

2006年5月15日

独立行政法人 理化学研究所

独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

細胞小器官ゴルジ体のタンパク質輸送の大論争に決着

- 性質の違う膜を融合・分離させ変化しながら運ぶ新メカニズムを発見 -

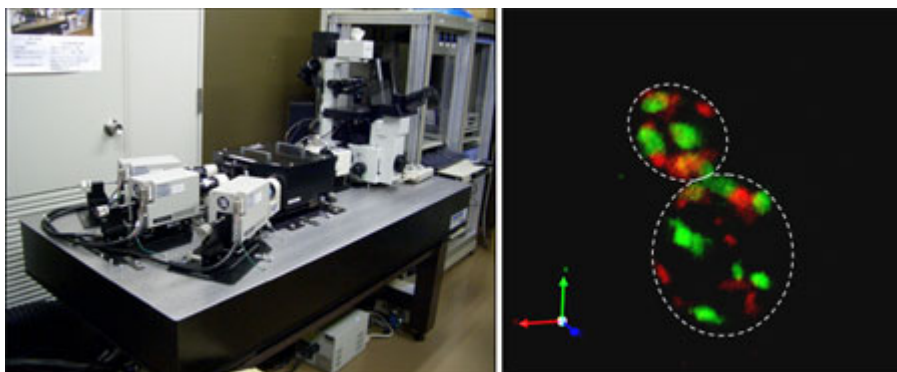
細胞は、生命の最小単位です。この細胞が働けるのは、細胞内でさまざまな仕事をしている「細胞小器官」のおかげです。この小さな器官は、細胞内に膜で囲んだ小さな区画を作り、さまざまな生命反応を分業する重要な構造を持っています。細胞小器官の一つ「ゴルジ体」では、細胞がつくったタンパク質を仕分けして外に運び出す役割を担っています。

ところが生命にかかわる重要なタンパク質が、ゴルジ体の中をどのように輸送されていくかは世界中の大勢の研究者が努力しているにもかかわらず謎のままでした。

「小さな膜の袋（小胞）で輸送する」、「槽の性質が変わって成熟しながら運ぶ」という2つのモデルが、世界を二分して大論争が続いていました。

中央研究所中野生体膜研究室は、光学顕微鏡の限界を越え、ナノという微細な世界を生きたまま観察することができる世界初の高性能顕微鏡を開発、この論争に決着をつけました。槽が成熟しながらタンパク質を運ぶだけでなく、性質の違う膜を分離させ変化しながら移動させる新メカニズムを発見したのです。

この新顕微鏡の開発は、生きたままの細胞をナノの目で観察することを可能とするもので、今後、さまざまな生命現象の謎を解き、威力を発揮することになります。



(写真) 開発した新型レーザー顕微鏡システムと撮影したゴルジ体の映像例

2006年5月15日

独立行政法人 理化学研究所

独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

細胞小器官ゴルジ体のタンパク質輸送の大論争に決着

- 性質の違う膜を融合・分離させ変化しながら運ぶ新メカニズムを発見 -

◇ポイント◇

- ・光学顕微鏡の限界越え細胞内のナノ現象を生きたまま観察する新システムを開発
- ・感度、測定速度、従来光学顕微鏡の100倍以上、3次元分解能も新記録
- ・薬物の細胞内の作用の追跡や病原体の細胞内侵入を捉える

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）と独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO技術開発機構・牧野力理事長）は、光学顕微鏡の限界を越え、細胞内の微細なナノ構造を生きたまま観察することができる新しいレーザー顕微鏡システムの開発に成功し、この顕微鏡を用いて細胞小器官^{*1}ゴルジ体^{*2}のタンパク質輸送のメカニズムを初めて解明しました。これは、理研中央研究所（茅幸二所長）の中野明彦主任研究員、時田（松浦）公美基礎科学特別研究員らの研究成果です。

細胞は、生体内で他の細胞と相互作用するためにさまざまなタンパク質を細胞外に分泌します。その分泌されるタンパク質が作られてから外に出るまでの過程で、仕分けの仕事をする細胞内の小器官が「ゴルジ体」です。ゴルジ体は、1898年に発見された小器官で、扁平な袋（槽）が積み重なった構造をしています。その槽の間のタンパク質の移動機構は長年の謎であり、世界中の研究者が大論争を繰り広げていました。理研の研究グループは、横河電機、NHK、日立国際電気などとの共同研究で、新型レーザー共焦点顕微鏡システム^{*3}の開発研究を進め、従来の顕微鏡よりも感度、測定速度が100倍以上優れ、記録的な3次元分解能をもつ装置の開発に成功しました。この装置を用い、ゴルジ体では、1つの槽が網目状の構造を取りながらその中で違う性質の膜の融合と分離を繰り返し、次第に全体の性質を変えながら内部のタンパク質を移動させていくという、新しいメカニズムが働いていることを世界で初めて明らかにしました。

