

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「細胞内標識による生物分子
トモグラフィー」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年3月

研究代表者：宮澤淳夫
(兵庫県立大学大学院生命理学研究
科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

生命現象の解明には、様々な細胞機能を担う生体分子が生きた状態に近い環境で、しかも機能を発現している状態において解析することが重要である。現在、細胞内に存在する分子複合体や繊維状構造体などの三次元構造解析には、電子線トモグラフィーが有効な手法である。しかし、細胞内には非常に多くの生体分子や細胞内小器官が存在しており、電子顕微鏡法で観察できる確実な分子標識法がないため、細胞内で生体分子の同定が困難であった。また電子線トモグラフィーは、これまで非生物系分野の試料を主な研究対象として測定装置や解析ソフトウェアの開発が行われてきたため、電子線損傷を考慮する必要がない分、高分解能での解析結果を得ることができた。これを生物試料にそのまま適用しても、電子線による損傷や試料ドリフトなど生物試料特有の問題のために、生体分子の構造を分子レベルの高い分解能で解析することは非常に困難である。

そこで、本研究では細胞内の分子の形が観察できて、それが何であるか同定することを可能にする「細胞内標識による生物分子トモグラフィー」の実現を目指した。本課題の柱の一つである電子顕微鏡用遺伝的標識法への取り組みとして 3MT タグの開発があげられる。3MT タグは金属結合タンパク質であるメタロチオネイン(MT)を3分子連結したもので、細胞内において電子顕微鏡で観察可能な標識となる金属クラスターを形成することができる。3MT タグの基礎的検証のため、ホモ 14 量体を形成する大腸菌シャペロンタンパク質 GroEL や、神経ポストシナプス肥厚部に集積する足場タンパク質 PSD-95 に 3MT タグを遺伝的に融合して細胞内で発現させ、そこに形成された金属クラスターの電子顕微鏡観察を行った。その結果、3MT タグは世界初の電子顕微鏡用の遺伝的コード化標識として細胞内タンパク質の標識に有用であることを示した。さらに標識の効率化、検出感度の向上を目指したモデルタンパク質として、単量体蛍光タンパク質 GFP に 3MT タグを融合させたタンパク質を作製した。この電子顕微鏡観察を行うと共に、システム開発グループを中心に開発した画像解析システムを適用し、観察手法と解析手法の両面から同時に検討を行うことにより 3MT 標識による一分子レベルの検出が可能であることを示した。

本研究課題のもう一つの柱は、生物分子トモグラフィー技術の確立である。透過型電子顕微鏡の利点は、標識された目的分子だけでなく、周辺要素も同時に観測(ブラウジング)でき、かつ、ナノメートルの分解能でそれら分子構造も観察できることである。この利点を生かし、尚かつ、生きている状態に近い水和した試料の観測を可能にする生物分子トモグラフィー技術の開発に取り組んだ。得られた成果としては、クライオ電子線トモグラフィー実データの取得や、非晶質凍結切片法(CEMOVIS)、光-電子相関顕微鏡法の立ち上げ、ならびに、独自の電子顕微鏡制御システムと画像解析システムの構築である。クライオ電子線トモグラフィーの実現では、これまでの切片観察では不可能だった、天然状態の超分子構造の観測ができることを示した。活性化血小板では、これまでの報告とは異なるアクチン構造を示し、ウイルス感染宿主細胞では、細胞内のウイルス粒子およびその伝搬装置ともいべきチューブ構造解明に関して、顕著な成果をあげた。CEMOVIS では、最も難易度の高い CEMOVIS の電子線トモグラフィーという技術的な面の進展から、ミドリムシの光センサー器官解明という成果まで残すことができた。光-電子相関顕微鏡観察では、神経シナプスにおける接着装置解明という重要な結果に貢献することができた。本課題が遂行されるまでは、国内でこれらの技術を使ったデータの取得は不可能な環境であり全くなかったにもかかわらず、現在のチームの技術は完全に世界レベルに到達した。本領域を通じて国内の生物電子顕微鏡分野に我々の果たした役割は非常に大きかったと自負できる。

ここで構築してきた電子顕微鏡画像処理、クライオ電子線トモグラフィー・システムの成果を受け、統計的画像処理により、軸糸内でのダイニン重鎖の配置を明らかにした。また、これらのプログラムは、グループ外研究室に提供され、共同研究を通して Cell 誌等にアクチンフィラメント、ダイニン等の構造解析として報告された。

これら二本柱の成功を受け、これらをまとめて生物の動きなどの生物機能に係わる鞭毛に適用した。ここでは、ダイニンの中でも結合部位が未知であり、鞭毛の制御に重要であるサブユニットを 3MT 標識し、鞭毛内におけるダイニンでのサブユニット構造のクライオ電子線トモグラフィーによる解析を進めた。その結果、鞭毛内での 3MT 標識をクライオ電子線トモグラフィーで観察することに成功し、外腕ダイニン上での結合が明らかになった。また、メタロチオネインが光-電子相関顕微鏡の標識としても有効である可能性が示唆された。

(2) 顕著な成果

1. Takazaki, H., Liu, Z., Jin, M., Kamiya, R. and Yasunaga, T., Three Outer Arm Dynein Heavy Chains of *Chlamydomonas reinhardtii* Operate in a Coordinated Fashion Both In Vitro and In Vivo, *Cytoskeleton*, 67 (7), 466-476, 2010. (DOI: 10.1002/cm.20459)

概要: 今回開発した画像処理システムを用いて、ダイニン及び微小管の画像を、分類、平均化、標識可視化に用いる密度差の統計処理等を行い、鞭毛内の外腕ダイニン重鎖のアーキテクチャのモデルを提唱した。同様の技術は、ProNAS 誌や Cell 誌へ発表された他グループとの共同研究でも活かされた。

2. Wei, T., Miyazaki, N., Uehara-Ichiki, T., Hibino, H., Shimizu, T., Netsu, O., Kikuchi, A., Sasaya, T., Iwasaki, K. and Omura, T., Three-dimensional analysis of the association of viral particles with mitochondria during the replication of Rice gall dwarf virus. *J. M. B.*, 410 (3), 436-446, 2011. (DOI:10.1016/j.jmb.2011.05.017)

概要: レオウイルス科のライス・ゴール・ドワーフウイルスが、感染宿主細胞中で複製の際必要となる ATP 獲得の為にミトコンドリア周辺に集積している様子を電子線トモグラフィー技術により三次元的に解析した。本解析において用いた試料作製法は、クライオ電子線トモグラフィー法での試料作製において活かされた。

3. 国内特許、出願番号: 2007-131007、名称: 電子顕微鏡用標識

概要: 金属結合タンパク質を標的タンパク質と遺伝的に融合させたタンパク質として細胞内で発現させ、金属結合タンパク質に形成された金属クラスターを電子顕微鏡で観察することにより、細胞中の標的タンパク質の二次元または三次元情報を得る方法。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

これまで構造生物学的なアプローチからタンパク質の生理機能を明らかにするため、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構造解析を行ってきた。しかし、細胞の重要な機能を担っているのは個々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分子複合体であることが判明してきた。したがって、細胞の機能を明らかにするためには、個々のタンパク質の研究を行うと共に、細胞内に存在する分子複合体としての構造と機能を研究していく必要がある。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、透過型電子顕微鏡の利点を生かし、生物試料の三次元構造を解析する手法である電子線トモグラフィーである。しかし、現在のところ電子顕微鏡法では、免疫金コロイド法に代わる確実な分子標識法がないため、細胞内の分子は見えていないのに、残念ながらその分子が何であるのか同定できず解析できないというジレンマに陥っている。また、電子線トモグラフィーは、これまで非生物系分野の試料を主な解析対象として測定装置ならびに解析ソフトウェアの開発が行われてきた。しかし、これを生物試料にそのまま適用しても、電子線による損傷やチャージアップによる試料ドリフトなど生物試料特有の問題のために、生体分子の構造と機能の解析を分子レベルの分解能で行うことは非常に困難である。そこで、「生物分子トモグラフィー」という新たな電子顕微鏡法アーキテクチャを提唱し、「電子顕微鏡で観察できる細胞内分子標識法」と「生物試料用の電子線トモグラフィーシステム(ハードとソフト)」の開発を、総合的に取り組む必要があると考えた。

この目的を実現するため、下記に示す3項目の開発を3つのグループがそれぞれ分担して行うチームを編成して、本研究を行うことにした。

- a. 電子顕微鏡で観察可能な遺伝的にコードされた細胞内分子標識法の開発
- b. 生物試料の電子線トモグラフィー計測を行う電子顕微鏡システムの開発
- c. 生物試料の電子線トモグラフィー解析を行う専用ソフトウェアの開発

a. 電子顕微鏡で観察可能な遺伝的にコードされた細胞内分子標識法の開発 <分子ラベル開発グループ>

本研究期間の初期において、標的タンパク質に融合させた金属結合タンパク質により、金属クラスターを細胞内で形成させる分子標識法の、基礎的な検証実験を行うことにした。予備の実験から、分子標識として標的タンパク質の遺伝子に融合できる金属結合タンパク質として、メタロチオネインが有用であることが分かった。そこで、ホモオリゴマーを形成するタンパク質(大腸菌 GroEL)を標的タンパク質に用いて、電子顕微鏡で観察可能となるか詳細に検討を行った。研究期間中期では、分子標識した標的タンパク質の細胞内での観察を行うことを計画した。標識部分の金属クラスターの大きさから、標的タンパク質の1分子の観察よりも、その凝集体の観察の方が比較的容易であると考えられた。そこで、ポストシナプス肥厚部に集積する足場タンパク質(PSD-95)や繊維状構造となる細胞内骨格系タンパク質など、細胞内で分子複合体を形成するものを標的分子として、細胞内での局在観察を目指した。また、分子標識が標的分子本来の機能に影響しないことを確認するため、標的融合タンパク質の生化学的解析や、細胞内局在とダイナミクスの観察を各種顕微鏡法により行いことにした。さらに、標識分子の検出効率やコントラストを増加させるために、クラスターの金属種や他の金属結合タンパク質についての検討も計画した。研究期間後期においては、全研究期間を通じて検討してきた細胞内分子標識法、および同時並行して開発を進めてきた生物試料に適した電子線トモグラフィーの測定精度の向上とソフトウェアの高度化を併せることにより、本研究の最終目標である「生物分子トモグラフィー」を完成させることを目指した。

b. 生物試料の電子線トモグラフィー計測を行う電子顕微鏡システムの開発 <電子線トモグラフィー観測グループ>

電子線トモグラフィー観測グループは、クライオ電子線トモグラフィー観測の実現を骨子にその

研究計画を立てていた。培養細胞や、組織切片における生体分子のクライオトモグラフィーの実現、およびラベルが有効に使えるような高分解能撮影条件の最適化がその当初目標である。このため研究を二つの領域に分けて計画を立てた。一つは、電子線トモグラフィーシステムの構築である。クライオ電子線トモグラフィーにおける撮影をもっとも困難にしている要因を調査し、システム開発グループへフィードバックすることで改善を予定していた。具体的には、電子線許容照射量の測定、試料傾斜時のドリフト量の測定、低コントラストイメージに対する自動フォーカス機能の精度測定等であった。また、高分解能に達するには、電子線トモグラフィー特有の問題である、欠損領域への対策が必要と考え、クライオ用の回転傾斜ホルダーの開発を念頭に入れながら、既存の常温用回転傾斜ホルダーを使った二軸撮影の調査を計画した。二つ目は、細胞内標識分子のトモグラフィーであるが、このためには、まずは、試料調製法の開発が必須であった。そこで、加圧凍結装置、急速凍結装置を使い、様々な、試料保持剤(sustain)を試しつつ、固定によるアーティファクトを最小限にした電子線染色による調製法、完全な非染色による調製法、電子線照射時の試料の歪みを最小限にする方法の探索を計画した。これら試料作製法を試みるなかで、分子標識として既存のナノゴールドや量子ドットを使用し、テストすることを考慮に入れていた。

c. 生物試料の電子線トモグラフィー解析を行う専用ソフトウェアの開発 ＜システム開発グループ＞

システム開発グループでは、電子線トモグラフィー法を行うための専用ソフトウェアの開発を当初予定していた。特に、金属標識を利用した三次元再構成法(金属標識のぼけを補正することを通じた超解像法等を用いた高速三次元再構成法)、トモグラフィー画像の取り扱いのための三次元グラフィックスソフトウェア(3次元トモグラムの適切な取り扱いが可能なソフトウェア)、トモグラフィー撮影のためのソフトウェア開発(各電子顕微鏡等の性能確認、電子顕微鏡制御のためのソフトウェア)、また、それにより操作できるトモグラフィー用ホルダーの開発を目標にしていた。

研究中期より分子ラベル開発グループからの標識画像の提供、電子線トモグラフィー観測グループからのトモグラフィー撮影の問題点等に係わる情報を得、上記の開発と相まって、それを十分に活かしたソフトウェアの開発を目指す予定であった。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想 ＜分子ラベル開発グループ＞

1. 細胞内分子標識法の基礎的検討

研究期間前半で、Cd を用いた 3MT 標識法により、多量体やクラスターを形成するタンパク質を電子顕微鏡で検出できるようになった。しかしながら細胞内には単量体として存在するタンパク質も多く、それらの標識にも広く適用可能とする必要がある。そこで次に単量体タンパク質一分子検出を目標として、Cd から原子散乱因子の大きい Pt へ金属置換を行うことにより、タンパク質の一分子観察を試みた。これと並行して検出感度の向上を目標としてその他の種々の金属の検討およびメタロチオネイン以外の金属結合ペプチドを利用した標識の検討も行った。

2. 細胞内標識分子のトモグラフィー観察

当研究グループにおける生物学的な研究対象であるシナプスでの情報伝達機構を解明するため、神経のポストシナプスに局在する PSD-95 ばかりでなく、他のポストシナプスに存在する受容体関連タンパク質クラスター(rapsyn)や、シナプス可塑性にも関わるタンパク質(F-アクチン、CaMKII)などの局在や形態の電子線トモグラフィー観察に 3MT 標識法を利用することにした。

3. 細胞内分子標識法の様々な電子顕微鏡法への展開

・凍結切片への応用

細胞内分子標識法は、通常の電子顕微鏡法における分子標識法である免疫金抗体法で必要な抗原抗体反応を始めとした一切の化学反応を試料作製過程で行う必要がないという特徴を持っている。この特性を活かすため、化学固定を施さないために抗原抗体反応を行うことが不可能な凍結切片への細胞内分子標識法の適用を検討した。

・STEM による観察

細胞内分子標識法では、標識が直接目的タンパク質と結合して、細胞内で発現するので、免疫金抗体法で懸念される抗体や化学物質の組織・細胞への浸透性の問題もない。よって、通常より厚い切片に対しても適用できると考えられる。この特性を最大限に活かすために、厚い試料切片の観察が可能な走査透過型電子顕微鏡法(STEM)へ細胞内分子標識法を適用するための STEM を用いた生物試料の観察の検討を新たに開始した。

・凍結割断・レプリカ法、および走査型電子顕微鏡法への展開

細胞内分子標識法は、通常の透過型電子顕微鏡法(TEM)による試料観察に有効な標識法として開発を目指してきたが、凍結割断・レプリカ法における分子標識や、走査型電子顕微鏡法(SEM)による組織断面、細胞表面の観察にも適用するための検討を開始した。これにより、本研究による細胞内分子標識法は、ほとんどの電子顕微鏡法を対象とした分子標識法としての利用を目指した開発を行うことになった。さらに、2010 年に、Se、Cd 存在下で金属結合タンパク質を発現させることによって細胞内で Q-dot を形成できることが他の研究者らによって報告された。Q-dot は蛍光を発する金属クラスターであることから光学顕微鏡と電子顕微鏡の両方で検出が可能である。そこで、電子顕微鏡用に開発したこの遺伝的標識法を利用して光学顕微鏡と電子顕微鏡の相関観察を行うことも視野に入れ、光学顕微鏡を用いた標識融合タンパク質の観察も開始した。

<電子線トモグラフィー観測グループ>

1. PSD-95 の測定

中枢神経系ポストシナプスにおいて膜直下に集積していると考えられている PSD-95 について、分子ラベル開発グループが、3MT 標識し、電子線トモグラフィー観察を平成21年度に報告した。一方で、PSD-95 そのものの全体構造は、報告されておらず、これに対するメタロチオネインの配向も不明のままであった。ラベルの開発実験が様々に試される一方で、PSD-95 に関しては未だ全体構造が不明なため、細胞から精製した PSD-95 の三次元構造解析を計画に取り入れた。

2. 本プロジェクト技術を用いたデータの取得

もともと、本課題がスタートしたときには、クライオ電子線トモグラフィーを行う環境がなかったため、実データの取得は、クライオ電子線トモグラフィーのシステムが可動するのを待つ予定だった。ところが、理想的ではないが、手動撮影でも、ある程度のクオリティーでクライオ電子線トモグラフィーができることがわかり、当初計画にない H19 年度内にはスタートにこぎ着けた。しかし、一回一回の実験の労力は膨大で、成功率も低かった。大腸菌、活性化血小板は、そのような中、取得されたデータである。そのような環境の中、予定外にも最新鋭のクライオ電子線トモグラフィー専用機が大阪大学大学院生命機能研究科に導入され、これにより、様々な試料への適用にともなう、試料作製や観測等の条件検討・改良を行えるようになった。また、それにともなって、本装置を購入すれば良いというものではなく、現状のクライオ電子線トモグラフィーの問題点が浮き彫りになってきた。RDV 感染細胞を用いた高精細のクライオ電子線トモグラフィーは、これまでのノウハウを使用してこの専用機にて実行されたものである。

3. 光-電子相関顕微鏡法

同一視野を蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で観察する光-電子相関顕微鏡法については、細胞内標識の目的からも本課題の範疇には当然あったが、明確な計画を立てていなかった。これは、その他の実験の進捗状況に強く依存することや、専用の道具の開発・準備等があったからである。しかし、当課題の進行中にも様々な情報が入り、小道具の購入等によって、クライオでなければ試せる可能性が出てきたため、平成 20 年度終わり頃から計画し、ニューレキシンとニューロリギンの観測を通してその開発を行った。本課題に内容にも一致し、クライオ電子線トモグラフィー、分子標識、免疫電子顕微鏡法などと相補的に使われることが期待される方法である。

4. CEMOVIS

アモルファスの氷層に物理固定した試料を液体窒素雰囲気下でそのまま薄切するという本方法については、まず、本課題計画時当初は、CEMOVIS の詳細がわからなかった。申請書には、もちろんこの用語の記載もない。しかし、学会での欧州グループの発表が話題を呼び、幸いにも、ライカマイクロシステムズの伊藤氏が目的は違うが、本方法を知っていたため、また、運良く加圧凍結

装置が阪大に納入されたため、挑戦することとなった。まだまだ、アーティファクトの検証が行われている段階だが、本課題が進む中で、ヒトの細胞等大きな試料を水和した状態で観察するには、現状では、ほぼ唯一の方法であることがわかってきた。

<システム開発グループ>

本研究がスタートした段階で、電子線トモグラフィーを氷包埋試料に適用できる電子顕微鏡は、海外機の1社のものであった。当初国産機での適用を検討し始め、本研究費を用いて国産機を購入し、その機能等の問題を洗い、可能かどうかの検討を行った。同時期に、所属機関、九州大学、及び大阪大学に海外機が導入され、その性能を比較した。その結果、氷包埋試料による撮影はぎりぎり可能であるが、いくつかの理由で機能的に不十分であることが分かり、かつ、海外機がクライオ電子線トモグラフィー向けのアーキテクチャとして適していることが明白となった。更に、電子線トモグラフィー観測グループが、大阪大学の海外機を使って、クライオ電子線トモグラフィー撮影が可能となった。そこで、他グループとの共同研究を優先し、かつ、金属タンパク質による標識の可視化、及び、有効性を最優先課題とすることとした。

そこで、ひとつには、金属タンパク質による標識がどのように観察されるべきか、また、標識一分子の可視化が可能かどうかについて画像処理法等を用いて、明らかにすることにした。また、鞭毛内のダイニンサブユニットや鞭毛内での微小管結合タンパク質等に、ラベル開発グループが開発した金属タンパク質を用いて標識を行い、鞭毛内でどこに配置しているか、かつ、軸糸内のダイニン等の超分子構造体内部での位置を決定し、鞭毛のカルシウム制御や外腕ダイニンの配置方法などの構造機能相関の解明を目指すこととした。

また、三次元再構成法に関しては、氷包埋像による三次元再構成法が、雑音レベル、CTF による画像変調、ミッシングエリアなどによるアーティファクトが大きいことから、インプリメントに先立ち、アーティファクトを生み出す原因を情報数理の観点から洗い直し、アルゴリズムの再構築を行うこととした。現在、各種の手法を見出し、統合化することで 3 次元画像の改善が見られる可能性を示唆するアルゴリズムの構築を実施した。GPGPU などによる並列化による高速化の検討も進め、100 倍を超える高速化が可能であることが分かった。いずれもインプリメントが遅れている点が問題として残った。

新たな研究グループ、「光検出磁気顕微鏡開発グループ」(研究分担者: 白川昌宏・京都大学大学院工学研究科)の追加

本課題が最終的に目指している細胞機能の理解へ近づけるため、電子顕微鏡法以外のアプローチをチームに取り入れ、競い合い、相補いあい、あるいは協力する形で、それぞれの手法を展開させ、その結果として細胞機能の理解へ貢献できる電子顕微鏡の計測法を探っていくことを考えた。そのため、平成22年度に核磁気共鳴を専門として標識開発を行う「光検出磁気顕微鏡開発グループ」を、新しいグループとして加えた。

§ 3 研究実施体制

(1)「分子ラベル開発」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
宮澤 淳夫	兵庫県立大学大学院生命 理学研究科	教授	H18.10～
福永 優子	同上	助教	H18.10～
石原 あゆみ	同上	M1～2	H22.4～
伊藤 紗也佳	同上	M1～2	H22.4～
上里 真史	同上	M1～2	H22.4～
西野 有里	(独)理化学研究所 放射 光科学総合研究センター	研究員	H18.10～
東原 愛	同上	リサーチアソシエ イト	H18.10～
伊藤 喜子	ライカマイクロシステムズ (株)UM 事業部	担当マネージャ ー	H22.5～
平林 愛	同上	スペシャリスト	H18.10～

② 研究項目

- ・ 金属結合タンパク質を利用した細胞内分子標識法の開発
- ・ 標識融合タンパク質の電子顕微鏡観察
- ・ 細胞内分子標識法の様々な電子顕微鏡観察法への応用

(2)「電子線トモグラフィー観測」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
岩崎 憲治	大阪大学 蛋白質研究所	准教授	H18.10～
岡田 愛子	同上	研究員	H19.4～H21.1
宮崎 直幸	同上	研究員	H19.6～
的場 京子	同上	研究員	H21.4～

② 研究項目

- ・ クライオ撮影を含む電子線トモグラフィー撮影条件と解析方法の探索
- ・ 分子分解能を目指した、CEMOVIS を含む試料作製法の改良・開発
- ・ 本プロジェクトにおける技術を使用した生物学上の発見につながるデータの取得
- ・ 光-電子相関顕微鏡法の導入と改良

(3)「システム開発」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
安永 卓生	九州工業大学大学院情報 工学研究院	教授	H18.10～
小松 英幸	同上	助教	H18.10～
野田 和弘	九州工業大学情報工学部	産学連携研究員	H19.3～H19.4
我妻 竜三	同上	産学連携研究員	H20.4～
金 明月	同上	産学連携研究員	H20.4～
高崎 寛子	九州工業大学大学院情報	M2～D3	H18.10～H22.9

	工学府		
峰 寛	同上	M1～M2	H19.4～H21.3
瀧本 雄介	同上	M1～M2	H19.4～H21.3
新名 人士	同上	M1～M2	H19.4～H21.3
中尾 亮太	同上	M1～M2	H19.4～H21.3
福地 弘昭	同上	M1～M2	H20.4～H22.3
富永 彰人	同上	M1～M2	H20.4～H22.3
塚田 祥弘	同上	M1～M2	H21.4～H23.3
吉竹 純一	同上	M1～M2	H21.4～H23.3
大田 興起	同上	M1～M2	H21.4～H23.3
白川 圭太	同上	M1～M2	H21.4～H23.3
鶴崎 聖也	同上	M1～M2	H21.4～
大熊 康夫	同上	M1～M2	H22.4～
日高 裕章	同上	M1～M2	H22.4～
山下 理沙	同上	M1～M2	H22.4～
吉田 一章	同上	M1～M2	H22.4～
渡邊 慶太	同上	M1～M2	H22.4～
荒牧 慎二	同上	M1	H23.4～
木原 達也	同上	M1	H23.4～
八木 隼人	同上	M1	H23.4～
伊藤 典子	九州工業大学情報工学部	技術補佐員	H20.10～

②研究項目

- ・標識タンパク質を用いた新規トモグラフィー・アルゴリズムの探索
- ・生物分子トモグラフィーのための電子顕微鏡制御システムの開発
- ・標識タンパク質の可視化方法の開発と実践

(4)「光検出磁気顕微鏡開発」グループ

①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
白川 昌宏	京都大学大学院工学研究科	教授	H23.1～
朽尾 豪人	同上	准教授	H23.1～
猪股 晃介	同上	博士研究員	H23.1～
五十嵐 龍治	同上	D2～D3	H23.1～
森本 大智	同上	D1	H23.4～
Erik Walinda	同上	研究員	H23.4～
外間 進悟	同上	M2	H23.1～
村山 秀平	同上	M2	H23.1～
大金 信幸	同上	M1	H23.1～

②研究項目

- ・光検出磁気顕微鏡の開発

§ 4 研究実施内容及び成果

4. 1 電子顕微鏡用標識の開発(兵庫県立大学 分子ラベル開発グループ)

金属結合タンパク質を用いて電子顕微鏡で観察可能な金属クラスターを細胞内で形成させ、分子標識として利用できるようにする。このため標識となる金属クラスターを形成する金属結合タンパク質やペプチド等の遺伝子を、標的タンパク質の遺伝子に組み込んで融合タンパク質として発現させる。その標識融合タンパク質に、細胞内に存在する金属による金属クラスターを形成させることにより、電子顕微鏡で観察できる遺伝的にコード化された細胞内分子標識とする、この手法の開発を行うことを中心に研究を行ってきた。

