経細胞で発現している事が確かめられた。

(2) 細胞内 PSD-95-3MT の局在観察

海馬初代培養細胞内での PSD-95-3MT の観察を行った。まず、局在を観察するために、オスミウムでの後固定と切片の酢酸ウラン、クエン酸鉛での電子染色を行った試料の観察を行った (図 2-6)。図の丸いものがシナプス小胞でそれを含む細胞がプレシナプス、その対岸がポストシナプスである。上 3 枚の写真のように、PSD-95-3MT を発現し、Cd 処置した細胞では PSD の厚みがコントロールである、何もしていない細胞、PSD-95-3MT を発現し、Cd 処置していない細胞、発現なしで Cd 処置した細胞 (下 3 枚) より厚く、黒くなっており、PSD の下に電子密度の高い領域が見られた。コントロールでは、ポストシナプスにこのような電子密度の高い領域は見られなかった。よって、PSD-95 は 3MT 標識によってポストシナプスで観察できることが分かった。

(3) 無染色試料における細胞内 PSD-95 の観察

電子染色を施すことによって、細胞の形態がはっきりと観察でき、PSD-95-3MT-Cd がポストシナプスに局在している事が分かった。しかし、PSD には多くのタンパク質が集まっており、電子染色によって、PSD-95 以外にも染色されてしまう。そこでオスミウムやウラン、鉛などの染色なしでの観察を行った。この場合、図 2-7 で示すように、電子顕微鏡写真は細胞の方が白く見える。図の上 3 枚の写真のように、PSD-95-3MT を発現し、Cd 処置した神経細胞内に電子密度の高い領域がみられ、コントロールの細胞では見られな

った。ここでは染色をしていないため、電子顕微鏡で検出されるのは添加した Cd のみであると考えられる。よって、3MT 標識により、神経細胞内で PSD-95 クラスターが検出できることが分かった。

2-4 PSD-95 の局在と結合機能への遺伝的標識法の影響

3MT の融合が PSD-95 の局在や他のタンパク質との結合に影響しないかどうかを確かめる実験を行った (図 2-8)。まず、シナプスへの局在への影響を調べるために、海馬初代培養細胞に PSD-95-3MT-Flag, PSD-95-Flag, MT-Flag それぞれの遺伝子を導入し、カドミウムを添加し、添加後、20 時間で固定し、Flag と synaptophysin での免疫染色を行った (図 2-8 上)。Synaptophysin はシナプス小胞に局在するタンパク質でその抗体はシナプスのマーカーとして用いられる。3MT をつけた場合でも PSD95 のみの時と同様に Synaptophysin と共局在しており、MT を融合させてもシナプスへの局在には影響しないことが確かめられた。また、MT のみだとその局在は神経突起全体に広がり、シナプスへの局在は見られなかった。次に、3MT の融合による PSD-95 の他のタンパク質との結合機能への影響を調べた (図 2-8 下)。PSD-95 と結合することが知られている、NR2B と Kv1.4、nNOS それぞれを PSD95-3MT-Flag、PSD95-Flag、MT-Flag と共発現させ、Flag 抗体での免疫沈降実験を行った。一番上のパネルをみると PSD-95-3MT は PSD-95 と同様に NR2B と共沈しており、3MT の融合が NR2B との結合に影響していない事が分かった。また、MT のみでは NR2B との共沈降は見られなかった。Kv1.4 と nNOS についても同様の結果が得られたことから、3MT の融合は PSD-95 の他のタンパク質との結合能に影響しないことが確かめられた。MT のみではいずれのタンパク質とも結合していない事も分かった。Kv1.4 や nNOS についても同様の事が確かめられた。これらの結果から、3MT の融合は PSD-95 のシナプスへの局在や他のタンパク質との相互作用に影響しないことが確かめられた。

2-5 内在性メタロチオネイン

Cd²⁺ は様々な組織で MT の発現を誘導する事が知られている [12]、[13]。そこで、内在性 MT の関与について検討を行った (図 2-9)。海馬初代培養細胞に 5 μ M CdCl₂ を 20 時間処置し、抗 MT 抗体で免疫染色したところ (図 9 上)、内在性 MT は CdCl₂ を処置しない神経細胞にはほとんど存在せず、5 μ M CdCl₂ の 20 時間処理後の神経細胞においては MT の発現が認められた。樹状突起の拡大写真を観察すると (図 2-9 上左)、その発現分布パターンは樹状突起全体にわたってほぼ均一であった。また、カドミウムの処置時間を 20、48 時間

とし、経時変化を調べたところ（図 2-9 左下）、24 時間の CdCl₂ 処置により誘導される内在性 MT 発現神経細胞は 48 時間処置の時よりも少なかった。しかし、5 μM CdCl₂ を 20 時間処置した海馬初代培養細胞では電子密度の高い領域は認められなかった（図 2-9 右下）。よって、5 μM CdCl₂ を 20 時間処置で内在性 MT の発現を誘導するが、十分な高電子密度ではないということが分かった。

2-6 考察

染色ありの観察により 3MT で標識した PSD-95 が本来の局在場所であるポストシナプスでクラスターとして観察され、電子染色なしの観察で、PSD-95 のみのクラスターを検出することができた。また、3MT の融合は PSD-95 のシナプスへの局在や他のタンパク質との結合に影響しない事が確かめられた。免疫反応を行うにはその組織、細胞、抗原毎に、適した固定方法や抗体処置条件を検討しなければならないが、この遺伝的標識法は免疫染色や電子染色を行うことなく、細胞内タンパク質クラスターの様子を観察できるため、電子顕微鏡用の新たな標識法として有用であり、透過像を観察するだけでなく、様々な手法の電子顕微鏡法にも応用できる有用な標識法になると考えられる。よって、3MT 標識は細胞内タンパク質クラスターを検出するのに有用なラベルであることが示された。

無染色の電子顕微鏡写真を観察すると、コントロールの細胞内にわずかに黒い小さな点が見られる。しかし、これは PSD-95-3MT を発現し、Cd 処置した細胞で見られた電子密度の高い領域よりは明らかに小さく、固定や樹脂への包埋の際に生じたアーティファクトだと考えられる。さらに、電子染色した像中ではこのようなものは見られず、染色によって隠れてしまうものだという事も分かる。

PSD-95-3MT 遺伝子導入、Cd 処置した細胞をオスミウム、ウラン、鉛で染色した像では PSD が厚くなると共に、PSD の下に電子密度の高い領域が見られた。今回 PSD-95-3MT を発現させているので、過剰発現によって PSD の下で大きな電子密度の高い領域が見えたという可能性も考えられる。しかし、PSD-95-3MT を発現しただけでは、このような電子密度の高い領域は見られず、Cd 処置を加えた時に見えてきたので、この PSD の下で見られた電子密度の高い領域も PSD-95 のクラスターが 3MT 標識によって観察されたものであり、電子染色のみでは見えてこない PSD-95 のクラスターが 3MT によって検出されたと考えられる。また、免疫電子顕微鏡法を用いて PSD-95 の局在を観察した報告 [14] では PSD-95 が PSD から離れた場所にも局在し、スパインアパラタスというスパイン頸部に存在する膜構造と結合しているという事が報告さ

れている。そこでは金粒を使って局在を示していたが、今回、3MTで標識することによって、PSDの下でもクラスターを形成していることを示す事ができた。今後、PSD-95とPSD-95-3MTの局在を免疫電子顕微鏡法の2重染色することなどによって、より確かな結果となると考えられる。

図2-1 本研究に用いたDNAコンストラクト

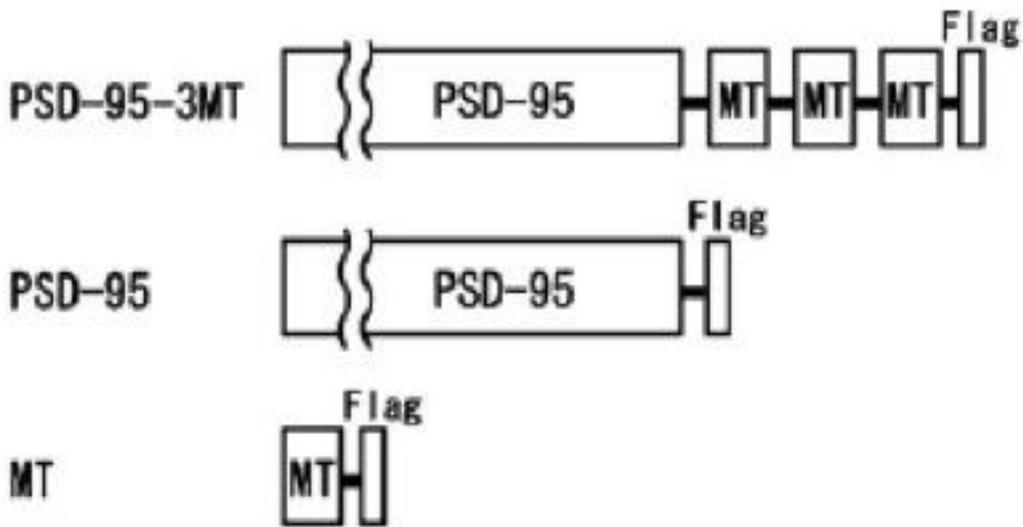
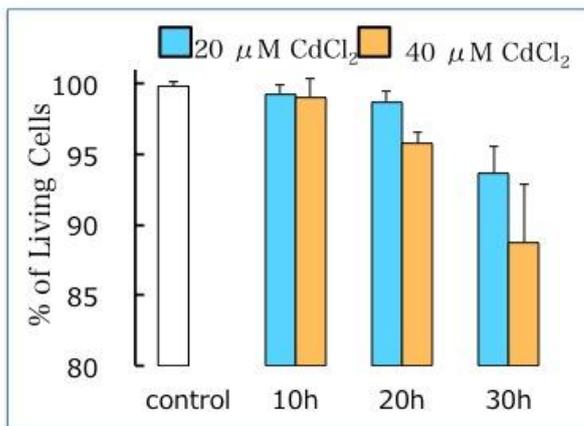