この新しい顕微鏡システムは、レーザー光を用いながら100 nm（ナノメートル=10⁻⁹メートル）以下という高い分解能で、かつ0.01秒という非常に短い間隔で生きた細胞の動的変化を観察することが可能です。この性能は、これまで電子顕微鏡により凍結あるいは化学固定した細胞だけでしか観察できなかった微視の世界を3次元の動画で捉えることを可能にしました。生きたままの細胞をナノメートルの目で観察することによって多くの生命現象の謎を解決し、ライフサイエンスの発展に新たな大きな展望を拓くものと期待されます。また、薬物の細胞内の作用の追跡や病原体の細胞内侵入を捉えるなど、創薬、臨床医学等への幅広い応用も期待されます。

本成果は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO技術開発機構）の「細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発」プロジェクトの委託を受けたもので、英国科学誌「ネイチャー」（5月14日付）電子版に掲載されます。

1. 背景

生命の最小単位は細胞であり、生命活動の基本は、一つ一つの細胞が遺伝情報として書かれた設計図にしたがって正しく形を作り、機能を果たすことにあります。細胞小器官は、細胞内に膜で囲まれた小さな区画を作って、さまざまな生命反応を分業する重要な構造です。主要細胞小器官の1つ、「ゴルジ体」は、イタリアの神経医学者であったカミロ・ゴルジ博士が1898年に発見した構造で（この業績により1906年にノーベル医学生理学賞を受賞）、近年の研究により、細胞内でつくられたタンパク質を仕分けしてさまざまな方向に送り出す重要な機能を持っていることがわかってきました（図1）。ゴルジ体を構成する膜に包まれた扁平な袋を「槽（cisterna:シスターナ）」と呼び、ゴルジ体は通常この槽が数枚積み重なった層板構造を取ります（図2）。また、ゴルジ体には方向性（極性）があり、新たに作られたタンパク質（積み荷タンパク質）が入ってくる側をシス槽、仕分けされて出ていく側をトランス槽、その中間をメディアル槽と呼びます。積み荷タンパク質がシス槽からトランスへと向かう移動の途中で、ゴルジ体に局在するさまざまな酵素タンパク質が働き、積み荷タンパク質が化粧直し（修飾）されて最終目的地へ進む体制が完了します。しかし、この過程で積み荷タンパク質がどのように移動していくかという問題については、2つのモデルが提出され、世界中の大勢の研究者の努力にもかかわらず決着がついていませんでした。槽が安定な区画として存在し、積み荷タンパク質が小さな膜の袋（小胞）によって運ばれるという小胞輸送モデルと、積み荷タンパク質は槽の中でじっとしていて、酵素タンパク質の方が移動することによって槽の性質が変わっていくという槽の成熟モデルが対立し、世界を二分する細胞生物学の大論争が続いていたのです（図3）。

この注目されているゴルジ体のタンパク質輸送メカニズムの解明に取り組むため、研究グループは、自ら高速高感度レーザー共焦点顕微鏡システム開発に着手、新しい生細胞イメージング手法の確立に取り組んできました。

2. 研究手法と成果

1) 新型顕微鏡システムの開発

従来、ゴルジ体内でタンパク質がどのように輸送されているかということ調べるためには、生化学的な手段を使ってタンパク質の修飾を追うなどの方法が主流でした。何が起きているのかを眼で見ようにも、1 μm （マイクロメートル=10⁻⁶メートル）よりも小さなナノの世界の構造を観察するには電子顕微鏡に頼るしかありませんでした。電子顕微鏡は、非常に高い分解能（5 nm以下）を持ちますが、凍結するか化学固定した試料を電子線に当てるため、生きたままの状態の動きを見ることができません。同じ細胞について時間を追って観察することができず、したがってダイナミックな輸送の過程を直接見ることができないという大きな欠点がありました。一方、オワンクラゲから得られた緑色蛍光タンパク質など、可視の蛍光を発するタンパク質が近年続々と開発され、光学顕微鏡を用いて、生きた細胞の中でタンパク質の挙動を観察しようという生細胞イメージングの技術が発展し始めました。生きたまま観察できる利点を生かし、さらにゴルジ体や小胞のような微細でかつ高速で動く細胞小器官をありのままに観察するために、従来の光学顕微鏡の分解能の限界を超えて少しでも