4. 1. 1 細胞内分子標識法の開発

(1) 研究実施内容及び成果

a. メタロチオネイン(MT)を利用した標識法の開発

まず、ホモ 14 量体タンパク質である GroEL を目的タンパク質として、メタロチオネイン 3～5 分子をタンデムにつないだ 3MT、4MT、5MT タグの電子顕微鏡用標識としての有効性を検証した。GroEL の個々のサブユニットに 3～5MT を融合し、0.1～1mM の Cd イオン存在下、大腸菌で発現させた。その結果、0.1～0.2mM の Cd イオンを添加した状態でかつ 3MT を融合した時に、最も MT への Cd の結合効率が高いことが明らかになった。また、4MT、5MT では GroEL の 14 量体形成が阻害傾向にあった一方、3MT では 14 量体を形成できることが分かった。そこで、3MT を用いて詳細な検討を行った。GroEL-14(3MT)を精製して電子顕微鏡で観察したところ、電子染色像からは GroEL と同様の分子形状を確認でき、無染色像では電子密度を持った黒いスポットとして GroEL-14(3MT)粒子を検出することができた(図 1)。さらに、氷包埋して極低温電子顕微鏡で観察した場合も、GroEL-14(3MT)は GroEL より高いコントラストを持った粒子として検出することができ、これらの結果は平成 19 年度に原著論文として発表した(*J Electron Microsc.*, **56**, 93, 2007)。また、単粒子解析の結果、3MT は GroEL 分子の内腔部から外側へ向かって広がっていることが明らかになった。

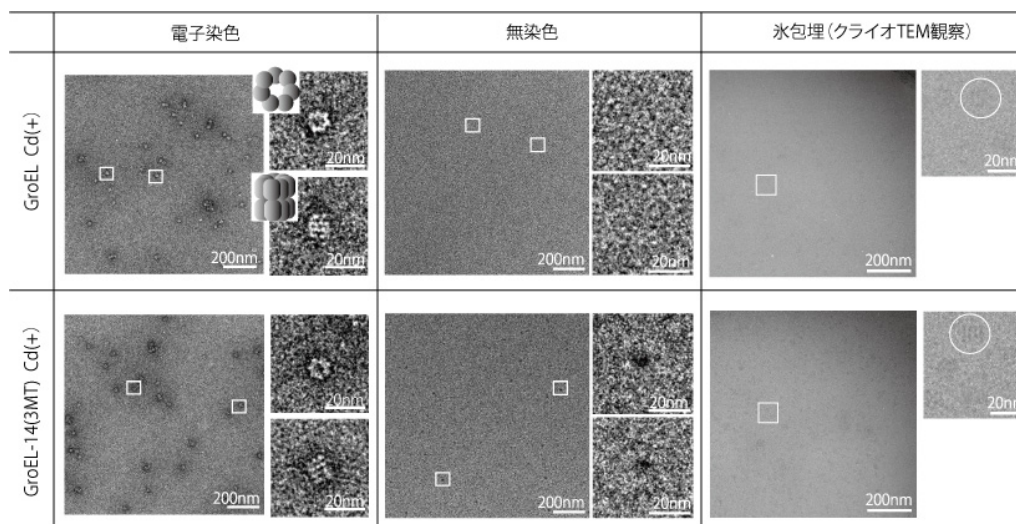


図 1: Cd 存在下大腸菌で発現後、精製した GroEL および GroEL-14(3MT)の TEM 観察

さらに、クラスター形成タンパク質である PSD-95 についても同様に 3MT を融合(PSD95-3MT)して大腸菌で発現させ、精製タンパク質を電子顕微鏡で観察することができた。PSD-95-3MT に関しては、真核生物の培養細胞株である COS7 細胞でも Cd イオン存在下発現検討を行い、20μM Cd イオン存在下で発現させた PSD-95-3MT を精製し、電子顕微鏡で観察できることを確認できた。

本研究において開発した電子顕微鏡で観察できる遺伝的コード化標識「3MT タグ」については、標識開発に関わる論文を公表後から、これまでに国内外合わせて12件の3MTタグ遺伝子の供与依頼が届いた(表 1)。これは、研究開発のコンセプトである電子顕微鏡で観察可能な分子標識法が、電子顕微鏡分野で切望されてきたということを客観的に物語っている。我々が論文を発表したのと同時期に、Brandeis University の DeRosier 教授等も金属結合タンパク質としての MT の性質を利用した分子標識法の研究として精製した MT 融合タンパク質を電子顕微鏡で観察することに成功している(*J Mol Biol*, **355**, 211, 2006 & *J Struct Biol*, **160**, 70, 2007)。しかしながら、これらは *in vitro* での化学反応で金チオリンゴ酸ナトリウムを利用して金を MT に結合させる手法であり、生きている細胞内で分子の標識を完結させる本方法とは異なっている。

表 1: MT タグ遺伝子の提供先

	日 時	プラスミドを提供した機関
1	2008 年 1 月	NIH, 米国
2	2008 年 7 月	MPI (Baumeister's Lab.), ドイツ
3	2008 年 8 月	名古屋大・医
4	2008 年 10 月	京都大・理
5	2008 年 10 月	University of Konstanz, ドイツ
6	2009 年 4 月	結核研究所
7	2009 年 5 月	岡山大・医
8	2009 年 8 月	農業生物資源研究所
9	2009 年 8 月	UC Berkeley, 米国
10	2009 年 9 月	Brandeis University, 米国
11	2010 年 1 月	Tsinghua University, 中国
12	2011 年 9 月	University of Munster, ドイツ
13	2011 年 11 月	中国科学研究院 中国
14	2011 年 11 月	東京大学・理

b. 3MT 標識による一分子観察の検討

Cd 結合 3MT による標識は、これまで多量体を形成するタンパク質の電子顕微鏡検出に成功してきた。そこで、次に単量体タンパク質一分子の電子顕微鏡観察を目指し、Cd よりも原子散乱因子の大きい Pt を用いて検討を行った。3MT 標識タンパク質を組み込んだ大腸菌を Pt 化合物であるシスジアミンジクロロ白金(cisDDP)存在下で培養したが、金属を結合したタンパク質を回収することができなかった。そこで、Cd 結合 3MT 標識 GFP (GFP-3MT)を発現・精製し、cisDDP により金属置換を行った。その結果、MT への Pt 結合によって上昇する 284nm の吸光度が、cisDDP の置換濃度と時間に依存して上昇した。置換開始 24 時間後の試料から、ゲルろ過カラムによって単量体画分を分離し、Pt が結合した GFP-3MT を得ることができた。一方、3MT 標識していない GFP では、284nm の吸光度は上昇せず、Pt が 3MT に特異的に結合していることが示唆された。そこでこの Pt 結合 GFP-3MT を、電子染色を行わずに電子顕微鏡で撮影し、システム開発グループが開発を行ってきた電子顕微鏡画像解析ソフトウェア Eos を用いて、システム開発グループと共同で撮影画像の解析を行った。その結果、図 2 に示すように、GFP-3MT では、3MT 標識していない GFP と比べて Pt 由来と思われる高い電子密度が多く観察された(*J Electron Microsc*, in press)。

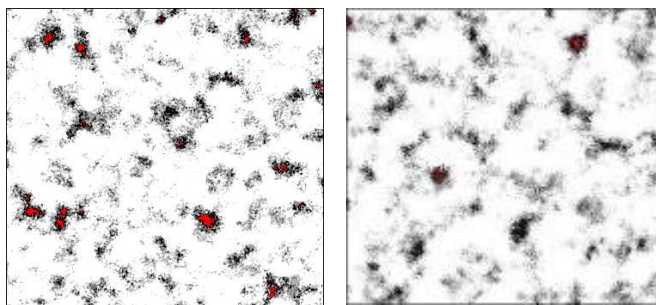


図 2: Pt 結合 GFP-3MT(左)と GFP(右)。黒:タンパク質や金属の密度。赤:周辺に比べ偏差値 90-100 に対応する高い電子密度を示す。

本研究によって、3MT 標識が、多量体タンパク質だけでなく単量体タンパク質一分子の電子顕微鏡検出にも有効であることを示すことができた。加えて、金属由来の電子密度を検出するためには、画像解析が非常に有効に働くことが明らかになった。本研究は、電子顕微鏡で細胞内一分子を検出する上で非常に重要な位置を占めるものである。これまでに金チオリンゴ酸ナトリウムを用いて Au が結合した 3MT によってもタンパク質一分子が検出されることが報告されている(*J Struct Biol*, **160**, 70, 2007)。しかし、我々の検討の結果、金チオリンゴ酸ナトリウム は細胞毒性を示さない濃度では細胞内に取り込まれなかった。一方、cisDDP は、細胞毒性を示す濃度以下で細胞内に取り込まれることを確認している。また、AuCl を用いて、大腸菌内に発現した MT 標識タンパク質を電子

顕微鏡で観察した結果が報告されているが(*J Struct Biol*, **165**, 157, 2009, *ProS One*, **4**, 1, 2009)、AuCl は水溶液中で不均化しやすいことが知られている。また、我々の検討では、Au 化合物は cisDDP よりも強い細胞毒性を示した。以上より、細胞内一分子の検出には、Au 化合物よりも cisDDP の方が適していると考えられる。

c. 他の金属の検討

3MT タグの検証は Cd と Pt を用いて行ってきたが、MT はこれらの金属以外にも Zn、Cu、Ag、Au、Hg、Pb、Bi など種々の金属と結合することが報告されている。そこで、水溶液として安定に細胞に添加することが可能な Zn、Ag、Au、Hg について検討を行った。しかしながら大腸菌にこれらの金属を種々の濃度で添加して 3MT 融合タンパク質の発現を試みたところ、いずれも 3MT 融合タンパク質可溶性画分に得ることができなかった。また、これらの金属の中でも原子散乱因子の大きな Hg と、二価イオン (MT 一分子あたり金属 7 原子) よりも細胞内で MT に多数結合することが報告されている Ag (MT 一分子あたり金属 12 原子) については COS7 細胞でも検討を行った。その結果、Hg に関しては、Hg イオン存在下、PSD-95-3MT を発現させ、精製することができたが、精製タンパク質中からは Hg は検出されなかった。細胞溶解液からは Hg が検出されたため、細胞内へ

は取り込まれたが、3MT と結合していないもしくは Hg が結合した 3MT 融合タンパク質は分解してしまったと考えられる。次に Ag イオンでは、PSD-95-3MT を Ag 存在下発現させ、精製することができた。Ag では 3MT を融合していない PSD-95 でも PSD-95 一分子あたり数原子の Ag が結合してしまうことが明らかになったが、PSD-95-3MT では、およそ 40 原子の Ag を結合した PSD-95-3MT を得ることができ、それは図 3 のように電子顕微鏡で高いコントラストで検出することができた。PSD-95-3MT 一分子あたりの Ag の結合数は Cd の 2 倍以上に相当する。MT は 1957 年に単離されて以来、多くの研究が進められたタンパク質である。MT と金属との結合は Cd や Zn に関しては X 線結晶構造解析や NMR により結合様式が明らかにされている。しかしながら、多くの金属については MT との結合様式や結合数もはっきりしておらず、本 CREST 研究期間中にも、今まで知られていなかった金属との相互作用や(*Angew Chem Int Ed Engl*, **49**, 7019, 2010)、イオン状態の金属だけでなく新たにウンデカゴールドとの結合(*Dalton Trans*, **21**, 3742, 2009)なども報告されている。MT と金属の結合を利用した本 CREST 研究は、これら MT 研究と平行して進んでいる研究である。

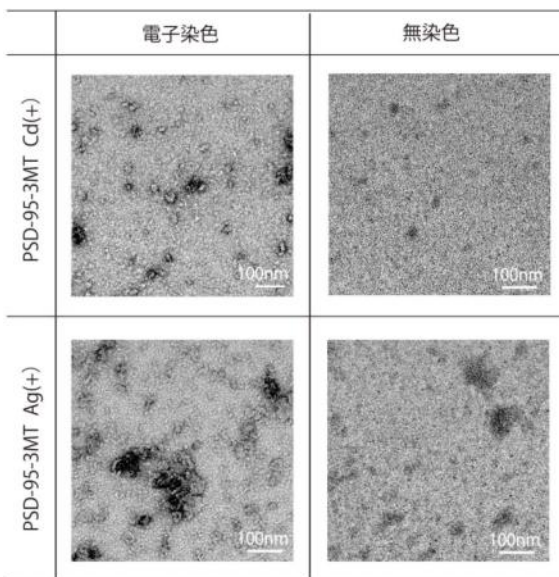


図 3: Cd もしくは Ag 存在下大腸菌で発現後、精製した PSD-95-3MT の TEM 観察

d. 他の金属結合ペプチドの検討

タグの融合による立体障害を最小限に抑え、かつ検出効率を高めるためには、タグ分子はなるべく小さくし、かつ多くの金属を結合させられることが望ましい。そこで、天然に存在する金属結合タンパク質だけでなく、金属結合人工ペプチドをタグとして利用する検討を行った。まず、チタン、銀、シリコンと特異的に結合する人工ペプチドとして創製されたチタン結合ペプチド(TBP-1) (*Langmuir*, **21**, 3090, 2005)を融合させた PSD-95 を Ag イオン存在下 COS7 細胞で発現させた。しかし PSD-95-TBP-1 は沈殿画分に回収されたために精製できず、結合金属の確認には至らなかった。

そこで次に、フィトケラチンアナログについて検討を行った。植物に過剰な重金属イオンが取り込まれるとグルタチオンが重合してフィトケラチンが合成される。フィトケラチンは Glu と Cys の繰り返し配列で構成されるγアミノ酸ペプチドであり、Cd をはじめとして種々の重金属イオンと結合すること

が報告されている。そこで、フィトケラチンの α アミノ酸アナログである、EC20((Glu-Cys)₂₀)をタグとして利用できるのではないかと考え、4 種のコンストラクト(EC20, MT-EC20, MT-2EC20, MT-3EC20)をタグの候補として作製した。それらを GroEL の各サブユニットもしくは PSD-95 に融合させて、Cd イオン存在下大腸菌で発現させた。それぞれ

表 2: 3MT タグと MT-EC20 タグの Cd 結合数の比較

精製したタンパク質の Cd 含有量を測定したところ上表のように MT-EC20 では、3MT と比較してタグの分子量

	GroEL-3MT	GroEL-MT-EC20
タグ分子量	19.3	11.3
GroEL1 分子あたりの Cd 結合数	17.8	11.8
タグ 1kDa あたりの Cd 結合数	0.92	1.04

あたりの Cd 結合量を 10%上昇させることができた(表 2)。また、GroEL-14(MT-EC20)は 14 量体一分子あたりの Cd 含有量は GroEL-3MT より少なかったにもかかわらず電子顕微鏡で検出することが可能であった。

これらの人工ペプチドは、材料工学の分野で機能性ナノ粒子の創製やバイオレメディエーションなどの目的で近年、研究が活発になっている。本 CREST 研究である金属結合ペプチドを用いたタンパク質の標識技術は、材料工学分野で創製されるペプチドの今までに報告がない応用例となる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本 CREST 研究期間中に確立できた細胞内分子標識法を用いてあらゆるタンパク質の検出を可能とするためには、検出感度の上昇などまだ改良の余地は残されている。しかし、3MT 標識法による分子標識技術は、電子顕微鏡による観察技術を、光学顕微鏡による一分子観察のレベルにまで近づけることができたと考えている。GFP を含め遺伝的コードされた分子標識が免疫染色より優れている点の一つは、標的分子を認識するための良い抗体を作製する手間を省略できることである。常に抗体価が高く、特異性の高い抗体を、標的とするタンパク質に対して迅速に作製するのは、決してたやすいことではない。本研究における分子標識法は、一般的な遺伝子組み換え技術で実行可能であり、電子顕微鏡法に応用することで従来の組織・細胞化学研究のスピードを加速度的に促進する。また、3MT 標識法の最大の特徴は、細胞が活着している間に標識操作が完了し、その後の検出のための操作が必要ないという点である。そのため、3MT 標識は、従来の免疫金標識法を行うことが困難な CEMOVISをはじめとした最新のクライオ技術への適用も可能であるため、今後重要性が増すことは明らかである。

4. 1. 2 細胞内標識分子のトモグラフィー観察

(1) 研究実施内容及び成果

基礎的検討が進んだ 3MT 標識を用いて、次の段階となる細胞内標識への検討を PSD-95 を用いて進めた。

PSD-95 は、中枢神経ポストシナプスにおいて、受容体やイオンチャネルと結合してシナプスに集積しており、また、細胞内情報伝達分子とも相互作用し、シナプス伝達において重要な働きをするタンパク質である。まず始めに、ポストシナプスに局在する PSD-95 の 3MT 標識による検出に取り組んだ。海馬初代培養細胞を用いた発現検討の結果、3MT を融合しても、PSD-95 の性質や局在には影響を及ぼさないことを確認した。さらに、細胞生存を指標として CdCl₂ の処置濃度と時間を決定した。図 4 は、PSD-95-3MT を高発現した神経細胞を電子顕微鏡で観察した結果である。ここでは、Cd 由来の電子密度だけを検出するために、四酸化オスmiumによる後固定や酢酸ウラニル等の電子染色は行っていない。細胞はバックグラウンドに比べて明るく観察された。Cd を処置した PSD-95-3MT 発現細胞において、高い電子密度を持つ領域が認められた(図 4a-c)。このような高い電子密度を持つ領域は、無処置の細胞(図 4d)、Cd だけを処置した細胞(図 4e)、あるいは PSD-95-3MT 遺伝子を発現させただけの細胞(図 4f)では認められなかったことから、PSD-95-3MT に結合した Cd クラスターであると考えられる。電子染色を行った細胞の観察により、電子密度の高い領域がポストシナプスであることが明らかとなった。以上の結果より、細胞内に発現した 3MT 標識

目的タンパク質は、Cd と結合することで、電子顕微鏡観察が可能であることを示すことができた (*J Electron Microsc*, **56**, 119, 2007)。現在では、MT(*J Struct Biol*, **165**, 157, 2009)やフェリチン(*Structure*, **19**, 147, 2011)などの金属結合タンパク質を遺伝的標識として用いた研究は海外でも行われているが、我々は世界に先駆けて、細胞内に発現した金属結合タンパク質で標識されたタンパク質の電子顕微鏡による検出に成功した。

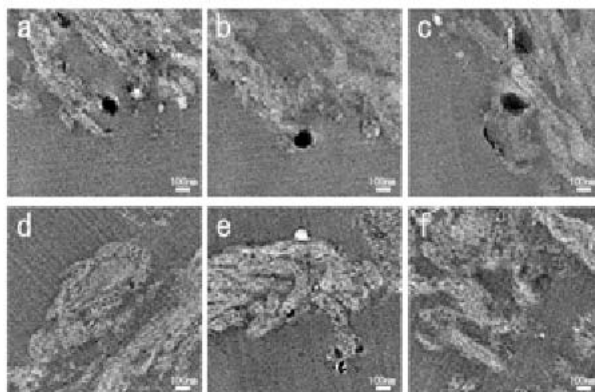


図 4: 海馬初代培養細胞に発現した PSD-95-3MT-Cd

これまでに MT やフェリチンなど用いた標識タンパク質をクライオ電子線トモグラフィー解析した結果が報告されているが、いずれも大腸菌内に発現した標識タンパク質を対象としている。真核細胞を用いた金属結合タンパク質標識の電子線トモグラフィー解析に成功した例は当研究のみで、他にはない。こうした細胞内分子標識の必要性は非常に高いが、開発が困難であり、金属結合タンパク質以外は、これまで 2 種類の標識法が報告されたに過ぎない。1つは Quantum Dot と呼ばれる高発光性半導体を用いた標識法である (*Science*, **281**, 2016, 1998)。しかし、標識結合タンパク質を細胞内に取り込ませる方法であるため、確実な分子標識の必須条件である標的タンパク質と融合させて細胞内で発現することができず、厚い切片を試料とする電子線トモグラフィーには使えない。また、相関顕微鏡法として利用することが可能な標識法である Tetracycline(*Science*, **296**, 503, 2002)や miniSOG (*PLoS Biol*, **9**, 1, 2011)を含む組み換えタンパク質を細胞内で発現させる標識法は、電子顕微鏡下では、固定試料にしか応用できないジアミノベンチジン (DAB) を光転換させた電子密度の高い反応生成物を観察するため、標識法の適用に制限がかかる。しかし、3MT 標識法は細胞が活着している状態で標識が完了するため、クライオ試料にも適用が可能である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、基礎的検討において電子顕微鏡で観察できることを確認した 3MT タグが、実際に細胞内標識分子として使用できることを証明した。3MT の標識対象とした PSD-95 は神経細胞のポストシナプスでクラスターを形成することが知られている。今回電子線トモグラフィー解析によってこの PSD-95 クラスターの立体構造を明らかにすることができた。一般的な光学顕微鏡解析では、蛍光強度を指標として、シナプスにおける PSD-95 の増減という量に関する情報しか得ることができないが、本法では PSD-95 によって形成されるクラスターの大きさ・形状・数密度(単位体積当たりの分子数)について情報を得ることができる。また、免疫金法では PSD-95 が存在する場所を示すのに対し、本法では PSD-95 からなるクラスター構造自体を解析することが可能になる。このように 3MT 標識法によって、一般的な光学顕微鏡や免疫電子顕微鏡では得ることのできない情報が得られるようになる。従って、本法による PSD-95 クラスター構造の変化の解析は、シナプスの構造変化がおこる神経細胞の発達段階や、神経細胞の虚血などの病的状態における PSD-95 の役割の解明につながると期待される。

4. 1. 3 細胞内分子標識法の様々な電子顕微鏡法への展開

(1) 研究実施内容及び成果

a. STEM による観察

興奮性神経シナプスの主要な形成部位である樹状突起スパインは、頭部の直径が $0.5\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$ の突起構造をしている。そして神経細胞の興奮により、スパイン内部において機能性タンパク質の局在や分子間相互作用がダイナミックに変化する。3MT 標識を用いて、このようなダイナミックな変化を観察するためには、スパインの一部を観察して得られる情報を集めるよりも、スパイン全体を観察する方が適している場合がある。しかし、通常の透過型電子顕微鏡法 (TEM) では約 100nm 以上の

厚さの切片を観察するのは困難である。一方、走査透過型電子顕微鏡法(STEM)では、数百 nm ~1 μ m という非常に厚い試料の観察が可能である。しかも STEM は通常の TEM よりも金属クラスターの検出感度が良い(*J Struct Biol*, **160**, 70, 2006)。しかし電子線損傷が深刻な問題になると危惧されていることから、STEM による生物試料の電子線トモグラフィー観察例は多くない。そこで、厚い試料における 3MT 標識タンパク質の観察を実現するために、生物試料の STEMトモグラフィー観察の確立を目指した。まず、生物試料観察において一番の障壁と考えられてきた電子線損傷について検討を行った。HEK293 細胞を用いて、STEM トモグラフィーを行うと共に、試料の収縮率を測定し、試料に与える電子線損傷を定量した。その結果、厚い試料を用いた場合、STEM トモグラフィーの方が通常の TEM トモグラフィーよりも電子線損傷が少ない事が分かった(平成 20 年度原著論文発表 *Ultramicroscopy*, **109**, 70, 2008)。また、海馬初代培養細胞を用いた STEM トモグラフィー観察によって、TEMトモグラフィーよりも本来の厚みに近い状態で立体構造を観察できることがわかった(図5)。今回の実験で、STEMトモグラフィーが厚い生物試料の立体再構成に非常に有効であることが確認でき、3MT 標識を応用するための基盤を築くことができた。このマイクロメートルレベルの厚さを持つ試料は、これまで超高压電子顕微鏡でなければ観察できなかっただけに、こうした試料の立体再構成がSTEMトモグラフィーで可能になるのは大きな利点である。

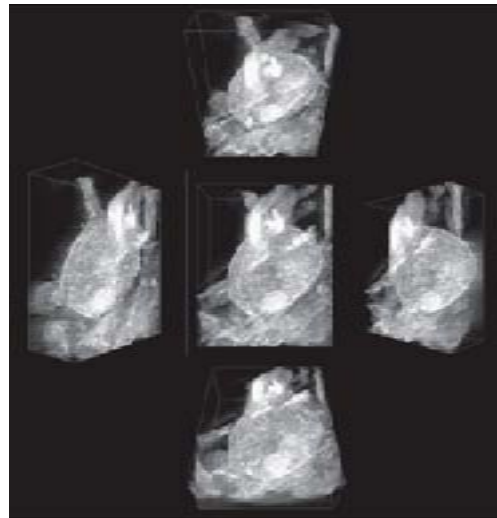


図 5: STEMトモグラフィーによる海馬初代培養細胞の三次元再構築像

b. 凍結切断レプリカ法への展開

3MT 標識は、当初、薄切切片において観察するための細胞内タンパク質標識法として開発された。しかしながら、3MT によるタンパク質の標識は、薄切切片の観察に限らず、電子顕微鏡による観察に共通した標識法になり得ると考えられる。凍結切断・レプリカ法では、凍結した細胞を切断し、細胞内小器官やタンパク質由来の凹凸を持った切断面に白金・カーボン蒸着を行ってレプリカ膜を作製し、このレプリカ膜を TEM で観察する方法が一般的な方法である。白金により作製した厚いレプリカ膜上では、3MT タグによる Cd 由来の電子密度を検出することは困難であると考えられる。そこで白金の蒸着を最小限もしくはカーボンのみによる蒸着を行い、薄いレプリカ膜を作製することにより、Cd 由来の電子密度を検出することができるのではないかと考えた。また、レプリカ法では細胞膜タンパク質分子そのものを観察した例が報告されている。そこで、神経筋接合部で形成されるニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)のクラスター形成機構を解明するため、5 量体膜タンパク質である nAChR と、nAChR の細胞膜直下に形成される 3MT 融合 rapsyn クラスターの同時検出を目標とした。rapsyn は nAChR の足場タンパク質で、nAChR のクラスター化に必要不可欠なタンパク質である。間接蛍光抗体法を用いた光学顕微鏡観察では nAChR と rapsyn はクラスターとして共局在することが確認されているが、蛍光顕微鏡ではクラスター内の個々のタンパク質分子が一体となって蛍光を発してしまい、個々のタンパク質分子の分布を観察することはできない。nAChR と rapsyn が結合することは生化学的に証明されているが、その結合様式は不明であり、また分化や加齢により nAChR と rapsyn の存在比が変化することが報告されている。今までに神経筋接合部の nAChR クラスターの個々の分子を電子顕微鏡で観察した例はない。一つ一つの膜タンパク質分子を直接観察可能な凍結切断レプリカ法と、細胞質タンパク質である rapsyn への 3MT 標識技術の融合は nAChR と rapsyn の分布を観察する上で非常に有効な手段であると考えられる。そこでまず C2C12 細胞由来の筋管で形成させた nAChR クラスターを凍結切断レプリカ法を用いて観察する検討を行った。その結果、細胞膜表面には局所的に膜タンパク質の集積している領域が存在しており、一部の分子では図6のように 5 つのサブユニット構造を観察することができた。現在までにイ