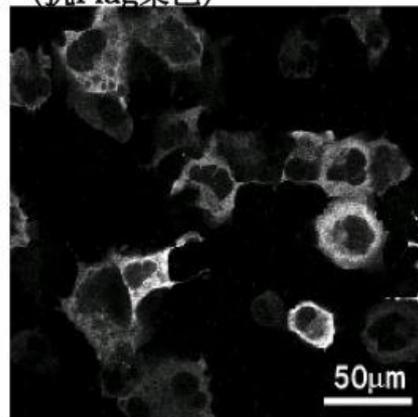
図2-2 Cos7細胞へのカドミウム処置濃度・時間の検討

Cos7細胞のCd処置による生存率の変化



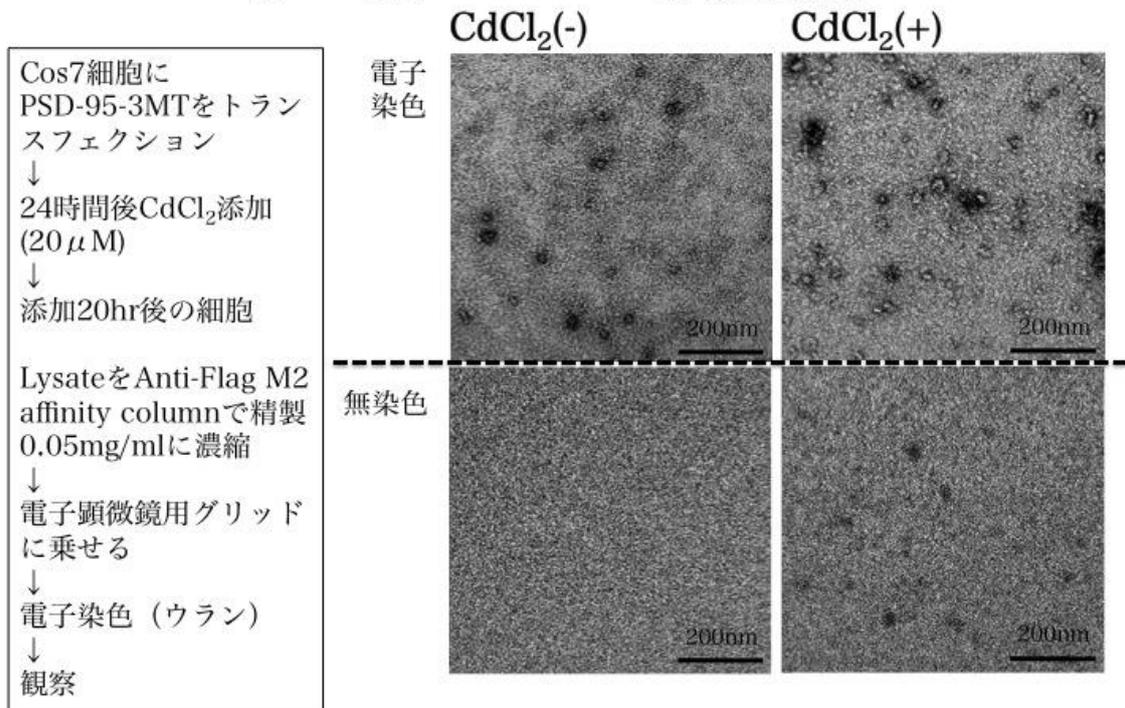
染色：生細胞=Calcein、
死細胞=Propidium Iodide

Cos7細胞の光学顕微鏡写真 (抗Flag染色)



PSD-95-3MT-Cd
(20 μM CdCl₂, 20hr)

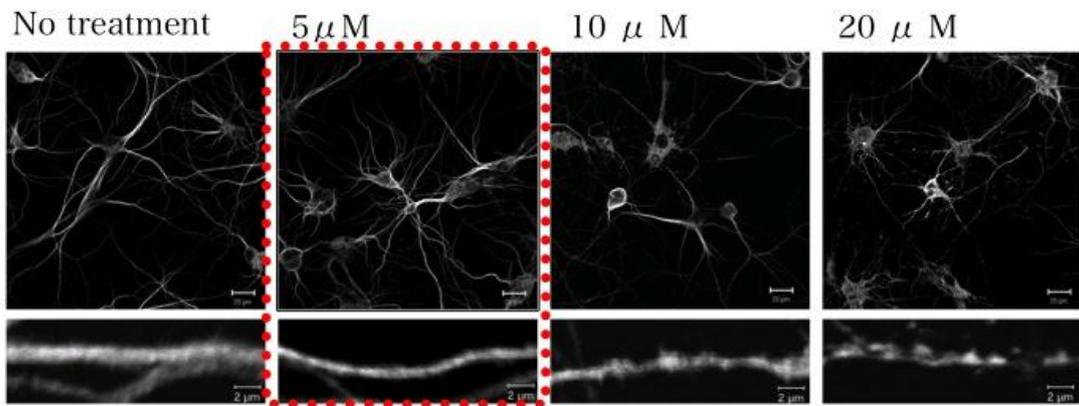
図2-3 精製PSD-95-3MTの電子顕微鏡観察



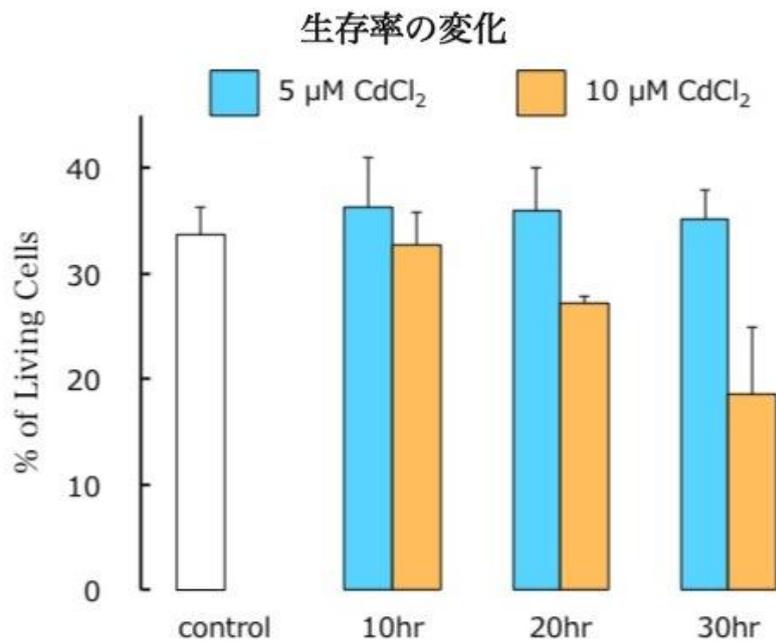
電子染色すると、Cd ありでもなしでも同様の粒子が観察できる。電子染色なしでは、Cd 添加したときのみ黒い粒子が観察できる。

図2-4 海馬初代培養細胞へのカドミウム処置濃度・時間の検討
形態観察

胎生19日目のラットより海馬を摘出し分散培養
↓
培養13日目 CdCl₂を添加
↓
添加20時間後、4% PFAで細胞を固定、免疫染色anti-MAP2抗体

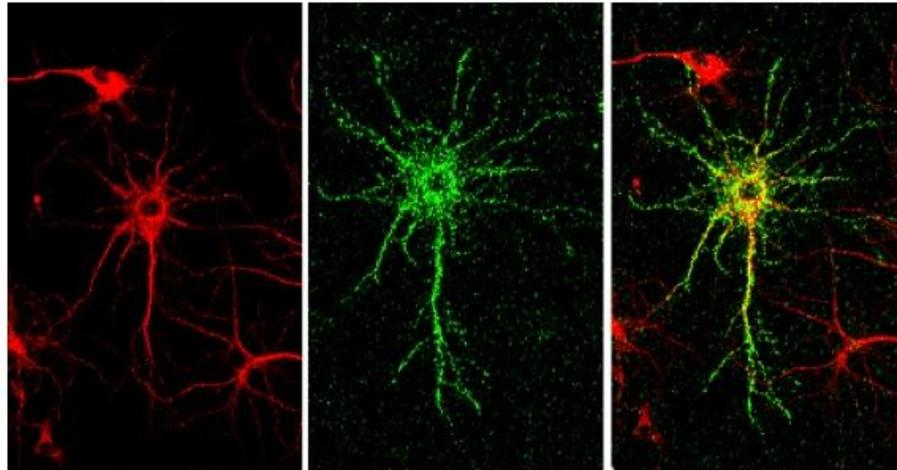


免疫染色：anti-MAP2抗体



染色：生細胞=Calcein、
死細胞=Propidium Iodide

図2-5 PSD-95-3MTの発現確認

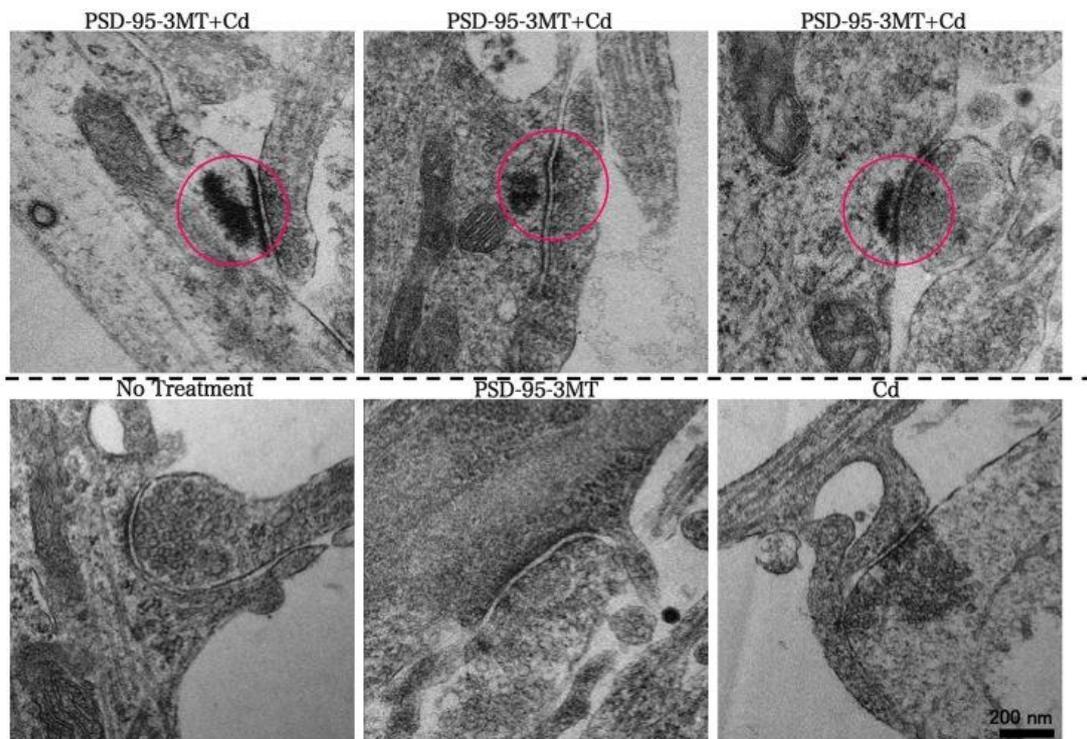


Red=MAP2
(神経細胞のマ-カー)

Green=Flag

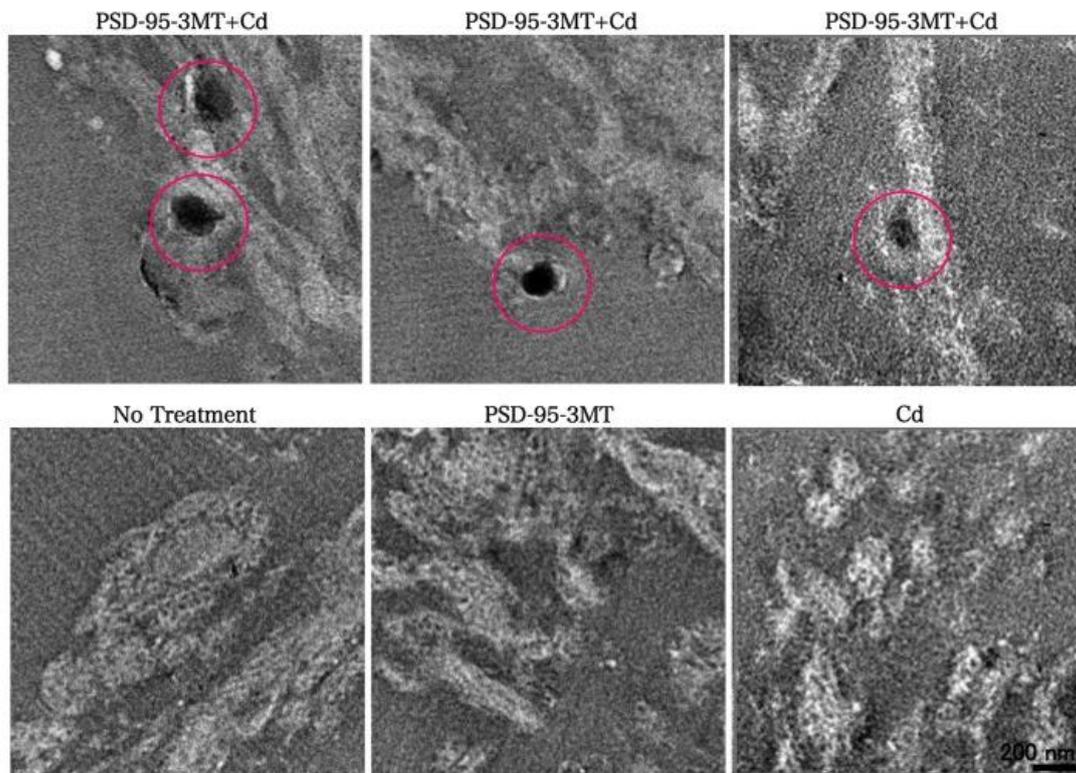
Merge

図2-6 PSD-95-3MTの電子顕微鏡観察 (オスミウム・ウラン・鉛染色)



