

生体マルチソーム研究チーム

Bio-multisome Research Team

チームリーダー 宮澤 淳夫

MIYAZAWA, Atsuo

生体におけるタンパク質の機能的複合体（生体マルチソーム）の高度な機能構造を、顕微鏡法を駆使して構造生物学的視点から詳細に解析し、生命機能を総合的かつ立体的に、分子構造から解明することを本研究チームの目的とする。これまで構造生物学的なアプローチから細胞内情報伝達システムを解明するために、受容体やチャネルなどの膜タンパク質と、それらに特異的な結合タンパク質の機能構造を解析してきた。しかし、細胞の重要な機能を担っているのは単独のタンパク質ではなく、細胞内での相互作用によりタンパク質が集合した生体マルチソームであることが明らかになってきた。したがって、生命機能を明らかにするためには、個々のタンパク質の研究と共に、生体マルチソームを1つの高度機能集合体として、その機能と構造を総合的に研究していく必要がある。そこで本研究チームにおいては、4つの顕微鏡法；電子線結晶構造解析、単粒子解析、電子線トモグラフィー、光学顕微鏡法、の研究開発を通して、原子レベルから細胞レベルに至る俯瞰的な構造も含めた広範囲な立体構造を解明できる新たな観測手法を確立する。

1. ニコチン性アセチルコリン受容体の構造解析（東原、西野、宮澤）

ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）は、神経筋接合部に存在するリガンド開閉型イオンチャネルである。nAChRは3つの状態（静止・活性化・脱感作）を取ることが知られており、静止状態や活性化状態の構造は解明が進んできたが、脱感作状態の構造は全く未解明であり、脱感作状態へ移行する分子メカニズムは未知のままである。そこで脱感作状態のnAChRの原子分解能レベルでの構造解析を目指して、脱感作状態としたnAChRの二次元結晶化を行った。二次元結晶化は、受容体の再配列による方法と再構成による方法の2通りの手法で検討した。1つ目の再配列法は、シビレイの電気器官より調製した膜画分からnAChRを可溶化することなく、過剰量のアゴニストを加えた緩衝液中で脱感作状態としてインキュベートし、膜内でnAChRを再配列する方法である。同様の方法で作製された静止状態のチューブ状結晶は、凍結保存した電気器官ではなく生のサンプルを用いなければ結晶を生じなかった。そこで、生きたシビレイを安定に供給できるように、日本国内の漁港から入手できるルートを確認した。その結果、日本産のシビレイからもnAChRを豊富に含むリポソームを調製することができた。また、2つ目の再構成法として、シビレイの電気器官の膜画分からショ糖密度勾配遠心分離法によりnAChRを豊富に含むポストシナプス膜を単離し、界面活性剤を用いてnAChRを可溶化、過剰量のアゴニストと脂質を加えて脂質二重膜へ再構成する方法を検討した。この方法ではカラムを使って精製するよりも少ない行程でnAChRを精製できるため、精製中のタンパク質へのダメージが少ないと考えられる。可溶化のために使用する界面活性剤については、dodecyl-maltoside (DDM) や pentaethylene glycol monodecyl ether ($C_{10}E_5$)、dodecyl octaethylene glycol ether ($C_{12}E_8$) などと比較的高い可溶性が得られ、中でもDDMを用いた場合、脂質としてホスファチジルセリンを添加して透析することにより大きな脂質二重膜を生じることが分かった。またある種のホスファチジルエタノールアミンを添加した場合、一部のnAChR

が脂質二重膜に再構成されることが分かった。しかしながら、ショ糖密度勾配遠心分離法では Na^+/K^+ ATPaseを完全に除去することはできず、また、脂質の組成が一定ではないため、再現性を得ることが難しいことが分かった。そこで、今後は、良好な可溶性の得られたDDMや $C_{10}E_5$ 、 $C_{12}E_8$ を用いてnAChRを可溶化し、カラムを用いて高純度に精製する方法も検討する予定である。