ムノゴールド法を用いた走査電子顕微鏡観察でクラスター内における nAChR 分子の分布は一様でないことが観察されているが、イムノゴールド法では 100%の分子が標識されるわけではないため、正確な分子分布を捉えるのは困難である。凍結割断レプリカ法によって直接的に膜タンパク質分子を観察できることは凍結割断レプリカ法の大きなメリットである。凍結割断レプリカ法で同定できるタンパク質は特徴的な構造の大きな膜タンパク質に限定される。そこで、rapsyn に 3MT を融合させた遺伝子を C2C12 細胞のゲノムに組み込み、rapsyn-3MT を nAChR と共にクラスター化させることが可能な C2C12 細胞株を樹立し、rapsyn-3MT 観察の準備を行った。レプリカ法では特徴的な構造を持たない小さなタンパク質を像から同定することは難しく、分子の同定が長年の課題であった。レプリカ法のタンパク質標識法として、生理学研究所の重本博士により SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling 法 (SDS-FRL 法) が提唱され、レプリカ法でも免疫金標識が可能になった。これはレプリカ膜作製後に行う免疫金による標識法であり、細胞が活着している時に標識が完了する 3MT 標識法とはアプローチが異なるものである。

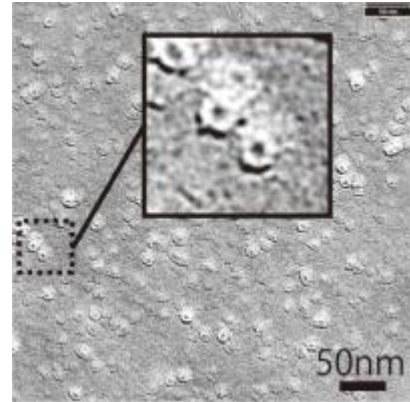


図 6: 凍結割断レプリカ法を用いた筋管細胞表面の観察

(2) 研究成果の今後期待される効果

研究において、海馬初代培養細胞の凍結切片内において 3MT 標識 PSD-95 を検出することに成功した。今後、3MT 標識 PSD-95 を発現している細胞のクライオ電子線トモグラフィー解析により、細胞内で”機能している PSD-95”の構造を明らかにできると期待される。さらに、シナプス後肥厚部における PSD-95 の立体配置を足掛かりに、種々の機能タンパク質で構成されている複合体の構造やダイナミクスの解明へと発展させることができると考えている。また、本研究において確立した海馬初代培養細胞の凍結切片法は、活着している状態に近いシナプスを観察する上で、非常に有意義な成果である。化学固定し免疫染色した試料では、試料作製過程で分子が流出してしまったり、複合体構造が破壊されたりする場合がある。例えば、興奮性神経シナプスの主要な形成部位である樹状突起スパイン内には、網目状に張りめぐらされているアクチン繊維が存在しているが、アクチン繊維は通常の電子顕微鏡試料作製によって破壊されやすく、たとえ観察されても、それがネイティブな構造を維持している保障はない。そのため、スパインにおけるアクチン繊維の動態がシナプスの形態学的可塑性において重要な役割を果たすことは分かっているが、実際にスパインのアクチン繊維を微細構造レベルで解析した例は少ない。海馬初代培養細胞のクライオ電子線トモグラフィー観察が可能になれば、このような通常の電子顕微鏡法では困難なスパイン内のアクチン繊維動態を解析することができるようになる。さらに 3MT 標識と組み合わせる事で、アクチン繊維動態の調節機構が明らかとなり、シナプスの形態学的可塑性のメカニズムの解明につながることを期待される。

走査透過型電子顕微鏡法 (STEM) トモグラフィーによって、生物試料の観察が可能になった事で、頭部の直径が $0.5\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$ もあるスパイン全体の三次元構造の解析を行うことができた。今後は、3MT 標識を用いることで、スパイン内部においてダイナミックに変化する機能性タンパク質の局在や分子間相互作用を、スパインやシナプス全体を対象として解析できるようになると考えている。より広い領域でのタンパク質のダイナミクスが分かることによって、それぞれのタンパク質と生理現象の結びつきの解明が進むと期待できる。

また、レプリカ法を用いて細胞構造を観察する手法は古くから行われてきた方法であるが、分子の同定が非常に困難であるために、他の電子顕微鏡法より普及が進んでいない。生理学研究所の重本博士により SDS-digested Freeze-fracture Replica Labeling 法 (SDS-FRL 法) が提唱され、レプリカ法の免疫金標識が可能となったが、良質な抗体が必要であることは言うまでもなく、また厚さ 10nm 程度の薄くて小さなレプリカ膜を扱う操作は熟練が必要な困難な作業である。3MT による標識法は、活着している間に標識操作が完結し、抗体も必要ないことから、3MT 標識のレプリカ膜への適用が実証されれば、レプリカ法の普及にもつながると考えられる。

さらに、TEM だけでなく SEM への標識の適用が可能となれば、3MT 標識はあらゆる電子顕微鏡法で検出可能な標識法となり、その汎用性と利用価値が高まることは間違いない。また、細胞内で MT やフィトケラチンの遺伝子導入による大量発現によって Q-dot 様の金属ナノ粒子が形成されるという昨年の論文(*Angew Chem Int Ed Engl*, **49**, 7019, 2010)は、MT や EC20 による標識を光学顕微鏡と電子顕微鏡の相関観察に利用できる可能性を示している。光学顕微鏡と電子顕微鏡で共に利用できる標識としてはテトラシステインタグによる標識法が報告されているが(*PLoS Biol*, **9**, e1001041, 2011)、光学顕微鏡観察後に電子顕微鏡で観察するための化学反応が必要であり、CEMOVIS やクライオ SEM 観察への適用は困難である。本 CREST 研究では、MT や EC20 融合タンパク質によって Q-dot 様の粒子が形成されることが光学顕微鏡で確認できた。近年、相関顕微鏡の開発も進められており、今後、相関観察に利用可能な標識の需要は増すと考えられる。そこで、本 CREST 研究終了後も、「電子顕微鏡で検出可能な標識法の開発」の次のステップとして、相関観察に利用可能な標識法の開発を是非進めて行きたいと考えている。

4. 2 電子顕微鏡計測システムの開発(大阪大学 電子線トモグラフィー観測グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

当初計画では、電子線トモグラフィーにおける最大の懸念材料である電子線損傷を最小にする低電子線照射機能(MDS)制御ソフトの開発において、これまでの当グループの電子線トモグラフィーの経験を生かし、実際の試料撮影から携わり、システム開発グループが開発した MDS 制御システムを用いてクライオ電子線トモグラフィー観測法の構築を行う予定であった。しかし、大阪大学大学院生命機能研究科にクライオ電子線トモグラフィー専用機が納入され、使用が可能となったので、試料作製技術や観察方法の改良・開発に重点を置き、生命現象の理解を目指した細胞内の生体分子の構造観察とその計測技術の評価を行ってきた。

<電子線トモグラフィー観測条件・解析方法の探索>

当グループが、電子線トモグラフィー撮影において以前より不安定パラメータとして懸念していたのは、フォーカスの値であった。これは、当グループ代表の岩崎が、大阪大学・超高圧電子顕微鏡センター在籍中に H-9500SD 型電子顕微鏡に TVIPS 社の自動トモグラフィー機能の導入を行って以来直面している“自動フォーカス機能を用いた際に生じる大きなフォーカス量のずれ”の問題である。特に生体試料のクライオ電子顕微鏡観察に必須である MDS を使用するとそのずれは著しく、近年金属材料の解析を中心に再燃してきた電子線トモグラフィー技術はそのままの形では我々の目指す生体試料の分子分解能トモグラフィー解析にはとても使えないことを示していた。この生物試料撮影時のフォーカスのずれがどの程度なのかを、シミュレーション画像を用いて最終三次元画像に及ぼす影響を Fourier Shell Correlation(FSC)を基準に評価した。その後、実際にネガティブ染色した GroEL を撮影した傾斜像シリーズ実データとあわせて評価を行った。システム開発グループによる H-9500SD の通信制御コマンドを利用した自動クライオトモグラフィー用ソフトの開発は、当課題が始まる前から準備を始め、当報告書執筆時点でも続いている。これまでに、MDS システム、スポットスキャンシステムが完成した。当グループでは、これら完成したシステムを使用し、単粒子解析等を行い、得られる分解能について検討した。

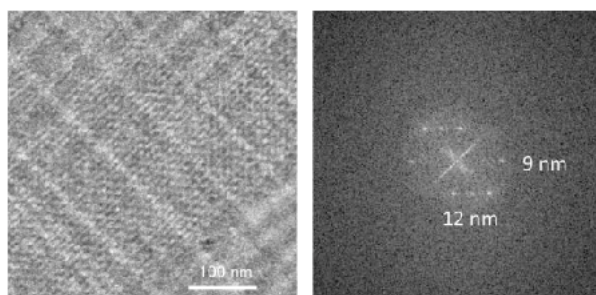
クライオ電子線トモグラフィーは、手動撮影であるが、傾斜シリーズ撮影後国内で初めて三次元再構成像解析に成功した。当初、システム開発グループが開発した制御ソフトが実行できるまで、あるいは、日本電子システムテクノロジーズの TEMography がクライオ電子線トモグラフィーの実行に耐えうるまで不可能かと思われたが、大阪大学大学院生命機能研究科難波研究室のヘリウムステージを備えたクライオ電子顕微鏡を使用し手動撮影したところ、トモグラフィーデータ取得は予想外に上手くいった。難航したのは、そのコントラストの低さ故の解析時のアライメント精度の低さを解決することであった。当初、TEMography ソフトウェアを用いての相関法による画像アラインメントを行っていたがなかなか上手く行かなかった。その後適切なマイクログリッドの選択、撮影方法の改良により、金コロイドを用いて、IMOD ソフトウェアのマーカー法で解析した方が、精度良い結果を得られることがわかった。本条件を得るまで平成 19 年度からクライオ電子線トモグラフィーを始め、

平成 21 年度前期までであった。

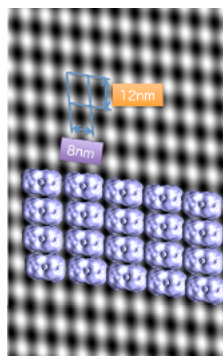
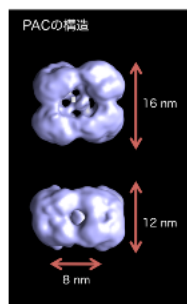
また、電子線トモグラフィー解析の分解能を左右する要因として傾斜角度に着目した。サイドエントリー型電子顕微鏡ゴニオメータ外部に傾斜角度測定装置を設置し、トモグラフィー画像撮影と同時に傾斜角度を実測してその測定角度を三次元再構成に使用する、という新たなデータ取得法を試みた。通常、最も一般的なトモグラフィー解析法であるマーカー法では、切片試料表面に添加した金粒子等 fiducial marker の混在したトモグラフィーシリーズ画像を撮影し、画像中の fiducial marker の座標を追跡することで画像の並進アラインメント、傾斜軸の位置、各画像の傾斜角度を同時に算出する。ただし、高分解能を目指す際に不可欠な高倍率での撮影時では観察したい領域に適切な分布状態で適切な個数のマーカーを導入できる保証はない。また CEMOVIS 試料においては切片の上に金粒子マーカーを導入する事は不可能となる。このような場合、fiducial marker を用いたマーカー法による解析は不可能となる為、傾斜角度は算出されず傾斜設定角度を使わざるを得ないのが現状である。そこで、どのような試料条件においても少なくとも傾斜角度だけは正確な値を得る事を目的に傾斜角度測定装置による 傾斜角度の実測を行い、その値を用いて三次元再構成を行ったところマーカー法で算出された値を用いた場合と同程度の質の高いトモグラムを得る事に成功した。現在論文投稿中である。このように解析のためのパラメータを“計算”するのではなく“実測”するという発想は生物分子トモグラフィーの為の新たな電子顕微鏡アーキテクチャの一要素として今後取り入れられて行くべきであると考えます。

<非晶質切片観察法(CEMOVIS)の導入と改良>

従来の樹脂包埋法では、試料の固定、有機溶媒による脱水、樹脂への置換という操作が含まれ、その過程により微細構造は破壊され、固定されなかった物質の流出が起こるという問題が生じていた。それらの問題を解決するために、ヒトの細胞等厚い試料に対して、水和した試料を観察する技術の開発が、当課題では必要であった。そこで、加圧凍結装置を用いてできるだけ細胞の表面から深くまで非晶質層に物理固定し、この氷をそのまま液体窒素雰囲気下で薄切し、クライオ電子顕微鏡で観察する CEMOVIS 法を導入、改良し、その手法を駆使することによって新たな生命現象の理解につなげようと考えた。まずは、大腸菌を用いて CEMOVIS を行い、論文に報告されているものと同等の品質のものを得ることに平成 19 年度に成功し、その後の晶質防止剤の導入や、適切なグリッドの選択等、小さな改良を重ねることで、平成 20 年度には非常に再現性よく観察ができるようになった。平成 19 年度には、得られた大腸菌の CEMOVIS の画像と、そのクライオ電子線トモグラフィー像の比較に計画通り成功し、論文として報告することができた(文献 18)。CEMOVIS 法の導入がうまくいったので、平成 21 年度から、実際に生命現象の理解につながる研究対象としてミドリムシの光センサー装置である、paraflagellar body (PFB)の観測を始めた。ミドリムシ全体、あるいはミドリムシから単離した PFB を CEMOVIS 法で観察した結果、PFB が周期構造をもった準結晶状態であることが示された。これらは、通常の氷包埋法を利用したクライオ電顕の観察では、大きすぎて観察できず、CEMOVIS 法を使うことで初めて観察が可能となったものである。また、本実験により CEMOVIS の精度検証という技術的検証も行うことが出来た。PFB の結晶構造を利用して、その像をフーリエ変換することで分解能を見積もった結果、少なくとも 9nm の分解能までは、試料構造を保持していることを初めて示すことが出来た。CEMOVIS では、ナイフマークやチャターといったよく知られた構造アーティファクトがあるが、少なくともこの分解能までは議論できることがわかったことは意義深い。これらのミドリムシに関する研究は、総研大(現 東邦大)の伊関博士、渡辺博士らとの共同研究である。生物学的な貢献としては、本実験を一步推し進め、準結晶構造のフーリエフィルタリング解析を行い、12nm と 8nm の明瞭な周期構造が存在することが判明した。PAC の単粒子解析の結果得られた三次元再構成像から、ある方向に対して、丁度 12nm と 8nm の大きさを持つことが分かり、先の周期構造の解析と合わせて、分子の配向まで考慮した PFB のモデル構造を提唱することができた。PAC の原子構造は、まだ明らかにされていないが、ホモロジーモデリングを行い、単粒子解析の結果に当てはめると非常に整合性のとれたフィッティング構造が得られた。結果、原子構造情報から、生体におけるオルガネラ構造まで構造情報がつながったことになり、ミドリムシの光センシング機構の解明に向けた大きな成果となったといえる。現在これらの結果をまとめて論文執筆中である。



結晶構造の CEMOVIS：左, PFB の CEMOVIS 像。格子縞が見える。PFB 丸ごとでは、大きすぎで通常の電顕観察では真っ黒である。右, 左図のフーリエ変換像（パワースペクトル）。周期性が示されている。



PFB（器官）における
PAC（分子）の配列
左：単粒子解析像
右：フーリエフィルタリング像に単粒子解析像を重ねたもの

< 氷包埋試料を使用したクライオ電子線トモグラフィーによる実データ取得 >

< 電子線トモグラフィー観測条件・解析方法の探索 > の項目で述べたように、クライオ電子線トモグラフィーを実行するのに十分な環境はなかったが、平成 19 年度後半には、手動による撮影によって、実データの取得を始め、まずは、大腸菌のトモグラムを得ることに成功した。そして、通常の培養細胞よりは小さい、ヒト血小板を用いて、その活性化状態における形態についてクライオ電子線トモグラフィーを行っていった。厚い試料に関しては、上記の CEMOVIS 法による試料の切削が必要となるが、大腸菌や血小板の糸状仮足のような非常に薄い部位では、丸ごと非晶質層に包埋する氷包埋法において観測可能である。大腸菌と血小板では共に、60枚近くの傾斜シリーズの撮影に成功したのだが、それでも、通常のタンパク質の氷包埋試料と比べると非常にアモルファスの氷層が厚いため、非弾性散乱の影響で一層コントラストが低くなってしまった。そのため、日本電子システムテクノロジーズ社製の TEMography ソフトウェアを使った相関法によるアライメントでは結果が悪かった。相関法によるアライメントの精度がこれほどまでよくないとは予想外だった。このため、金コロイド標識を適切に混入させ、かつ観察を行いたい場所に複数存在できるようにマイクログリッドを適切に選び、マーカーを使用した IMOD による解析を行い、さらにローカルアライメントを工夫することによって、非常に精度良い結果が得られるようになった。これについては、電子線トモグラフィー観測条件・解析方法の探索に前述している通りである。血小板は、活性化するとフィブリノーゲンを介して凝集するわけだが、このときにフィブリノーゲンの受容体となっているのが、インテグリンである。このインテグリンは、不活性化状態では、リガンドに対する親和性が非常に低い。このことを利用して活性化インテグリンに結合するペプチドを作製し、さらにそれを Qdot で標識することで、Qdot による分子認識がクライオ条件下で可能かどうかを確かめた。結果、血小板凝集の界面に Qdot による標識が観察された。ただ、分子一つ一つの形状を認識できるまでには至らなかった。しかし、当初から狙いを定めていた偽足とよばれる活性化血小板にみられる特有の糸状仮足部分のトモグラムを観察したところ、アクチン繊維一本一本が認識でき、さらにアクチンモノマーの配列と推測されるジグザグ構造を可視化することができた。重要な発見としては、これまで糸状仮足におけるアクチン繊維の構造は、粘菌で報告されているのみだったが、これとは異なる構造を発見することができたことである。膜を可溶可した糸状仮足の観察からは、わからなかった厚み方向のアクチン繊維のアレンジメントも解明することができた。

<光-電子相関顕微鏡法の導入と改良>

「新たに追加・修正など変更した研究構想」にて記載したように平成 20 年度終わり頃から、当初の計画には無かったシナプス間接着タンパク質ニューレキシシンとニューロリギンの細胞間接着構造の光-電子相関顕微鏡観察を計画し、実験を開始した。両タンパク質は、それぞれ、前シナプス、後シナプスに存在しシナプス間の接着を担う膜タンパク質であるが、それらがどのようにしてシナプス間の接着を行い、シナプスの機能を担っているかは不明であった。そこで、本研究では、通常法よりも微形態保持が良い加圧凍結-凍結置換法を組み入れた光-電子相関顕微鏡観察を行った。光-電子相関顕微鏡観察と加圧凍結-凍結置換法を組み合わせた研究は、世界的にも例が少なく、このようなタンパク質の構造観察に用いられた例はほとんどなかったもので、試行錯誤しながら独自の方法を構築した。ニューレキシシンとニューロリギンの細胞質側に異なる蛍光タンパク質を融合させそれぞれ異なる 293T 細胞に発現させ、蛍光顕微鏡観察すると、シナプスタンパク質による細胞間接着が観察された。その蛍光顕微鏡観察した細胞そのものを電子顕微鏡により観察することに成功し、蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察の相関をとることでそれらの接着分子の接着構造を蛍光を指標として間違いなく観察することが出来た。本研究により結晶構造解析から予測された集積構造を実際に細胞間においてみることができ、ニューレキシシンとニューロリギンの集積を伴った接着構造を始めて明らかにすることができた。また、アイソフォームの違いによる、接着構造の差異も議論することができた。これらの結果は、ニューレキシシン-ニューロリギン複合体の構造形成がシナプス形成、さらには神経ネットワークの形成に影響を与え得るということを意味しており、生物学的に重要な知見が得られたものである。現在、論文を投稿中である。また、この実験で得られたもう一つ重要なことは、蛍光顕微鏡によって同じ様に細胞間に共局在して観察されるものであっても、電子顕微鏡観察においては、それらタンパク質間の集積構造は全く異なっていたことである。すなわち、光学顕微鏡で観察されているのは、やはり「ぼけた光の広がり」であり、タンパク質の機能を考える上では、電子顕微鏡等を使って、それらの構造を調べるということが非常に重要であるということを示している。

<非晶質凍結切片(CEMOVIS 用試料)のクライオ電子線トモグラフィー>

<非晶質切片観察法(CEMOVIS)の導入と改良>の項目において述べたように、CEMOVIS でのクライオ電子顕微鏡観察が出来るようになったので、次に非晶質切片のクライオ電子線トモグラフィーを行った。クライオ電子線トモグラフィーには、京都大学藤吉研究室の傾斜機能付きヘリウムステージおよび8kx8k画素のCMOSカメラを備えた極低温電子顕微鏡を使用した。非晶質切片は、非常に薄い厚みを持っているため、トモグラフィーをしない限り、その電子顕微鏡像はその厚み分の投影像になる。それ故に、タンパク質間の相互作用を議論するには、傾斜シリーズを獲得して三次元構造にしなければならない。トモグラフィーに限ったことではないが、非晶質切片は非常に低コントラストであり、その目的の視野を探すのが非常に困難である。また、電子線損傷も受けやすいので MDS を使用して非常に低倍率で探索するしか手段がない。このような中、手動による撮影に成功し、三次元データを得る事ができた。ミドリムシの細胞表面の観察では、細胞の裏打ち構造を微小管の素繊維一つ一つ高精度で観察することに成功し、精製した微小管の構造とは異なるという知見を得ている。本研究は、*in vivo* での構造解析の重要性を示すものである。さらに、三次元構造にすることによって、CEMOVIS で懸念されているアーティファクトの一つ、クレバスの大きさを評価できたことは大変意義深い。本実験の経験により、厚い試料についても、クライオ電子線トモグラフィーを実行できるノウハウが蓄積した。現在論文報告に向けて執筆中である。

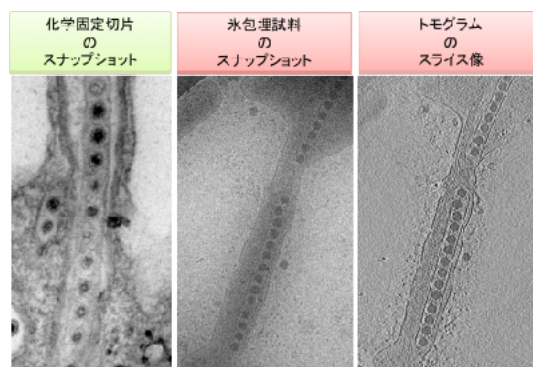
<PSD-95 の測定>

新たに追加・修正など変更した研究構想」にて記載したように、本課題の中で、PSD-95 は、分子ラベル開発グループによって早くから取り組まれてきたラベルのターゲット分子である。しかし、PSD-95 の全体構造は、未だ報告されておらず、これに対するメタロチオネインの配向も不明のままであった。そこで、PSD-95 全体の大きさを測定するために、ランダムコニカルティルト法、単粒子再構成法、Ni-NTA 修飾脂質を利用したリポソームへのヒスチジンタグ融合 PSD-95 の配位等を試みた。精製 PSD-95 の二次元平均画像解析を試みるなかで、PSD-95 が、非常に柔軟な構造をしてい

ることが判明したため、ランダムコニカルティルト法による多様なコンフォメーションの三次元構造解析に集中した。単粒子再構成法は、元来、大部分の蛋白質が、溶液中で同一のコンフォメーションを保有していることを前提に発達してきた方法のため、この適用を避けたのである。また、これらの解析は、ネガティブ染色した試料で行った。より天然に近い状態の構造を観測するために、精製 PSD-95 の氷包埋試料のクライオ電子顕微鏡観察し単粒子解析する事も計画したが、分子量が小さいため(分子量約 8 万)、解析に十分なシグナルをもった写真が得られない可能性が高い。そこで、PSD-95 の脂質修飾部位である N 末端領域にヒスチジンタグを導入し、Ni-NTA 修飾脂質を使って作製したリポソームに、ヒスチジンタグ融合 PSD-95 を配位させ、このときリポソーム周辺に見られる集積構造の大きさを測定することにした。