それぞれの写真の右側の細胞内に見えている小胞がシナプス小胞、その対岸がポストシナプス。図の上、PSD-95-3MT を遺伝子導入し、Cd 処置した神経細胞の PSD がコントロールよりも厚くなり、PSD 直下に電子密度の高い領域が見られる。

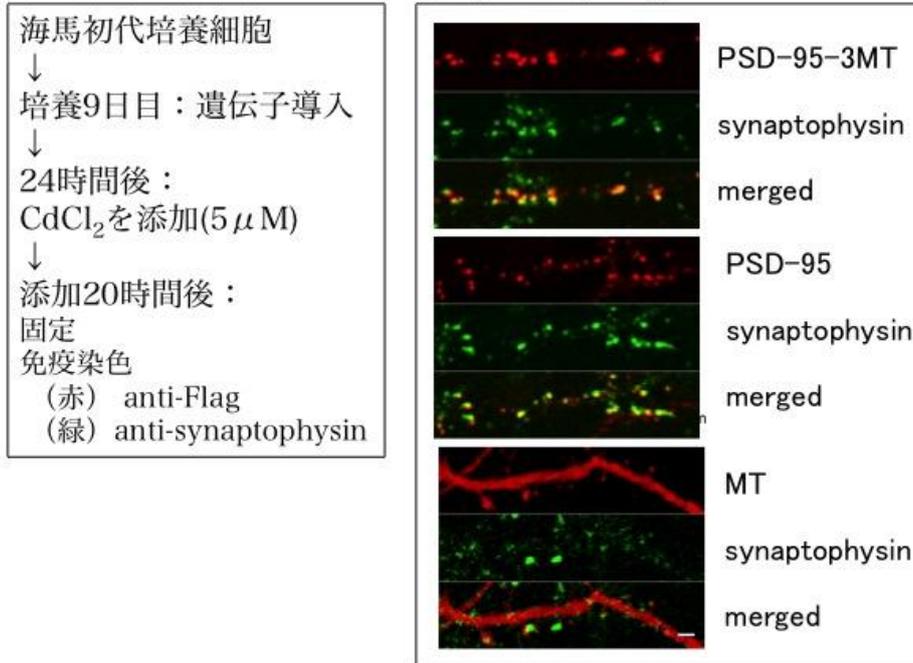
図2-7 PSD-95-3MTの電子顕微鏡観察（無染色）



無染色では細胞よりも樹脂の方が電子密度が高くなり、細胞が白く見える。図の上、PSD-95-3MT を遺伝子導入し、Cd 処置した神経細胞で電子密度の高い領域が見られる。

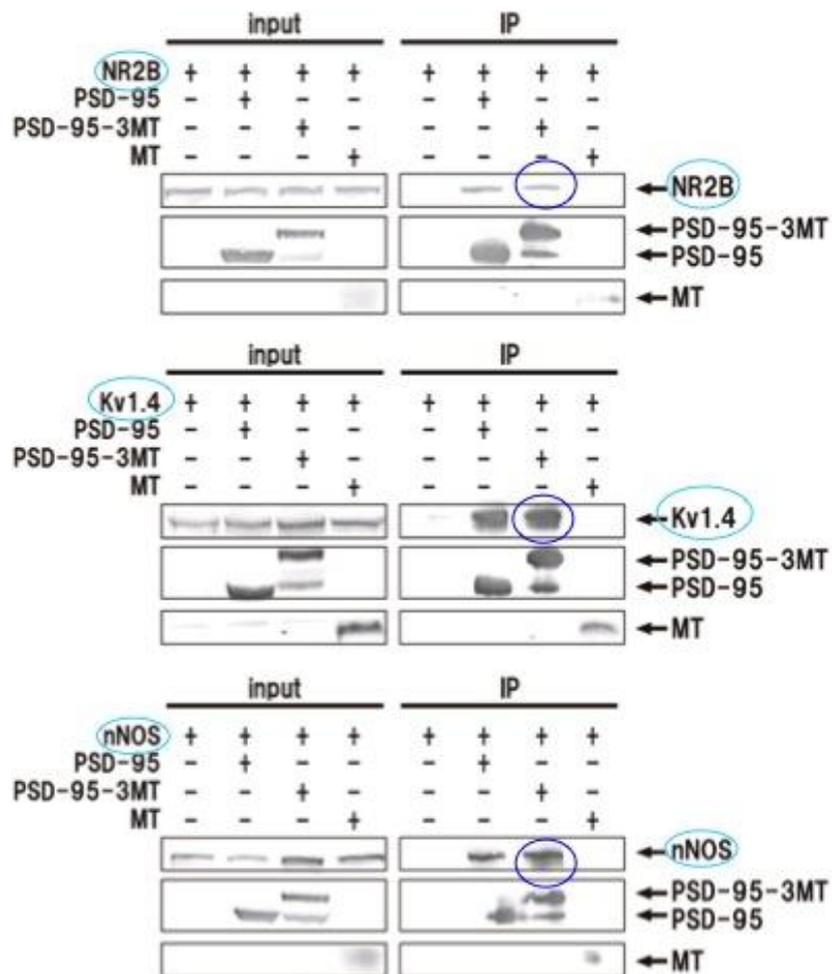
図2-8 PSD-95の局在・機能に及ぼす3MTの影響

PSD-95のsynapse targeting



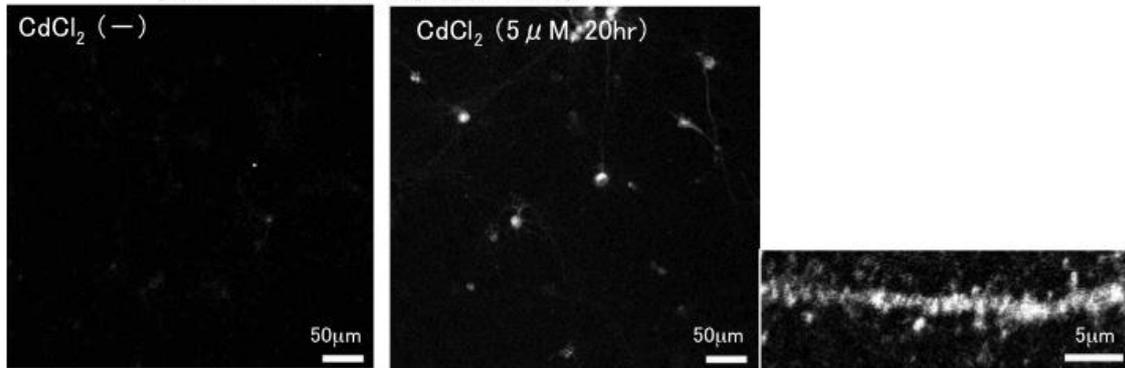
PSD-95の他のタンパク質との相互作用

Cos7細胞にPSD-95-3MTを
遺伝子導入
↓
24時間後CdCl₂を添加(20 μM)
↓
添加20時間後に細胞を回収
Lysateをサンプルとし、
Anti-Flag抗体で免疫沈降

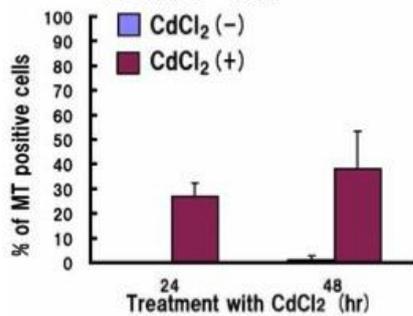


左が細胞破碎液に含まれるタンパク質で、右が免疫沈降の結果。NR2Bは、MTとは結合しないが、PSD-95 および PSD-95-3MT と結合している。Kv1.4 と nNOS についても同様の結果がみられる。

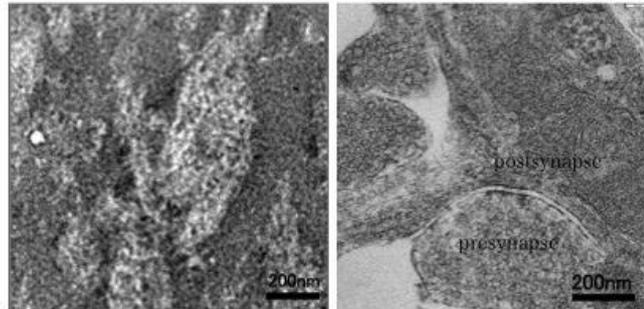
図2-9 内在性メタロチオネインの検討
抗メタロチオネイン抗体による染色



CdCl₂添加後24h, 48hの
MT発現細胞の割合



CdCl₂添加20hの海馬初代培養細胞の電子顕微鏡写真



CdCl₂添加により、海馬初代培養細胞に内在性 MT の発現が認められたが（光学顕微鏡写真とグラフ）、細胞内全体に分布しており（光学顕微鏡写真右の高倍率像）、電子顕微鏡観察では、細胞内に電子密度の高い領域は認められなかった。

第3章 細胞内 PSD-95 の電子線トモグラフィ解析

3-1 材料と方法

PSD-95-3MT を遺伝子導入し、Cd 処置した細胞で電子密度密度の高い領域が見られた試料切片を用いて、電子線トモグラフィを行った。切片を -60° から $+60^{\circ}$ まで回転させ、 1° 毎の傾斜像を取得した(図 1、2)。得られた連続傾斜像をアライメントし、三次元再構築を行った。電子顕微鏡は JEOL 社の JEM-2100 を使い、加速電圧 200kv にて、TVIPS 社のカメラで撮影を行った。連続傾斜像の取得から三次元再構築は(株)システムインフロンティア社の Tomography にて行った。

結果

3-2 細胞内 PSD-95 クラスターの立体構造解析

はじめに、オスミウムでの染色と切片の電子染色を施した試料で、シナプス内に電子密度の高い領域が観察された試料切片の電子線トモグラフィを行った(図 3-1)。三次元再構築したのちのスライス像を観察すると電子密度の高い領域は切片の上から下まで存在している事が分かった。また、切片の中央付近のスライス像でシナプス間隙の距離を測定すると約 20 nm であり、以前からの報告と一致していたことから、電子線トモグラフィが正しく行われていることが確かめられた。

次に PSD-95 クラスターのみを細胞内の三次元構造を観察するために、電子染色を施していない試料で電子密度の高い領域が観察された試料切片の電子線トモグラフィを行った(図 3-2)。連続傾斜像から三次元再構築を行うと図 4 左のような volume 像が得られた。一番上のは膜状、中央のものは楕円体状に集積していた。さらにある一定の電子密度をもつものを見やすくした Isosurface 像(図 3-4)を観察してみると、楕円体や膜状に集積している様子がより明らかになった。また、一番上のはサブクラスターが集合して、膜状のクラスターを形成しているように見え、一番下のは透過像(2章の図 2)では円錐状で見えていたが電子線トモグラフィによって内部にサブクラスターが存在している事が分かった。