2. バクテリア由来ナトリウムチャネルの構造解析（入江、宮澤）

バクテリア由来ナトリウムチャネル（Navch）のチャネル開閉やイオン透過のメカニズムを分子レベルで明らかにすることは関連する疾患の病因解明に大きな役割を果たす。しかしながら、高等生物のNavchは巨大で複雑なタンパク質であることから、X線結晶構造解析を行うのは非常に困難である。そこで、我々は原核生物の電圧感受性 Na^+ チャネルであるNachBacが存在することに着目し、これをX線結晶構造解析のターゲットにすることを考えた。これまでに、NachBacの全長をHis-tag融合タンパク質として発現および精製することに成功した。しかしながら、可溶化後の精製NachBacは不安定でチャネルを形成する四量体が速やかに単量体に乖離することが分析超遠心にて明らかになった。そこで、安定なチャネル四量体を精製するために構造的に不安定なNachBacの電位センサーとチャネルポアの固定を試みた。システイン変異体の実験から電位センサーを形成する4番目の膜貫通ヘリックスが隣接するサブユニットのチャネルポアである5番目の膜貫通ヘリックスの近傍に存在することがわかった。この近傍に存在する残基をシステインに変えた二重変異体は非還元環境で安定な四量体を形成することを明らかにし、現在、この変異体を用いた結晶化を行っている。

3. 神経ポストシナプスにおける足場タンパク質 PSD-95 の機能解析（福永、宮澤）

細胞膜裏打ちタンパク質であるMAGUKファミリーに属するタンパク質（MAGUKs）は、3つのPDZドメイン

と SH3-GK ドメインから構成される。これまでの研究により、MAGUKs への Ca^{2+} /カルモジュリン ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) の結合により、SH3-GK ドメインの分子内相互作用に変化がおり、分子間相互作用ができるようになること。また、この変換が PDZ ドメインリガンドの結合により影響を受けることが推測された。そこで SH3-GK ドメインの分子内相互作用から分子間相互作用への変換が、細胞内で実際に起こること、そして、神経興奮によって活性化された $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の MAGUKs への結合が、この変換におけるスイッチとして働くことを証明し、さらに $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ と MAGUK の結合に対する PDZ ドメインリガンドが及ぼす影響を検討することで、MAGUK の相互作用を変換させる制御機構を明らかにすることを目的とする。本年度は、MAGUKs と $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の相互作用と、MAGUKs の分子内相互作用から分子間相互作用への変換が、生理的条件下で起こるか、また、その生理的意義を検討するために、細胞内で起こる分子間相互作用をモニターすることができる FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 実験系の確立を進めた。FRET が起こることがすでに報告されている CFP と YFP をグリシン残基でつないだコンストラクト (CFPgggYFP) や Ca^{2+} センサーとして知られる CFP-CaM-M13-YFP を作成し、それらを用いて、FRET 現象を共焦点レーザー顕微鏡で観察するための条件検討を行っている。

4. 神経細胞スパインの高精度三次元形態解析方法の開発 (合田、宮澤)

分散培養した哺乳類の錐体神経細胞が形成するスパインは、通常の培養条件下で活発に形態を変化させている。光学顕微鏡を用いてその変化を高精度で定量的に計測することは、スパイン形成の仕組みを解析する上で重要である。そこでまず、リアルタイムで画像を取得できる共焦点レーザー顕微鏡に高感度 EM-CCD カメラを備えた顕微鏡システムを用い、神経細胞の微小領域の形態を高精度に解析する手法の検討を行った。神経細胞の細胞膜を生きたまの状態で蛍光染色できる FM-43 (Molecular Probes) で処理したラット海馬由来の錐体神経細胞を、温度調節しながら培養液を常時還流することが可能な試料チャンパーに取り付け、光学的な安定を維持した顕微鏡システムの上で錐体神経細胞の蛍光像を解析した。照射レーザーの強度やカメラ感度などを様々な条件で検討した結果、蛍光の退色がほぼ抑えられた状態で錐体神経細胞の $4\mu\text{m}^3$ の領域から 40 枚の切片像を 10 秒以内で取得することができた。今後は、三次元蛍光像の時間変化の解析 (四次元解析) に向けて、顕微鏡システムの構築を進めるとともに、形態変化を定量的に計測するための画像解析方法の検討を行っていく。

5. 電子顕微鏡法のための細胞内分子標識法の開発

(1) メタロチオネインを用いた分子標識法の開発 (西野、福永、宮澤)