<クライオ電子線トモグラフィー観測技術の向上>

<氷包埋試料を使用したクライオ電子線トモグラフィーによる実データ取得>の項目で述べたように、我々は、研究当初から大腸菌や血小板の糸状仮足のような非常に薄い部位をターゲットにして手動によるクライオ電子線トモグラフィーの撮影を進めていたが、大阪大学大学院生命機能研究科に最新のクライオ電子線トモグラフィー専用機(FEI 社 TitanKRIOS)が導入されたことで、試料作製法や観察系の改善に集中することが可能になった。そこで、大腸菌や血小板よりもはるかに大きな通常の真核細胞をターゲットにして、氷包埋試料を使用したクライオ電子線トモグラフィー撮影を試みた。真核細胞においても接着細胞では、薄く広がった部位においては、CEMOVISによる切削をせずとも、氷包埋において観察できると想定したからである。観察対象としては、細胞から細胞へ伝搬していく数十ナノメートルの大きさをしたウイルスを選択することにした。レオウイルス科に属するイネ萎縮ウイルスは、吸着から、侵入、宿主細胞内移動から、複製、放出、隣接細胞への感染まで、わずか 12 個の遺伝子ながら様々な超分子複合体をつくり、子孫拡大の工夫を行っている。こうしたウイルスのライフサイクルの中に現れてくるナノ構造は、ウイルスのライフサイクル解明においても重要である一方、現状の電子線トモグラフィーの質を評価する上においても役に立つものである。我々は、RDV を感染させた昆虫細胞を凍結により物理固定し、クライオ電子線トモグラフィーで観察可能な構造の吟味と従来の化学固定法の比較を行った。特に、ウイルス由来のタンパク質が形成するナノチューブの中を通してウイルスが細胞から細胞へ移行していく様子に焦点を当ててクライオ電子線トモグラフィーで観察した。この結果、化学固定法では、脱重合して観察されなかったアクチンフィラメントや、形状すら識別できなかったウイルス粒子の正二十面体構造が明瞭に可視化できた。ウイルス粒子のサブトモグラムの平均化から得られた細胞内ウイルス構造は、Fourier Shell Correlation を使った分解能測定では、7nm を示した。実際の構造においても、キャプシドタンパク質一つ一つがきちんと識別できたので細胞内の構造をこのレベルの信頼性を持ってクライオ電子線トモグラフィーで解析できるということを示すことができた。細胞間移行しているウイルスを周りのナノチューブ、アクチンフィラメント、細胞膜を含めた状態でナノレベルの分解能で構造を観察することによって、初めてそれらの関係が分かり、ウイルス粒子が如何にしてナノチューブルに包埋され、隣接細胞へ伝搬されていくかという仕組みを調べる上での非常に重要な知見を得た。現在行っている他のウイルス蛋白質の研究と併せて近い将来詳細なその機構を報告できると期待する。



3 種類の方法の比較：RDV が隣接細胞へ Pns10 チューブルを使って感染していく様子を 3 種類の方法で比較した。クライオ電子線トモグラフィーのスライス像が最も明瞭に、アクチン繊維からウイルス粒子の配向まで見える。

(2) 研究成果の今後期待される効果

<光-電子相関顕微鏡法>

加圧凍結装置を使用した光-電子相関顕微鏡の例はこれまでにあまりなく、特にタンパク質の構造を見るのに使われた例はほとんどない。そのため、独自に本グループで立ち上げたことから、ノウハウの蓄積ができた。そのノウハウは、様々な細胞間接着タンパク質の構築する構造と機能を調べることに直ちに应用できるものである。それ以外にも、細胞内で局在するものに関しても応用できるものと考えている。本手法は、今後、後述の細胞のクライオ電子線トモグラフィーの進展にともなって、“それが何であるか”を識別する道具として相補的に役に立つと期待している。

<CEMOVIS の導入>

CEMOVIS に当グループが成功してから、それに関する講演の依頼が国内では多く、興味を持っている人が多いことが伺えた。また、本結果は、宮澤チームリーダー等が主催する学会のチュートリアルでも紹介し、本方法の具体的なプロセスを広く理解してもらうのに役だった。今後は、実データ取得だけでなく、CEMOVIS 法に関するアーティファクトの詳細な吟味や、適切な使用方法の提示を積極的に行っていくことで、広く一般に使われる技術となっていくものと期待される。

<クライオ電子線トモグラフィー>

バクテリアでは、あまり化学固定切片とは、大きく異なる印象を与えなかった本方法であるが、培養細胞では、非常に特徴的な像が得られた。化学固定による変性や、脱水による非架橋分子の漏出がないため、全てが写っているためだと推測する。ウイルスの研究では、細胞間移行しているウイルスをその周辺のナノチューブ、アクチンフィラメント、細胞膜を含めた状態でナノレベルの分解能で構造を観察することによって、初めてそれらの関係(相互作用)が分かり、どのように隣接細胞へ伝搬されていくかという仕組みが理解できた。さらに、解像度が上がり、分子標識法の発達に伴えば、ウイルスよりも小さなタンパク質同士の相互作用を細胞内でそのまま観察できるようになり、今後、新しい解剖学ともいえる分野が切り開けると想像する。

4. 3 生物分子トモグラフィーシステムの開発(九州工業大学 システム開発グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

電子線トモグラフィーは、非生物系分野である物質・材料関係での研究が中心であったことから、生物試料への応用には生物試料に適した改良が不可欠であると考え、研究を進めてきた。現在、この分野ではFEI社製の電子顕微鏡(Tecnai/Titan)とその解析ソフトウェアが、世界のスタンダードと言える。本グループでは、1分子標識を用いた、生物試料用電子線トモグラフィーの開発を、研究提案の原点である生命機能を担う細胞内分子複合体の構造と機能の解析のために、独自に行いたいと考えた。そこで、画像処理システムEosの能力を拡張し、特に、クライオ電子顕微鏡技術を対象として、電子顕微鏡本体の制御プログラム及び解析ソフトウェアを総合的に生物試料の解析のために専用開発した電子線トモグラフィーシステムを構築することを目指した。

更に、グループ内での技術開発に伴って、電子線トモグラフィー法、クライオ電子線トモグラフィー法を導入し構造解析を進め、かつ、開発された金属結合タンパク質の可視化技術を開発すると共に、実際に分子標識を鞭毛に導入し、サブユニット構造の解明を目指した。本研究は、再構成系でなく、鞭毛打がうてる、鞭毛もしくは、脱膜した軸糸内でのサブユニット・アーキテクチャを、サブユニットを同定しながら、観察し、鞭毛の制御メカニズムの解明に迫ろうとするものである。

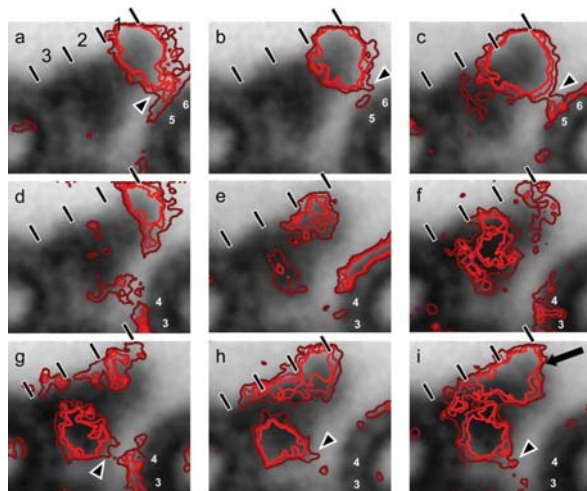
4. 3. 1 生物試料のための解析ソフトウェアの開発

1) 標識タンパク質を用いた新規画像処理、及び、トモグラフィー・アルゴリズムの探索

a. 標識タンパク質の可視化

電子顕微鏡画像中、タンパク質が本来持つ密度よりも統計学的に有意な領域を抽出するプログラムを開発した。また、同様の技術の中で、二つもしくはそれ以上の画像の中で、統計的に有意に

差のある領域を取り出すプログラムを開発した。この手法を用い、鞭毛内の重鎖の配置を決定し、報告した(Takazaki *et al.* Cytoskeleton, **67**:7 466-476, (2010))。



鞭毛内の三つのダイニン重鎖の配置をミュータントと野生型のクラミドモナス鞭毛を用いて解析を行った。上段: α サブユニット、中段: β サブユニット、下段: γ サブユニットが欠落したミュータントとの統計学的に有意な領域を赤線で囲んでいる。また、その密度の欠落の状況から、3つの重鎖のアーキテクチャに関して、クライオ電子顕微鏡の写真と併せて、新しいモデルを提唱した。

Takazaki *et al.* Cytoskeleton, **67**:7 466-476, (2010)より

同様の手法を用いて、ダイニン・微小管のクライオ電子顕微鏡像の構造解析を実施し、ダイニンの滑り運動の分子メカニズムの新しいモデルを提唱した研究に繋がった(Ueno, Yasunaga *et al.*, ProNAS, 2008)。さらに、このシステムを用いて、いくつかのタンパク質の構造解析を進め、MrpB, chaperonin II, tropoelastin に関して原著論文として公表した。電子顕微鏡写真に、画像処理法を加えることで、更に、生物機能発現に係わる情報を抽出できることで興味深い。

b. 3次元再構成法

種々のプログラムを組み合わせた3次元再構成のための他統合環境の制作に着手した。その中で、本研究の成果の発現として、筋肉の細いフィラメントの構造解析(Murakami *et al.*, 2008, ProNAS)、アクチン繊維の高分解能構造解析(Murakami, Yasunaga *et al.*, 2008, Cell)へと共同研究を通して繋がった。

更に、「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3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3次元的に確認した。振り返って、2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。

更に、この構造のなかで興味深かったのは、メタロチオネインの密度が GroEL の内部からはみ出すように見えていることである。GroEL の作り出すタンパク質のケージ空間は、特に、側面に大きな隙間があることが結晶構造から示されていた。単に外部溶液の溶媒環境と関連するだけでなく、構造を作らないタンパク質や小さいサブユニットが外部に出ることも示唆している。

また、3次元再構成法として、現在、SIRT 法を用いた3次元再構成のシステムまで開発が進めた。また、更に、画像処理アルゴリズムを改善し、トモグラフィー再構成のための画像処理システム一式を作成し、厚みのある試料に対する3次元再構成の際に問題となる、位置あわせのアルゴリズムの改善を進めた。さらに、FOM法などにより画像とモデル画像の正当性を評価するアルゴリズムをシステム内に導入した。

この FOM 法や変形フーリエシェネルコリレーション法はアクチン・フィラメントの高分解能構造解析(Murakami, Yasunaga, et al., Cell, 2010)にも用いられた。揺らぎをもつタンパク質複合体では、解析された密度マップが必ずしも同一の密度を持たないが、密度の統計的有意差の検討により、固定された領域と揺らぎのある領域の区別が可能となった。このことは、生物の機能発現に係わる揺らぎを見出すことができる可能性を示唆した。

アクチン/ミオシン複合体(myosin-II/myosin-XI)にも適用し、サブナノメートルレベルの分解能を得ている。化学力学反応共役の分子メカニズム解明にもつながるであろう。

c. 超解像:ブランド・デコンボリューション

ミッシングエリアをもつ三次元像を再構成するための超解像法を用いた方式も試行し、有効であることが分かった。ソルベント・フラットニング等を導入することで画像の改善を得た。また、画像形成の本来のメカニズムに戻り、Ewald 球を考慮した再構成法、CTF,MTF の補正、凍結試料や凍結切片がある一定の厚み敷かないことからくる空間制限による超解像法などを指向し、さらに、前期の繰り返し法と組み合わせ、それらを統合化した、新しい3次元再構成アルゴリズムの構築を進めている。この方法は、2011 年のバイオインフォマティクス学会において、ポスター賞(Azuma & Yasunaga)を得るなど高い評価を得ている。

2) 画像処理プラットフォームの開発

各種の画像処理方法に関して、当初、想定された以上に、計算機システムのアーキテクチャの進展があった。特に、GPGPU と呼ばれるグラフィックスボードを使った画像処理の進展が著しく、PC レベルで1TFLOPS の計算能力を持たせることが可能である。そこで、本研究でも、高速性が必要とされる部分に関して、この GPGPU 等の利用できるシステムの構築を進めた。その結果、画像処理全体を高速化するために、CELL や GPGPUによる高速化を試み、フーリエ変換を始めとするアルゴリズムでの100倍を超える高速化を示してきた。現在、こうした高速化の方法に関しても検討を進めている。

また、画像処理部分に関して、会社との共同開発を進める中で、本クレスト研究を超えて、画像処理共通プラットフォームの必要を痛感するに至った。一方で、本 CREST 研究では、トモグラフィーアルゴリズム等の開発を進めることに主眼があり、共通プラットフォームを作成する為の人的資源が不足している。

そこで、2009 年10月より、JST/最先端機器・ソフトウェア・調査研究に応募し、採択された。更に、2011 年10月より、共通プラットフォーム化の開発に取り組む、本クレスト研究でのアルゴリズム開発及びシステム開発の経験を元に、より広範な電子顕微鏡に対し、使用できる画像処理システムを提供するものであり、更に、本クレスト研究の成果を広く適用できるものである。

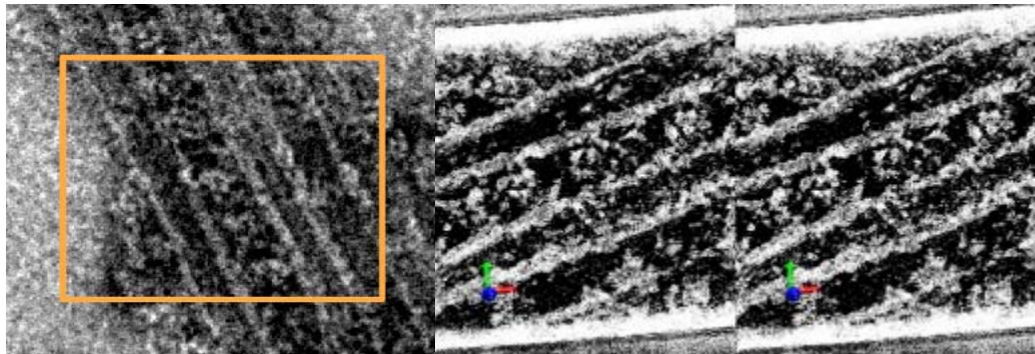
それに関して、顕微鏡学会での発表を通して、本システム開発に関して、興味をもった業者との共同開発を始めている。本クレスト研究の成果のひとつであり、企業への展開が期待できる。

4. 3. 2. 電子線トモグラフィーシステムの構築

a. 汎用トモグラフィーシステム:プロトタイプ構築

我々の開発してきた Eos を用いて、トモグラフィーシステムのプロトタイプを作成した。その結果、トモグラフィーによる三次元像を得ることができた。現在も改良を続けている。例えば、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った。

下図は、本システムにより得られた微小管とダイニンのトモグラムを示している。左図が無傾斜画像であり、右二つがその三次元再構成像である。本成果は、2009年度顕微鏡学会において、発表された。



ダイニン／微小管複合体の三次元画像：左図の0度画像の視野の右図は三次元再構成を行ったもの。画像の性質(特に、コントラストの高い画像が中心に無い場合)によっては、位置合わせの精度(軸ズレ)を生じる場合があり、上述のように、位置合わせ精度の向上のため、分割画像による位置合わせを試行しており、改善がはかられた。

b. MDS(最小電子線撮影法)の問題点の洗い出しと開発

「観測グループ」の使用できる日立H9500を、外部よりTCP/IPを用いて制御することで、電子線損傷を押さえるためのソフトウェア(MDS:Minimum Dose System)を作成した。その結果、損傷が軽減し、トモグラフィー観測グループの写真の質は上昇した。このことは、傾斜シリーズ撮影、三次元再構成における解析の信頼度の上昇を意味する。

また、JEOL社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。特に、MDSとの組合せによる電子線の不安定さが問題となっていたが、照射系レンズの変更を最小限にするなどの方法により、撮影が可能となった。前出の図はその方法により撮影した4万倍での撮影画像である。

c. イメージシフトによる画像撮影システムの問題点の洗い出しと開発

トモグラフィーのための試料傾斜、撮影位置の移動の制御の可能性を吟味した。結果として、日立社製H9500の機械的な精度は、100nm程度であり、その後の画像解析で補える量であることがわかった。ただし、移動速度が遅く、高速の撮影は困難である。

また、日本電子社製JEM2100に関しても、評価を行い、機械的な精度として、100–500nm程度であると分かった。この量は、ピエゾを使った制御、イメージシフトコイルによる画像位置制御と絡めることで、画像解析の範囲で、実現可能範囲である。ただし、ヒステリシスが大きいので、いずれかの段階で試料ステージについても吟味することが必要である。

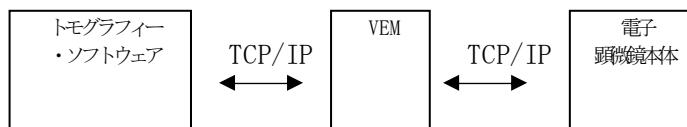
いずれの電子顕微鏡においても、試料ステージの移動を使って、イメージシフトコイルによる画像の移動を最小限に抑える事ができることがわかる。現在の、通常システムは、イメージシフトコイル及び、PLアラインメントなどの電子的制御によるため、その像の逃げ補正に限界が生じている。ただし、汚染防止装置等の改良、ステージ移動装置の吟味が必要であろう。

d. 連続傾斜シリーズ撮影法の問題点の洗い出しと開発

JEOL社の電子顕微鏡に付随した連続傾斜像撮影装置(Recorder@TEMography)を利用して、連続傾斜像の撮影を行った。日本電子社製JEM2100に対して、傾斜シリーズ撮影条件の検討を行い、8千倍程度の低倍での視野探索と4万倍程度の高倍でのフォーカス、撮影が可能な条件を見いだした。特に、視野中にコントラストの高い物体があった場合に、その物体を軸として傾斜シリーズを撮影してしまうことが問題となった。

現在、連続傾斜像撮影のためのシステムの構築を進めており、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。

傾斜シリーズ撮影モジュールの概要設計を終了し、実装を開始した。仮想的な電子顕微鏡システム(VEM)を作成することで、異なる電子顕微鏡機器の違いを吸収し、共通のクライオトモグラフィー・ソフトウェアとして実行できるシステムとして設計し、実装した。各ソフトウェア間は、TCP/IPのソケットにより通信を行うことで、計算機そのものもネットワーク上から使用できるものとした。(下図参照)。



電子顕微鏡制御ソフトウェアの概要設計。各種電子顕微鏡で利用できるように、VEMとして仮想化した電子顕微鏡を設置し、各々がTCP/IPで接続されている。

ここに至り、当初予定していなかった事として、九州工業大学に、特別経費により、FEI社のトモグラフィー電子顕微鏡が導入された。また、九州大学・医学部に共同利用施設として、同様の電子顕微鏡が導入された。これらは、実際にクライオ・トモグラフィーで成果を挙げている機種である。電子顕微鏡と比較しながら開発を進めることは有効であった。

一方で、比較のなかで、明らかに、クライオ電子線トモグラフィー法には向かないハードウェア上の制限を、上述の国産の電子顕微鏡が持つことが明確になった。そこで、分子ラベル開発グループと電子線トモグラフィー観測グループの二つのグループの成功を受け、優先順位を、分子ラベ

ルの可視化とそれを用いた生物学観点からの研究に軸足を移すこととした。

e. 三次元構造を観察する環境の開発

molvie と我々が呼ぶ、2次元電子顕微鏡画像、3次元再構成像と原子モデルを同時表示し、互いの構造を比較するためのツールを作成した。特に、2次元画像と三次元画像を比較するツールは他に例が無く、2次元画像の認識、及び、三次元画像の妥当性を認識する上で重要な更に、Wii リモコンなどを用いた、新しい入力デバイスの検証を行った。今後、立体視等のシステムの検証を行い、安価でかつ有益な三次元可視化ツールの提供を行う予定である。

これらの開発したプログラムのほとんどは、SourceForge 上にオープンソースとして公開した。一部、ソースコードの整理が終わっていない部分が公開されていないが、今後、オープンソースとして公開し、開発を進めていく予定である。

4. 3. 3 金属標識を用いた鞭毛構造のサブユニット・アーキテクチャの解明

真核生物の鞭毛は数百種類に及ぶタンパク質の巨大なタンパク質複合体である。この中ではダイニンですら一つのサブユニットに過ぎない。しかし、このサブユニットの一つ一つが鞭毛の正常な機能発現にとって重要である。しかし、一つ一つのサブユニットの機能発現を理解する上で重要なサブユニットの鞭毛内アーキテクチャは未だ明らかでない。精製して再構成することが鞭毛規模の複合体では困難であることから、鞭毛のまま、*in vivo/in situ* 観察ができることが必須である。今回は、特に、LC2/LC4 に関して研究を進めた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

これまでの研究から、分子ラベルを遺伝的に導入し、クライオ電子線トモグラフィー法により観察可能であることが明らかとなった。今回、鞭毛内のサブユニット LC2/LC4 の配置に係わるアーキテクチャを決定でき始めている。LC2 では鞭毛内への外腕ダイニンの配列制御に係わること、LC4 ではカルシウム制御に係わるアーキテクチャが明らかになってきている。ここで、再構成ではなく、鞭毛内での配置が分かっていることは注目に値するであろう。

例えば、筋肉などでも精製・再構成した細いフィラメントと筋肉そのものではカルシウム制御に係わるヒル係数が異なるなどが指摘されている。前者の構造は、我々の開発してきたシステムを使った研究(Murakami et al. ProNAS, 2008)などで、ようやくナノメートルレベルで明らかになってきた。しかし、後者は未だ報告がない。再構成系(*in vitro*)で明らかにすることはもちろん議論の上でも重要である。一方で、実際の *in vivo/in situ* での観察を通してでしか、生物機能を理解できない場合もある。iPS 細胞や筋肉幹細胞などを用い、トロポニンやその他のサブユニットに標識をし、クライオ電子線トモグラフィー法などを筋肉に適用することで、前者と後者の違いを明らかにできる可能性もある。

実際、鞭毛に関しても、外腕ダイニンの機能に係わる分子メカニズムを再構成系において提案してきた(Uyeno, Yasunaga et al. ProNAS, 2008)が、これを活動中の鞭毛内で、それぞれのサブユニットやサブユニット内の特定の場所に標識し、クライオトモグラフィーで観察することにより、鞭毛内での構造変化を捉えることができるであろう。

今回の鞭毛の例もそれにあたる。外腕ダイニンのリング・アーキテクチャに関しても、再構成系を通して、提案されている二つのモデルのうちの一つに対応するである可能性を示唆している。 γ リングに結合していることが示唆されている LC4 の配置が分かれば、鞭毛内の γ リングのステムの位置が同定でき、モデルの同定が可能となる。

以上のように、多数のサブユニットからなる細胞内小器官、巨大複合体などを細胞内 (*in vivo/in situ*) で観察することができれば、しかも、それは化学固定→プラスチック包埋による方法では、巨大構造体のみがよく見えるように、抽出されてきたものとは違う、ある種の分子クラウドという生物本来の条件で観察が可能になる可能性を示唆している。まさに、生物本来がもつ機能発現の現場を覗き見るのが可能になると考える。

また、今回、FEI 社の電子顕微鏡を利用したクライオ電子線トモグラフィー法の実施に成功した。また、同社の電子顕微鏡に比べて、国産の電子顕微鏡のもつ要素技術の良さも明らかに存在して

いる(電子線分光装置の能力等)。一方で、国産の電子顕微鏡法の問題点も明らかになったことから、ハードウェアの改良、ソフトウェアの改良も含めて、国産電子顕微鏡の要素技術の良さを活かせる電子顕微鏡の開発に繋がることが期待できる。

トモグラフィーのための制御ソフトウェアに関しては、現在、作成中のものが更に開発を進めていくことで一つの解が与えられる。さらに、国産メーカ等が作成しているソフトウェアには画像処理等の能力の問題がある。本研究は、実用化(画像処理プラットフォームの開発・JST)へとつながった。従って、企業等との共同開発等により新たな展開が期待できる。さらに、今回の実用化展開は画像処理プラットフォームの開発である。したがって、他のソフトウェアの開発元になるようなプラットフォームの開発が行われ、GUIを含むユーザビリティの問題、高速化・並列化、解の精密化など考慮すべき課題を解決する。したがって、更に、画像処理に関する技術の発展も期待できるものと考え

4. 4 細胞、生体分子の構造、運動を計測するための光検出磁気顕微鏡の開発(京都大学 光検出磁気顕微鏡開発グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

白川グループは、生細胞において細胞膜、オルガネラ、タンパク質の運動性、構造等をナノメートルレベルで計測しうる光検出磁気顕微鏡(ODMR)の開発を目指した。この装置で得られると期待される細胞、細胞内分子の関する一粒子計測としての情報は in-cell NMR によって得られる細胞内タンパク質のアンサンブル計測と合わせて、細胞の生きた状態を定義付ける、構成分子の動的挙動の解明に繋がる。そのため本研究では ODMR 装置と計測・解析手法の開発に加えて、in-cell NMR による細胞内蛋白質の観察と *in vitro* における蛋白質の構造・物性変化についても研究を進めた。本研究の中心となる ODMR に関しては 4 項目において大きな進展が得られた。

(2) 研究成果の今後期待される効果

現在、ガン化した扁平上皮細胞由来の培養細胞が細胞移動の際に生ずる膜ラフリングや、細胞分化に伴う細胞骨格の秩序化という課題に焦点を当て、振動数解析および膜ダイナミクスの異方性計測に基づく細胞骨格計測の方法論を確立するために基礎実験を進めている。また、個体を用いた計測においては線虫腸内のナノダイヤモンド粒子について回転運動における回転異方性の存在を示唆する結果を高い頻度で得ており、生体内のナノメートルレベルの運動というこれまで計測にかかることのなかった現象が遺伝型や表現型とどのように結びつくのかにも注目しつつ、運動の性質・性格について現在確認を進めているところである。

§ 5 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内(和文)誌 4件、国際(欧文)誌 36件)