3-3 考察

3MT 標識を用いて電子線トモグラフィを行うことによって細胞内の PSD-95 クラスターの三次元構造を観察することができ、膜状や楕円体状に集積してい

る事が分かった（図 3-4）。一番上の膜状に集積しているものの厚みは約 23 nm であり、免疫電子顕微鏡法で示された PSD に局在する PSD-95 の局在範囲と類似していたため [4]、PSD に局在している PSD-95 であると考えられる。PSD 内では PSD-95 はパルミトイル化されて、ポストシナプス膜直下で集積しているという報告が出ているので [14]、このクラスターは膜直下でクラスター化し、受容体の足場として機能していると考えられる。中央の楕円体状クラスターの厚みは約 91 nm であり、PSD の厚みとしては大きく、染色した像で観察されたクラスターと同様に PSD の下に存在する PSD-95 であると考えられる。これらの観察結果より、PSD-95 は神経細胞内で 2 つの異なる領域で集積していると考えられる。PSD 内では PSD-95 はパルミトイル化されているという報告が出ているので [14]、楕円体状のクラスターはパルミトイル化されていない PSD-95 が PSD の下で集積したものとも考えられる。しかし、2-6 でも考察したように、過去にも免疫電子顕微鏡法によって、PSD-95 がスパインアパラタスや小胞体と結合している様子が観察されており [17]、PSD から離れたところに局在している PSD-95 は細胞内小器官の膜と結合している可能性も考えられる。PSD に含まれない PSD-95 の機能や詳しい局在、クラスター形成様式を明らかにするためには、更なる研究が必要であると考えられる。透過像（図 2-2）では、一番上のクラスターは膜状、一番下のものは円錐状で見えていたが、電子線トモグラフィーによって内部に小さなクラスターが存在している事が分かった（図 3-4 右）。二次元の透過像もよく観察してみると、下 2 つのクラスターの内部や周りにサブクラスターが観察され（図 3-5）、この大きさと電子線トモグラフィーで見られたサブクラスターの大きさは一致していた。よって、PSD-95 はサブクラスターを形成し、これらが集まって大きなクラスターを形成している事が示唆された。

図3-1 PSD-95-3MTが検出された細胞切片の電子線トモグラフィ（染色あり）

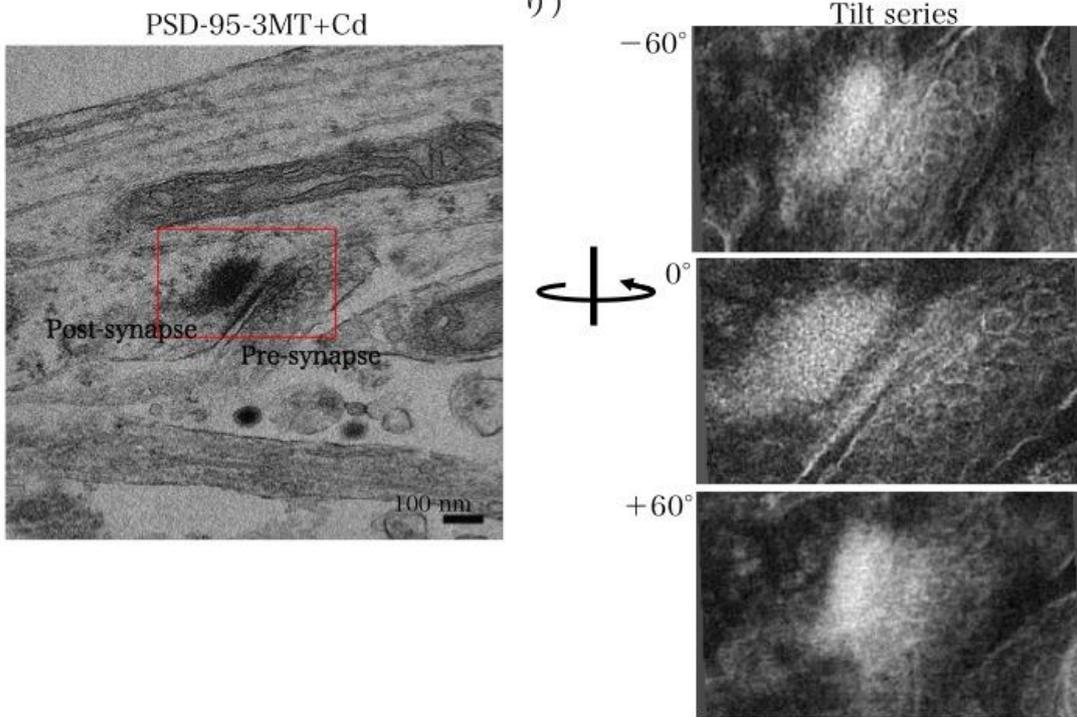


図3-2 PSD-95-3MTが検出された細胞切片の電子線トモグラフィ（無染色）

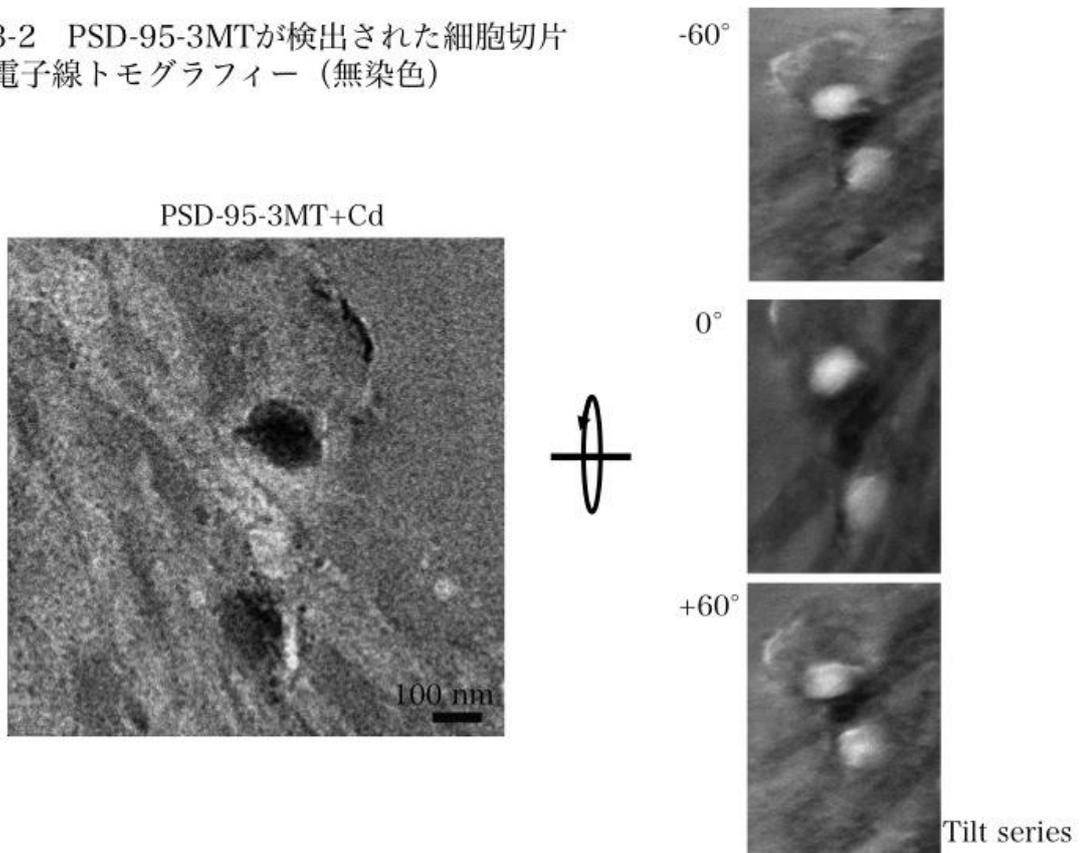


図3-3 PSD-95-3MTが検出された細胞切片の電子線トモグラフィー (Z-Slices)