細胞内におけるタンパク質の局在や動きを電子顕微鏡で観察するためには、観察したいタンパク質を確実に標識できる、電子顕微鏡で検出可能な「標識」が必要となる。そこで、光学顕微鏡における蛍光標識 GFP のように「観察したいタンパク質の遺伝子に組み込んで、生きた細胞内で融合タンパク質として発現でき、電子顕微鏡で検出可能

な」標識法の開発を試みた。電子顕微鏡で観察できるのは原子散乱因子の大きな重金属により形成されるクラスターである。そこで、このような重金属クラスターを分子内に形成することが知られているメタロチオネイン (MT) 3~5 分子をタンデムにつないで (3~5MT)、標識としての可能性を検討した。MT に結合させる金属イオンとしては大腸菌の生育に影響を及ぼさず、細胞内への取り込みを確認することができた Cd^{2+} を用いた。また、MT を融合させる標的タンパク質としては、単量体タンパク質である GFP とホモ 14 量体を形成する GroEL、およびクラスターを形成する PSD-95 を用いた。MT 3~5 分子を融合させた GFP (GFP-3~5MT)、GroEL (GroEL-14(3~5MT))、PSD-95 (PSD-95-3~5MT) はいずれも、 Cd^{2+} を含む培養液を用いて大腸菌で大量発現させることができ、MT 1 分子あたり平均して 4~6 個 Cd^{2+} を結合した状態で精製することができた。一方、MT を融合していない GFP、GroEL、PSD-95 からは Cd^{2+} を含む培養液で発現させたにもかかわらず、 Cd^{2+} はほとんど検出されなかったことから、 Cd^{2+} は MT に特異的に取り込まれていることが分かった。そこで、GFP-3~5MT および GroEL-14(3MT)、PSD-95-3MT を無染色状態で、電子顕微鏡で観察可能としたところ、GFP-3~5MT ではコントラストを検出することができなかったが、GroEL-14(3MT) および PSD-95-3MT では無染色状態においても、ネガティブ染色像の粒子にほぼ匹敵する大きさのコントラストを検出することができた。MT を融合していない GroEL や PSD-95 では、このようなコントラストは見られなかったことから、GroEL-14(3MT) 1 分子や PSD-95-3MT クラスター内で形成された MT- Cd^{2+} クラスターが、電子顕微鏡で観察できたと考えられる。また、GroEL-14(3MT) は氷包埋し、極低温電子顕微鏡を用いても観察を行った。この場合、位相コントラストにより、MT を融合していない GroEL でも 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) のほうが高いことを確認できた。以上のことから、多量体もしくはクラスターを形成するタンパク質は、3MT を融合させることにより、電子顕微鏡で検出できることが分かった。今後は、単量体タンパク質でも検出可能とするために、 Cd^{2+} より MT への結合効率が高い金属の検討や MT 以外の金属結合モチーフについても検討を行いたい。

(2) 標識融合 PSD-95 の細胞内観察 (福永、キム、平瀬、宮澤)

精製した PSD-95-3MT を電子顕微鏡で観察できたので、これを発現した細胞を電子顕微鏡で観察するための検討を行った。3MT と結合させる重金属である CdCl_2 の処置濃度と時間は、細胞の生存率を指標にして決定した (各々 $5\mu\text{M}$ 、20 時間)。3MT が標識分子として使用可能となるためには、標的タンパク質の性質に影響しない事が必要条件となる。そこで、3MT との融合が PSD-95 の局在や機能に与える影響について検討を行った。シナプスの足場タンパク質である PSD-95 は、神経細胞においてシナプスに集積する性質を有する。海馬初代培養細胞に発現した PSD-95-3MT は PSD-95 と同様に、シナプスに局在した。また、PSD-95 は、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と結合する性質を有する。免疫共沈降を行った所、PSD-95-3MT は、PSD-95 と同