電子顕微鏡に近づけるナノ領域の微細な分解能を持ち、高速度で動画を撮像できる顕微鏡の開発が必要となっていました。

新しい光学顕微鏡としてライフサイエンス分野に定着したものに共焦点レーザー顕微鏡があります。これはレーザーの光を1本の細いビームにして試料に当て、質の良い画像を得る方法ですが、1枚の画像を得るのに1秒以上の走査（スキャン）が必要という短所がありました。これに対して横河電機が開発したニポウディスク式共焦点スキャナは、約1,000本のレーザービームを同時に試料に当て、さらにそれを高速で動かすことによって1枚の画像を1ミリ秒(10^{-3} 秒)で得ることができます。中野主任研究員は、このニポウディスク式共焦点ユニットとNHKが放送用に開発した超高感度のHARPカメラ^{*4}を組み合わせることによって、従来型の光学顕微鏡よりも桁違いに性能の高い顕微鏡システムを製作できると発案し、NEDO技術開発機構の委託を受け、理研と横河電機、NHK放送技術研究所、NHKエンジニアリングサービス、日立国際電気、産業技術総合研究所、東京都臨床医学総合研究所が協力する研究グループを組織し、技術開発に取り組みました。4年間にわたる開発の過程で、ノイズの少ない共焦点ユニット、高感度のHARPカメラ、 piezo素子を用いた高速3次元撮像装置、多色同時観察用の分光フィルタ・分子識別ソフトウェア、高速のデータ処理をするための専用画像入力ボードなどが製作されました。

本プロジェクトで製作した新型レーザー顕微鏡は、横河電機のニポウディスク式共焦点スキャナとNHKのHARPカメラという純国産の技術を組み合わせた、世界でも全く前例のない超高感度高速リアルタイム3次元顕微撮像システムです(図4)。この顕微鏡は、高感度(CCDカメラを用いた場合に比べて約200倍、さらに画像増感システムと組み合わせると10,000倍以上)を生かして非常に短い時間間隔(0.01秒:従来型の顕微鏡を用いた場合に比べて100倍以上)で微弱な蛍光タンパク質の共焦点2次元像(断層写真)を得ることができます。さらに、その断層写真を数十枚積み重ねる精密な3次元共焦点観測と、複雑な数学的解析処理^{*5}(deconvolution:デコンボリューション)を組み合わせることによって、光学顕微鏡の空間分解能の限界とされてきた200 nmの壁を破り、100 nm以下の精度で膜の3次元的な構造の動態をリアルタイムに観察することを可能にしました(図5、6)。

2) ゴルジ体の輸送メカニズムの解明

開発した顕微鏡を使い、出芽酵母のゴルジ体のいくつかの酵素(あるいは酵素と同様に槽に局在するタンパク質)を異なる蛍光タンパク質で標識して観察した結果、ゴルジ体内のタンパク質輸送の驚くべきメカニズムが明らかとなりました。槽の蛍光色は観察している1~2分の中にシスからメディアルへあるいはメディアルからトランスへと明確に変化し、槽が安定に存在して積み荷タンパク質が移動するという小胞輸送モデルではなく、槽の間を酵素タンパク質の方が移動するという槽成熟モデルが支持されました。しかし、単にゴルジ槽の成熟が起こるだけでなく、その過程で非常にダイナミックな膜の融合と分離が起こることが明瞭となりました。100 nm以下の3次元分解能を達成した画像において、ゴルジ体のひとつひとつの槽が複雑に入り組んだ網のような構造をとり、

その中で2色の蛍光タンパク質で標識された性質の違うゴルジ体タンパク質が分離して存在している様子を観察しました(図6)。さらに時間を追って動画として観察すると、ゴルジ体の中ではこの2つのタンパク質が揉み合うように混じり合い、また分離し、より成熟した性質のタンパク質の割合が増えていくことが明らかになりました。生きた細胞で、このようなダイナミックなタンパク質の仕分けの現象を直接観察できたのは本研究が初めてです。(図5)。すなわち、性質の違う膜を融合・分離させ変化しながら積み荷タンパク質を運ぶという新しいメカニズムを発見したことになり、世界を二分した大論争に決着がつかしました。