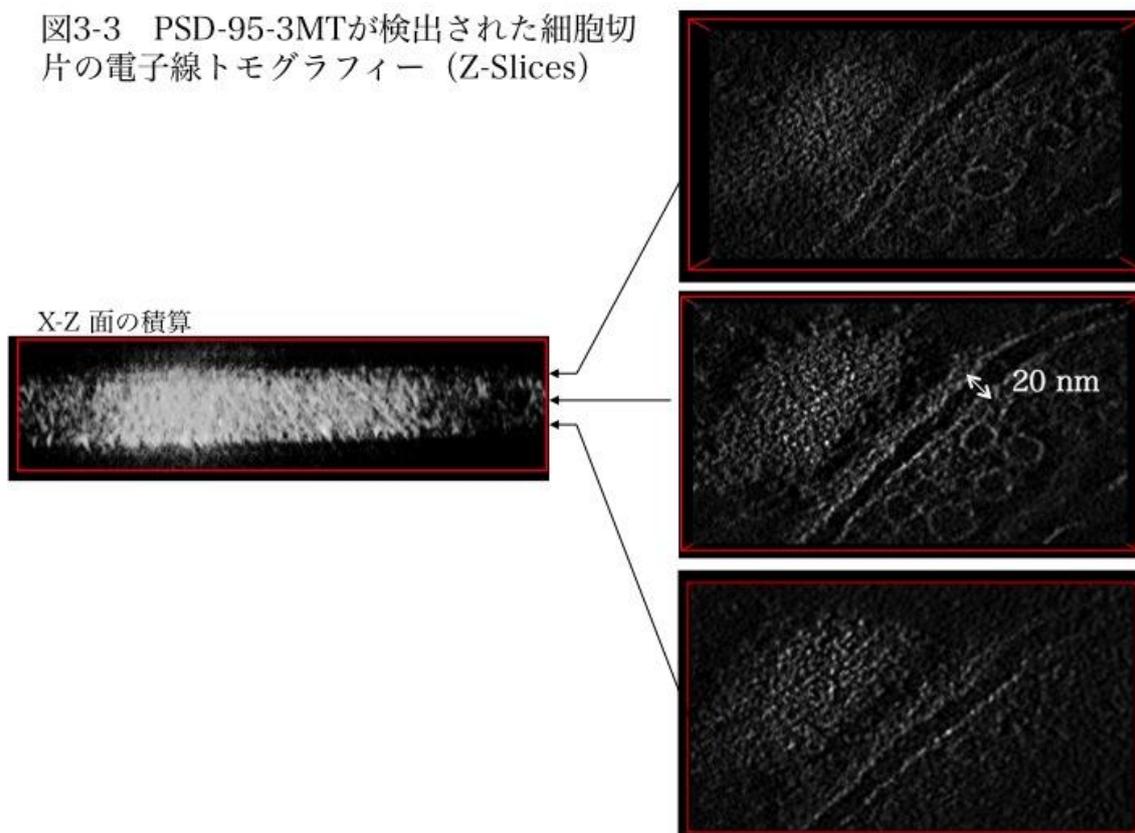
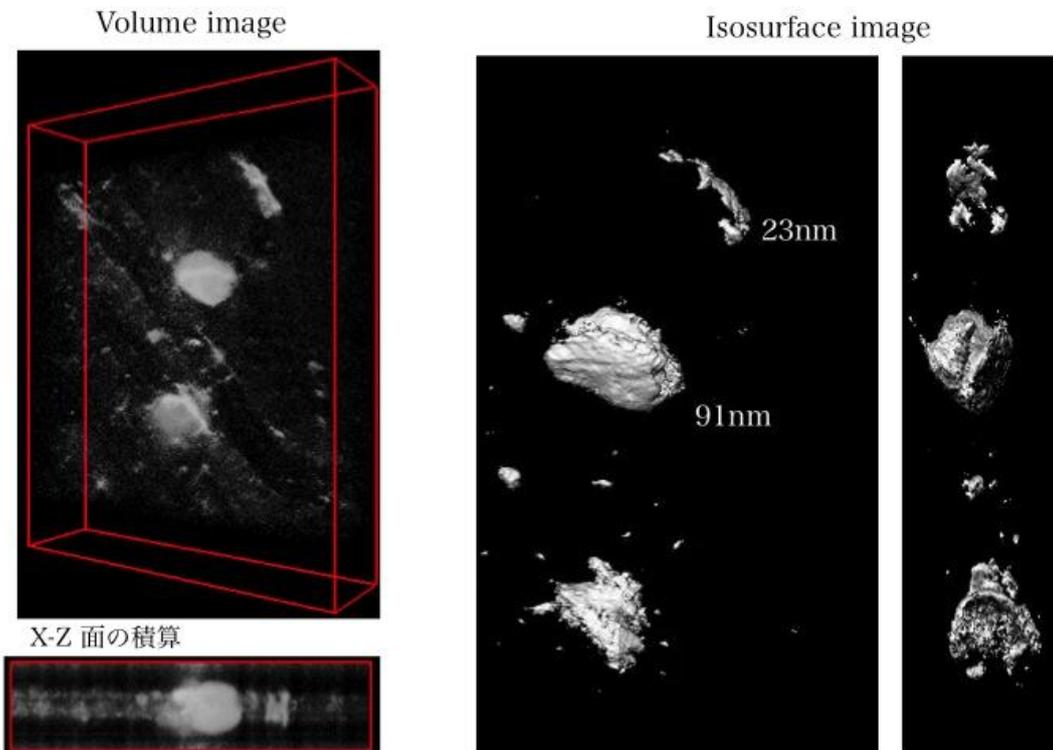
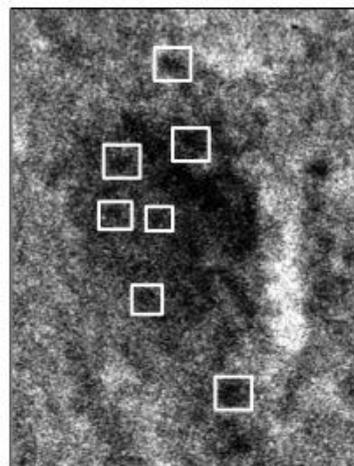
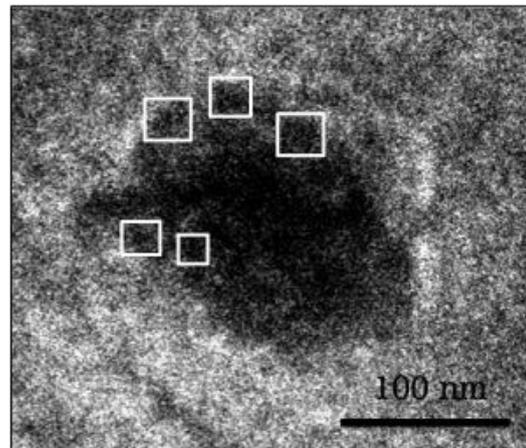
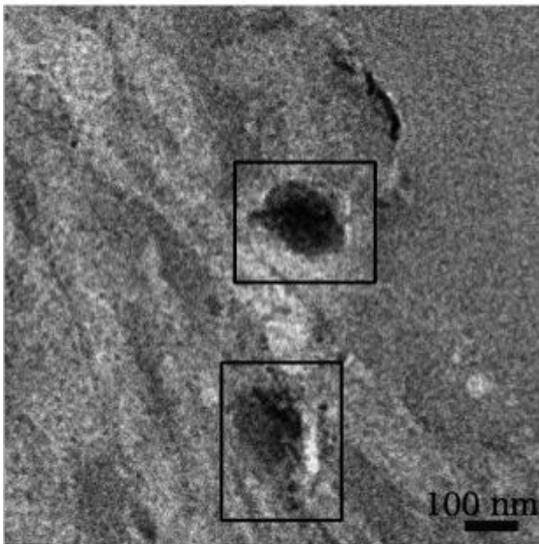


図3-4 PSD-95-3MTが検出された細胞切片の電子線トモグラフィー



Iso surface 像を観察すると、膜状や楕円体状に集積している様子がよく分かる。左パネル：膜状のものは厚み 23 nm、中央の楕円体状のものは厚み 90 nm で集積していた。右パネル：違う角度から観察してみると一番上の膜状のクラスターや一番下のクラスターがサブクラスターから形成されている様子が分かる。

図3-5
PSD-95-3MT+Cdの詳細観察



第4章 細胞内 PSD-95 の CEMOVIS 解析

4-1 化学固定と凍結固定

電子顕微鏡ではこれまで、化学固定法が広く使われていった。化学固定を用いた電子顕微鏡用の試料作製法は一般的には次の方法で行う。まず、アルデヒド固定を行い、その後、後固定として染色効果のあるオスミウム固定を行い、その後、エタノールによって脱水し、樹脂に置換、包埋する。重合した樹脂を超薄切片にし、必要に応じて、酢酸ウラン、クエン酸鉛等での染色を行う。化学固定に主に使われるアルデヒド固定では架橋化学固定を完了するまでに時間がかかるためすべての物質をそのまま保持する事は難しく、溶出や移動する可溶性物質も少なくない。また、タンパク質の構造の変化など種々のアーティファクトが加わってしまう場合もあると言われている。さらに、本来水分を含んだ状態である細胞を脱水、熱重合することにより、形態に変化がおこる可能性も指摘されている [20]。凍結固定はこれら化学固定法による人工的变化を最小限にとどめ、生きているときにできる限り近い状態で物質を保持し、構造を観察することができる方法として注目されている。しかし、細胞は60%以上が水分であるため、ただ凍らせただけでは氷晶ができ、細胞内の構造が壊れてしまう [21]。電子顕微鏡分野では直径 100nm 以上の氷晶ができると微細構造の観察は難しくなると言われている。そこで、氷晶が形成されないように氷晶形成域温度（細胞では -2°C ~ -80°C ）以下に試料を冷却する事が必要である。凍結固定には代表的な3つの方法があり、それぞれに長所や短所があるが、違いの一つは氷晶のない、非晶質な氷ができる深さである。液体窒素で冷やしたエタンやプロパンで急速凍結する浸漬凍結法では約 $5\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ 、冷却した純銅に圧着して凍結する金属圧着法では 10 ~ $20\mu\text{m}$ と言われている。一方、大気圧の2000倍の圧力をかけて凍結する加圧凍結では、 50 ~ $200\mu\text{m}$ と言われている。浸漬凍結は主に、精製したタンパク質の凍結に使われている。金属圧着法や加圧凍結法は主に組織や培養細胞の凍結に使われる。今回の実験材料であるモノレイヤーの海馬初代培養細胞は金属圧着によるダメージ層を除去できないという事と、細

胞周囲の水分を取り除く事が難しいので、より深い非晶質凍結深度を得やすい方がよいという理由で加圧凍結法を用いることにした。まず、実際に実験材料である海馬初代培養細胞でアルデヒドを用いた化学固定を行った細胞と加圧凍結した細胞とで電子顕微鏡像にどのような違いがあるのかを確認した。4-3 で示す CEMOVIS (非晶質氷切片の低温電子顕微鏡観察) は組織や細胞を凍結し、染色、脱水操作を施さないので、より生きている時に近い状態で、微細構造を観察できる手法だが、染色をしない事と、常温観察よりも電子線量を少なくしないといけないために、コントラストは低下し、電子顕微鏡像を化学固定と比較するのが難しいと考えられた。よって、まず、加圧凍結した試料の、凍結置換を行い、化学固定試料との比較を行った。

4-2 材料と方法

(1) 海馬初代培養細胞の加圧凍結・凍結置換

海馬初代培養細胞を直径 1.4mm のサファイアディスク上に培養し、専用のキャリアーに乗せ、EMPACT2 (Leica) で加圧凍結を行った (図 4-1)。

加圧凍結した細胞はキャリアーのまま、 -90° の凍結置換溶液に入れ、図 4-2 で示したように AFS2 (Leica) を使って凍結置換を行った。凍結置換後、キャリアーごと EPON812 樹脂に包埋し、重合後にキャリアーとサファイアディスクを剥がして超薄切片を作製した。切片を酢酸ウラン、クエン酸鉛にて電子染色し、電子顕微鏡観察や電子線トモグラフィー解析を行った。

(2) 海馬初代培養細胞の凍結切片の作製

これまでの報告で、脳組織の凍結切片 [15]、[16] や、遠心で集める事のできる培養細胞 [18]、大腸菌 [19] などについては凍結切片作製の方法が報告されてきた。今回海馬初代培養細胞の凍結切片を作製するにあたり、このようなモノレイヤーの培養細胞の凍結切片を作製した前例がなかったので、作製方法の検討を行った (図4-3)。海馬初代培養細胞はモノレイヤーで突起を伸ばして伸長している。この細胞はこれまでの報告のように遠心で集める事が出来なかったので、スクレイパーでディッシュから剥がし、キャリアーに乗せて、加圧

凍結を行った。今回のようなシート状の細胞を丸めて凍結した場合、凍結後にキャリアーから外すことは困難であり、細胞がバラバラになってしまう可能性も考えられた。そこで、キャリアーのままクライオウルトラマイクロトームUC6, FC6 (Leica)に入れ、キャリアーをトリミングナイフ (Ultra Trim45 (Diatome)) でトリミングし、ダイヤモンドナイフ (Cryoimmuno35 (Diatome)) を用いて、厚さ50 nmの凍結切片を作製した。クライオチャンバー内にキャリアーを固定するために、エタノールと2-プロパノールを2:1で混合したクライオグルーを接着剤として用いた。クライオグルーは -160°C で凝固するので、 -150°C でキャリアーをクライオグルーでウルトラマイクロトーム用のピンにつけ、その後、 -160°C に冷却することで固定した。凍結切片は染色を施さず、また、電子線量もプラスチック切片よりも低い条件で観察するため、細胞のコントラストは低くなる。海馬初代培養細胞をそのまま加圧凍結したところ、細胞周囲の水分（培養液など）が氷となってしまったために、切片が波打ってしまい、それを観察すると凹凸のコントラストが強くなり、細胞の輪郭は確認できたが、細胞内はほとんど観察できなかった。そこで、脳組織の凍結切片に用いられていた、人工脳脊髄液にデキストランとシュークロースを入れた氷晶防止溶液を使った。溶液を入れてから3分後に凍結を行ったので、この溶液を入れてから、5分後の細胞を光学顕微鏡で観察し、異常がないかを確認した。神経細胞に異常があるときは破裂や、突起が数珠状になるビーディングがおこるが、このような現象は見られなかった（図4-4）。凍結防止溶液を入れる事で、伸びた切片を作製することができた。凍結切片をC-Flat EM grid CF-2/2-2C (Aurion, Wageningen, Netherland) に乗せ、静電気によって切片をグリッドに定着させた (CRION, Leica Microsystems)。グリッドをクライオホルダー (Gatan Cryoholder914, Gatan, Warrendale, PA, USA) に入れ、 -170°C に保ちながら観察を行った。観察はJEOLのJEM-2100を使い、加速電圧200kV、Low-dose mode (300-400 electrons/ nm^2) で観察した。