様にこれら結合パートナーと結合した。以上の結果より、3MTはPSD-95の局在や機能に影響することなく融合させることができ、標識タンパク質としての必要条件を満たすことが示された。次に、PSD-95-3MTを発現した海馬初代培養細胞の電子顕微鏡観察を行うために、PSD-95-3MTの遺伝子を組み込んだ組み換えアデノウイルスを作成し、遺伝子導入と発現効率の検討を行った。その結果、アデノウイルス感染後4日目の神経細胞で、高い発現効率を得ることが明らかとなった。そこで、PSD-95-3MTを高発現した神経細胞を電子顕微鏡で観察した。その際、 Cd^{2+} 由来のコントラストのみを観察するために、通常像のコントラストを強くするために行われる重金属による電子染色工程を省いた。電子染色を省いても、細胞と細胞外のわずかなコントラストにより、細胞の存在は確認できた。 CdCl_2 を処置したPSD-95-3MT発現細胞内に電子密度の高い領域が認められた。無処置、AdPSD-95-3MT処置、または CdCl_2 処置の細胞では、このような高電子密度領域は認められなかった。以上の結果より、 Cd^{2+} を結合したPSD-95-3MTは、細胞内で発現し、電子顕微鏡で観察することが可能であるということが示された。今後、この高電子密度領域の細胞内での局在部位を明らかにするために、電子染色した細胞を観察する予定である。

6. 電子線トモグラフィーによる標識タンパク質の三次元画像解析 (平瀬、福永、宮澤)

細胞内に存在する分子複合体の結晶構造解析は非常に困難であることから、現在注目を集めている構造解析法が、電子顕微鏡法の1つである電子線トモグラフィーである。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、透過型電子顕微鏡像の利点を生かし、生物試料の三次元構造を高分解能で解析する手法として、研究が行われてきた。この電子線トモグラフィーに、我々が開発に取り組んでいる細胞内分子標識法を応用できれば、これまで巨大構造や繊維状構造など一部に限られていた解析の対象が広がり、電子線トモグラフィーから得られる膨大な情報「細胞内に存在するすべてのプロテオームの立体構造情報」を十分に生かせるようになる。さらに、電子線トモグラフィー解析から得られるナノオーダーでの位置情報により、細胞の三次元構造の中に重なっている多数の同じサイズの分子の中で、目的とする分子の立体配置を解析でき、細胞内におけるタンパク質間ネットワークを検証することも可能になる。そこで、電子線トモグラフィーに細胞内分子標識法を応用するために、本年度は電子線トモグラフィーのセッティングと、画像解析法の確立を進めた。更に、電子染色を施していない試料の細胞内にある、Cd-PSD-95-3MTに由来する電子密度の高い領域を電子線トモグラフィーで解析した。作成した超薄切片(80nm)を電子顕微鏡に取り付けられたトモグラフィーシステムによって ± 60 度回転させ、1度ずつの傾斜像を撮影した。その後、三次元再構築ソフトウェアを用いて、得られた傾斜シリーズから三次元再構築を行った。その結果、電子密度の高い領域から得られた立体構造は、不定形な楕円体に近い構造をしていることが明らかとなった。今後、細胞内局在や、更に詳細な立体構造情報を得るために電子染色を施した試料や、厚い切片での電子線トモグラフィーを行う予定である。

The aim of our research is to elucidate the advanced molecular mechanism of a functional complex of proteins *in vivo* (bio-multisome) from a viewpoint of structural biology in detail using microscopy freely. It has become clear the importance of bio-multisome which takes on the several events in cells. Therefore, we would establish the new technical approach that can elucidate the wide range of three-dimensional structures which overlook the configuration of bio-multisome reaching a cellular level from an atomic level, by the development of microscopic analyses such as electron crystallography, single particle analysis, electron tomography and light microscopy. These experimental attempts will provide critical insights into the dynamic structure, localization, and function of the bio-multisome in living cells.

1. Structural analysis of nicotinic acetylcholine receptor

The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is a ligand-gated ion channel at the neuromuscular junction. The nAChR can adopt three different functional states (resting, activated and desensitized state). To elucidate the structure of the nAChR in the desensitized states, their two-dimensional crystals are indispensable to the analysis by electron microscopy. For two-dimensional crystallization by rearranging the receptors in postsynaptic membranes, nAChR-rich membranes were successfully prepared from fresh Japanese *Torpedo* rays. Two-dimensional crystallization was also tried by reconstituting the detergent-solubilized receptors into lipid bilayers. nAChR-rich membranes were isolated by sucrose gradient centrifugation and nAChRs were sufficiently solubilized with dodecylmaltoside (DDM), pentaethylene glycol monododecyl ether (C_{10}E_5) and dodecyl octaethylene glycol ether (C_{12}E_8). Some of the DDM-solubilized nAChR were reconstituted into lipid bilayers by dialysis with phosphatidyl ethanolamine and carbachol.