3. 今後の期待

細胞内で起こっている微細な生命現象のメカニズムを理解するために、電子顕微鏡の分解能で、生きたままの細胞を詳細に観察することは、多くの生物学者の夢でした。今回の成果は、その夢に一步近づく画期的な一里塚として歴史に刻まれることになるでしょう。すなわちこの成果は、生きている細胞の中で実際に起こっている現象を、目で見ることによって理解しようという新しい世界を切り拓くものということができます。細胞生物学の分野では、生きたままの状態でも細胞の中を目で見ることができたら簡単に解決できる謎が、まだまだたくさん残されています。その謎を解くための大きな道具を手にした今、細胞生物学もまた大きく変わっていくでしょう。とくにゴルジ体を中心とする細胞内選別輸送の研究領域では、次々に教科書が書き換えられるような発見が続くでしょう。

この夢の実現のためには、方法論に加えて顕微鏡装置そのものを開発することが必須でした。分野の壁を越え、また機関の壁を越えた8年間の努力の結晶が、今回の研究成果であり、理研の学際的環境と民間企業との密な連携を活かして初めて実現することができました。研究用機器の多くを輸入品に依存する日本の基礎研究において、純国産の技術のみで世界に冠たる装置を開発できたということは特筆すべきことでしょう。今後さらに国内の技術を生かした装置開発に勢いがつくことが期待されます。

また、本研究で開発された新しい共焦点顕微鏡システムは、実用化・商品化も推進中であり、2、3年後には広くライフサイエンス分野のさまざまな研究者に提供できるようになる予定です。目で見ることによって生命の謎を解き、基礎生物学の推進に大きく貢献できるばかりでなく、医療、創薬、バイオテクノロジーといった応用分野にも大いにその威力を発揮することになるでしょう。一例として、薬剤の作用機構を知る上で薬剤がその標的器官にどのように到達するかというドラッグデリバリーの研究が現在盛んに行われていますが、本研究の成果を生かせば薬剤がさらに細胞内のターゲットまで到達するまでもも追求することが可能になっていくでしょう。また、SARSや鳥インフルエンザなどの新しい感染症が発生し、感染症研究の強化が叫ばれる中で、病原体がどのように細胞内に侵入するかをまのあたりに観察できる顕微鏡システムは、きわめて有用な研究手段となるに違いありません。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所
中央研究所 中野生体膜研究室

主任研究員 中野 明彦

Tel : 048-467-9547 / Fax : 048-462-4679

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構
(NEDO 技術開発機構)

バイオテクノロジー・医療技術開発部 主査 渡邊 章夫

Tel : 044-520-5231 (ext. 4251) / Fax : 044-520-5233

<補足説明>

※1 細胞小器官

オルガネラともいう。細胞内の膜に囲まれた構造体で、それぞれが定められた機能を果たす。具体的には細胞核、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソーム、ペルオキシソーム、ミトコンドリア、葉緑体、液胞など。

※2 ゴルジ体

複合的な膜系からなる細胞小器官で細胞内輸送において中心的な役割を果たす。小胞体で合成された分泌タンパク質などを修飾・選別し、最終目的地となる細胞外や細胞膜、その他の細胞小器官に選別輸送する。一般に扁平な袋状の構造をもつ槽 (cisternae:シスターナ) が積み重なったゴルジ層板 (stack:スタック) 構造をとる。今回実験に用いた出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、各槽が細胞質中に散らばった特徴的な構造をもっている。このため、他の生物にくらべて個々の槽を追跡して観察することが容易である。

ゴルジ体は極性をもち、小胞体に近い方から cis (シス)、 medial (メディアル)、 trans (トランス) の区画に分けられる。小胞体で合成された分泌タンパク質はゴルジ体へと移行し、シス槽、メディアル槽を経てトランス槽に到達する。この過程で分泌タンパク質 (積み荷タンパク質) は酵素によるさまざまな修飾を受ける。分泌タンパク質はトランス槽で分泌小胞に積み込まれて最終目的地である細胞外へと輸送される。

※3 レーザー共焦点顕微鏡

ピンホールを用いて焦点面以外からの蛍光を排除することにより、鮮明な画像を得られる顕微鏡。光源にレーザーを用い、試料から出た蛍光をピンホールを通した後

に検出して画像を再構成する。1つのピンホールで得られる1本のレーザービームを機械的に走査するガルバノミラー方式と、多数のピンホールをもつディスクを回転させることにより多数のレーザービームを用いて高速で走査できるニポウディスク方式がある。Z軸方向の分解能が高いためZ軸方向に試料または対物レンズを動かして連続的に断層写真を撮影することにより、3次元の映像をコンピュータ上で構築することができる。

※4 HARP カメラ

HARP方式（High-gain Avalanche Rushing amorphous Photoconductor、固体内電子なだれ増倍式高感度・高SN比（signal to noise ratio）・高画質撮像デバイス）撮像管を使用したカメラ。高感度、高解像度でノイズが少ない。