結果

4-3 海馬初代培養細胞の加圧凍結・凍結置換

化学固定と加圧凍結・凍結置換で海馬初代培養細胞の電子顕微鏡像にどのような違いがあるのかを比較するために、加圧凍結した試料を凍結置換した。置換は凍結した試料を低温下でアセトン、メタノールなどを用いて置換・脱水する方法であり、固定が瞬時に完了し、また、アルデヒド固定を用いず、脱水処理を低温でおこなうため、微細構造の変化、物質の移動、流出が少ないと言われている手法である。電子顕微鏡写真を図4-5に示した。比較してみると、加圧

凍結・凍結置換の方が細胞質内やミトコンドリア内が黒く見、細胞質中成分が保持されていることが伺える。また、下の2枚のシナプス間隙付近の高倍率写真で示すように、化学固定では脂質二重膜が湾曲しているが、加圧凍結・凍結置換では湾曲せず、より明瞭に二重膜が観察された。よって海馬初代培養細胞においても加圧凍結の方がアルデヒドを用いた化学固定をしたときよりも細胞構造の保持がよく、細胞質中成分の流出も少ないと考えられる。さらに加圧凍結・凍結置換した試料の電子線トモグラフィーを行い、スライス像を観察してみると(図4-6)、シナプス間隙の接着分子らしきデンシティーやPSDに局在する分子のデンシティーが確認でき、電子線トモグラフィーによってもこの試料調製の方法は細胞質中成分の保持がよく、海馬初代培養細胞の固定方法として適していることが確かめられた。

4-4 CEMOVISによる細胞内PSD-95解析

(1) 海馬初代培養細胞の凍結切片

4-1(2)で示した方法で海馬初代培養細胞の凍結切片を作製し、観察を行った。図7左上のように、微小管の横断面が多数みられ、おそらくデンドライトだと思われる領域があり、微小管の断面が見えていたところを拡大すると13個のチューブリンがきれいに並んでいる様子が観察された。この微小管の内部に電子密度の高いものが見え、これは、以前から、神経細胞の微小管で観察される事が報告されているルミナルパーティクルと同様のものと思われる[22]、[23]。また、右上の写真のようにデンドライトと平行に切削されたと思われる領域では微小管が縦に走っている様子も観察された。また、図4-7の左下の写真のようにミトコンドリアなどの細胞小器官も見えた。右下の写真はシナプス小胞があるのでシナプスだと思われ、プレシナプスとポストシナプスの細胞膜も明瞭に観察された。これらの観察結果から、今回検討した方法を用いて海馬初代培養細胞の凍結切片を作製し、神経細胞のシナプスを観察できることが分かった。凍結切片ではシナプス小胞が少し楕円に見えるがこれは無固定で凍結しただけの細胞を切削する際に切削による応力がかかってしまうことによると考えられる[18]。

(2) 凍結切片での細胞内PSD-95の観察

海馬初代培養細胞の凍結切片が作製、観察出来る事が分かったので、PSD-95を3MT標識した海馬初代培養細胞の凍結切片を作製し、観察すると図8のように、ポストシナプスに電子密度の高い小さなクラスター(デンスコア)が観察され

た。コントロールの何も処理していない海馬初代培養細胞やPSD-95-3MT発現のみ、Cd処置のみの海馬初代培養細胞のシナプスではこのようなデンスコアは見られなかった。また、この試料切片は染色を施していないので、電子顕微鏡で黒く観察されるものは膜系意外ではMTに結合したCdだと考えられる。よってこれらのデンスコアは、3MTで標識されたPSD-95由来のものだと考えられる。また、このデンスコアの大きさは化学固定、樹脂包埋した超薄切片で見られたサブクラスターと類似しており（図3-4, 3-5）、化学固定や脱水操作がなく、より生きていときに近い状態で細胞を観察できる凍結切片においてもサブクラスターの存在を確認する事ができた。

4-5 考察

化学固定無染色切片で見られた PSD-95 のサブクラスターが凍結切片内でも観察された。PSD-95 は N 末で結合し、ダイマーやマルチマーを形成しており、この自己重合がシナプスの機能を調製する AMPA 受容体のコントロールに重要であるという報告がある [24]。今回、CEMOVIS で観察されたサブクラスターの直径は約 10~30 nm であり、精製した PSD-95-3MT の大きさとも類似していた (図 2-3)。よって 3MT 標識法を用いることによって PSD-95 が自己重合したマルチマー (サブクラスター) を観察できたと考えられる。この PSD-95 のサブクラスターの分子機構をさらに明らかにするためにはより多くの細胞内 PSD-95 を観察することが必要であり、そのためにはラベルの効率を上げる事や、凍結切片観察の技術向上が必要だと考えられる。今回 CEMOVIS で観察されたデンスコアは化学固定で見られたものよりデンシティーが低く、また化学固定切片では PSD に局在すると思われるものと、PSD より下に局在すると思われるものが見られたが、凍結切片内では PSD の下では PSD-95-3MT は検出されず、数も少なかった。これら見え方の違いは、凍結切片ではコントラストが低く、また、S/N 比も低くなることによると考えられる。凍結切片の方が作製や観察の都合上、切片厚が薄くなり、よってコントラストが低くなる。また、凍結切片が電子線によって溶けないように Low-dose mode で観察しなければいけないことで S/N 比が低くなると思われる。このような条件にも関わらず、CEMOVIS でポストシナプス膜直下に PSD-95 のデンスコアが観察され、その局在場所は PSD に局在する PSD-95 と一致していたことから [4]、PSD に局在しない PSD-95 よりも PSD に局在している PSD-95 の方が電子密度が高い可能性も考えられる。クライオ電子線トモグラフィは生物試料内の三次元構造を生きていときに近い状態で観察できる方法として、注目されており、これまでも様々な細胞内タンパク質の解析に使われてきた [7]。しかし、4-3(1)で述べたように、凍結切片作製時にシナプス小胞の形が変化してしまっているように見え、今回の観察対象である PSD-95 のサブ

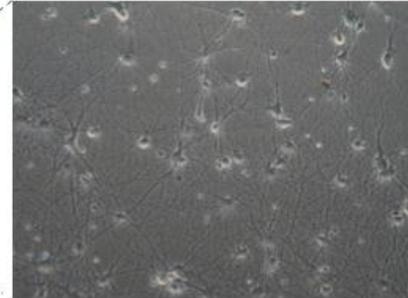
クラスターは非常に小さなものなので、このままクライオ電子線トモグラフィーしても正しい三次元構造が得られないと考えられた。今後、このサブクラスターの立体構造解析を行うには、さらなる方法の検討が必要だと考えられる。1つの例として、海馬初代培養細胞を電子顕微鏡用のグリッド上に培養し、PSD-95 のラベルを行い、急速凍結する。厚い試料のトモグラフィーに向いている STEM Tomography [25] を用いて、なるべく薄いシナプスを狙ってクライオ電子線トモグラフィーを行うという方法が考えられる。この方法であれば、切削の必要がないので、正しい立体構造が観察できると考えられる。しかし、電子線を長く当てる事はさげなければならず、視野探しにあまり、時間をかけられないので、より多くのシナプスでサブクラスターが観察出来るように、ラベルの効率を上げる検討も必要であると考えられる。

図4-1 海馬初代培養細胞の加圧凍結

EMPACT2 (Leica)



Hippocampal neurons
on sapphire
disk(1.4mm)



Flat carrier
($\text{O}1.5\text{mm}$ 、Depth: $200\mu\text{m}$)

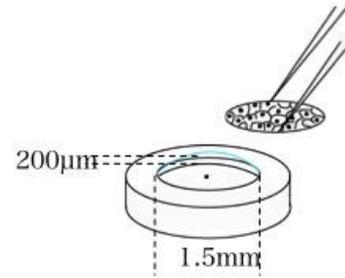


図4-2 海馬初代培養細胞の凍結置換

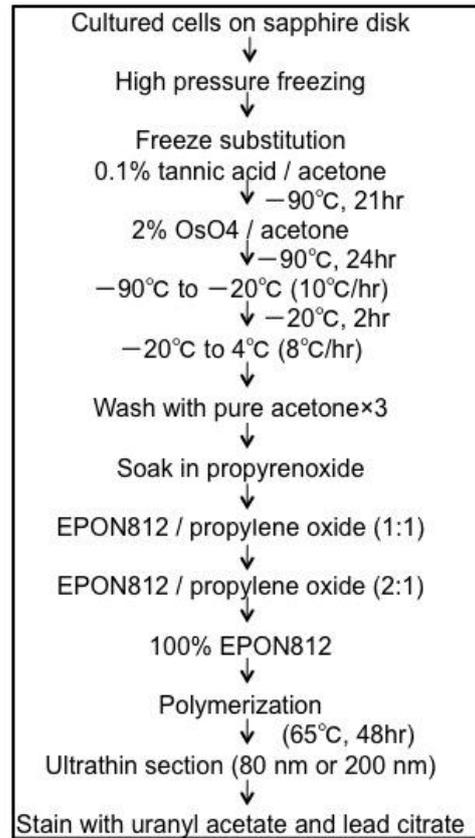


図4-3 海馬初代培養細胞の凍結切片作製

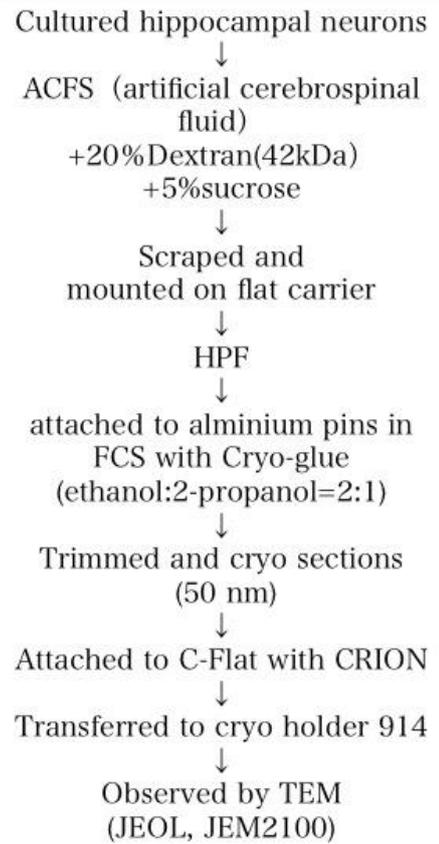
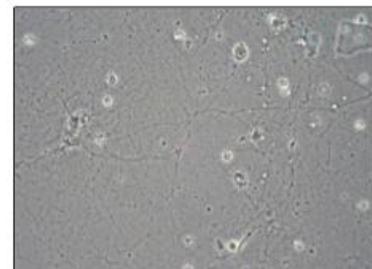
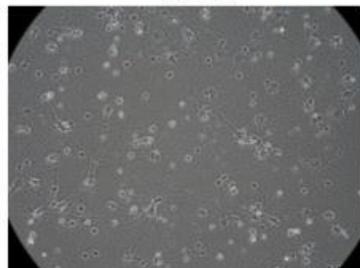
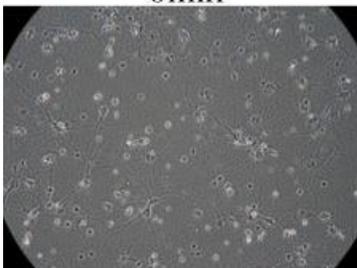