2. Structural analysis of voltage-gated sodium channel

To elucidate the structural basis of the mechanism of a voltage-gated sodium channel, a small sized sodium channel from a bacterium, *Bacillus halodurans*, (NachBac) has been studied. NachBac with His-tag was expressed in *Escherichia coli* and purified by an affinity column chromatography. But, analytical ultracentrifugation showed solubilized NachBac was unstable. Voltage-gated ion channel consists of two modules: a voltage-sensor (S1-S4 transmembrane helices) and a gating-pore (S5-S6 helices). The sensor is located around the pore that sits in the center of the functional tetramer. To stabilize the solubilized NachBac, we introduced two cysteine mutations into the voltage sensor and pore domain of NachBac. This mutant channel was tetramerized by intersubunit disulfide bond upon expression and formed stable tetramer. Exploring of good detergents and lipids for crystallographic works is in progress.

3. PSD-95 at neuronal postsynapse

To evaluate the interaction between MAGUKs and $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, and the exchange from the intermolecular interaction to the intramolecular interaction of MAGUKs in cells, we employ FRET (Fluorescence Resonant Energy Transfer) which is able to monitor the molecular interaction or conformational change of molecule. We have constructed CFP linked to YFP by three glycine residues (CFPgggYFP), and CFP-CaM-M13-YFP

which is known as Ca^{2+} sensor to determine the conditions of the confocal laser scanning microscope for FRET.

4. Three-dimensional fine morphological analysis of dendritic spines

Cultured pyramidal cell from hippocampus of rat embryo has many dendritic spines which possess rapid motility in a standard culture medium. To understand the mechanism of dendritic spine formation, quantitative and precise analysis of the motility is very important. In this term, using the EM-CCD camera and real-time laser scanning confocal microscope, we tried to take fine three-dimensional images of the dendritic spines which were stained with a fluorescent probe, FM-43. Without fluorescence photobleaching, we successfully took 40 confocal fluorescent images from 4 cubic micrometer spatial region of the pyramidal cell, including spines, within 10 second.

5. Molecular labeling of intracellular proteins for electron microscopy

(1) Development of a genetically encoded metallothionein tag

The techniques to observe proteins of interest in cells by transmission electron microscopy (TEM) are still now limited. In contrast, genetic labeling with green fluorescent protein (GFP) has led to rapid advances in the observation of proteins by light microscopy. Therefore, we developed an artificial fusion protein that allows for efficient protein detection by TEM without additional staining steps. We linked 3 to 5 repeats of metallothionein (3-5MT) with monomer protein GFP, 14-mer protein GroEL and clustered protein PSD-95. They were successfully expressed in *Escherichia coli* grown in Cd^{2+} -containing medium, and the purified protein included cadmium atoms. Cd^{2+} -bound GroEL-14(3MT) and PSD-95-3MT were detected by TEM in the absence of negative staining on a carbon grid, and the particle densities of GroEL-14(3MT) were much greater than those of untagged GroEL in vitreous ice. Taken together, our data indicate that the 3MT tag provides a promising TEM method of allowing the detection and visualization of oligomeric or clustered proteins assembled in living cells.

(2) Electron microscopic observation of PSD-95 fused with 3MT

Here we employ genetically encoded tags to examine the localization of proteins in transfected cultured cells by TEM. We addressed if genetically encoded tags affect the localization and/or function of the target proteins. We found that the conjugation of 3MT to PSD-95 did not alter its localization to the postsynaptic density or its association with known binding partners, indicating that 3MT satisfies a requirement for a tag. To observe the subcellular localization of Cd^{2+} -bound PSD-95-3MT under TEM, we prepared adenovirus encoding this fusion protein (AdPSD-95-3MT). In the primary hippocampal neurons, expression efficiency was highest 4 days after induction. Hereafter, we will observe primary hippocampal neurons expressed with PSD-95-3MT and treated with CdCl_2 . To limit the loss of signal for Cd^{2+} -bound PSD-95-3MT, these samples were prepared for plastic embedding without osmium tetroxide and electron staining. Many large electron dense deposits were present in neurons exposed to AdPSD-95-3MT and treated with CdCl_2 but not in untreated controls or in neurons treated with CdCl_2 alone. In addition, no signal was detected in neurons transduced with AdPSD-95-3MT but not incubated with CdCl_2 . Therefore we could demonstrate a useful

method for examining the localization of proteins at high resolution. To examine the cellular localization of electron dense deposits, next we will prepare the samples that were post-fixed with osmium tetroxide and electron staining