1. Yuri Nishino, Takuo Yasunaga and Atsuo Miyazawa, A genetically encoded metallothionein tag enabling efficient protein detection by electron microscopy, *Journal of Electron Microscopy*, 56(3), 93-101, 2007
2. Yuko Fukunaga, Ai Hirase, Heyji Kim, Natsuko Wada, Yuri Nishino and Atsuo Miyazawa, Electron microscopic analysis of a fusion protein of postsynaptic desity-95 and metallothionein in cultured hippocampal neurons, *Journal of Electron Microscopy*, 56(4), 119-129, 2007
3. 安永卓生, 「電子顕微鏡画像解析ソフトウェア統合環境 Eos の試み」, *顕微鏡*, 42(3), 214-216, 2007
4. Ueno H., Yasunaga, T., Shingyoji, C., and Hirose, K.: Dynein pulls microtubules without rotating its stalk, *ProNAS*, 105, 19702-19707, 2008
5. Liu Z., Takazaki H., Nakazawa Y., Sakato M., Yagi T., Yasunaga T., King S.M., and Kamiya R.: Partially functional outer arm dynein in a novel *Chlamydomonas* mutant expressing a truncated γ heavy chain, *Eukaryotic Cell*, 7, 1136-1145, 2008
6. Murakami K., Stewart M., Nozawa K., Tomii K., Kudou N., Igarashi N., Shirakihara Y., Wakatsuki S., Yasunaga T., and Wakabayashi T.: Structural basis for tropomyosin overlap in thin (actin) filaments and the generation of a molecular swivel by troponin-T., *ProNAS*, 105(20), 7200-7205, 2008
7. Yasunaga, T. and Wakabayashi, T.: Evaluation of a 2k CCD camera with an epitaxially-grown CsI scintillator for recording energy-filtered electron cryo-micrographs., *Journal of Electron Microscopy*, 57(3), 101-112, 2008
8. Iwasaki K., Miyazaki N., Hammar L., Zhu Y., Omura T., Wu B., Sjöborg F., Yonekura K., Murata K., Namba K., Caspar D.L., Fujiyoshi Y. and Cheng R.H. : Pleomorphic Configuration of the Trimeric Capsid Proteins of Rice dwarf virus that Allows Formation of Both the Outer Capsid and Tubular Crystals. *J. Mol. Biol.*, 383, 252-265, 2008
9. Aoyama K., Takagi T., Hirase A., and Miyazawa A. : STEM tomography for thick biological specimens, *Ultramicroscopy*, 109, 70-80, 2008
10. 宮澤淳夫, 「電子顕微鏡法のための細胞内分子標識法の開発」, *顕微鏡*, 43(1), 72-75, 2008
11. Kazuhiro Shigemoto, Sachiko Kubo, Chen Jie, Naohito Hato, Yasuhito Abe, Narifumi Ueda, Haoto Kobayashi, Kenji Kameda, Katsumi Mominoki, Atsuo Miyazawa, Akihito Ishigami, Seiji Matsuda and Naoki Maruyama, Myasthenia gravis experimentally induced with muscle-specific kinase, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1132, 93-98, 2008
12. Tanaka, H., Kato, K., Yamashita, E., Sumizawa, T., Zhou, Y., Yao, M., Iwasaki, K., Yoshimura, M. and Tsukihara, T. : The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science* 323, 384-388, 2009. DOI: 10.1126/science. 1164975
13. Wada, K., Sumi, N., Nagai, R., Iwasaki, K., Sato, T., Suzuki, K., Hasegawa, Y., Kitaoka, S., Minami, Y., Outten, W., F., Takahashi, Y. and Fukuyama, K. (2009). Molecular dynamism of Fe-S cluster biosynthesis implicated by the structure of SufC₂-SufD₂ complex. *J. Mol. Biol.*, 387, 245-258. DOI: 10.1016/j.jmb. 2009.01.054
14. Frederico F. Miranda, Kenji Iwasaki, Satoko, Akashi, Koji Sumitomo, Mime Kobayashi, Ichiro Yamashita, Jeremy R. H. Tamae, and Jonathan G. Heddle. : A self-assembled protein nanotubule with high aspect ratio. *Small*, 5, 2077-2084, 2009. DOI:10.1002/sml.200900667
15. Wei, T., Ichiki-Uehara, T., Miyazaki, N., Hibino, H., Iwasaki, K. and Omura, T. : Association of Rice gall dwarf virus with microtubules is necessary for viral release from cultured insect vector cells. *J. Virol.*, 83, 10830-10835, 2009. DOI: 10.1128/JVI.01067-09
16. 平瀬愛, 宮澤淳夫, 「STEMトモグラフィーにおける電子線損傷の定量」, 特集「STEMと電子線トモグラフィーの出会い」, *顕微鏡*, 44(4), 248-251, 2009

17. 片山寿美枝, 宮崎直幸, 大村敏博, 岩崎憲治, 「イネ萎縮ウイルスのライフサイクルにおける超分子複合体の解析」, 顕微鏡, 44(2), 82-86, 2009
18. Kishimoto-Okada, A., Murakami, S., Ito, Y., Horii, N., Furukawa, H., Takagi, J. and Iwasaki, K., “Comparison of the envelope architecture of E. coli using two methods: CEMOVIS and cryo-electron tomography”, J.E.M., 59 (5), 419-426, 2010. (DOI: 10.1093)
19. Iwasaki, K. and Omura, T., “Electron tomography of the supramolecular structure of virus-infected cells”, Curr.Opin.Struct.Biol., 50 (5), 632-639, 2010 (DOI: 10.1016)
20. Yamamoto, Y., Mochida, S., Miyazaki, N., Kawai, K., Fujikura, K., Kurooka, T., Iwasaki, K., and Sakisaka, T., “Tomosyn Inhibits Synaptotagmin-1-mediated Step of Ca²⁺-dependent Neurotransmitter Release through Its N-terminal WD40 Repeats”, J. B. C., 285 (52), 40943-40955, 2010 (DOI: 10.1074/jbc.M110.156893)
21. Miyazaki, N, Iseki, M., Watanabe, M., Hasegawa, K., Kobayashi, K., Fujiyoshi, Y. and Iwasaki, K. The IFSM international microscopy congress IMC17, Rio de Janeiro, Brazil, September 19-24, 2010, Edited by Guillermo Solórzano and Wanderley de Souza, DVD, L16.26.
22. Matsunaga, Y., Iwasaki, K. and Takagi, J. The IFSM international microscopy congress IMC17, Rio de Janeiro, Brazil, September 19-24, 2010, Edited by Guillermo Solórzano and Wanderley de Souza, DVD, L4.4. (proceeding)
23. Takazaki, H., Liu, Z., Jin, M., Kamiya, R., Yasunaga, T., “Three Outer Arm Dynein Heavy Chains of Chlamydomonas reinhardtii Operate in a Coordinated Fashion Both In Vitro and In Vivo”, Cytoskeleton, 67 (7), 466-476, 2010 (DOI: 10.1002/cm.20459)
24. Murakami, K., Yasunaga, T., Noguchi, T., Gomibuchi, Y., Ngo. K.X., Uyeda, T., Wakabayashi, T., “Structural Basis for Actin Assembly, Activation of ATP Hydrolysis, and Delayed Phosphate Release”, Cell, 143 (2), 75-287, 2010 (DOI: 10.1016/j.cell.2010.09.034)
25. Wei, T., Miyazaki, N., Uehara-Ichiki, T., Hibino, H., Shimizu, T., Netsu, O., Kikuchi, A., Sasaya, T., Iwasaki, K. and Omura, T., Three-dimensional analysis of the association of viral particles with mito- chondria during the replication of Rice gall dwarf virus. J. M. B., 410 (3), 436-446, 2011 (DOI:10.1016/j.jmb.2011.05.017)
26. Akita, F., Miyazaki, N., Hibino, H., Shimizu, T., Higashiura, A., Urhara-ichiki, T., Sasaya, T., Tsukihara, T., Nakagawa, A., Iwasaki, K. and Omura, T., Viroplasm matrix protein Pns9 from rice gall dwarf virus forms an octameric cylindrical structure. J. Gen. Virol., 92 (9), 2214-2221, 2011 (DOI: 10.1099/vir.0.032524-0)
27. Abe T., Oka, T., Nakagome, A., Tukada, Y., Yasunaga T., Yhoda, M.: StHsp14.0, a small heat shock protein of Sulfolobus tokodaii strain 7, protects denatured proteins from aggregation in the partially dissociated conformation, J. Biochme. 150 (4): 403-409. 2011 (DOI: 10.1093/jb/mvr074)
28. Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N and Shigemoto K., Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis, American J. Pathology, 180(2): 798-810, 2011 (DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.10.031)
29. Ashikawa Y, Ihara M, Matsuura N, Fukunaga Y, Kusakabe Y and Yamashita A., GFP-based evaluation system of recombinant expression through the secretory pathway in insect cells and its application to the extracellular domains of class C GPCRs, Protein Science, 20: 1720-1734, 2011 (DOI: 10.1002/pro.707)
30. Umetsu Y, Tenno T, Goda N, Shirakawa M, Ikegami T, Hiroaki H, Structural difference of vasoactive intestinal peptide in two distinct membrane-mimicking environments, Biochim. Biophys. Acta., 1814(5): 724-30, 2011(DOI: 10.1016/j.bbapap)
31. Fujiwara Y, Fujiwara K, Goda N, Iwaya N, Tenno T, Shirakawa M, Hiroaki H, “Structure and function of the N-terminal nucleolin binding domain of nuclear valosin-containing protein-like 2 (NVL2) harboring a nucleolar localization signal.” J. Biol. Chem., 286(24): 21732-41, 2011 (DOI:

- 10.1074/jbc.M110.174680)
32. Isogai S, Morimoto D, Arita K, Unzai S, Tenno T, Hasegawa J, Sou YS, Komatsu M, Tanaka K, Shirakawa M, Tochio H, “Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62 and its interaction with ubiquitin.” *J. Biol. Chem.*, 286(36): 31864–74, 2011 (DOI: 10.1074/jbc.M111.259630)
 33. Ohno A, Inomata K, Tochio H, Shirakawa M, “Application of NMR spectroscopy in medicinal chemistry and drug discovery.” *Curr Top Med Chem.*, 11(1): 68–73, 2011
 34. Iwasaki, K., Electron microscopic imaging of integrin. *Methods. Mol. Biol.*, 757, 111–128, 2012
 35. Sekiyama N, Jee J, Isogai S, Akagi KI, Huang TH, Ariyoshi M, Tochio H, Shirakawa M, “NMR analysis of Lys63-linked polyubiquitin recognition by the tandem ubiquitin-interacting motifs of Rap80.” *Journal of biomolecular NMR*, 2012 (DOI: 10.1007/s10858-012-9614-9)
 36. Iwaya N, Akiyama K, Goda N, Tenno T, Fujiwara Y, Hamada D, Ikura T, Shirakawa M, Hiroaki H, “Effect of Ca(2+) on the microtubule-severing enzyme p60-katanin. Insight into the substrate-dependent activation mechanism.” *The FEBS journal*, 279(7): 1339–1352, 2012 (DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08528.x)
 37. Yamada H, Mizusawa K, Igarashi R, Tochio H, Shirakawa M, Tabata Y, Kimura Y, Kondo T, Aoyama Y, Sando S, “Substrate/Product-targeted NMR monitoring of pyrimidine catabolism and its inhibition by a clinical drug.” *ACS Chem. Biol.*, 7(3): 535–42, 2012 (DOI: 10.1021/cb2003972)
 38. Takeshi Noda, Yukihiro Sugita, Kazuhiro Aoyama, Ai Hirase, Eiryo Kawakami, Atsuo Miyazawa, Hiroshi Sagara and Yoshihiro Kawaoka, Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus, *Nat. Commun.*, 3: 639, 2012 (DOI: 10.1038/ncomms1647)
 39. Yuko Fukunaga, Ai Higashihara, Yuri Nishino, Takuo Yasunaga, Mingyue Jin and Atsuo Miyazawa, Enhanced detection efficiency of genetically encoded tag allows the visualization of monomeric proteins by electron microscopy, *Journal of Electron Microscopy*, 2012, in press
 40. Ali D. Malay, Jonathan G. Heddle, Satoshi Tomita, Kenji Iwasaki, Naoyuki Miyazaki, Koji Sumitomo, Hisao Yanagi, Ichiro Yamashita, and Yukiharu Uraoka, Gold Nanoparticle-Induced Formation of Artificial Protein Capsids. *Nano Lett*, 2012, in press.

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

1. 岩崎憲治、「電子線トモグラフィー」、ことば、生化学、80 巻、12 号、1141、2008
2. 安永卓生、「ナノイメージング」、(株)NTS 第一編ナノイメージングを可能にする顕微鏡法、第3章電子顕微鏡を用いたナノイメージング、p.44–59、2008
3. 岩崎憲治、「生物学における話題と電子顕微鏡」、日本結晶学会誌、51 巻、1 号、70–71、2009
4. 宮崎直幸、岩崎憲治、大村敏博、「クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いたウイルス構造解析」、*VIRUS REPORT*、医薬ジャーナル、6 巻、52–61、2009
5. 安永卓生、光岡薫、岩崎憲治、「タンパク質をみる-構造と挙動-(長谷俊治・高尾敏文・高木淳一編 第6章2節電子顕微鏡イメージング担当)」、化学同人、2009
6. 伊藤喜子、宮澤淳夫、「クライオ電子顕微鏡法」、実験医学、28 巻、1 号、39–44、2010
7. 福永優子、宮澤淳夫、「シナプスの形態」、*Clinical Neuroscience*、28 巻、8 号、852–854、2010
8. 西野有里、宮澤淳夫、「電顕観察に向けた遺伝的標識法の開発」、細胞、43 巻、10 号、404–407、2011
9. 森博太郎、岩崎憲治、木本浩司、山崎裕一郎、長我部信行、佐藤貢。「新たな産業分野、学問領域をひらく電子顕微鏡技術」、日立評論、94 巻、2 号、13–16、2012

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 34 件、国際会議 14 件)
(国内会議)

1. 安永卓生(九州工業大学)、後藤龍珀(九州工業大学)、永井里奈(大阪大学)、高木淳一(大

- 阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、第15回日本バイオイメーシング学会学術集会、「From today's EM toward tomorrow's EM」、岩手医科大学(盛岡)、2006年10月31日～11月2日
2. 安永卓生(九州工業大学)、第3回日本生物物理学会中部支部討論会・クライオ電子顕微鏡法と電子顕微鏡画像処理システム Eos (Electron cryo-microscopy and Eos, our developed program package for analyzing micrographs)、岡崎統合バイオサイエンスセンター(岡崎)、2007年3月16日
3. 岩崎憲治(大阪大学)、「分子分解能電子顕微鏡イメージング」、ERL サイエンス研究会1、高エネルギー加速器研究機構、つくば、2007年5月16日～17日
4. 宮澤淳夫(理化学研究所)、「電子顕微鏡法のための細胞内分子標識の開発」、日本顕微鏡学会 第63回学術講演会、朱鷺メッセ、新潟、2007年5月20日～22日
5. 岩崎憲治(大阪大学)、片山寿美枝、高木淳一、松本淳、由良敬、安永卓生、伊藤喜子、「クライオ3D : マクロ分子の構造解析」、日本顕微鏡学会第63回学術講演会、朱鷺メッセ、新潟、2007年5月20日～22日
6. 安永卓生(九州工業大学)、「電子顕微鏡画像処理システム Eos の試み」、日本顕微鏡学会第63回学術講演会、朱鷺メッセ、新潟、2007年5月20日～22日
7. 安永卓生(九州工業大学)、「医用画像としてのクライオ電子顕微鏡法の可能性」、日本顕微鏡学会第63回学術講演会、朱鷺メッセ、新潟、2007年5月20日～22日
8. 岩崎憲治(大阪大学)、安永卓生、片山寿美枝、Taiyun Wei、大村敏博、永井里奈、高木淳一、「電子線トモグラフィー」、第7回日本蛋白質科学会年会、仙台国際センター、仙台、2007年5月24日～26日
9. 安永卓生(九州工業大学)、タンパク質の可視化技術の最前線、市民フォーラム「生命科学の進歩とバイオマス利用最前線」、日本生物工学会九州支部、九州工業大学、飯塚、2007年8月10日
10. 安永卓生(九州工業大学)、「生物試料のための電子顕微鏡と画像処理」、第2回次世代バイオイメーシング技術開発研究会、名古屋大学、名古屋、2007年12月26日
11. 岩崎憲治(大阪大学)、「電子顕微鏡イメージングの現状と展望」、第3回プロテオミクス・構造生物学講演会、岡崎コンファレンスセンター、岡崎、2008年1月13日
12. 岩崎憲治(大阪大学)、「分子分解能電子顕微鏡イメージング」、ERL サイエンス研究会1、高エネルギー加速器研究機構、つくば、2008年3月16日～17日
13. 岩崎憲治(大阪大学)、「分子分解能を目指した生体試料の電顕イメージング」、3次元電子線トモグラフィー法のマテリアルへの展開研究部会第2回チュートリアル、京都工芸繊維大学、京都、2008年5月20日
14. 宮澤淳夫(理化学研究所)、「遺伝的コード化標識によるタンパク質の電子顕微鏡観察」、次世代バイオイメーシング技術開発研究会、名古屋大学野依学術交流館、名古屋、2008年7月18日
15. 安永卓生(九州工業大学)、「電子顕微鏡でみえるものはなにか」、P&P先端技術講演会、九州大学、2008年10月16日
16. 宮澤淳夫(理化学研究所)、「電子顕微鏡による1分子観察を目指した遺伝的コード化標識の開発」、日本生物物理学会 第46回年会シンポジウム:機能性膜タンパク質系1分子計測最前線、福岡国際会議場、福岡、2008年12月3日～5日
17. 安永卓生(九州工業大学)、クライオ電子顕微鏡法の現状と将来、顕微鏡学会・九州支部会、久留米大学、2008年12月6日
18. 宮澤淳夫(理化学研究所)、「生物分子トモグラフィーを目指して」、日本顕微鏡学会 関西支部特別企画講演会:電子顕微鏡機能イメージング法の展開ー生物科学・材料科学における立体像構築と位相情報抽出、岡崎コンファレンスセンター、岡崎、2008年12月20日～21日
19. 宮澤淳夫(理化学研究所)、「トモグラフィーへの応用を目指した細胞内標識法の開発」、日本顕微鏡学会 第33回関東支部講演会:顕微鏡3Dイメージング法の最前線、工学院大学、東京、2009年3月7日
20. 岩崎憲治(大阪大学)、「Electron microscopy study of platelet and integrin using new

methods」, 第 32 回日本血栓止血学会学術集会, リーガロイヤルホテル小倉, 2009 年 6 月 4 日～6 日

21. 安永卓生(九州工業大学), 「単粒子解析とトモグラフィー」, 第25回分析電子顕微鏡討論会, 幕張メッセ, 2009 年9月1日～2日
22. 安永卓生(九州工業大学), 「情報工学が切り拓く新しい世界 ～生物が創り出すナノ世界探訪」, 2009 九州 PC カンファレンス・基調講演, 九州工業大学, 2009 年 11 月 14 日～15 日
23. 宮澤淳夫(兵庫県立大学), 「電子顕微鏡法による神経シグナリング機構の構造生理学研究」, 日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会, 冠ワークショップ 第3回(平成22年度)風戸賞受賞講演会, 名古屋国際会議場, 名古屋, 2010 年 5 月 23-26 日
24. 岩崎憲治(大阪大学), 「電子顕微鏡イメージングによる分子分解能観察」, 第 57 回トキシシン(毒素)シンポジウム ～長浜カンファレンス～, 長浜ロイヤルホテル, 長浜, 2010 年 7 月 14-16 日
25. 岩崎憲治(大阪大学), 「電子顕微鏡イメージングー細胞・組織における分子分解能観察を目指してー」, 第 6 回連携大学院セミナー京都「生体分子の機能構造解析ー最新のトピックスと今後の展望」, 京都府立大学第 5 講義室, 京都, 2010 年 9 月 17 日
26. 岩崎憲治(大阪大学), 「電子顕微鏡イメージングー細胞・組織における分子分解能観察を目指してー」, グローバル COE「細胞運命決定」主催 第5回構造生物学・先端技術講演会, 九州大学馬出病院キャンパス総合研究棟2階204号室, 2010 年 9 月 29 日
27. 岩崎憲治(大阪大学), 「クライオ電子線トモグラフィーと CEMOVIS による水和試料の高分解能観察」, 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, パシフィコ横浜, 横浜, 2011年3月28-30日
28. 白川昌宏(京都大学), 「細胞内タンパク質・細胞膜の構造、運動性の磁気共鳴を使った計測手法の開発」理化学研究所 細胞システム研究コロキウム, 鈴木梅太郎ホール, 理化学研究所和光キャンパス, 2011年7月22日
29. 安永卓生(九州工業大学), 「Advanced electron microscopy for supramolecular assemblies: in vitro, in vivo, in situ and then in silico (超分子複合体のための最先端電子顕微鏡法: in vitro, invivo, in situ そして, in silico)」, 第49回生物物理学会年会, 姫路, 2011年9月16日～18日
30. 岩崎憲治(大阪大学), 第 1 回 先進素材開発解析システム (ADAM) シンポジウム, 京大大学生存圏研究所/木質ホール, 京都大学宇治キャンパス, 宇治, 2011年11月14日
31. 岩崎憲治(大阪大学), 「CEMOVIS」, 生理研研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」テーマ:「3D イメージングの最先端」, 岡崎統合バイオサイエンスセンター3 号館 2F, 岡崎, 2011年11月30日-12月1日
32. 安永卓生(九州工業大学), 「電子顕微鏡画像処理システムの現状と今後」, 生理研研究会「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用」, 岡崎, 2011 年11月30日～12月1日
33. 宮澤淳夫(兵庫県立大学), 「遺伝的標識法による生体分子の電子顕微鏡観察」, 日本顕微鏡学会 関西支部講演会, コンファレンスセンター, 名古屋, 2011年12月26日
34. 安永卓生(九州工業大学), 「3次元電子顕微鏡を用いたモータータンパク質の構造機能相関」, 第116回日本解剖学会, 横浜, 2012年3月28日～3月30日

(国際会議)

1. Iwasaki, K.(Osaka University), 「Electron microscopy imaging of extracellular proteins」, 2007 Annual Meeting, Korea Society of Microscopy, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea, Nov 14-16, 2007.
2. Atsuo Miyazawa(RIKEN), 「Development of a genetically encoded metalloprotein tag enabling protein detection by electron microscopy」, The 39th NIPS International Symposium “Frontiers of Biological Imaging -Synergy of the Advanced Techniques-”, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan, 10-12 November 2008
3. Atsuo Miyazawa(RIKEN), 「Development of genetically encoded protein tags for electron microscopy」, International Symposium of Global COEーStructural Biology from atoms to tissuesー, University of Hyogo, Hyogo, Japan, 24-25 March 2009

4. Kenji Iwasaki (Osaka University), 「EM imaging of Flexible proteins and supramolecular complexes within cells」International Symposium of Global COE—Structural Biology from atoms to tissues—, University of Hyogo, Hyogo, Japan, 24-25 March 2009
5. Iseki, M.(SOKENDAI), Fujiyoshi, S.(Tokyo Institute of Technology), Hirano, M. (Tokyo Institute of Technology), Matsushita, M. (Tokyo Institute of Technology), Miyazaki, N. (Osaka Univ.), Iwasaki, K.(Osaka Univ.) and Watanabe, M. (SOKENDAI),「Single molecule studies on fluorescence and 3-dimensional structure of photoactivated adenylyl cyclase (PAC), the sensor for photoavoidance in Euglena」, 13th Congress of the European Society for Photobiology in conjunction with the 2nd Conference of the European Platform for Photodynamic Medicine (EPPM), Wroclaw, Poland, 5-10 September 2009
6. Iwasaki, K. (Osaka University), 「EM imaging technique for molecular resolution in a cellular context, Microscopy of Soft and Hybrid Materials」, A joint NUANCE-Hitachi workshop on correlative & multiplexed microscopy at the interface of biology and materials, Northwestern University, Evanston, IL, USA, 25 October 2010
7. Masahiro Shriakawa (Kyoto University), 「Structures, functions and stability of proteins in mammalian cells investigated by magnetic resonance detectionsin-cell NMR spectroscopy」, The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Miyako hotel in Tokyo.December 1-2, 2010
8. Masahiro Shirakawa (Kyoto University), 「Structural biology of proteins in vitro and in cells」, The KMRS (Korean magnetic resonance society) symposium,Yong-Pyeong, a ski resort in Kangwon province, Korea, Feb 17-19, 2011
9. Masahiro Shirakawa (Kyoto University),「Mechanics of cells and intracellular macromolecules measured by magnetic resonance,Gordon Research Conference on Computational Aspects of Biomolecular NMR, Il Ciocco Hotel and Resort, Italy, May 22-27, 2011,
10. Masahiro Shirakawa (Kyoto University), 「Magnetic resonance techniques for observation of s tructure anddynamics of biomolecules in cells」,The 11th Annual Meeting of the protein Science Society of Japan, Hotel Hankyu Expo-park, Osaka, June 7-9, 2011
11. Masahiro Shirakawa (Kyoto University), 「Magnetic resonance for cell biology:Mechanics of intra-cellar proteins and cells」,2011 KAIST chemical biology symposium, Korea, June 22, 2011
12. Iwasaki, K.(Osaka University), Miyazaki, N. (Osaka University) and Omura, T. (NARC), 「EM imaging technique toward molecular resolution in cellular context」, Symposium Bio-inspired Materials and Functionalities (One of the Osaka University 80th Anniversary Commemorative Events), Hampshire Hotel Plaza, Groningen, Netherland, 21-22 June 2011
13. Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. Tech.), 「Motor Protein Structure Elucidated by Cryo-EM」, BIT 1st Annual World Congress of Molecular & Cell Biology, Beijing, China, 6-8 August 2011
14. Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. Tech.), 「Structural Analysis of Protein Complexes by Electron Microscopy and Image Analysis」, Eighth International Conference on Flow Dynamics, Sendai, Miyagi, 9-11 November 2011

② 口頭発表 (国内会議 68 件、国際会議 12 件)

(国内会議)

1. 今村元樹(九州工業大学)、永井里奈(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、安永卓生(九州工業大学)、電子顕微鏡画像における変調関数決定法の開発及び応用、日本顕微鏡学会・生体構造解析分科会・2006 年度研究討論会VI、大阪大学中之島センター(大阪)、2006 年 12 月 22-23 日
2. 太田好則(九州工業大学)、梅木伸洋(大阪大学)、片山栄作(東京大学)、丸田晋作(創価大学)、安永卓生(九州工業大学)、電子分光クライオ電子顕微鏡を用いた、筋タンパク質ミオシンIのヌクレオチド結合状態による構造変化の検出、日本顕微鏡学会・生体構造解析分科会・2006

