

光岡 薫

大阪大学超高压電子顕微鏡センター
教授

クライオ電子顕微鏡法のベイズ高度化と他計測との融合

§ 1. 研究成果の概要

まず、我々は今年度、解析手法の開発に用いるため、クライオ電顕によるデータ収集を行うシステム構築に取り組んだ。特に、電子線トモグラフィー法について、1 秒間に約 16 フレームの画像収集ができるソフトウェアを導入し、それにより動画補正可能な電子顕微鏡動画が得られるようになった。非晶質の氷に包埋した試料は、電子線照射により氷が変形し動くことが知られているので、高分解能構造解析には動画補正が必須となる。

また、我々は神由来の NG108-15 培養細胞を用いて、そのクライオ電子顕微鏡グリッドを作製した。作製したクライオグリッドから傾斜像シリーズを撮影し、その三次元再構成を行った。NG108-15 細胞は、cAMP 刺激により、成長円錐を形成し葉状仮足から糸状仮足を突出させるが、その糸状仮足部分は太さが 100~200nm 程度で、電子線トモグラフィー法に適した試料である。得られた糸状仮足の立体構造中に束ねられてバンドルになっているアクチン繊維が明瞭に観察された。

単粒子解析については、既に V-ATPase の約 5 Å 分解能の立体構造を得ているが、そのさらなる高分解能化のための試料調製法の改善を行った。一つは酸化グラフェンを利用したクライオグリッド作製法の改良である。今までは、薄いアモルファスカーボン膜を利用して、そこに V-ATPase を吸着させることでデータ収集を行っていたが、それを更に薄い酸化グラフェン膜に変更することで、その画像の S/N の向上に取り組んだ。

もう一つは V-ATPase の調製法の改良である。V-ATPase は膜タンパク質複合体であり、クライオ電子顕微鏡観察のためには可溶化し水溶液中で安定な状態で維持する必要がある。そのため、いままでは LMNG という界面活性剤を利用していたが、そのかわりに天然の状態に近いナノディスクを利用することで、さらなる安定化が実現できないか検討した。その結果、ナノディスクを利用した試料を用いてデータ収集を行うことで、更なる高分解能化が期待できることがわかった。

解析アルゴリズムとして、新たに投影角の探索の際に、グリiddingをしない形で、遺伝的アル

ゴリズムの応用として、適応型の角度探索のプログラムのプロトタイプを作成した。モデルデータに対しては、通常より高速化し、かつ、精度があることが分かっている。今後、複数の実データに対して、確認していく予定である。

タンパク質分子運動解析の観点からは、X線輝点明滅法(Diffracted X-ray Blinking method: DXB)を新たに開発し、リガンドに応答した膜タンパク質の分子内部運動を検出することに成功した。本法では各ピクセル輝度の自己相関係数を計算することで運動速度等の情報抽出が可能である。従来より用いてきたDXT(Diffracted X-ray tracking)では白色X線源が必要であったが、DXBでは放射光施設を使用しなくても運動計測が可能となるため、広く適用が可能である。

【代表的な原著論文】

Hiroshi Sekiguchi, Masahiro Kuramochi, Keigo Ikezaki, Yu Okamura, Kazuki Yoshimura, Ken Matsubara, Jae-Won Chang, Noboru Ohta, Tai Kubo, Kazuhiro Mio, Yoshio Suzuki, Leonard M. G. Chavas & Yuji C. Sasaki, "Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions", Sci Rep. 8(1):17090, 2019.

§ 2. 研究実施体制

(1) 光岡グループ(大阪大学)

- ① 研究代表者:光岡 薫 (大阪大学 超高压電子顕微鏡センター 教授)
- ② 研究項目
 - ・電子線トモグラフィ法によるデータ収集のためのシステム構築
 - ・電子線トモグラフィ法のためのクライオ電顕試料調製法の確立
 - ・単粒子解析による高分解能構造解析のためのクライオ電顕試料作製法の確立
 - ・他のグループと連携した単粒子解析のためのクライオ電顕グリッド作製検討

(2) 安永グループ(九州工業大学)

- ① 主たる共同研究者:安永卓生 (九州工業大学 大学院情報工学研究院 教授)
- ② 研究項目
 - ・単粒子解析のための解析アルゴリズム検討
 - ・傾斜像シリーズからの電子線トモグラフィ法による立体再構成

(3) 三尾グループ(産業技術総合研究所)

- ① 主たる共同研究者:三尾 和弘 (産業技術総合研究所 先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ ラボチーム長)
- ② 研究項目
 - ・クライオ単粒子解析試料作製とデータ収集
 - ・X線1分子追跡法によるタンパク質内部運動のデータ収集
 - ・統合アルゴリズム開発