※5 複雑な解析処理:deconvolution

デコンボリューション（畳み込み積分の逆演算）。非焦点面にある輝点からの拡散光（像のボケ）を、計測データに基づき計算により除くこと。分解能を上げ、ノイズを低減できるためさらにシャープな画像が得られる。

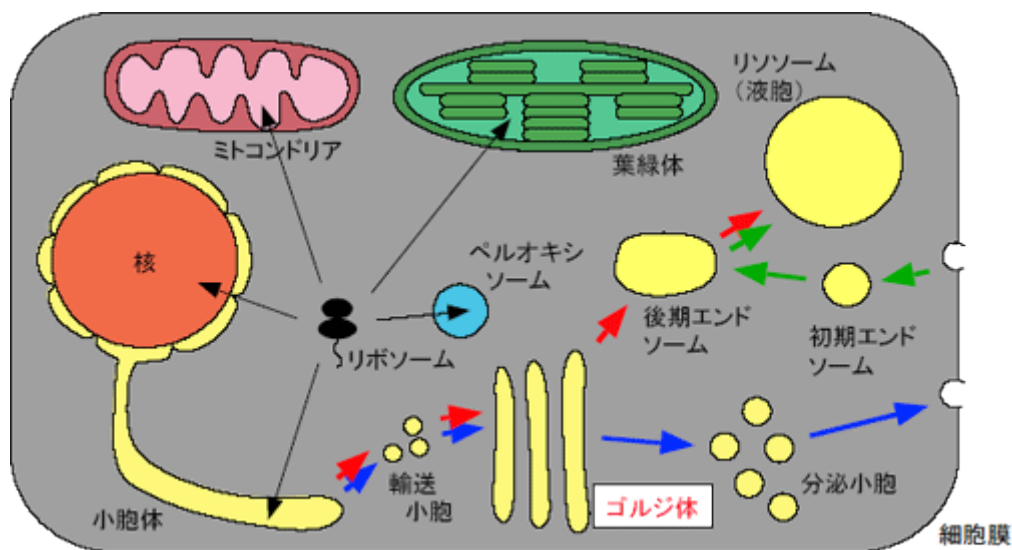


図1 細胞の図

小胞体で新しく作られたタンパク質はゴルジ体の酵素のはたらきで化粧直し（修飾）・仕分けされて目的地に運ばれる。

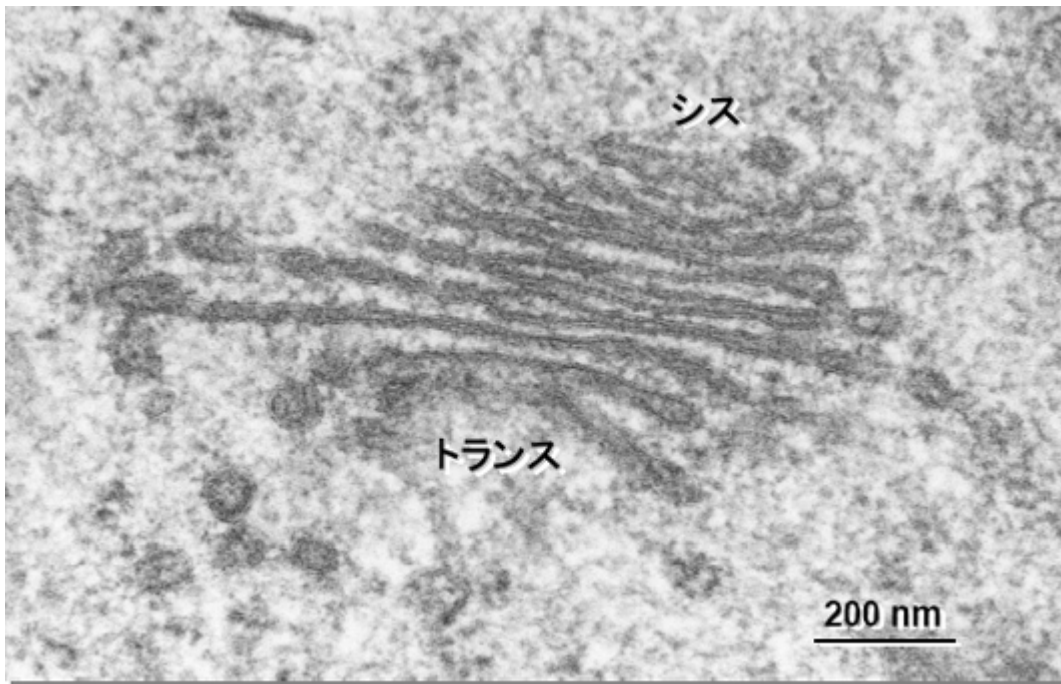


図2 ゴルジ体の電子顕微鏡写真

ゴルジ体は普通、扁平な膜の袋（槽）が積み重なった層板構造を取り、積み荷タンパク質が入ってくる側をシス、出ていく側をトランス、その中間をメディアル領域と呼ぶ。写真は高等植物シロイヌナズナのゴルジ体。バーの長さが 200 nm。