図4-4 凍結防止溶液の海馬初代培養細胞への影響

ACSF+dextran+sucrose

0min

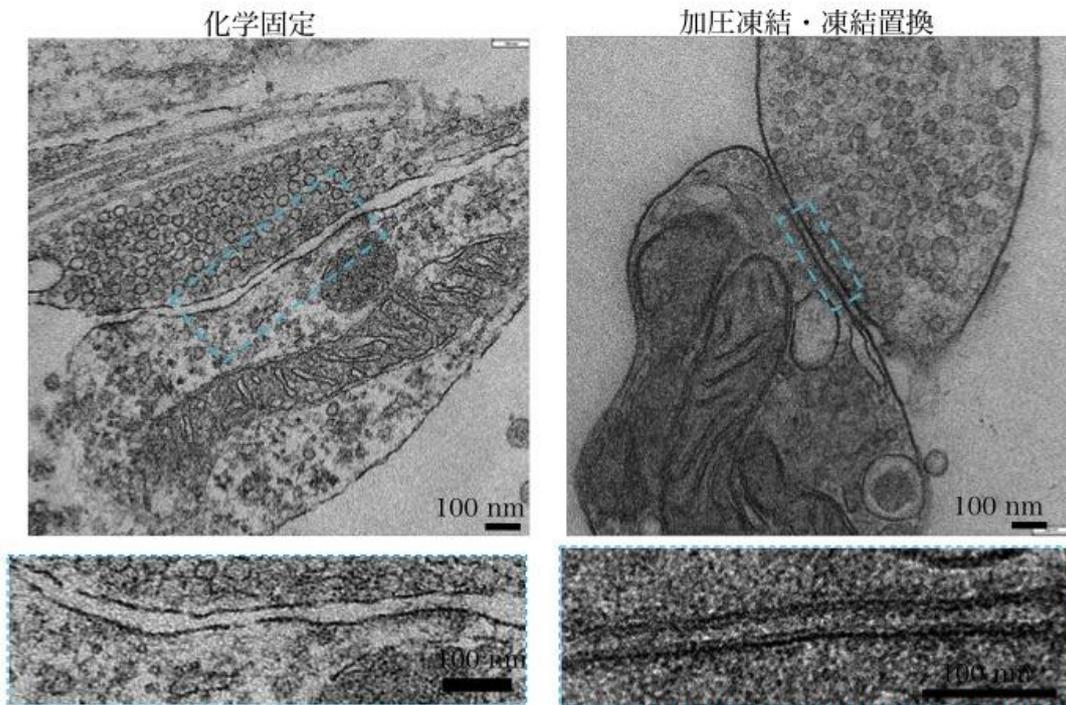
5min



ビーディングや破裂が見られる海馬初代培養細胞

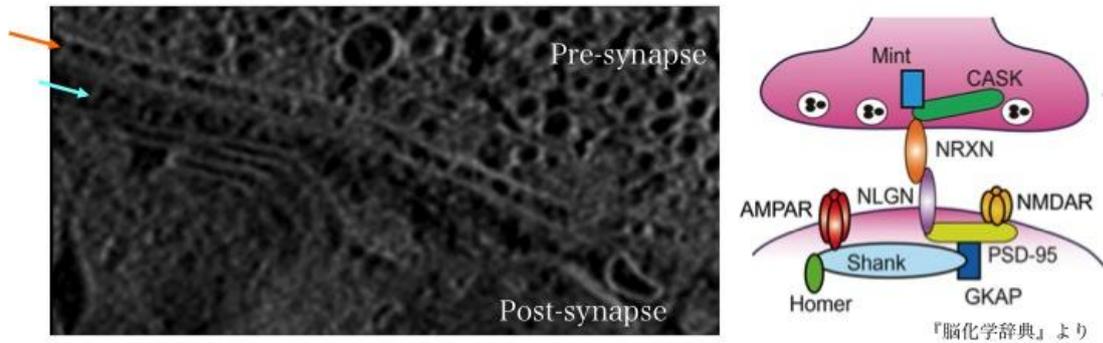
凍結防止溶液を入れてから 5 分後の細胞も形態的变化はなく、ビーディングなどは見られなかった。

図4-5 海馬初代培養細胞の化学固定と凍結固定の比較



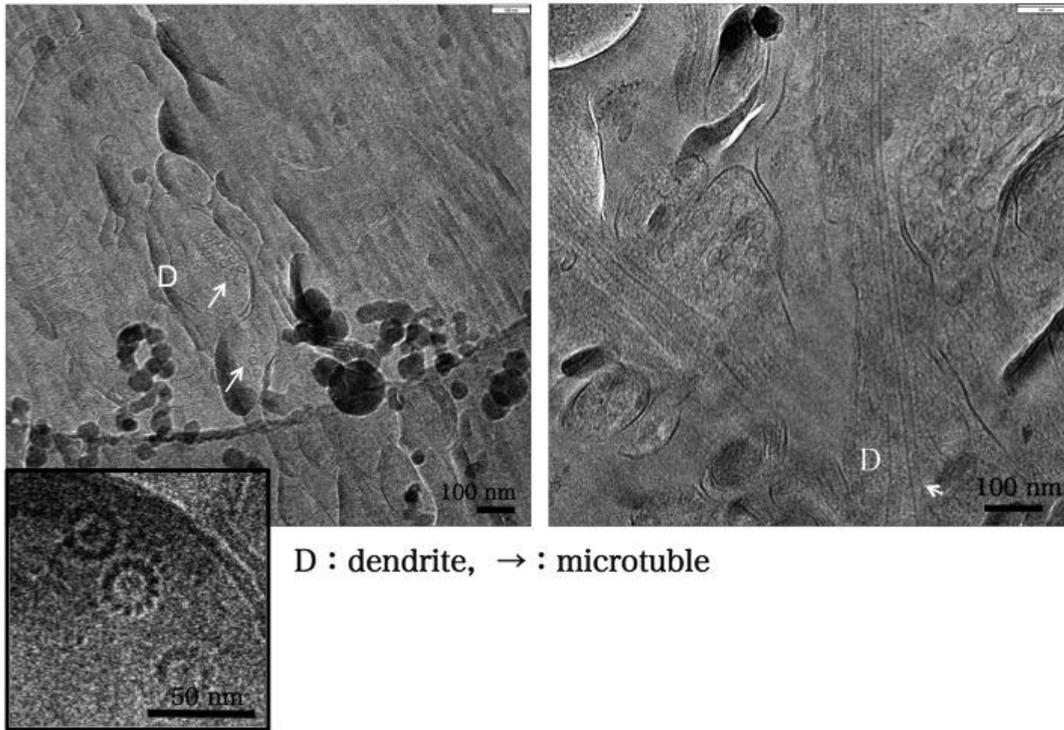
加圧凍結・凍結置換の方が細胞質内やミトコンドリア内が黒く見、細胞質中成分が保持されていることが分かる。また、下の2枚の写真で示すように、化学固定では脂質二重膜が湾曲しているが、加圧凍結・凍結置換では湾曲せず、より明瞭に脂質二重膜が観察された。

図4-6 海馬初代培養細胞の加圧凍結・凍結置換
(電子線トモグラフィー、Zスライス像)



シナプス間隙に細胞間接着と思われるデンシティー（オレンジ矢印）が見え、ポストシナプス膜からも PSD に局在するタンパク質に由来するデンシティー（水色矢印）が観察できた。

図4-7 海馬初代培養細胞の凍結切片の観察



13個のチューブリンの中央にはルミナルパーティクルが見られる。右下の写真の矢印は切削方向を示しており、切削方向に応力がかかってシナプス小胞が楕円形になっている。

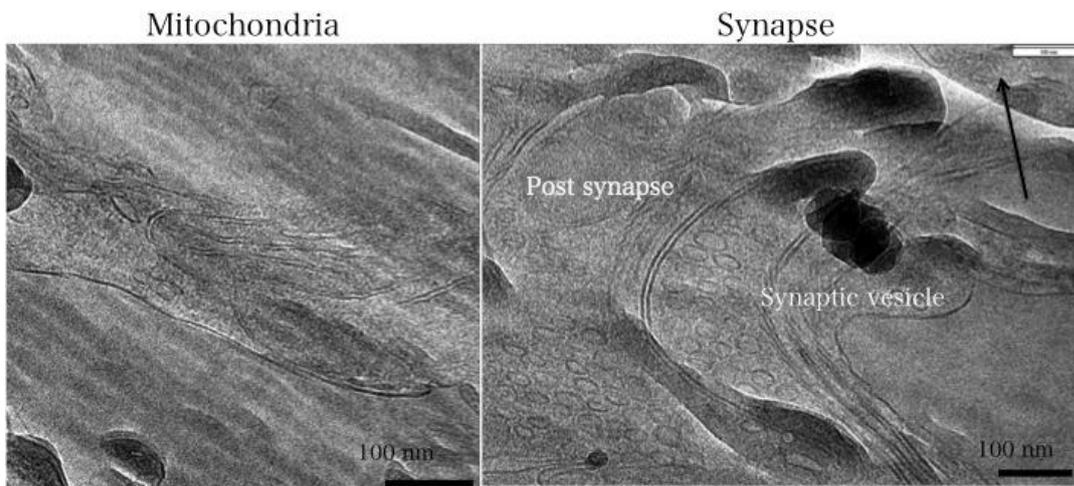
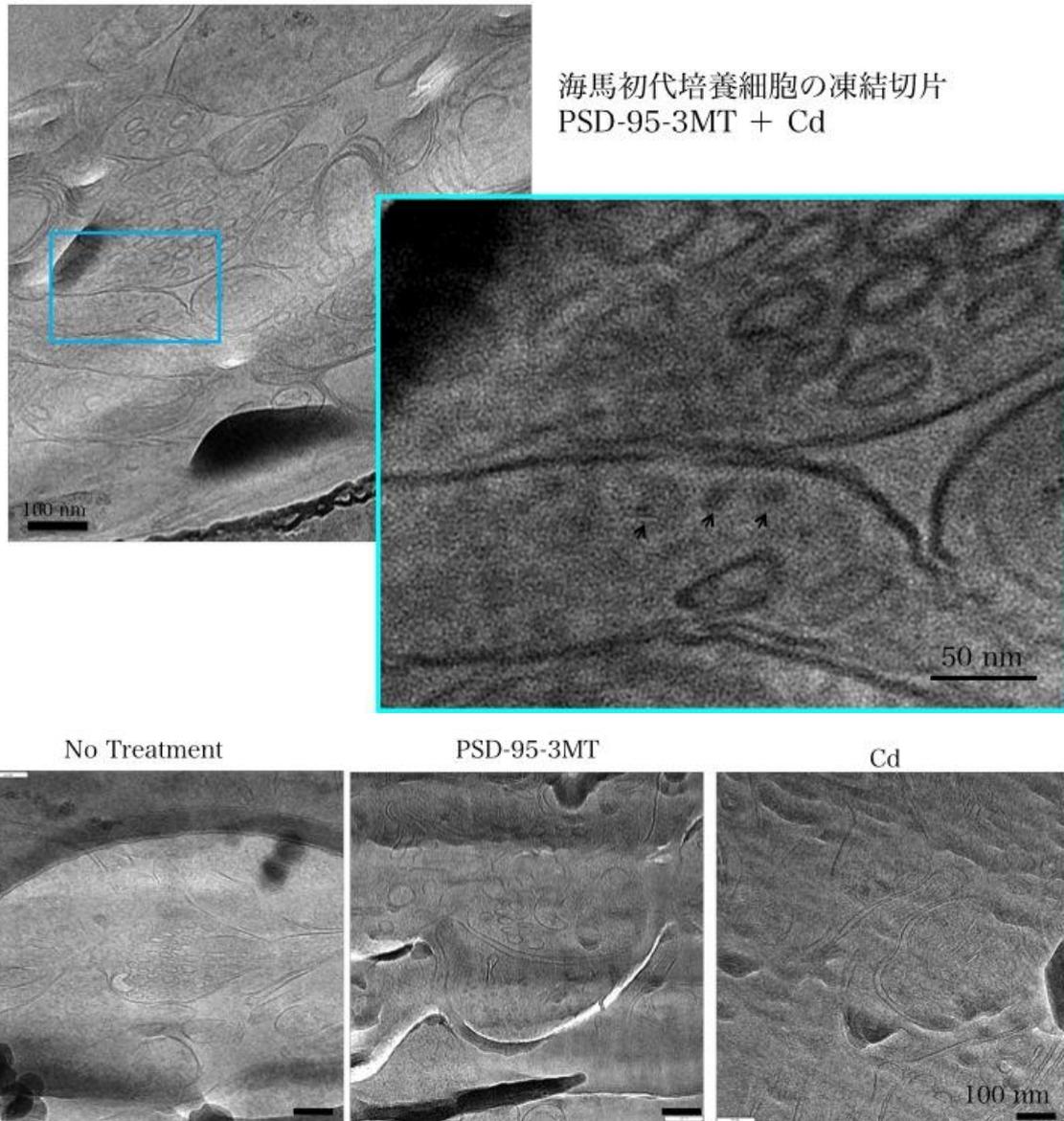