- 年度研究討論会VI、大阪大学中之島センター(大阪)、2006年12月22-23日
3. 福永優子(理化学研究所)、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VI、大阪大学中之島センター(大阪)、2006年12月22-23日
 4. 西野有里(理化学研究所)、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VI、大阪大学中之島センター(大阪)、2006年12月22-23日
 5. 村上健二(帝京大学)、安永卓生(九州工業大学)、野澤佳世(帝京大学)、富井久美子(帝京大学)、若林健之(帝京大学)、ハイブリッドアプローチによる細いフィラメントの原子モデル構築、生体運動合同班会議、金沢市文化ホール(金沢)、2007年1月7-9日
 6. 上野裕則(産業技術総合研究所)、安永卓生(九州工業大学)、真行寺千佳子(東京大学)、広瀬恵子(産業技術総合研究所)、ダイニン・微小管運動機構の構造学的研究、生体運動合同班会議、金沢市文化ホール(金沢)、2007年1月7-9日
 7. 高崎寛子(九州工業大学)、劉中美(東京大学)、神谷律(東京大学)、安永卓生(九州工業大学)、Chlamydomonas 鞭毛での外腕ダイニン重鎖の位置決定、生体運動合同班会議、金沢市文化ホール(金沢)、2007年1月7-9日
 8. 藤原真悟(九州工業大学)、本間和明(マサチューセッツ大学)、池辺礼子(マサチューセッツ大学)、池辺光男(マサチューセッツ大学)、安永卓生(九州工業大学)、電子分光クライオ電子顕微鏡法によるミオシン IX の解析、生体運動合同班会議、金沢市文化ホール(金沢)、2007 年1月7-9日
 9. 瀧本雄介(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「2+3次元画像を用いた、電子顕微鏡画像解析のための角度決定ツール」、日本顕微鏡学会・九州支部会(2007)、九州大学、大野城、2007年12月1日
 10. 新名人士(九州工業大学)、谷口佳苗(九州工業大学)、西野有里(理化学研究所)、岩崎憲治(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、宮澤淳夫(理化学研究所)、安永卓生(九州工業大学)、「多種の処理ツールの統合による半自動3次元再構成システム」、日本顕微鏡学会・九州支部会(2007)、九州大学、大野城、2007年12月1日
 11. 中尾亮太(九州工業大学)、堤 由佳(九州工業大学)、東元祐一郎(九州工業大学)、野口正人(九州工業大学)、坂本 寛(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「ヘムオキシゲナーゼ-1・シトクロム P450 還元酵素複合体結合様式の解明」、日本顕微鏡学会・九州支部会(2007)、九州大学、大野城、2007年12月1日
 12. 平瀬 愛(理化学研究所)、「金属結合タンパク質標識の電子顕微鏡観察」、日本顕微鏡学会生体構造解析分科会 2007年度研究討論会VII、(独)産業技術総合研究所・臨海副都心センター、東京、2007年12月19日～20日
 13. 平瀬愛(理化学研究所)、福永優子(理化学研究所)、西野有里(理化学研究所)、宮澤淳夫(理化学研究所)、「遺伝的標識法を用いた細胞内タンパク質の電子顕微鏡解析」、日本顕微鏡学会 第64回学術講演会、国立京都国際会館、京都、2008年5月21日～23日
 14. 金明月(九州工業大学)、高崎寛子(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「クライオ電子顕微鏡による外腕ダイニンミュータントの比較」、顕微鏡学会・九州支部会、久留米大学、2008年12月6日
 15. 峰寛(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電子顕微鏡-3次元再構成法を用いた車軸藻ミオシンの反応メカニズムの解明」、顕微鏡学会・九州支部会、久留米大学、2008年12月6日
 16. 安永卓生(九州工業大学)、「クライオ電子顕微鏡を用いたモーター分子の構造解析」、生体運動合同班会議、東京大学、2009年1月11日
 17. 安永卓生(九州工業大学)、瀧本雄介(九州工業大学)、岩崎憲治(大阪大学)、宮澤淳夫(理化学研究所)、「画像処理ソフトウェア Eos のツール統合による発展」、第65回日本顕微鏡学会学術集会、仙台国際センター、2009年5月26日～29日
 18. 岩崎憲治(大阪大学)、「CEMOVIS の評価とクライオ電子線トモグラフィー」、日本顕微鏡学会

- 第 65 回学術講演会, 仙台国際センター, 2009 年 5 月 26 日～29 日
19. 岩崎憲治(大阪大学)、電顕技術開発若手研究部会第一回ワークショップ、JFCC 名古屋、2009 年 9 月 19 日
20. 高崎寛子(九州工業大学)、劉 中美(東京大学)、神谷 律(東京大学)、安永卓生(九州工業大学)、「3 つの *Chlamydomonas* 外腕ダイニン重鎖の立体配置とその相互作用」、日本顕微鏡学会九州支部会、九州工業大学、北九州市、2009 年 12 月 6 日
21. 金 明月(九州工業大学)、高崎寛子(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「軸系外腕ダイニンと微小管が複合体を形成する際の仕組み」、日本顕微鏡学会九州支部会、九州工業大学、北九州市、2009 年 12 月 6 日
22. 塚田祥弘(九州工業大学)、若林健之(帝京大学)、安永卓生(九州工業大学)、「アクチン-ミオシン硬直複合体の高分解能 3 次元像の獲得」、日本顕微鏡学会九州支部会、九州工業大学、北九州市、2009 年 12 月 6 日
23. 高崎寛子(九州工業大学)、劉 中美(東京大学)、神谷 律(東京大学)、安永卓生(九州工業大学)、「in vivo と in vitro における 3 つの *Chlamydomonas* 外腕ダイニン重鎖の相互作用」、生体運動合同班会議、中央大学、東京、2010 年 1 月 9 日～11 日
24. 平瀬愛(理化学研究所)、福永優子(兵庫県立大学)、西野有里(理化学研究所)、東原愛(理化学研究所)、宮澤淳夫(兵庫県立大学)、「遺伝的コード化標識(3MT)の CEMOVIS への応用」、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋、2010 年 5 月 23-26 日
25. 松永幸子(大阪大学)、藤井敬大(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、「遺伝子導入型プローブによる分子標識」、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋、2010 年 5 月 23-26 日
26. 的場京子(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、「電子線トモグラフィーを用いたネガティブ染色試料における染色剤の厚さ測定」、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋、2010 年 5 月 23-26 日
27. 宮崎直幸(大阪大学)、伊関峰生(総合研究大学院大学)、渡辺正勝(総合研究大学院大学)、小林一美(日本電子データム株式会社)、藤吉好則(京都大学)、岩崎 憲治(大阪大学)、「CEMOVIS による *Euglena* の構造解析」、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋、2010 年 5 月 23-26 日
28. 岩崎憲治(大阪大学)、宮崎直幸(大阪大学)、田中宏樹(大阪大学)、禾 晃和(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、「神経シナプス接着機構の解明～原子から細胞まで～」、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋、2010 年 5 月 23-26 日
29. 岩崎憲治(大阪大学)、的場京子(大阪大学)、「ランダムコンカルティルト法～正しい構造を求める～」、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋、2010 年 5 月 23-26 日
30. 安永卓生(九州工業大学)、「単粒子解析法に向けた各種ソフトウェアの開発(指定講演)」、日本顕微鏡学会年会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋市、2010 年 5 月 23-26 日
31. 我妻竜三(九州工業大学)、小屋迫光太郎(九州工業大学)、金名月(九州工業大学)、高崎寛子(九州工業大学)、大田興希(九州工業大学)、白川圭太(九州工業大学)、塚田 祥弘(九州工業大学)、鶴崎聖也(九州工業大学)、吉竹純一(九州工業大学)、大熊康夫(九州工業大学)、日高裕章(九州工業大学)、山下理沙(九州工業大学)、渡邊慶太(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「Eos プラットフォーム開発と利用環境」、日本顕微鏡学会年会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋、2010 年 5 月 23-26 日
32. 金明月(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電子線トモグラフィーを用いた軸系外腕ダイニン-微小管複合体の 3 次元構造」、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋市、2010 年 5 月 23-26 日
33. 我妻竜三(九州工業大学)、小屋迫光太郎(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電子線トモグラフィーの高速化:繰り返し再構成に対する GPGPU の活用」、日本生物物理学会年

- 会、東北大学(仙台市)、2010年9月20-22日
34. 村上健二(帝京大学)、安永卓生(九州工業大学)、野口太郎(産業技術総合研究所)、五味
渕由貴(帝京大学)、Ngo Kien(産業技術総合研究所)、上田太郎(産業技術総合研究所)、若
林健之(帝京大学)、「アクチン重合とそれに伴う ATPase 活性化の構造的基盤」、日本生物物
理学会年会、東北大学(仙台市)、2010年9月20-22日
35. 鳥羽栞(大阪市立大学)、山田雅巳(大阪市立大学)、安永卓生(九州工業大学)、広常真治
(大阪市立大学)、「LIS1 は細胞質ダイニンのリング状頭部の微小管に沿った運動を制御する」、
日本生物物理学会年会、東北大学(仙台市)、2010年9月20-22日
36. 渡邊慶太(九州工業大学)、小川佳織(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「クライ
オ電子顕微鏡法による小さい生体分子複合体の可視化」、可視化情報学会全国講演会、国分
シビックセンター、霧島、2010年10月7-8日
37. 山下理沙(九州工業大学)、瀧本雄介(九州工業大学)、中尾亮太(九州工業大学)、坂本寛
(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電子顕微鏡画像解析のための GUI 環境を有
した新規分子可視化ツールの開発」、可視化情報学会全国講演会、国分シビックセンター、霧
島、2010年10月7-8日
38. 大熊康夫(九州工業大学)、糟屋大介(産業技術総合研究所)、光岡薫(産業技術総合研究
所)、佐伯泰(東京都臨床研)、安永卓生(九州工業大学)、「高分解能クライオ電子顕微鏡と画
像処理による 26S プロテアソームの単粒子解析」、可視化情報学会全国講演会、国分シビック
センター、霧島、2010年10月7-8日
39. 山下理彩(九州工業大学)、中尾亮太(九州工業大学)、瀧本雄介(九州工業大学)、坂本寛
(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電子顕微鏡画像に基づいた原子モデル構築
のための支援ツールの開発」、日本顕微鏡学会九州支部総会、九州大学、福岡、2010年12月
4日
40. 渡邊慶太(九州工業大学)、小川佳織(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「クライ
オ電子顕微鏡法の低分子量タンパク質の3次元再構成法への挑戦」、日本顕微鏡学会九州支
部総会、九州大学、福岡、2010年12月4日
41. 我妻竜三(九州工業大学)、小屋迫光太郎(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電
子線トモグラフィーにおける反復再構成手法—技術開発のポイント」、日本顕微鏡学会生体構
造解析分科会、研究討論会(X)、湯沢ニューオータニホテル、湯沢、2010年12月27-28日
42. 山下理沙(九州工業大学)、新谷 優(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「ミオシ
ンのUP/DOWN 構造遷移バイアスに関する拘束付きMD法による検証」、生体運動合同班会議、
大阪市立大学、大阪、2011年1月7-9日
43. 金明月(九州工業大学)、柳澤春明(東京大学)、神谷律(東京大学)、安永卓生(九州工業大
学)、「金属結合タンパク質を使った鞭毛内でのダイニンサブユニットの可視化への試み」、生体
運動合同班会議、大阪市立大学、大阪、2011年1月7-9日
44. 岩崎憲治(大阪大学)、宮崎直幸(大阪大学)、伊関峰生(総合研究大学院大学)、渡邊正勝
(総合研究大学院大学)、長谷川浩司(アドバンスソフト)、足立伸一(高エネルギー加速器研究
機構)、岡田愛子(大阪大学)、村上聡(東京工業大学)、「CEMOVIS(非晶質切片)とクライオ
電子線トモグラフィー」、日本顕微鏡学会第67回学術講演会、福岡国際会議場、福岡、2011
年5月16日～18日
45. 岩崎憲治(大阪大学)、片山寿美枝(大阪大学)、宮崎直幸(大阪大学)、的場京子(大阪大
学)、「生体構造の電子線トモグラフィー解析」、日本顕微鏡学会第67回学術講演会、福岡国
際会議場、福岡、2011年5月16日～18日
46. 平瀬 愛(理化学研究所)、宮澤 淳夫(兵庫県立大学)、「海馬初代培養細胞の試料作製と
電子線トモグラフィー」、日本顕微鏡学会第67回学術講演会、チュートリアル「生体構造の電子
線トモグラフィー解析」、福岡国際会議場、福岡、2011年5月16日～18日
47. 金明月(九州工業大学)、柳澤春明(東京大学)、神谷律(東京大学)、安永卓生(九州工業大
学)、「金属標識タンパクのクライオ電子線トモグラフィーへの応用」、日本顕微鏡学会第67回学
術講演会、チュートリアル「生体構造の電子線トモグラフィー解析」、福岡国際会議場、福岡、2

011年5月16日～18日

48. Hideaki Tanaka (Osaka University), Koji Kato (University of Hyogo), Eiki Yamashita (Osaka University), Tomoyuki Sumizawa (Kagoshima Women's Junior College), Yong Zhou (Hokkaido University), Min Yao (Hokkaido University), Kenji Iwasaki (Osaka University), Masato Yoshimura (NSRRC, Taiwan), Tomitake Tsukihara (University of Hyogo).「細胞質内で最大の分子量を持つ核酸-蛋白質複合体ボルトの構造」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
49. Yasuhito Suzuki (University of Tokyo), Hiroshi Sekiguchi (University of Tokyo), Kentarou Hoshisaki (University of Tokyo), Suzuko Kobayashi (University of Tokyo), Weiyang Cai (University of Tokyo), Keiko Shimoyama (University of Tokyo), Atsuo Miyazawa (University of Hyogo), Yuri Nishino (RIKEN), Tai Kubo (AIST), Yuji Sasaki (University of Tokyo).「1分子膜タンパク質 nAChR の極微小回転運動計測」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
50. Ryuzo Azuma (Kyushu Inst. of Tech.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.): Cutting-edge reconstruction technique for electron tomography of 3D structures、「3次元構造の電子線トモグラフィーに対する新しい再構成計算技術」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
51. Yasuo Okuma (Kyushu Inst. of Tech., Daisuke Kasuya (AIST), Kaoru Mitsuoka (AIST), Yasushi Saeki (東京都臨床研), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.) 3D structure of the 26S proteasome by high-resolution electron cryo-microscopy、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
52. Kazuaki Yoshida (Kyushu Inst. of Tech.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.), 3D structure of non full-decorated actomyosin in the rigor state「硬直状態における単一ミオシンが結合したアクチンフィラメントの三次元構造」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
53. Hiroaki Hidaka (Kyushu Inst. of Tech.) Hiroshi Mine (Kyushu Inst. of Tech.), Kohji Ito (Chiba Univ.), Keiichi Yamamoto (Chiba Univ.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.), Elucidation of the molecule mechanism of Chara myosin's fast movement by electron cryomicroscopy、「クライオ電子顕微鏡法による車軸藻ミオシンの高速移動分子メカニズムの解明」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
54. Mingyue Jin (Kyushu Inst. of Tech.), Haru-aki Yanagisawa (Univ. of Tokyo), Kotaro Koyasako (Kyushu Inst. of Tech.), Ritsu Kamiya (Univ. of Tokyo), Kota Mayanagi (Kyushu Univ.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.), Detection of genetic heavy metal-labeled light chain 4 by electron cryo-tomography「クライオ電子線トモグラフィーによる遺伝的な重金属でラベルしたLC4の検出」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
55. Tatsuya Kihara (Kyushu Inst. of Tech.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.), Development of a convenient tool for making processes of particle clustering and averaging in 3-D reconstruction from electron micrographs「電子顕微鏡画像分類の利便化のためのツール開発」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
56. Seiya Tsurusaki (Kyushu Inst. of Tech.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.) Tests of the tomography system using a transmission electron microscope「電子顕微鏡を用いたトモグラフィー画像解析システムの検証」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
57. Risa Yamashita (Kyushu Inst. of Tech.) Ryota Nakao (Kyushu Inst. of Tech.), Hiroshi Sakamoto (Kyushu Inst. of Tech.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.) Atomic modeling of a complex of cytochrome P450 reductase and hemeoxygenase-1 by molecular dynamics restricted EM 3D maps「電子顕微鏡画像に基づいた拘束付き分子動力学法: シトクロム P450 還元酵素・ヘムオキシゲナーゼ1複合体の原子モデル構築」、日本生物物理学会 第49回

年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日

58. Keita Watanabe (Kyushu Inst. of Tech.) Kaori Ogawa (Kyushu Inst. of Tech.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.) Challenges to elucidate small biomolecular complex structure in electron cryo-microscope with a cold field emission gun「冷陰極電界放出銃を用いた、クライオ電子顕微鏡法による小さい生体分子複合体構造解析への挑戦」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
59. Shinji Aramaki (Kyushu Inst. of Tech.) Kazuhiro Aoyama (Kyushu Inst. of Tech.), Kouta Mayanagi (Kyushu Univ.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.) The 3D ultrastructure of the intact nerve cells, NG108-15 observed by electron cryo-tomography「電子線クライオトモグラフィー法による神経細胞 NG108-15 の超微細構造観察」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
60. Kotaro Koyasako (Kyushu Inst. of Tech.) Shiori Toba (Osaka City Univ.), Shinji Hirotsune (Osaka City Univ.), Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.) High Resolution Electron Tomography Analysis of the Cytoplasmic Dynein and Microtubule Complex「細胞質ダイニン-微小管複合体の高分解能電子線トモグラフィー」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大学、姫路、2011年9月16日～18日
61. 我妻竜三(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、Iterative method for 3D reconstruction of ultrastructures in cryo-electron microscopy、日本バイオインフォマティクス学会、神戸、2011年11月8日～10日
62. 岩崎憲治(大阪大学)、「分子分解能観察を目指した電子顕微鏡イメージング法」、超高圧電子顕微鏡センター 医学・生物学系共同利用研究報告会、ナノバイオ棟3Fセミナー室、大阪大学吹田キャンパス、2011年11月22日
63. 渡邊慶太(九工大)、小川佳織(九工大)、安永卓生(九工大)、冷陰極電界放出銃を用いたクライオ電子顕微鏡法による小さい生体分子複合体の可視化、第53回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、熊本大学、熊本市、熊本、2011年12月3日
64. 我妻竜三(九工大)、安永卓生(九工大)、超分解型反復3次元像再構成ソフトウェアの開発、第53回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、熊本大学、熊本市、熊本、2011年12月3日
65. 日高裕章(九工大)、峰寛(九工大)、伊藤光二(千葉大)、山本啓一(千葉大)、安永卓生(九工大)、クライオ電子顕微鏡法による車軸藻ミオシンの構造移動分子メカニズムの解明、2011年度日本生物物理学会九州支部会、飯塚、福岡、2011年12月4日
66. 渡邊慶太(九工大)、小川佳織(九工大)、安永卓生(九工大)、冷陰極電界放出銃を用いた、クライオ電子顕微鏡法による小さい生体分子複合体構造解析への挑戦、2011年度日本生物物理学会九州支部会、飯塚、福岡、2011年12月4日
67. 山下理沙(九工大)、安永卓生(九工大)、電子顕微鏡法と分子動力学法を用いたモータータンパク質の構造解析、生体運動合同班会議、筑波大学、筑波、2012年1月6日～8日
68. 金明月(九工大)、柳澤春明(東大)、小屋迫光太郎(九工大)、神谷律(東大)、安永卓生(九工大)、メタロチオネインを用いた軸糸内外腕タイニン軽鎖位置の同定、生体運動合同班会議、筑波大学、筑波、2012年1月6日～8日

(国際会議)

1. Yuri Nishino (RIEKN), Takuo Yasunaga (Kyushu Institute of Technology) and Atsuo Miyazawa (RIKEN), 「A new protein labeling technique using genetically encoded metallothionein tag for electron microscopy」, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Korea, 2-7 November 2008
2. Kenji Iwasaki (Osaka University), 「EM imaging of extracellular proteins」, 7th OIB symposium, Okazaki, Japan, 13 November 2008.
3. Yuri Nishino (University of Hyogo), Atsuo Miyazawa (University of Hyogo), 「A genetically encoded metallothionein-tag for electron microscopy」, China-Japan 3D-EM Forum 2010, Beijing, China, 4-7 January 2010

4. Ai Hirase (University of Hyogo), Atsuo Miyazawa (University of Hyogo), 「Application of a genetically encoded tag to the detection of intracellular proteins by electron microscopy」, China-Japan 3D-EM Forum 2010, Beijing, China, 4-7 January 2010
5. Kenji Iwasaki (Osaka University), 「EM imaging of Rice Dwarf virus」, China-Japan 3D-EM Forum 2010, Beijing, China, 4-7 January 2010
6. Takuo Yasunaga (Kyushu Institute of Technology), Ryuzo Azuma (Kyushu Institute of Technology), Mingyue Jin (Kyushu Institute of Technology), 「Electron tomography using our development software, Eos」, China-Japan 3D-EM Forum 2010, Beijing, China, 4-7 January 2010
7. Matsunaga, Y. (Osaka University), Iwasaki, K. (Osaka University), Takagi, J. (Osaka University), 「Utilization of a covalent probe and genetically-coded probe-acceptor in a dual-purpose labeling system for light and electron microscopy」, The IFSM International Microscopy Congress, IMC17, Rio, BRAZIL, 19-24 September 2010
8. Yuri Nishino (RIKEN), Yuko Fukunaga (University of Hyogo), Atsuo Miyazawa (University of Hyogo), Development and observation of a genetically encoded metallothionein tag for electron microscopy, Joint Seminar of National University of Singapore and Structural biology division, the Japanese Society of Microscopy, Singapore, 12-13 January 2012
9. Yuko Fukunaga (University of Hyogo), Ai Higashihara (RIKEN), Yuri Nishino (RIKEN), Atsuo Miyazawa (University of Hyogo), Improvement in detection sensitivity of a genetically encoded metallothionein tag, Joint Seminar of National University of Singapore and Structural biology division, the Japanese Society of Microscopy, Singapore, 12-13 January 2012
10. Yasunaga T. (Kyushu Inst. of Tech.), Application of image analysis system, Eos, to electron cryo-microscopy, Joint Seminar of National University of Singapore and Structural biology division, the Japanese Society of Microscopy, Singapore, 12-13 January 2012
11. Jin, M. (Kyushu Inst. of Tech.), A Chlamydomonas axoneme architecture elucidated by application of metallothionein labeling, Joint Seminar of National University of Singapore and Structural biology division, the Japanese Society of Microscopy, Singapore, 12-13 January 2012
12. Watanabe K. (Kyushu Inst. of Tech.), Visualization of typical size of proteins by three-dimensional electron cryo-microscopy, Joint Seminar of National University of Singapore and Structural biology division, the Japanese Society of Microscopy, Singapore, 12-13 January 2012

③ ポスター発表 (国内会議 91 件、国際会議 28 件)

(国内会議)

1. 岩崎憲治 (大阪大学)、片山寿美枝 (大阪大学)、Wei Taiyun (大阪大学)、大村敏博 (大阪大学)、安永卓生 (九州工業大学)、高木淳一 (大阪大学)、 「A new imaging method using electron beam tomography」、化学血清療法研究所主催第5回 Aso International Meeting、ホテルグリーンピア南阿蘇、南阿蘇、2007年5月17日～19日
2. 福永優子 (理化学研究所)、平瀬 愛 (理化学研究所)、キム ヘジ (理化学研究所)、和田奈津子 (理化学研究所)、西野有里 (理化学研究所)、宮澤淳夫 (理化学研究所)、 「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」、第30回日本分子生物学会・第80日本生化学会 合同大会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月11日～15日
3. 西野有里 (理化学研究所)、谷口佳苗 (九州工業大学)、安永卓生 (九州工業大学)、宮澤淳夫 (理化学研究所)、 「電子顕微鏡で観察可能なタンパク質標識法の開発」、第30回日本分子生物学会・第80日本生化学会 合同大会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月11日～15日
4. 宮崎直幸 (大阪大学)、井藤友恵 (大阪大学)、高木淳一 (大阪大学)、岩崎憲治 (大阪大学)、 「インテグリンファミリーにおける特異的な構造の探索」、第30回日本分子生物学会・第80日本生化学会 合同大会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月11日～15日
5. 宮崎直幸 (大阪大学)、Wei Taiyun (大阪大学)、日比野啓行 (大阪大学)、一木珠樹 (大阪大

- 学)、大村敏博(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、「電子線トモグラフィーによるミトコンドリア周辺に局在している Rice Gall Dwarf Virus の構造解析」、特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第4回公開シンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、吹田、2007年12月18日～19日
6. 平瀬 愛(理化学研究所)、福永優子(理化学研究所)、西野有里(理化学研究所)、宮澤淳夫(理化学研究所)、「電子顕微鏡で観察できる遺伝的コード化標識の開発」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 7. 上野裕則(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、真行寺千佳子(東京大学)、廣瀬恵子(産業技術総合研究所)、「ダイニン・微小管複合体の構造学的研究」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 8. 藤原真悟(九州工業大学)、狩野要介(九州工業大学)、佐藤 治(九州工業大学)、本間和明(九州工業大学)、池辺礼子(九州工業大学)、池辺光男(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電子分光クライオ電子顕微鏡法によるunconventional myosins の解析」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 9. 村山涼子(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「単粒子解析のための粒子投影方向決定の新技术—シノグラムライン特徴量とその応用」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 10. 新名人士(九州工業大学)、谷口佳苗(九州工業大学)、西野有里(理化学研究所)、岩崎憲治(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、宮澤淳夫(理化学研究所)、安永卓生(九州工業大学)、「多種の処理ツールの統合による半自動3次元再構成システム」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 11. 劉 中美(九州工業大学)、高崎寛子(九州工業大学)、中澤友紀(九州工業大学)、八木俊樹(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、神谷 律(九州工業大学)、「ダイニン外腕 γ 重鎖を欠失した新規クラミドモナス変異株の単離と解析」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 12. 高崎寛子(九州工業大学)、劉 中美(九州工業大学)、神谷 律(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「3つのクラミドモナス外腕ダイニン重鎖の位置と向きと構造」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 13. 上野裕則(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、真行寺千佳子(東京大学)、廣瀬恵子(産業技術総合研究所)、「ダイニン・微小管複合体の構造学的研究」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 14. 中尾亮太(九州工業大学)、堤 由佳(九州工業大学)、東元祐一郎(九州工業大学)、野口正人(九州工業大学)、坂本 寛(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「クライオ電子顕微鏡法によるヘムオキシゲナーゼ-1・シトクロム P450 還元酵素複合体の結合様式の解明」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 15. 寺西亮佑(九州工業大学)、蟻久大輔(九州工業大学)、藤島 寛(九州工業大学)、坂本順司(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電子分光クライオ電子顕微鏡法による呼吸鎖シトクロム c 酸化酵素の三次元構造決定」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 16. 深江和貴(九州工業大学)、須藤和夫(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「ダイニンストーク部位のアイソフォームに依存した撓やかさ」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 17. 安永卓生(九州工業大学)、岩崎憲治(大阪大学)、宮澤淳夫(理化学研究所)、「画像処理システム Eos と統合した3次元電子顕微鏡法の開発」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
 18. 後藤龍伯(九州工業大学)、永井里奈(大阪大学)、今村元樹(九州工業大学)、松浦亜由美(九州工業大学)、高木淳一(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、安永卓生(九州工業大学)、「3次元電子断層撮影法のための GUI ツールの開発」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日