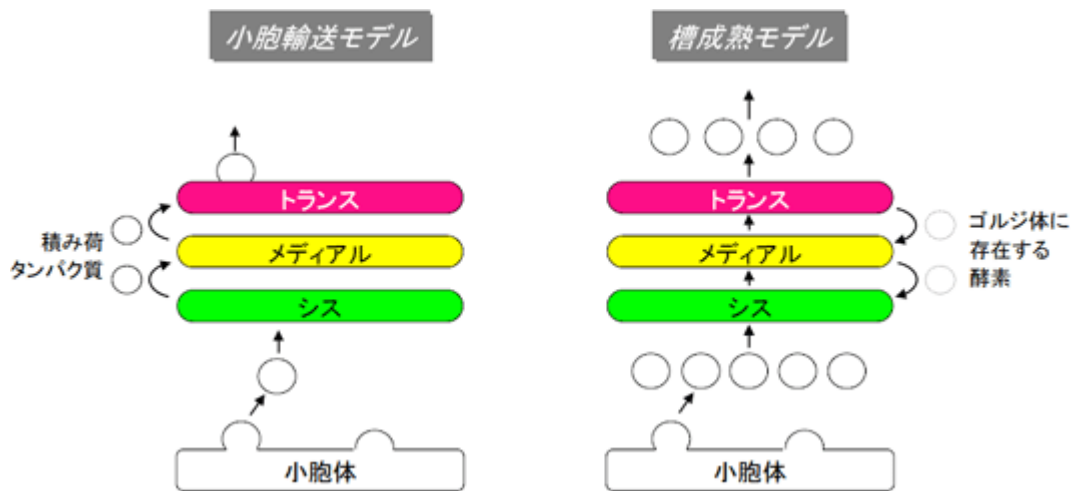


図3 ゴルジ体に関する大論争

小胞輸送モデル: ゴルジ体の槽は安定な構造で、小胞体から分泌される積み荷タンパク質が小さな膜の袋（小胞）によって槽の間を運ばれながら、酵素タンパク質によって化粧直し（修飾）されていく。