6. Three-dimensional image analysis of labeled proteins by electron tomography

Electron tomography is an electron microscopic technique for reconstructing the three-dimensional structure of a specimen from a tilt series of electron micrographs at tilt angles ranging from -60° to $+60^\circ$ in 1° increments. Electron tomography, combined with techniques of genetically encoded tags for electron microscopy, must become a successful strategy for taking advantage of conformational and configurational information from the tagged protein in the cells. Three-dimensional reconstruction using these techniques revealed the shape and subcellular localization of electron-dense deposit from Cd^{2+} -bound PSD-95-3MT in the primary hippocampal culture neurons, prepared for TEM without osmium tetroxide and electron staining, is distorted spherical/ellipsoidal. We will prepare specimen with osmium tetroxide and electron staining for further analyses.

Staff

Head

Dr. Atsuo MIYAZAWA

Members

Dr. Yuko FUKUNAGA

Dr. Makoto GODA

Dr. Katsumasa IRIE

Ms. Hyeji KIM

Ms. Yuri NISHINO

Ms. Ai HIRASE

Ms. Ai HIGASHIHARA

Visiting Members

Dr. Masato HASEGAWA (Tokyo Inst. Psychiatry)

Dr. Kenji IWASAKI (Osaka Univ.)

Dr. Mamoru MATSUBARA (Kyoto Gakuen Univ.)

Dr. Kaoru MITSUOKA (BIRC, AIST)

Dr. Takashi NONAKA (Tokyo Inst. Psychiatry)

Dr. Toshihisa OHTSUKA (Toyama Univ.)

Dr. Mika OKAMOTO (Kagoshima Univ.)

Dr. Akiko OKUTA (JBIC)

Dr. Toshiya SENDA (BIRC, AIST)

Dr. Kazuhiro SHIGEMOTO (Ehime Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(総説)

Iwasaki K. : "Single-particle analysis and electron tomography",
Int. J. Nanotechnol. 3, No. 4, pp.480-491 (2006).

宮澤 淳夫 : "ニコチン性アセチルコリン受容体の構造と機能", 実験医学 24, No. 5, pp.630-637 (2006).

西野 有里, 宮澤 淳夫 : "膜タンパク質の二次元結晶化法", 膜 32, No. 1, pp.25-31 (2007).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

Irie K., Nakatsu T., Mikoshiba K., Sobue K., Fujiyoshi Y., Kato H., and Miyazawa A.: "Preliminary Structure of Complex by Co-crystallization of IP3 Receptor Suppressor Domain and Homer CRH1", 3rd International Conference on Structure, Dynamics and Function of Proteins in Biological Membranes, (Paul Scherrer Institute), Monte Verita, Switzerland, May (2006).

Irie K., Nakatsu T., Mikoshiba K., Sobue K., Fujiyoshi Y., Kato H., and Miyazawa A.: "Preliminary Structure of Complex by Co-crystallization of IP3 Receptor Suppressor Domain and Homer CRH1", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).

Miyazawa A., Kim H., and Fukunaga Y.: "Study of expression of PSD-95 in neuron-glia mixed culture cells using adenovirus", 5th East Asian Biophysics Symposium and 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS and BSJ 2006), Okinawa, Nov. (2006).

(国内会議)

福永 優子: "金属結合タンパク質を融合した細胞内PSD-95の電子顕微鏡観察", 日本顕微鏡学会 生体構造解析分科会 2006年度研究討論会, 大阪, 12月 (2006).

西野 有里: "電子顕微鏡で観察可能なタンパク質標識法の開発", 日本顕微鏡学会 生体構造解析分科会 2006年度研究討論会, 大阪, 12月 (2006).