19. 瀧本雄介(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「2+3次元画像を用いた、可視化・可聴化による特徴像の解析補助ツールの開発」、日本生物物理学会 第45回年会、パシフィコ横浜、横浜、2007年12月21日～23日
20. 宮崎直幸(大阪大学)、井藤友恵(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、「電子顕微鏡イメージングによるラミニン結合型インテグリンの構造解析」、第8回日本蛋白質科学会年会、タワーホール船堀、東京、2008年6月10日～12日
21. 片山寿美枝(大阪大学)、白鹿正通(大阪大学)、富山佳昭(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、「クライオ電子顕微鏡法を用いた活性化血小板の分子分解能構造解析」、第31回日本血栓止血学会学術集会、大阪国際交流センター、大阪、2008年11月20日～22日
22. 福地弘晃(九州工業大学)、西野有里(理化学研究所)、宮澤淳夫(理化学研究所)、安永卓生(九州工業大学)、「クライオ電子顕微鏡法、単粒子解析を用いたアセチルコリン受容体の構造解析」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
23. 高崎寛子(九州工業大学)、金明月(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「クライオ電子顕微鏡法による軸糸ダイニンの構造解析」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
24. 峰 寛(九州工業大学)、伊藤浩二(千葉大学)、山本啓一(千葉大学)、安永卓生(九州工業大学)、「電子顕微鏡一三次元再構成を用いた車軸藻ミオシンの構造解析」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
25. 新名人士(九州工業大学)、谷口香苗(九州工業大学)、西野有里(理化学研究所)、岩崎憲治(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、宮澤淳夫(理化学研究所)、光岡薫(産業技術総合研究所)、安永卓生(九州工業大学)、「多種の処理ツールの統合による半自動3次元再構成システムの開発」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
26. 瀧本雄介(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「2+3次元画像を用いた、可視化・可聴化による特徴像の解析補助ツールの開発 2」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
27. 中尾亮太(九州工業大学)、堤由佳(九州工業大学)、東本裕一郎(久留米大学)、野口雅人(久留米大学)、坂本寛(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「ヘムオキシゲナーゼ1・シトクロムP450 還元控訴複合体結合様式の解明」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
28. 上野裕則(産業技術総合研究所)、安永卓生(九州工業大学)、真行寺千佳子(東京大学)、広瀬恵子(産業技術総合研究所)、「ダイニン・微小管複合体の構造学的研究」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
29. 村上健次(帝京大学)、安永卓生(九州工業大学)、若林健之(帝京大学)、「アクチンの吐露歩ミオシン結合モチーフについて」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
30. 安永卓生(九州工業大学)、岩崎憲治(大阪大学)、宮澤淳夫(理化学研究所)、「電子顕微鏡画像処理システムEos2の構築」、第46回日本生物物理学会、福岡国際センター、2008年12月3日～5日
31. 片山寿美枝(大阪大学)、白鹿正通(大阪大学)、富山佳昭(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、「クライオ電子顕微鏡法を用いた活性化血小板の分子分解能構造解析」、第81回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド、神戸、2008年12月9日～12日
32. 宮崎直幸(大阪大学)、伊関峰生(総研大)、渡辺正勝(総研大)、足立伸一(高エネ研)、朴三用(横浜市立大学)、岩崎憲治(大阪大学)、「電子顕微鏡によるミドリムシ光センサータンパク質Photoactivated Adenylyl Cyclase (PAC)の構造解析」、第9回日本蛋白質科学会年会、熊本全日空ホテルニュースカイ、2009年5月20日～22日
33. 平瀬愛(兵庫県立大学)、福永優子(兵庫県立大学)、西野有里(兵庫県立大学)、東原愛(理化学研究所)、宮澤淳夫(兵庫県立大学)、「細胞内タンパク質標識法の電子線トモグラフィーへの応用」、日本顕微鏡学会第65回学術講演会、2009年5月26日～29日

34. 高崎寛子(九州工業大学), 安永卓生(九州工業大学), 「クラミドモナス軸系ダイニン立体構造解析」, 第65回日本顕微鏡学会学術集会, 仙台国際センター, 2009年5月26日～29日
35. 金 明月(九州工業大学), 高崎寛子(九州工業大学), 安永卓生(九州工業大学), 「軸系外腕ダイニンの構造及び微小管と複合体を形成する際の仕組み」, 第65回日本顕微鏡学会学術集会, 仙台国際センター, 2009年5月26日～29日
36. 渡辺正勝(総研大), 伊関峰生(総研大), 藤芳暁(東工大), 松下道雄(総研大), 宮崎直幸(大阪大学), 岩崎憲治(大阪大学), 長谷川浩司(アドバンスソフト), 「エフェクター内蔵型光センサー、光活性化アデニル酸シクラーゼ(PAC、パック)の単分子レベルにおける蛍光分光解析および立体配置解析」, 特定領域研究「セルセンサーの分子連関とモーダルシフト」, 平成 21 年度夏の班会議, 2009 年 6 月 29 日～30 日
37. 清水巧(中央農業総合研究センター), Wei Taiyun(中央農業総合研究センター), 宮崎直幸(大阪大学), 一木(植原)珠樹, 日比野啓行(中央農業総合研究センター), 岩崎憲治(大阪大学), 大村敏博(中央農業総合研究センター). 「媒介昆虫細胞内における *Rice gall dwarf virus* のミトコンドリアへの局在」, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 都市センターホテル, 東京, 2009 年 10 月 25 日～27 日
38. 一木(植原)珠樹(中央農業総合研究センター), Wei Taiyun(中央農業総合研究センター), 宮崎直幸(大阪大学), 日比野啓行(中央農業総合研究センター), 岩崎憲治(大阪大学), 大村敏博. 「媒介昆虫細胞内における *Rice gall dwarf virus* のミトコンドリアへの局在」, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 都市センターホテル, 東京, 2009 年 10 月 25 日～27 日
39. 葦原雅道(大阪大学), 加藤貴之(大阪大学), 藤井高志(大阪大学), 松波秀行(大阪大学), 宮田知子(大阪大学), 岩崎憲治(大阪大学), 難波啓一. 「低温電子顕微鏡法における生体超分子複合体に対する電子線照射損傷の定量的評価」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
40. Hironori Ueno (産総研), Takuo Yasunaga (九州工業大学), Chikako Shingyouji (東京大学), Takami Yamaguchi (東北大学), Keiko Hirose (産総研), 「Structural changes in dynein molecules accompanying force generation」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
41. Yoshihiro Tsukada (九州工業大学), Takeyuki Wakabayashi (帝京大学), Takuo Yasunaga (九州工業大学), 「Obtainment of high resolution 3D map of actin-myosin rigor complex」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
42. Mingyue Jin (九州工業大学), Hiroko Takazaki (九州工業大学), Takuo Yasunaga (九州工業大学)「Structure of flagellar outer dynein arm and the structural mechanism in formation of the outer dynein arm-microtubule complexes」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
43. Jun Harano (筑波大学), Hironori Ueno (産総研), Katsutoshi Mizuno (筑波大学), Takuo Yasunaga (九州工業大学), Kazuo Inaba (筑波大学), Keiko Hirose (産総研) 「Structural analysis of Outer Arm Dynein molecules purified from *Ciona intestinalis*」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
44. Hiroaki Fukuchi (九州工業大学), Yuri Nishino (理化学研究所), Atsuo Miyazawa (兵庫県立大学), Takuo Yasunaga (九州工業大学), 「Structure of acetylcholine receptor by electron cryo-microscopy and single particle analysis」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
45. Hiroko Takazaki (九州工業大学), Mingyue Jin (九州工業大学), Takuo Yasunaga (九州工業大学), 「Configurational Interactions of *Chlamydomonas* Three Outer Arm Dynein Heavy Chains」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
46. Junichi Yoshitake (九州工業大学), Kenji Iwasaki (大阪大学), Takuo Yasunaga (九州工業大学) 「Semiautomated analysis of protein structure by the random conical tilting method」, 第 47

回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日

47. Seiya Tsurusaki (九州工業大学), Takuo Yasunaga(九州工業大学), 「Tests of the tomography system using a transmission electron microscope」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
48. Ryuzo Azuma (九州工業大学), Mingyue Jim (九州工業大学), Hiroko Takazaki (九州工業大学), Akito Tominaga (九州工業大学), Hiroaki Fukuchi (九州工業大学), Koki Ohta (九州工業大学), Keita Shirakawa (九州工業大学), Yoshihiro Tsukada (九州工業大学), Seiya Tsurusaki (九州工業大学), Junnichi Yoshitake (九州工業大学), Takuo Yasunaga (九州工業大学), 「Development of Eos: efficient 3D reconstruction of biomolecules from electron micrographs by enabling GPU computing and use of stereoscopic devices」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
49. Kouki Ohta (九州工業大学), Takuo Yasunaga (九州工業大学), 「Protein polymorphism detection using subtomographic maps and structural classification」, 第 47 回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日
50. 高崎寛子(九州工業大学), 劉 中美(東京大学), 神谷 律(東京大学), 安永卓生(九州工業大学), 「3 つの *Chlamydomonas* 外腕ダイニン重鎖の立体配置とその相互作用」, 日本顕微鏡学会九州支部会, 九州工業大学, 北九州市, 2009 年 12 月 6 日
51. 金 明月(九州工業大学), 高崎寛子(九州工業大学), 安永卓生(九州工業大学), 「軸系外腕ダイニンと微小管が複合体を形成する際の仕組み」, 日本顕微鏡学会九州支部会, 九州工業大学, 北九州市, 2009 年 12 月 6 日
52. 我妻竜三(九州工業大学), 金 明月(九州工業大学), 高崎寛子(九州工業大学), 富永彰人(九州工業大学), 福地弘晃(九州工業大学), 大田興希(九州工業大学), 白川圭太(九州工業大学), 塚田祥弘(九州工業大学), 鶴崎聖也(九州工業大学), 吉竹純一(九州工業大学), 安永卓生(九州工業大学), 「Eos プラットフォーム: GPGPU ならびに立体視テクノロジー」, 日本顕微鏡学会九州支部会, 九州工業大学, 北九州市, 2009 年 12 月 6 日
53. 西野有里(理化学研究所), 白石千夏(兵庫県立大学), 宮澤淳夫(兵庫県立大学), 「アセチルコリン受容体のクラスター形成に対するカドミウムの影響」, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 9 日～12 日
54. 岩崎憲治(大阪大学), 安永卓生(九州工業大学), 宮澤淳夫(兵庫県立大学), 「生命現象のための計測分析」, さきがけ・CREST 研究報告会, 品川, 2010 年 1 月 13 日～14 日
55. Miranda, F.F.(横浜市立大学), Iwasaki, K. (大阪大学), Akashi, S. (横浜市立大学), Sumitomo, K. (NTT物性科学基礎研究所), Kobayashi, M.(奈良先端科学技術大学院大学), Yamashita, I. (奈良先端科学技術大学院大学), Tame, J.R.H. (横浜市立大学), Heddle, J.G. (東京工業大学), 「A Self-Assembled Artificial Protein Nanotube」, The 2010 WPI-AIMR Annual Workshop, 仙台エクセル東急・仙台国際センター, 仙台, 2010 年 5 月 25 日～27 日
56. 宮崎直幸(大阪大学), 伊関峰生(総合研究大学院大学), 渡辺正勝(総合研究大学院大学), 足立伸一(高エネルギー加速器研究機構), 朴三用(横浜市立大学), 小林一美(日本電子データム株式会社), 藤吉好則(京都大学), 岩崎憲治(大阪大学), 「非晶質氷切片を使用した極低温電子顕微鏡による *in vivo* 構造解析」, 第 10 回日本蛋白質科学会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010 年 6 月 16 日～18 日
57. 松永幸子(大阪大学), 藤井敬大(大阪大学), 岩崎憲治(大阪大学), 高木淳一(大阪大学), 「Cutinase 融合タンパク質を用いた部位特異的、共有結合的、一段階分子標識法の開発」, 第 10 回日本蛋白質科学会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2010 年 6 月 16 日～18 日
58. 菅野亜美(京都大学), 杉山淳司(京都大学), 岩崎憲治(大阪大学), 今井友也(京都大学), 「電子顕微鏡による GxCesB の構造解析」, セルロース学会第 17 回年次大会, 徳島文理大, 徳島, 2010 年 7 月 15 日～16 日
59. 鶴崎聖也(安永卓生), 安永卓生(九州工業大学), 「電子顕微鏡を用いたトモグラフィー画像解析システムの検証」, 第 48 回日本生物物理学会年会, 東北大学, 仙台, 2010 年 9 月 20 日

～22 日

60. 太田興希(九州工業大学)、高崎寛子(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「少数の傾斜面像からの 3 次元像構築によるタンパク質ポリモルフィズムの検出」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台市、2010 年 9 月 20 日～22 日
61. 金明月(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「軸糸外腕ダイニンが微小管上に整列する際のメカニズム」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010 年 9 月 20 日～22 日
62. 山下理沙(九州工業大学)、中尾亮太(九州工業大学)、坂本寛(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「擬似原子モデル構築のための GUI を持った支援ツールの開発」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010 年 9 月 20 日～22 日
63. 塚田祥弘(九州工業大学)、若林健之(帝京大学)、安永卓生(九州工業大学)、「硬直状態におけるアクチン-ミオシン硬直複合体の三次元構造」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010 年 9 月 20 日～22 日
64. 高崎寛子(九州工業大学)、金明月(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「クラミドモナスの外腕ダイニンが持つ構造特徴」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010 年 9 月 20 日～22 日
65. 日高裕明(九州工業大学)、峰寛(九州工業大学)、伊藤光二(千葉大学)、山本啓一(千葉大学)、安永卓生(九州工業大学)、「クライオ電子顕微鏡法による車軸藻ミオシンの高速移動分子メカニズムの解明」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010 年 9 月 20 日～22 日
66. 渡邊慶太(九州工業大学)、小川佳織(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「小さい生体分子複合体のためのクライオ電子顕微鏡法の挑戦」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010 年 9 月 20 日～22 日
67. Yasuo Okuma(九州工業大学)、Daisuke Kasuya(九州工業大学)、Kaoru Mitsuoka(産業技術総合研究所)、Yasushi Sasaki(東京都臨床研)、Takuo Yasunaga(九州工業大学)、「Single particle analysis of the 26S proteasome by high-resolution electron cryo-microscopy and advanced image analysis」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010 年 9 月 20 日～22 日
68. 吉竹純一(九州工業大学)、岩崎憲治(大阪大学)、安永卓生(九州工業大学)、「ランダムコニカルティルト法によるタンパク質構造解析の半自動化」、第 48 回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台市、2010 年 9 月 20 日～22 日
69. 我妻竜三(九州工業大学)、小屋迫光太郎(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「SIRT システムの開発」、日本顕微鏡学会九州支部総会、九州大学、福岡、2010 年 12 月 4 日
70. 金明月(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「クライオ電子線トモグラフィーを用いた金属標識へのアプローチ」、日本顕微鏡学会九州支部総会、九州大学、福岡、2010 年 12 月 4 日
71. 的場京子(大阪大学)、三原恵美子(大阪大学)、米田晋祐(大阪大学)、岩崎憲治(大阪大学)、高木淳一(大阪大学)、「Wnt 補助受容体 LRP6 の電子顕微鏡による立体構造解析」、第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸ポートアイランド、神戸、2010 年 12 月 7～10 日
72. 我妻竜三(九州工業大学)、小屋迫光太郎(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「SIRT electron tomography system: design & development」、2010 年日本バイオインフォマティクス学会年会、九州大学、福岡、2010 年 12 月 13～15 日
73. 山下理沙(九州工業大学)、新谷優(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)、「ミオシンの UP/DOWN 構造遷移バイアスに関する拘束付き MD 法による検証」、2011 年生体運動合同班会議、大阪市立大学、大阪、2011 年 1 月 7 日～9 日
74. 金明月(九州工業大学)、柳沢晴明(東京大学)、神谷律(東京大学)、安永卓生(九州工業大学)、「金属結合タンパク質を使った鞭毛内でのダイニンサブユニットの可視化への試み」、2011 年生体運動合同班会議、大阪市立大学、大阪、2011 年 1 月 7 日～9 日

75. 今井友也(京都大学)、菅野亜美(京都大学)、杉山淳司(京都大学)、岩崎憲治(大阪大学)、
「セルロース合成酵素複合体における制御サブユニット GxCesB の単粒子構造解析」、日本顕
微鏡学会第67回学術講演会、福岡国際会議場、福岡、2011年5月16日～18日
76. 的場京子(大阪大学)、陣内浩司(九州大学)、安永卓生(九州工業大学)、岩崎憲治(大阪大
学)、「電子線トモグラフィーにおける傾斜角度の実測」、日本顕微鏡学会第67回学術講演会、
福岡国際会議場、福岡、2011年5月16日～18日
77. 宮崎直幸(大阪大学)、Wei Taiyun(中央農研センター)、日比野啓行(中央農研センター)、
一木珠樹(中央農研センター)、大村敏博(中央農研センター)、岩崎憲治(大阪大学)、「クライ
オ電子線トモグラフィー:植物レオウイルスのライフサイクル解明に向けて」、日本顕微鏡学会第
67回学術講演会、福岡国際会議場、福岡、2011年5月16日～18日
78. 宮崎直幸(大阪大学)、Taiyun Wei(中央農研センター)、日比野啓行(中央農研センター)、
一木珠樹(中央農研センター)、大村敏博(中央農研センター)、岩崎憲治(大阪大学)、「クライ
オ電子線トモグラフィーによるイネ萎縮ウイルスの細胞内構造解析」、第11回日本蛋白質科学
会年会、ホテル阪急エキスポパーク、大阪、2011年6月6日～9日
79. 的場京子(大阪大学)、平瀬愛(理化学研究所)、福永優子(兵庫県立大学)、宮崎直幸(大阪
大学)、永井里奈、宮澤淳夫(兵庫県立大学)、岩崎憲治(大阪大学)、「電子顕微鏡による
PSD-95 全体構造の解明」、第11回日本蛋白質科学会年会、ホテル阪急エキスポパーク、大
阪、2011年6月6日～9日
80. 福永優子(兵庫県立大学)、山本悠貴(兵庫県立大学)、桃田菜央(兵庫県立大学)、宮澤淳
夫(兵庫県立大学)、「シナプス外 NMDA 受容体分布の発達性調節」、平成23年度(第4回)兵
庫県立大学シンポジウムー産学公連携による地域の活性化ー神戸市産業振興センター、神戸、
2011年9月13日
81. 石原あゆみ(兵庫県立大学)、齊藤潤一(兵庫県立大学)、福永優子(兵庫県立大学)、宮澤
淳夫(兵庫県立大学)、「培養細胞を用いた神経筋接合部作製法の検討」、平成23年度(第4
回)兵庫県立大学シンポジウムー産学公連携による地域の活性化ー神戸市産業振興センター、
神戸、2011年9月13日
82. 福永優子(兵庫県立大学)、山本悠貴(兵庫県立大学)、桃田菜央(兵庫県立大学)、宮澤淳
夫(兵庫県立大学)、第34回日本神経科学大会、「Distribution pattern of extrasynaptic NMDA
receptors is developmentally regulated:シナプス外 NMDA 受容体の分布様式は発達により調整
される」、パシフィコ横浜、横浜、2011年9月14日～17日
83. 石原あゆみ(兵庫県立大学)、齊藤潤一(兵庫県立大学)、福永優子(兵庫県立大学)、宮澤
淳夫(兵庫県立大学)、第34回日本神経科学大会、「In vitro formation of Neuromuscular
junction with NG108-15 cells and C2C12 cells:NG108-15 細胞と C2C12 筋管細胞を用いた in
vitro 神経筋接合部の作製」、パシフィコ横浜、横浜、2011年9月14日～17日
84. Kazuaki Yoshida(Kyushu Inst. of Tech.), Takuo Yasunaga(Kyushu Inst. of Tech.)、「3D
structure of non full-decorated actomyosin in the rigor state(硬直状態における単一ミオシンが
結合したアクチンフィラメントの三次元構造)」、日本生物物理学会 第49回年会、兵庫県立大
学、姫路、2011年9月16日～18日
85. 山下理沙(九工大)、中尾亮太(九工大)、坂本寛(九工大)、安永卓生(九工大)、電顕微鏡
画像に基づいた制限付き分子動力学法を利用したシトクロム P450 還元酵素・ヘムオキシゲナー
ゼI複合体の原子モデル構築、2011年度日本生物物理学会九州支部会、飯塚、福岡、2011 年
12 月 4 日
86. 金明月(九工大)、柳澤春明(東大)、小屋迫光太郎(九工大)、神谷律(東大)、安永卓生(九
工大)、遺伝的ラベルのクライオ電子線トモグラフィーへの応用、2011年度日本生物物理学会
九州支部会、飯塚、福岡、2011 年 12 月 4 日
87. 荒牧慎二(九工大)、青山一弘(大阪大)、真柳浩太(九大)、安永卓生(九工大)、TEM 及び
STEM を用いたクライオ電子線トモグラフィーによる神経細胞の超微細構造観察、2011年度日
本生物物理学会九州支部会、飯塚、福岡、2011 年 12 月 4 日
88. 吉田一章(九工大)、安永卓生(九工大)、硬直状態における単一ミオシンが結合したアクチン

フィラメントの三次元構造、2011年度日本生物物理学会九州支部会、飯塚、福岡、2011 年 12 月 4 日

89. 我妻竜三(九工大)、安永卓生(九工大)、電子線トモグラフィーに対する超解像3次元再構成アルゴリズム、2011年度日本生物物理学会九州支部会、飯塚、福岡、2011 年 12 月 4 日
90. 上里真史(兵庫県立大学)、福永優子(兵庫県立大学)、宮澤淳夫(兵庫県立大学)、第34回日本分子生物学会、「Analysis of interaction between CaMKII β and different organization of F-actin」、パシフィコ横浜、横浜、2011年12月13日～16日
91. 西野有里(理化学研究所)、長谷川翔(兵庫県立大学)、狩谷悠輔(兵庫県立大学)、宮澤淳夫(兵庫県立大学)、第34回日本分子生物学会、「Correlative light-electron microscopy of acetylcholine receptor clusters」、パシフィコ横浜、横浜、2011年12月13日～16日

(国際会議)

1. Ryosuke Teranishi(Kyushu Institute of Technology), Daisuke Kakihisa(Kyushu Institute of Technology), Hiroshi Fujishima(Kyushu Institute of Technology), Junshi Sakamoto(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Determination of the three-dimensional structure of respiratory chain cytochrome c oxidase by electron cryomicroscopy, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
2. Yoshinori Ohta(Kyushu Institute of Technology), Nobuhisa Umeki(Kyushu Institute of Technology), Eisaku Katayama(Univeristy of Tokyo), Shinsaku Maruta(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Visualization of the ATP Hydrolysis Intermediates of Myosin II by Electron Cryo-microscopy, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
3. Hiroko Takazaki(Kyushu Institute of Technology), Zhongmei Liu(Kyushu Institute of Technology), Ritsu Kamiya(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Localization of Three *Chlamydomonas* Outer Arm Heavy Chains, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
4. Hironori Ueno(Kyushu Institute of Technology), Azumi Yoshimura(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Chikako Shingyoji(Kyushu Institute of Technology), Keiko Hirose(Advanced Insititute of Science and Technology), Structural study of sea urchin outer-arm dynein bound to microtubules, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
5. Shingo Fujiwara(Kyushu Institute of Technology), Yousuke Kano(Kyushu Institute of Technology), Osamu Sato(Kyushu Institute of Technology), Kazuaki Honma(Kyushu Institute of Technology), Reiko Ikebe(Kyushu Institute of Technology), Mitsuo Ikebe(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Analysis of unconventional myosins by spectroscopic electron cryo-microscopy, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
6. Chie Hirai(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Fabrication of freezing apparatus with controlling temperature and humidity for electron cryo-microscopy, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
7. Motoki Imamura(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Development of novel automated determination of contrast transfer function of electron microscopy, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
8. Kazuki Fukae(Kyushu Institute of Technology), Kazuo Sutoh(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Potential structure changes of dynein stalk by molecular dynamics calculation, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
9. Norihiko Yaji(Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga(Kyushu Institute of Technology), Hideyuki Komatsu(Kyushu Institute of Technology), Takao Kodama(Kyushu Institute of Technology), Visualization of domain structure of bacterial glucosyltransferase-I by electron cryo-microscopy, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006