図4-8 海馬初代培養細胞の凍結切片でのPSD-95-3MTの検出



ポストシナプス膜直下（膜から約 20 nm）の所にデンスコアが見られる（矢印）コントロールである下の 3 枚の写真のシナプスではこのようなデンスコアは見られない。

第5章 結論

本研究において、3MT 標識により、細胞内 PSD-95 クラスターを電子顕微鏡で観察することに成功し、楕円体状や膜状で集積しているという 3次元構造を観察することができた。さらに、海馬初代培養細胞の凍結切片作製法を確立し、その中で、3MT 標識した PSD-95 を検出することができた。これらの研究結果から、3MT 標識法は細胞内のタンパク質クラスターの三次元構造の観察やより生きている時に近い状態での低温電子顕微鏡観察にも有用な標識法であることを示すことができた。

3MT 標識法を用いて電子線トモグラフィーを行うことで、PSD-95 が PSD と PSD 以外の 2カ所に局在し、膜状と楕円体状の 2種類の形状で集積している様子を観察することができた。これまでも、免疫電子顕微鏡法によって、PSD や PSD 以外に局在する PSD-95 の同定は行われてきたが [4]、[14]、今回初めて、PSD 以外でクラスターを形成している様子を観察することができた。また、電子線トモグラフィーと CEMOVIS での観察結果から PSD-95 はサブクラスターを形成し、それらが集まってクラスターを形成していることを初めて示すことができた。電子線トモグラフィーで膜状に見えた PSD-95 の厚みはこれまで、PSD に局在する PSD-95 として報告されてきた局在範囲 [4] と一致しており、PSD に局在する PSD-95 だと考えられる。パルミトイル化された PSD-95 がポストシナプス膜直下でナノクラスターを形成しているという報告が出されており [5]、この報告では光顕で長径約 200nm のナノクラスターが形成されていることを示しているが、今回、電子線トモグラフィーによって、膜状に集積している三次元構造を観察することができた。また、AMPA 受容体をポストシナプス膜に結合させ、シナプス機能を調整するには、PSD-95 がダイマーもしくはマルチマーを形成することが必要であることが分かっている [24]。今回、シナプスで観察されたサブクラスターの大きさ (図 3-4, 3-5, 4-8) は 3MT 標識によって観察された精製 PSD-95 粒子と大きさが類似しており (図 2-3)、PSD-95 が自己集合によってダイマーもしくはマルチマーを形成したものだと考えられる。よって、PSD-95 は自己集合によって、サブクラスターを形成し、それらが集まってクラスターとなり、受容体の足場タンパク質として機能していると考えられる。なぜ、サブクラスターを形成する必要があるかは解明されていないが、一分子の PSD-95 では相互作用する多くのシグナルタンパク質と同時に結合できないので、サブクラスターを形成し、これらを同時に PSD に集め、機能させている可能性が考えられる。PSD の下で見られたクラスターに関してはこれまで、免疫電子顕微鏡法により、スパインアパラタスや小胞体などの細胞内小器官の膜に結合している事が報告されてきたが、今回、初めて、楕円体状のクラスターを形成している様子を観

察することができた。今回の実験で、化学固定した透過像中や電子線トモグラフィの iso surface 中で、サブクラスターから大きなクラスターが形成されている様子が観察できたが、COMOVIS では PSD の下のサブクラスターは観察されていない。4-5 で述べたように、今後、ラベルの効率や低温電子顕微鏡でのシナプスの観察効率を上げることによって、このクラスターについての詳細な情報が得られると考えられる。

PSD-95 はシナプス活動において非常に重要な役割を担っている。従って、PSD-95 のポストシナプスへの移動およびクラスターの形成過程を明らかにすることはシナプスの形成や機能を理解する上で極めて重要であり、後には、神経細胞の変異が原因である病気の原因解明などにも役立つと考えられる。よって本研究の結果から初めて、PSD-95 がサブクラスターを形成し、それが集まって大きなクラスターを形成していることを示すことができたことは今後の神経シナプス研究に貢献する重要な結果であると考えられる。

参考文献

- 1 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, et al. (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**: 433-439.
- 2 Tomita S, Nicoll R A, and Brecht D S (2001) PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J. Cell Biol.* **153**:F19-24.
- 3 Fukata M, Fukata Y, Adesnik H, Nicoll RA, Brecht DS. (2004) Identification of PSD-95 Palmitoylating Enzymes. *Neuron* **44**: 987-996
- 4 Valtschanoff J G, Weinberg R J (2001) Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. *J. Neurosci.* **21**: 1211-1217.
- 5 Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer O, Perez F, and Fukata M (2013) Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J. Cell. Biol.* **202**:145-161.
- 6 Nishino Y, Yasunaga T, and Miyazawa A (2007) A genetically encoded metallothionein tag enabling efficient protein detection by electron microscopy. *J. Electron Microsc* **56**(3): 93-101.
- 7 Al-Amoudi A, Diez D C, Betts M J, Frangakis a S (2007) The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* **450**: 832-837.
- 8 Delgado L, Carrión O, Martínez G, López-Iglesias C, Mercadé E (2013) The stack: a new bacterial structure analyzed in the antarctic bacterium *Pseudomonas deceptionensis* M1(T) by transmission electron microscopy and tomography. *PLoS One* **8**: e73297.
- 9 Couture-Tosi E, Ranck J L, Haustant G, Pehau-Arnaudet G, Sachse M (2010) CEMOVIS on a pathogen: analysis of *Bacillus anthracis* spores. *Biol. Cell* **102**: 609-619.

- 10 Nielson K B, Atkin C L, and Winge D R (1985) Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.* **260**: 5342-5350.
- 11 Lopez E, Figueroa S, Oset-Gasque M J, and Gonzalez M P (2003) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *Br. J. Pharmacol.* **138**: 901-911.
- 12 RenXY, ZhouY, ZhangJP, FengWH, andJiaoBH(2003)Expres- sion of metallothionein gene at different time in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *World J. Gastroenterol.* **9**: 554-1558.
- 13 Vasconcelos M H, Tam S C, Hesketh J E, Reid M, and Beattie J H (2002) Metal- and tissue-dependent relationship between metal- lothionein mRNA and protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182**: 91-97.
- 14 El-Husseini a E, Craven S E, Chetkovich D M, Firestein B L, Schnell E, Aoki C, Brecht D S (2000) Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic target- ing, and ion channel clustering. *J. Cell Biol.* **148**: 159-172.
- 15 Zuber B, Nikonenko I, Klauser P, Muller D, Dubochet J (2005) The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**: 19192-19197.
- 16 Fukuda Y, Fukazawa Y, Danev R, Shigemoto R, Nagayama K (2009) Tuning of the Zernike phase-plate for visualization of detailed ultrastructure in complex biological specimens. *J. Struct. Biol.* **168**: 476-484.
- 17 Aoki G, Miko I, Oviedo H, Mikeladze-Dvali T, Alexandre L, Sweeney N, Brecht D S (2001) Electron microscopic immunocyto- chemical detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at postsynaptic, presynaptic, and nonsynaptic sites of adult and neo-natal rat visual cortex. *Synapse* **40**: 239-257.
- 18 Dubochet J, Zuber B, Eltsov M, Bouchet-Marquis C, Al-Amoudi A, Livolant F (2007) How to “read” a vitreous section. *Methods Cell Biol.* **79**: 385-406.

- 19 Pierson J., Fernández J. J., Bos E., Amini S., Gnaegi H., Vos M., Bel B., Adolfsen F., Carrascosa J.L., Peters P.J. (2010) Improving the technique of vitreous cryo-sectioning for cryo-electron tomography: Electrostatic charging for section attachment and implementation of an anti-contamination glove box. *J. Struct. Biol.* **169**: 219-225
- 20 Norle L. and Al-Amoudi A. (2004) Stratum corneum keratin structure, function, and formation: the cubic rod-packing and membrane templating model. *J Invest Dermatol.* **123**:715-32.
- 21 Muhlfeld C1 and Richter J. (2006) High-pressure freezing and freeze substitution of rat myocardium for immunogold labeling of connexin 43. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **288**:1059-67.
- 22 Bouchet-Marquis C, Zuber B, Glynn a M, Eltsov M, Grabenbauer M, Goldie KN, Thomas D, Frangakis a S, Dubochet J, Chrétien D (2007) Visualization of cell microtubules in their native state. *Biol. Cell* **99**: 45-53.
- 23 Garvalov B K, Zuber B, Bouchet-Marquis C, Kudryashev M, Gruska M, Beck M, Leis A, Frischknecht F, Bradke F, Baumeister W, Dubochet J, Cyrklaff M (2006) Luminal particles within cellular microtubules. *J. Cell Biol.* **174**: 759-765.
- 24 Xu W, Schlüter O M, Steiner P, Czervionke B L, Sabatini B, Malenka R C (2008) Molecular dissociation of the role of PSD-95 in regulating synaptic strength and LTD. *Neuron* **57**: 248-262.
- 25 Aoyama Kazuhiro, Takagi Tomoko, Hirase Ai and Miyazawa Atsuo (2008) STEM tomography for thick biological specimens. *Ultramicroscopy*, **109** 70-80

謝辞

本研究を遂行するに当たりご指導下さいました、兵庫県立大学大学院 細胞構造学分野 宮澤淳夫教授、九州工業大学 情報工学部 生命情報工学科 安永卓生教授、大阪大学 タンパク質研究所 岩崎憲治准教授 に厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するに当たり、多くのご指導、ご助言、ご協力をいただきました、兵庫県立大学の福永優子助教、西野有里特任助教、元理化学研究所リサーチアソシエイト東原愛様に深く感謝いたします。

電子顕微鏡用試料調製法についてご指導いただきました日本電子株式会社の会田嗟武朗様、ライカマイクロシステムズ株式の伊藤喜子様、Diatome 社の Mr. Gnaegi Helmut 、京都大学の諸根信弘先生に厚く御礼申し上げます。

電子線トモグラフィーの解析についてご指導いただきました、株式会社システムインフロンティアの古河弘光様・清水美代子様・堀井則孝様・川本克巳様・片桐康代様・森裕子様に深く感謝いたします。

ありがとうございました。