

計測技術と高度情報処理の融合によるインテリジェント計測・解析手法の  
開発と応用

2018 年度採択研究代表者

2019 年度 実績報告書
------------------

光岡 薫

大阪大学超高压電子顕微鏡センター

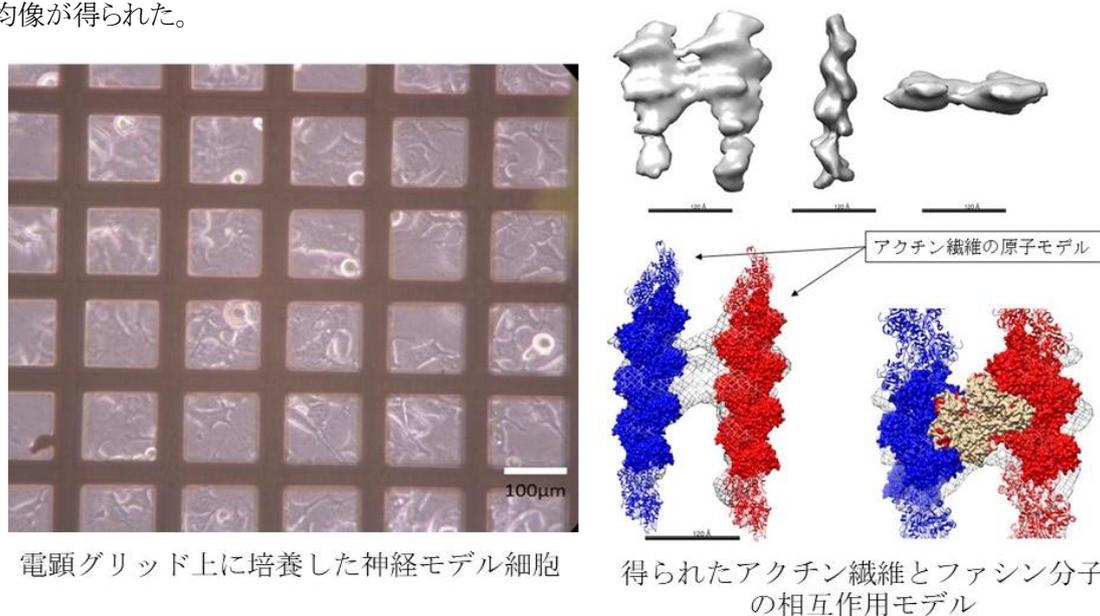
教授

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

我々は今年度計測手法開発のため、クライオ電子顕微鏡(電顕)から得られる画像コントラストの向上が期待できる位相板を導入し、その評価を行った。位相板を用いると、クライオ電顕を用いた生体高分子からデータ収集においては、主に位相コントラストを利用しているため、コントラスト伝達関数の特性から画像の分類や方位決定に利用できる低分解能情報からの信号が小さくなり、その決定精度が悪くなることが知られている。位相板を用いると、コントラスト伝達関数の特性を変化させることで低分解能信号の低下を抑制できるので、その特性を用いてデータ収集効率の改善などが実現できると期待されている。しかし、我々が導入したボルタ型位相板においては、その特性が電子線照射量と関連して変化することが知られているので、その特性を実時間で評価して最適のデータ収集を実現できるシステムを構築した。

また我々は、細胞中に存在する生体高分子やその複合体からの高分解能構造解析を実現するクライオ電子線トモグラフィー法の改善のため、昨年度に収集した神経モデル培養細胞 NG108-15 からの三次元再構成像からの、アクチン繊維とファシン分子複合体のサブトモグラム平均化に取り組んだ。神経細胞などは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、その糸状仮足はアクチン繊維のバンドルで形成されていることが知られており、その機構の解明には、アクチン繊維と相互作用することでアクチン繊維バンドルの形成に関与しているファシン分子とアクチン繊維との結合構造を原子レベルの分解能で明らかにする必要がある。そして、クライオ電顕法で高分解能構造を得るためには、その信号とノイズ比を向上するため多くの画像を平均する必要がある、その平均化をトモグラフィーデータに対して行う手法がサブトモグラム平均化である。我々は今年度、サブトモグラム平均化手法を検討し得られる分解能向上に取り組み、1.7nm 分解能の平均像が得られた。



3次元再構成法について、EDAs 法を用いた新たな3次元再構成法を作成し、かつ、Deep Learning 等で利用される勾配降下法を用いて実装し、結果として、3次元構造の初期モデルの構築に成功した。後者の技術を用いる事により、現実的な時間で初期モデルを構築する事が出来た。

また、複数の複合体構造をもつ GroEL/ES 複合体を用いて、RELION および cryoDrgon 等のベイズ推計アルゴリズム、および、DeepLearning アルゴリズムの検証を行い、構造変化や複数構造を分離できる可能性について調査した。その結果、クラスタ数の定義することなく、パラメータ空間内で、2つの異なるクラスタに分類するなどが可能であることが示された。但し、まだ画像にはアーティファクトを含むため、今後更なる改善が必要である。また、RELION で利用されるパラメータについて最適化するための学習アルゴリズムを検討し、自動的にパラメータ設定をすることで構造の多様性を分類できる可能性が示唆された。更に、トモグラフィ法のための位置合わせのシステムのプロトタイプを作成した。今後、さらに開発を進める。

1 分子運動計測の実験においては、放射光施設が不要で、ラボの X 線発生装置で計測可能な DXB (Diffracted X-ray Blinking) 法を用いることで、様々な応用が広がりつつある。特に低エネルギーで計測可能なため、細胞に遺伝子導入を行なって発現させた膜タンパク質の、生きている細胞上での運動計測に成功した。計測時のフレームレートを変更することにより、セロトニン受容体の  $\mu\text{sec}$  レベルの早い分子振動状態から、 $\text{msec}$  レベルの細胞内シグナル伝達も含めたダイナミックな動きなどを区別して検出することに成功した。また核膜病の疾病多様性と重篤度が、ラミン分子の物性変化で非常によく説明できることを、電顕解析をはじめとする物理化学計測から明らかにした。

#### 【代表的な原著論文】

1. Muneyo Mio, Toshihiko Sugiki, Chie Matsuda, Hiroaki Mitsuhashi, Chojiro Kojima, Siu Yuen Chang, Yukiko K. Hayashi and Kazuhiro Mio, "Structural instability of lamin A tail domain modulates its assembly and higher order function in Emery–Dreifuss muscular dystrophy", *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 512, No. 1, pp.22–28, 2019
2. Masahiro Kuramochi, Chiaki Takanashi, Akari Yamauchi, Motomichi Doi, Kazuhiro Mio, Sakae Tsuda, Yuji Sasaki, "Expression of Ice-Binding Proteins in *Caenorhabditis elegans* Improves the Survival Rate upon Cold Exposure" *Sci Rep.*, vol. 9, No. 1, 6246, 2019

## § 2. 研究実施体制

### (1) 光岡グループ

- 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統合アルゴリズム開発

### (2) 安永グループ

- 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

- 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