10. Takuo Yasunaga (Kyushu Institute of Technology), Ryo Saito (Kyushu Institute of Technology), Takahide Kon (Kyushu Institute of Technology), Reiko Ohkura (Kyushu Institute of Technology), Masaya Nishiura (Kyushu Institute of Technology), Kazuo Suto (Kyushu Institute of Technology), Three-dimensional structure of dynein elucidated by electron cryo-microscopy, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
11. Ryoko Murayama (Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga (Kyushu Institute of Technology), A novel approach for common line search based on sinogram-line features, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
12. Hirosho Sumikura (Kyushu Institute of Technology), Takuo Yasunaga (Kyushu Institute of Technology), Development of electron microscopic image classification method by integration of principal component analysis with cluster analysis, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
13. Tatsunori Goto (Kyushu Institute of Technology), Rina Nagai (Osaka University), Junichi Takagi (Osaka University), Kenji Iwasaki (Osaka University), Takuo Yasunaga (Kyushu Institute of Technology), Development of GUI-based tools for three dimensional electron tomography, , EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16, 2006
14. Yasunaga (Kyushu Institute of Technology), Analysis of unconventional myosins by spectroscopic electron cryo-microscopy, EABS & BSJ 2006, Nov. 12-16
15. Kenji Iwasaki (Osaka University), Naoyuki Miyazaki (Osaka University), Tomoe Ito (Osaka University) and Junichi Takagi (Osaka University), Structures of the laminin-binding integrins], XXI Congress of the International Union of Crystallography, Osaka, Japan, 23-31 August 2008.
16. Yuri Nishino (RIKEN), Takuo Yasunaga (Kyushu Institute of Technology) and Atsuo Miyazawa (RIKEN), 「A new protein labeling technique using genetically encoded metallothionein tag for electron microscopy」, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Korea, 2-7 November 2008
17. Yuko Fukunaga (RIKEN), Ai Hirase (RIKEN), Hyeji Kim (RIKEN), Natsuko Wada (RIKEN), Yuri Nishino (RIKEN) and Atsuo Miyazawa (RIKEN), Electron microscopic study of Cd-metallothionein-labeled PSD-95 in primary culture of hippocampal neurons, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Korea, 2-7 November 2008
18. Takuo Yasunaga (Kyushu Institute of Technology), Ryuhaku Goto (Kyushu Institute of Technology), Motoki Imamura (Kyushu Institute of Technology), Ayumi Matuura (Kyushu Institute of Technology), Ryoko Murayama (Kyushu Institute of Technology), Hitoshi Niina (Kyushu Institute of Technology), Yusuke Takimoto (Kyushu Institute of Technology), Kenji Iwasaki (Osaka University) and Atsuo Miyazawa (RIKEN), Development of Electron Tomography Systems integrated with our Developed Image Analysis Environment, Eos, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Korea, 2-7 November 2008
19. Atsuo Miyazawa (RIKEN), Yuko Fukunaga (RIKEN), Yuri Nishino (RIKEN), Ai Hirase (RIKEN), Development of a genetically encoded metallothionein tag for electron microscopy, Asia-Pacific Congress on Electron Tomography, Brisbane, Australia, 31 January - 4 February 2009
20. Miyazaki, N. (Osaka University), Iseki, M. (Graduate University for Advanced Studies), Watanabe, M. (Graduate University for Advanced Studies), Hasegawa, K. (AdvanceSoft Corporation), Adachi, S. (High Energy Accelerator Research Organization), Park, S-Y. (Yokohama City University), Kobayashi, K. (JEOL), Fujiyoshi, F. (Kyoto University) and Iwasaki, K. (Osaka University), "Structure of a sensor for photomovement in *Euglena*", The IFSM International Microscopy Congress, IMC17, Rio, BRAZIL, Sep 19-24, 2010
21. Fukunaga, Y. (University of Hyogo), Momota, N. (University of Hyogo), Yamamoto, Y. (University of Hyogo), Ariga, R. (University of Hyogo) and Miyazawa, A. (University of Hyogo), "The distribution of extrasynaptic NMDA receptors in cultured hippocampal neurons", 10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Phuket Island, Thailand, Oct

17-20 2010

22. Akita, F. (NARC), Miyazaki, N. (Osaka University), Hibino, H. (NARC), Shimizu, T. (NARC), Higashiura, A. (Osaka University), Uehara-Ichiki, T. (NARC), Sasaya, T. (NARC), Tsukihara, T. (University of Hyogo), Nakagawa, A. (Osaka University), Iwasaki, K. (Osaka University) and Omura, T. (NARC). Structural and functional insight into viroplasm matrix protein Pns9 of rice gall dwarf virus, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, 6-16 September 2011
23. Miyazaki, N. (Osaka University), Akita, F. (NARC), Nakagawa, A. (Osaka University), Omura, T. (NARC) and Iwasaki, K. (Osaka University), Structural analysis of Rice dwarf virus in vitro and in vivo, International Union of Crystallography XXII Congress and General Assembly, Madrid, Spain, 22-30 August 2011
24. Miyazaki, N. (Osaka University), Symposium Bio-inspired Materials and Functionalities (One of the Osaka University 80th Anniversary Commemorative Events), Hampshire Hotel Plaza, Groningen, Netherland, 21-22 June 2011
25. Mingyue Jin (Kyushu Inst. of Tech.), Haru-aki Yanagisawa (Tokyo Univ.), Kotaro Koyasako (Kyushu Inst. of Tech.), Ritsu Kamiya (Tokyo Univ.), Kouta Mayanagi (Kyushu Univ.) and Takuo Yasunaga (Kyushu Inst. of Tech.), Elucidation of dynein subunits by a genetically encoded metallothionein tag using electron cryo-tomography, 17th IUPAB, Beijing, China, 30 October -3 November 2011
26. Yamashita R. (Kyushu Inst. of Tech.), Nakao R. (Kyushu Inst. of Tech.), Sakamoto H. (Kyushu Inst. of Tech.) and Yasunaga T. (Kyushu Inst. of Tech.) Development of Atomic Modelling Tool for Electron Microscopy, Applying Steered Molecular Dynamics Method, 10th Asia-Pacific Microscopy Conference, Perth, Australia, 6th-9th Feb. 2012
27. Aramaki S. (Kyushu Inst. of Tech.), Aoyama K. (Osaka Univ.), Mayanagi K. (Kyushu Univ.) and Yasunaga T. (Kyushu Inst. of Tech.), 3D Ultrastructure Within Intact Cells Explored By Electron Cryo-Tomography in TEM and STEM, 10th Asia-Pacific Microscopy Conference, Perth, Australia, 6th-9th Feb. 2012
28. Yasunaga T. (Kyushu Inst. of Tech.), Azuma R. (Kyushu Inst. of Tech.), Progress of an Image Analysis Tool, Eos, and its Applications for Cryo-Electron Microscopy, 10th Asia-Pacific Microscopy Conference, Perth, Australia, 6th-9th Feb. 2012

(4)知財出願

①国内出願 (1件)

発明の名称: 電子顕微鏡用標識、発明者: 宮澤淳夫、福永優子、西野有里、
出願人: 独立行政法人理化学研究所、出願日: 2007 年 5 月 16 日、
出願番号: 2007-131007

②海外出願 (0件)

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 講演優秀発表賞

高崎寛子 (九州工業大学)

「3つの Chlamydomonas 外腕ダイニン重鎖の立体配置とその相互作用」

平成 21 年度日本顕微鏡学会九州支部学術講演会、2009 年 12 月 5 日

2. 風戸賞 財団法人風戸研究奨励会、2010年2月20日

宮澤淳夫 (兵庫県立大学)

電子顕微鏡法による膜タンパク質複合体の構造生理学研究

3. ポスター賞

Miyazaki, N. (Osaka University)

Symposium Bio-inspired Materials and Functionalities (One of the Osaka University 80th Anniversary Commemorative Events), Hampshire Hotel Plaza, Groningen, Netherland, 21-22 June 2011

4. ポスター賞

我妻竜三(九州工業大学)、安永卓生(九州工業大学)

「Iterative method for 3D reconstruction of ultrastructures in cryo-electron microscopy」

2011 年日本バイオインフォマティクス学会年会、2011 年 11 月 8～10 日

5. 優秀発表賞

渡邊慶太(九州工業大学)

日本生物物理学会九州支部会、2011 年 12 月 4 日

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 宮澤淳夫(理化学研究所)

日刊工業新聞 2007年 7月 3日

独創研究集団 理研の最前線、「生体分子の構造生理学研究」

2. 福永優子(理化学研究所)

日刊工業新聞 2009年 4月 7日

独創研究集団 理研の最前線、「電子顕微鏡用の遺伝的コード化標識の応用」

3. 安永卓生(九州工業大学)

西日本新聞 2011年10月18日

くらし特報・教育・おじゃまします研究室 「10 億分の1の世界、立体化へ」

③その他

1. 日本顕微鏡学会・展示会場でのブース展示、

岩崎憲治(大阪大学)、「ノートパソコンでできる単粒子解析」、

日本顕微鏡学会第66回学術講演会、名古屋国際会議場、2010年5月23～26日

2. 日本顕微鏡学会生体構造解析分科会と共同で、以下の4件のワークショップを開催した。

2-1. CEMOVIS ワークショップ

日時:2009年6月2日(火)～3日(水)

場所:独立行政法人理化学研究所・播磨研究所(SPring-8 キャンパス)

参加人数:25 名

目的・内容:理化学研究所・播磨研究所に設置されている凍結生物試料作製に関わる装置一式とクライオ電子顕微鏡を用いた実演指導を行い、超薄切片法の中でも最も難易度の高い CEMOVIS の手法とノウハウを紹介した。

2-2. 単粒子解析ワークショップ

日時:2010年6月3日(木)～4日(金)

場所:九州工業大学・情報工学部(福岡県飯塚市)

参加人数:24名

目的・内容:生体高分子・超複合体の三次元構造を解く方法のひとつとして、結晶試料を必要としない単粒子解析法が挙げられる。しかし、電子顕微鏡を使って生物試料等の像を観察しても、なかなか画像処理まではできない、と思う方々も多い。そこで、電子顕微鏡画像処理の基礎と、単粒子解析法に実際に触れてもらった。

2-3. 生体構造トモグラフィーワークショップ

日時:2011年5月19日(木)～20日(金)

場所:九州大学・生体防御医学研究所

参加人数:16名

目的・内容:ミトコンドリア等のオルガネラや多様な構造をとりうる超分子複合体の解析においては、二次元結晶解析や単粒子解析と異なり、同一の形状をした多数の粒子を対象としないため、単一の対象から傾斜シリーズを取得し三次元再構成を行う電子線トモグラフィーが必要となる。近年、電子顕微鏡装置の発達によって、この電子線トモグラフィーは以前より極めて身近な手法となった。しかしながら、未だ電子顕微鏡本体においてトモ

グラフィー機能はオプションとして扱われる事が多く、実際にこの機能に触れ、更には計算機による三次元再構成を行った経験の無い方も多い。そこで、本ワークショップの目的は入門者を対象に、生物試料を用いて電子線トモグラフィーのデータ取得、そして計算機を用いて立体構造の構築を、実際に体験してもらった。

2-4. 凍結切断ワークショップ

日時: 2011年5月23日(月)

場所: 日本電子(株) データム館

参加人数: 15名

目的・内容: 一般的手法ながら未だに進化を続けており、膜タンパク質の分子レベルの解析では非常に重要性が高い凍結切断法を、ここで今一度しっかりと理解し、実際に行ってみることにより、新たな研究の展開と研究領域の裾野の拡大を図ることを目的とした。ワークショップ会場に凍結切断装置と電子顕微鏡を準備し、主に生物系試料を対象として、凍結試料作製から電子顕微鏡観察まで一貫したワークショップとして実施した。

(6)成果展開事例

① 実用化に向けての展開

安永卓生(九州工業大学)

本成果で作成したプログラム「Eos」は研究室 HP(URL://www.yasunaga-lab.bio.kyutech.ac.jp/)にて公開し、マニュアル等を公開すると共に、オープンソース・ソフトウェアとして、SourceForge.jp (<http://sourceforge.jp/projects/eos/>)にて開発を行うと共に、一般に公開している。ワークショップ(2010年5月)で、一部チュートリアルを実施した。

Software Tools For Molecular Microscopy/ General packages としてまとめられた海外のWIKIBOOKSにも、14本の登録のうち、国内唯一のパッケージとして登録されている。URL は下記の通り。

http://en.wikibooks.org/wiki/Software_Tools_For_Molecular_Microscopy/General_packages

開発したソフトウェアに関して、並行して、JSTの「研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム」事業・ソフトウェア開発(調査研究)に採択され、並行して実施した。課題名「電子顕微鏡のための画像処理サーバの構築をめざしたプラットフォーム開発」(H21.10～23.3)

開発したソフトウェアの実用化及びプラットフォーム化に向けて、JSTの「研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム」事業・ソフトウェア開発タイプ【プラットフォーム開発】に採択され、現在実施中。課題名「3次元電子顕微鏡のための画像処理プラットフォームの開発」(H23.10～27.3)

上記の採択に伴い、本格実用化に向け、(株)なうデータ研究所との共同開発を開始した。これ以外にも、(株)マックスネット、(株)システムインフロンティアとの共同研究を実施し、本格実用化への展開を図っている。同様に、国内11研究室(産総研、理研、名古屋大学、東京大学、兵庫県立大学、大阪大学、帝京大学、東北大学、横浜市立大学、大阪市立大学、生理研)に本ソフトウェアを公開もしくは利用してもらい、研究を進めている。海外でも、研究室にソースコードを提供している。

開発したソフトウェアは、国内外の研究室に配付している。本ソフトウェアを用いた研究を通して、国際的にインパクトファクターの高い雑誌に報告され、例えば、アクチンの高分解能構造解析(Cell 誌: Murakami, Yasunaga, et al. 2010)、ダイニンの構造機能連関に関する新モデル提案(ProNAS 誌: Ueno, Yasunaga et al. 2008)、筋肉の制御メカニズムに関する新提案(ProNAS 誌: Murakami et al. 2008)などへと繋がり、実用化ソフトウェアであることが示されている。

§ 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2008年5月3日	大阪大学「銀杏祭」での一般向け講演	大阪大学吹田キャンパス	約 10 名	テーマ「蛋白質を3Dで見よう」
2008年10月24日	高校・出前講義	福岡県立東筑高校	約 40 名	模擬授業の実施
2009年6月2～3日	CEMOVIS ワークショップ	(独)理化学研究所播磨研究所	25 名	日本顕微鏡学会と共同開催。宮澤グループの研究実施場所にて開催、本 CREST チームメンバーが指導に当たった。
2009年7月28日	高校・出前講義	鹿児島県立加世田高校	約 25 名	模擬授業の実施
2009年8月20日	高校・出前講義	福岡県立青豊高校	約 25 名	模擬授業の実施
2009年8月20日	高校・出前講義	愛媛県立今治南高校	約 40 名	模擬授業の実施
2010年1月4～7日	China-Japan 3D-EM Forum 2010	中国科学院生物物理学研究所	74 名	中国科学院生物物理学研究所、日本顕微鏡学会と共同開催。本 CREST チームメンバーが中心となって企画し、参加、発表した。
2010年6月3～4日	単粒子解析ワークショップ	九州工業大学情報工学部	24 名	日本顕微鏡学会と共同開催。安永グループの研究実施場所にて開催、本 CREST チームメンバーが指導に当たった。
2010年7月3日	高校・出前講義	熊本県立第2高等学校	約 25 名	模擬授業の実施
2010年7月8日	高校・出前講義	福岡県立稲築志耕館高校	約 25 名	模擬授業の実施
2010年8月27日	中学校・出前講義	福岡女学院中学校	約 90 名	中学3年生対象・模擬授業の実施
2010年10月22日	高校・出前講義	福岡県立東筑高校	約 25 名	模擬授業の実施
2010年10月29日	高校・出前講義	熊本県立東陵高校	約 40 名	模擬授業の実施
2010年11月22日	高校・出前講義	愛媛県立今治北高校	約 40 名	模擬授業の実施
2011年3月15日-16日	中学生・体験学習	九州工業大学	4 名	職場体験・研究(画像処理、電子顕微鏡による研究) 幸袋中学校

2011年5月3日	大阪大学「银杏祭」での一般向け講演	大阪大学吹田キャンパス		テーマ「立体写真を自分でつくろう」
2011年5月19～20日	生体構造トモグラフィワークショップ	九州大学生体防御医学研究所	16名	日本顕微鏡学会と共同開催。本CRESTチームメンバーが指導に当たった。
2011年5月23日	凍結切断ワークショップ	日本電子(株)データム館	15名	日本顕微鏡学会および日本電子(株)と共同開催。本CRESTチームメンバーが指導に当たった。
2011年7月7日	高校・出前講義	熊本県立熊本北高校	約30名	模擬授業の実施
2011年8月12日	高校教員対象研修会「情報工学の最先端技術と高校教科との関わり」	九州工業大学	約40名	体験学習・電子顕微鏡を使った演習 「生命のつくりだすかたちを観るー情報と高校理科との関わりー」
2011年8月24日	中学・情報工学体験学習	九州工業大学	約40名	体験学習・電子顕微鏡を使った演習・九州国際大・附属中学
2011年9月13日	中学・情報工学体験学習	九州工業大学	約30名	体験学習・電子顕微鏡を使った演習・飯塚市立第三中学校
2011年10月19日	高校・出前講義	福岡県立城南高校	約50名	模擬授業の実施
2011年10月21日	高校・出前講義	熊本市立必由館高校	約30名	模擬授業の実施
2011年11月2日	高校・出前講義	福岡県立新宮高校	約25名	模擬授業の実施
2011年11月16日	高校・SSHへの貢献	九州工業大学	約40名	SSHにおける講義・及び演習(電子顕微鏡を用いた学修／演習)・福岡県立嘉穂高校
2012年1月12～13日	Joint Seminar with the Japanese Society of Microscopy	シンガポール国立大学	25名	シンガポール国立大学、日本顕微鏡学会と共同開催。本CRESTチームメンバーが中心となって企画し、参加、発表した。
2012年2月11日	高校・出前講義	長崎県立西陵高校	80名	模擬授業の実施
2012年2月17日	高校・出前講義	愛媛県立今治西高校	160名	模擬授業の実施
2012年3月7-8日	中学生・体験学習	九州工業大学情報工学部	4名	電子顕微鏡と画像処理に関する体験(2日間)、職場体験の一環

2012 年 3 月 16 日	高校での特別授業	山口県立徳 山高等学校	101 名	大学模擬授業を2コマ行った。
--------------------	----------	----------------	-------	----------------

§ 7 結び

本研究の開始にあたり私たちは、電子顕微鏡観察における分子標識法の開発を目指す本研究において、また電子線トモグラフィーの一般への普及を念頭におくのであれば、真面目に根本的に電子顕微鏡のアーキテクチャを考え直し、電子顕微鏡をすべて設計し直す必要があると考えました。しかし、真空技術や高圧技術など種々の技術が高度に集積した装置である電子顕微鏡は、GFP の 1 分子蛍光観察を行う全反射顕微鏡のように測定装置を一から組み立てるという研究スタイルをとることは非常に困難です。これには多くのノウハウを持つ企業との共同研究が必須であること、また我々の力不足もあるが人的資源が十分でないことなどが理由として挙げられます。そこで本研究では、研究代表者および主たる共同研究者が保有する電子顕微鏡をベースにして、本研究開発を行う計画としました。その後、日本のお家芸と言われ続けてきた電子顕微鏡ですが、電子線トモグラフィー、さらにはクライオ電子線トモグラフィーに非常に特化した高性能な電子顕微鏡が、海外のメーカー (FEI 社) により開発されました。現在、世界中の電子線トモグラフィーを実施する研究施設に導入されており、特に中国、東南アジア諸国での普及率は非常に高く、国産メーカーにおいては同種の電子顕微鏡の開発を諦めたかの様相です。こうした状況下で、大阪大学には FEI 社製の Titan、さらに九州大学にも同じく FEI 社製の Polara が、それぞれ導入されました。これは期せずして、本研究の目指した電子顕微鏡分野の将来は電子線トモグラフィーへの発展にあるという考えに沿った形で、外部環境の整備が、我々の思案を超えて進んだ結果とも言えると思います。さらに幸運なことは、本研究の共同研究者等が、それぞれ大阪大学と九州大学に導入された最新の電子顕微鏡を使用できる状況になったことです。その結果、本研究で開発してきた標識・観察・解析システムを生かし、当初からの目標である生物分子トモグラフィーを行う環境が整うことになりました。今後、日本国内にも電子線トモグラフィー研究が普及し、発展していく中で、本研究により私たちが開発した技術が役立つに違いないと自負しています。(宮澤)

本 CREST 事業を通じて、阪大岡田特任研究員のクライオ電子線トモグラフィーや CEMOIVS の立ち上げ、続く阪大宮崎特任研究員の、CEMOVIS の工夫と CEMOVIS のクライオ電子線トモグラフィー、光-電子相関顕微鏡の開発、高精細クライオ電子線トモグラフィーの取得等、本邦初の結果が、若いポストドクの手によって、しかも、海外での手習いでなく、自分たちの力で得られたことは、次世代リーダーの育成に役だったといえるかもしれない。また、岡田特任研究員は、出産というライフイベントを挟んで研究を行い、的場特任研究員も二児の母として、男女共同参画事業の援助を受けて、研究ができたことは、家庭をもつ女性研究者の参画の機会を広げたといえる。最も、評価すべきは、以下の点である。現在当たり前のように言われているクライオ電子線トモグラフィーも、本計画が始まった時には、果たして本当に可能なのか、真の意味で挑戦であった。CEMOVIS に至っては、当初計画時は、見当もつかない方法であった。それが、こうした方法が再現性よく、安定して行えるようになり、電子顕微鏡イメージングの新世代技術として定着しつつあることは、本領域に採用して頂いた成果であることは間違いない。世界一の結果を出すことは、CREST の目標であり、そのための姿勢は、今後も持ち続けるが、とてつもなく欧米に遅れをとっていた細胞の電子顕微鏡観察において、自力でここまで達したのは、評価されるべきだと考える。(岩崎)

トモグラフィー撮影が可能な電子顕微鏡法を目指し、研究を開始した。分子標識の可視化等に係わる画像処理、及び、高密度として十分に可視化できる観察条件等を見出し、実際に金属標識が可視化できたことは本 CREST の成果として評価すべき事だと考える。また、実際に鞭毛・軸糸などでの in situ で、金属標識を可視化できたことは、生物の機能・構造連関の解明に対して大きな一歩となったと考える。また、情報工学・科学の観点から、3次元再構成法という技術要素を洗い出し直せたことも意義深い。これは、本 CREST 研究において、若手情報科学者の参加(雇用)を得ら

れたことが大きい。過去から現在にいたる他分野での三次元再構成法を網羅的に洗い出す事ができ、また、並列処理、GPGPU などの最先端の高速処理等にも評価でき、端緒を得るに至った。力足らず、現時点で、電子顕微鏡画像へのインプリメントが十分ではないが、本研究で得られた成果は、日本顕微鏡学会、バイオインフォマティクス学会、生物物理学会等で発表し、他分野の研究者との連携を図る方向で進んでいる。数理科学、情報科学の研究者と実用を念頭においたユーザとの間の乖離を埋める作業が今後必要である。さらに、本 CREST の予算により購入した電子顕微鏡、及び期を一にして、当該大学のバイオイメージング施設、九州大学等にトモグラフィー用電子顕微鏡の設置が相次ぎ、実際に電子顕微鏡を用いて、国産2社、海外1社に関して、クライオトモグラフィー撮影を実施する際の問題点を明確化できたことは本 CREST 研究の成果であり、意義深い。3社の比較ができる環境を本予算も含めて得られたことに感謝する。当初、国産機でのトモグラフィー撮影ソフトウェアの評価、及び、開発を進めたが、ハードウェアである電子顕微鏡がクライオ電子線トモグラフィー撮影に向かない点があることが明確となった。これは、クライオ電子線トモグラフィーという明確な目標をもつシステムとして、電子顕微鏡アーキテクチャが組まれていないためである。個々の要素技術としては国産機が優れていることは数多くあるが、システム設計の点で、国産の電子顕微鏡が劣っている。一方で、海外メーカの場合にも、クライオ電子線トモグラフィーという点では機能を果たしているが、本研究が目指した分子レベルの開発という点では、不十分といえる。もっと、SN 比を改善し、安定した、高速撮影ができる電子顕微鏡開発が、ソフトウェアの開発と相まって、電子顕微鏡アーキテクチャを考え直す必要が今後必要といえる。

電子顕微鏡システムの開発は、システムの高度化故に非常に予算がかかる研究であり、本 CREST 研究の予算規模でも困難である、また、個別の要素技術ではなく、アーキテクチャとしてシステム構築することが必須である。このままでは、本分野での活用は海外メーカのものに置き換えられることを危惧している。今後、開発をする際の参考にのために下記に記しておく。我々出なくとも、今後、どこかで国産メーカが本格的に開発することを期待する。

【電子線トモグラフィーを目的とした電子顕微鏡アーキテクチャ】

試料ステージ(ホルダー等)：完全にコンピュータ制御可能で有る試料ステージが必須である。制御可能とは、5軸(可能であれば、6軸(平行移動と回転))の情報が、画像によらず、完全に測定し、フィードバックできること。稼働領域としては角度として ± 70 度以上、平行移動として $\pm 1\text{mm}$ 以上、精度は角度として 0.1 度以下、平行移動として 100nm 以下であることが望ましい。かつ、 10 度/秒程度の角速度で回転することが望ましい。全てのステージ制御は外部から制御可能であること。(この点が最も国産機と海外機の違いである)。

可能であれば、冷媒によらない温度制御(液体ヘリウム温度～液体窒素温度において可変)が可能であること。

電子レンズ等：ヒステリシスを小さくするために、対物レンズのレンズ電流の変化をなくし、かつ、数百倍から10万倍程度の倍率に対応できること(ミニレンズの使用等が解のひとつである。国産1社採用)。集束レンズ及びビームシフトコイル等によるヒステリシスをできるだけ小さくなる様に補正コイルを配置すること。特に、クライオ撮影に必須のイメージシフトに伴うビームシフトを補正する特別なコイル等を用意すること(国産1社、海外1社には存在)。全ての電子線制御は外部から外部ソフトウェアを使ってせいぎょできること。(この点も海外機との大きな違いである)

電子分光：電子顕微鏡に内蔵されたエネルギーフィルタ装置が設置されていること(国産2社)。

電子銃：照射角が 0.02mrad 以下の冷電界放出銃を備えること(国産2社)、もしくは、安定した位相板を用い、照射レンズを3段以上備えること。

測定器：1電子毎に $20\mu\text{m}$ の分解能(サンプリングは $10\mu\text{m}$ 以下)で、 $50\text{mm} \times 50\text{mm}$ の範囲が観察できること。CCD もしくは Direct Counting が候補である。

試料グリッド：ナノ成形技術(LSI 成形技術)等を用いて、トモグラフィー撮影に適したグリッド(試料支持)が可能であり、かつ、その位置が低倍においても認識できること。以上。(安永)

チームミーティング集合写真、2010年10月14日、理化学研究所播磨研究所



チームミーティングにて、2011年11月9日、大阪大学