槽成熟モデル: 積み荷タンパク質はゴルジ体の槽の中でじっとしていて、酵素タンパク質の方が槽の間を移動する。

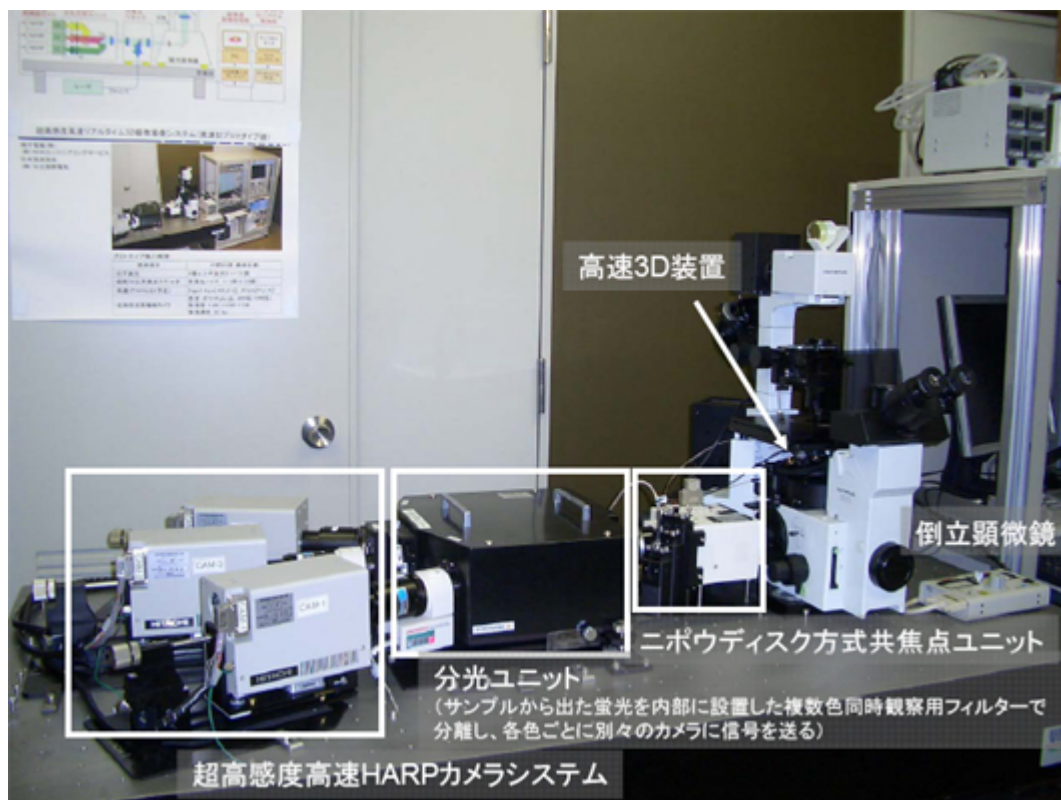


図4 新型レーザー顕微鏡

国産の技術を組み合わせて開発されたシステム。3色の蛍光を同時に高速（0.01秒）で観察することが可能である。

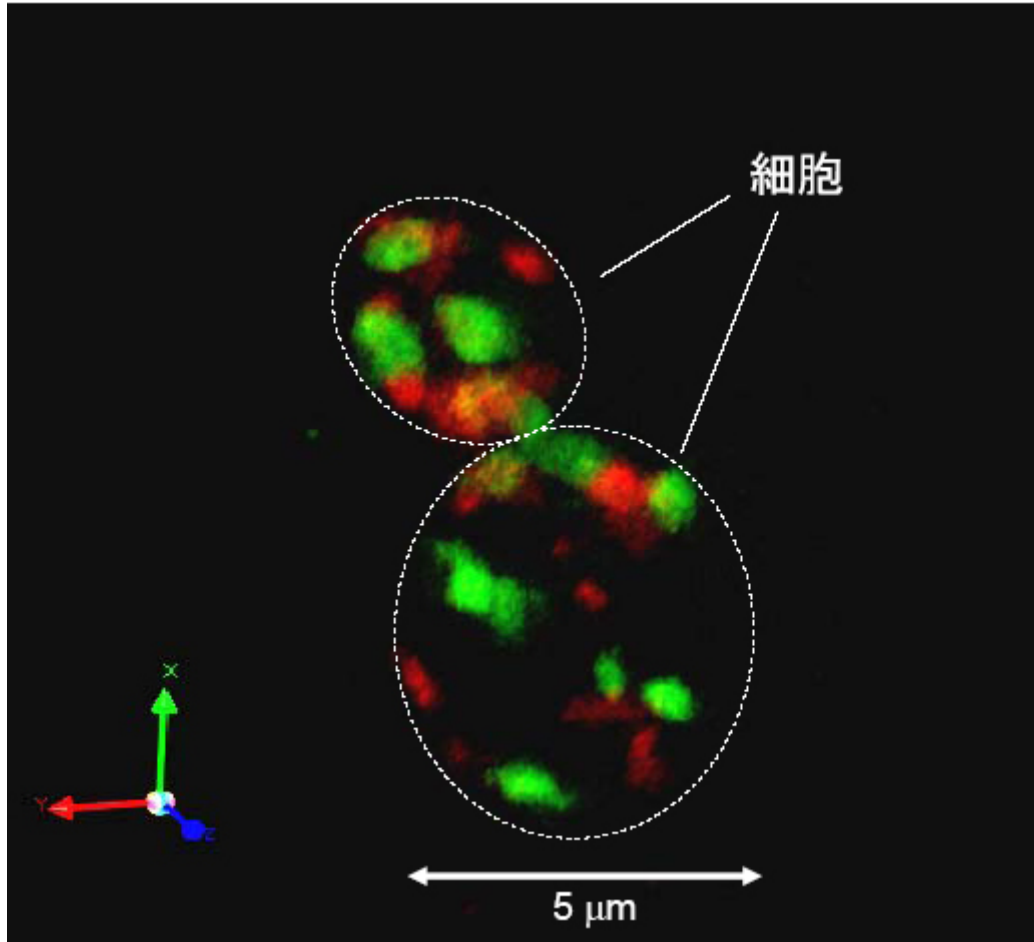


図5 顕微鏡で撮影した映像の例

酵母細胞のゴルジ体を赤と緑の蛍光タンパク質で染めて生きたまま観察したもの。赤と緑の固まりひとつひとつがゴルジ体の槽である。この酵母のゴルジ体はヒトなどの動物細胞とは異なり、それぞれの槽が細胞中に点在している。

