

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

宮澤 淳夫

((独)理化学研究所放射光科学総合研究センター グループディレクター)

「細胞内標識による生物分子トモグラフィー」

## 1. 研究実施の概要

これまで、電子線トモグラフィーは、国内において、材料や染色固定した電子線損傷に強い試料を対象に開発されてきた。しかし本研究課題では、ラベルの明瞭な可視化、および変性していないタンパク質の三次元像を観察するために、非染色・非晶質状態の試料を対象としたクライオ電子線トモグラフィーが必須であると考えている。そこで、分子ラベル開発グループでは、電子顕微鏡で検出可能な標識法の開発のため、金属結合タンパク質を用いた標識法の検討を開始した。標的タンパク質として、ホモ 14 量体を形成する GroEL や、神経シナプス後肥厚部 (PSD) において集積する性質を持つ PSD-95 に、金属結合タンパク質を融合させたコンストラクトを用いて、細胞内で発現・形成された金属クラスターの電子顕微鏡観察を行った。また、電子線トモグラフィー観測グループでは、システム開発グループの作製したトモグラフィー用低電子線照射装置を用いて、最も問題となるクライオ試料ホルダーの稼働時における微動の測定を始めた。また、画像解析法の改良として、システム開発グループが作製したプログラムを使い、コントラスト伝達関数がトモグラムに及ぼす影響について、シミュレーションにより定量化を行った。

## 2. 研究実施内容

「電子線トモグラフィー観測」グループ

クライオ電子線トモグラフィーの実現に向けて、「システム開発」グループが開発した制御ソフト、解析ソフトを使用し、問題点・改良点の調査をおこなった。本年度は、トモグラフィー用低電子線照射制御ソフトが完成したので、これを用いてクライオ試料ホルダーの試料微動の計測を始めた。最も心配されていた傾斜時における微動が、許容範囲であることが判明し、クライオ電子線トモグラフィーの実現に向けて一歩前進した。また、撮影した試料のデフォーカス値を自動で計算できるソフトも完成したので、これを用いてトモグラフィーで懸念されている、位相補正の問題のシミュレーションを行った。これにより、自動デフォーカスの精度が大きく分解能に影響を与えることが判明したが、トモグラフィー撮影時における様々な条件を考慮に入れて評価を行うため、次年度も、さらに引き続きシミュレーションを行う予定である。

#### 「システム開発」グループ

電子顕微鏡・電子線トモグラフィーに向けたシステム開発のため、日立社製の電子顕微鏡について、電子線制御・低電子線損傷ソフトウェアのプロトタイプ・システムを開発し、「電子線トモグラフィー観測」グループと共同して、その評価・問題点を洗い出した。また、日本電子社製の電子顕微鏡についても外部制御可能となるように、共同開発を始めた。これらは階層性を持たせたシステムとすることで、複数の機種に対応できるようなシステムとなるよう、オブジェクト指向型プログラミング（継承・多型）を考慮したシステムとした。さらに、新型汚染防止装置の評価を行い、クライオ観察において有効であることが分かった。次年度は、低電子線損傷撮影機能と傾斜撮影機能を組み合わせたクライオトモグラフィー撮影装置のプロトタイプを開発する。

電子顕微鏡画像解析ソフトウェアEosの開発を進め、特に、種々のプログラムを組み合わせた統合環境の制作に着手した。また、「分子ラベル開発」グループによる金属タンパク質標識 GroEL の三次元像解析を行い、金属タンパク質が GroELC末端に確かに存在することを三次元的に確認した。振り返って、二次元像を確認すると対応する部位に金属標識による密度の上昇が確認できた。今後、トモグラフィー撮影における有用性を検証する。さらに、トモグラフィー像の像質を改善することを目的として、電子顕微鏡画像解析ソフトウェアEos上に、自動位相補正、画像改善のための超解像アルゴリズムの導入、傾斜角度の補正プログラムの開発を行い、「電子線トモグラフィー観測」グループにより撮影された、負染色連続傾斜画像に適用し、評価を行った。次年度に向け、クライオ電子顕微鏡画像に対する適用を試みる。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「分子ラベル開発」グループ

①研究分担グループ長：宮澤 淳夫((独)理化学研究所放射光科学総合研究センター グループディレクター)

#### ②研究項目

細胞内分子標識法の開発

- ・電子顕微鏡で検出可能な金属結合タンパク質を用いた標識法の開発
- ・金属標識 GroEL の電子顕微鏡観察と単粒子解析(「システム開発」グループと共同)
- ・金属標識融合タンパク質 PSD-95 を発現した培養細胞の電子顕微鏡観察

#### (2)「電子線トモグラフィー観測」グループ

①研究分担グループ長：岩崎 憲治(大阪大学蛋白質研究所 助教授)

#### ②研究項目

電子顕微鏡計測システムの開発

- ・ロードス機能の搭載(「システム開発」グループと共同)
- ・トモグラムに対する位相補正効果の評価

・クライオ試料ホルダーの検証

(3)「システム開発」グループ

①研究分担グループ長：安永 卓生(九州工業大学情報工学部 助教授)

②研究項目

電子顕微鏡・電子線トモグラフィーに向けたシステム開発

- ・トモグラフィー画像の自動位相補正の評価
- ・トモグラフィー画像改善のための超解像アルゴリズムの導入
- ・トモグラフィー撮影のための電子顕微鏡制御システムのプロトタイプの開発(「電子線トモグラフィー観測」グループと共同)
- ・金属結合タンパク質標識タンパク質の三次元構造解析(「分子ラベル開発」グループと共同)