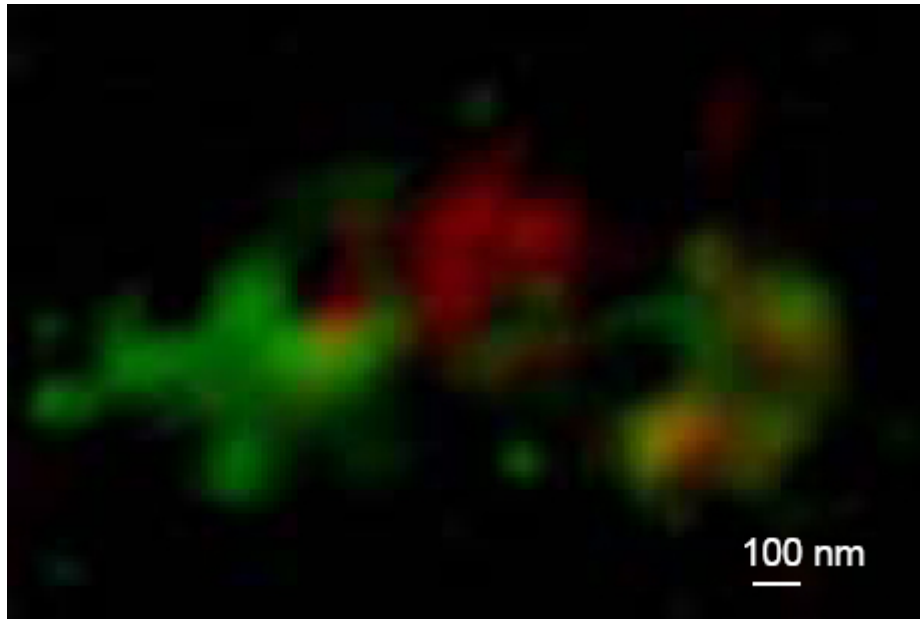


図6 達成された高い3次元分解能

高速に画像を取り込める性能を生かし、多数の断層写真から3次元像を作り上げ、さらに数学的処理によりボケを除くと、100 nm以下の微細な構造が見えてきた（白いバーの長さが100 nm）。その動きをさらに時間を追って観察する4次元動画が本研究の決定打となった。

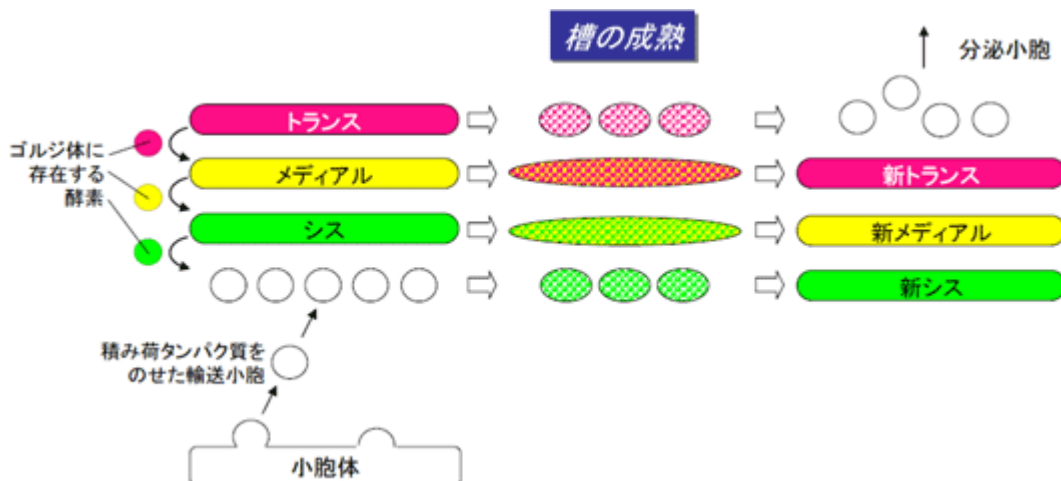


図7 解明されたゴルジ体のタンパク質輸送メカニズム

ゴルジ体に局在する酵素が槽の間をトランスからシスの方向に送り返されることにより槽の成熟が起こる。成熟の過程では、異なる酵素をもつ膜がダイナミックに融合と分離を繰り返し、次第に性質を変えていく。シスの槽は小胞体から運ばれてきた輸送小胞同士が融合して新たに形成されると予想される。トランスの槽はばらばらになって分泌タンパク質をのせた小さな膜の袋（分泌小胞）になる。