様式 C-7-2

自己評価報告書

平成２３年　５月２０日現在

機関番号：８２６２６
研究種目：基盤研究（Ｂ）
研究期間：2008～2011
課題番号：２０３００１０７
研究課題名（和文）　電子顕微鏡画像を用いたタンパク質構造変化の自動解析技術の開発

研究課題名（英文）　Development of an automatic analysis system at the protein-structural mobility using the electron microscope

研究代表者
小椋 俊彦（OGURA TOSHIHIKO）
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：７０３７１０２８

研究分野：ナノバイオ工学
科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学
キーワード：電子顕微鏡、画像情報処理、生物サンプル、３次元構造､タンパク質

１．研究計画の概要

本研究は電子顕微鏡によりタンパク質を撮影し、この画像情報より３次元構造を構築する単粒子構造解析法の新しいアルゴリズムや画像取得システムに関する開発を行う。タンパク質は、構造を変化させることで機能しているため、3 次元的な構造変化を捉えることは極めて重要となる。本提案は、新たな画像情報処理アルゴリズムや新規の低ダメージ高コントラスト検出技術を開発することで、タンパク質の３次元構造の変化を簡便にかつ自動的に解析することを目的とする。さらに、本提案により開発したアルゴリズムを並列分散化し、解析速度を向上させることで、多くのタンパク質の構造変化と機能の解明を進める。新規の低ダメージ高コントラスト観察手法は、走査型電顕内に設置し、より高感度・高速の検出素子を使用することで、低電子線量で、かつ高速の観察を可能とする。これに加えて、サンプルを支持するサンプルホルダーを改良することで、より低ダメージでの解析を可能とする。

２．研究の進捗状況

(1)　構造変化画像の自動解析アルゴリズムの開発を進め、Simulated-Annealing アルゴリズムを応用した新たな方法を開発した。これにより、構造変化を伴うサンプルの３次元構造解析をより高精度かつ高速に行うことが可能となった。この計算アルゴリズムを並列分散化し、クラスターPC により計算可能なように改良を進め、従来よりも８倍以上の高速化を達成した。今回開発した計算アルゴリズムをタンパク質の電顕画像に用いることで、これまで以上の高速処理が可能となった。これに加えて、複数のステートを有するタンパク質画像の新たな解析方法として、Simulated-Annealing を用いて、各平均画像にそれぞれのステートを割り当てる方法を開発した。この方法を用いることで、自動的に様々な構造変化のクラス平均画像が生成されるため、この平均画像よりそれぞれの３次元構造を独立に求めることを可能とした。

(2)　細胞内の酸化ストレス防御機構に関与する Keap1 タンパク質の構造解析を行い、その機能解明を進めた。この解析では、透過型電子顕微鏡により Keap1 タンパク質の画像を撮像し、この画像情報より、これまで当研究室で開発した画像情報の解析処理技術を総動員することで、完全な非対称タンパク質である Keap1 の３次元構造を解明した。この結果は、アメリカの学術誌である米国科学アカデミー紀要に掲載された。

(3)　走査型電子顕微鏡を用いた新たな生物サンプルの観察手法を開発した。この目的のためにマグネトロンスパッタ装置の購入を行い、生物試料による実験を進めた。この方法では、水溶液中の生物サンプルを染色する事無く観察することが可能である。そのため、水溶液中での生物サンプルの構造変化を捉えることも将来的には可能になると予想される。さらに、電子線によるダメージも極めて少なく、画像のコントラストも高くできるため、今後の生物観察手法として極めて有望であると考えられる。こうした結果は３本の査読有り学術誌に掲載された。

３．現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

当初の計画よりやや早いペースで目標が達成されている。これまでのアルゴリズム開発やこれを用いたタンパク質の構造解析で

は、アルゴリズム開発が順調に進展することで、これを応用したタンパク質の３次元構造解析の結果を論文として発表した。さらに、より高コントラストで低ダメージの画像取得システムに関しては、新規の素子やデータ取得システムを開発することで、当初の目的を達成することができた。この成果は、数本の学術論文として発表した。

４．今後の研究の推進方策

(1) タンパク質の自動構造分離アルゴリズムの高精度化を進め、多数の構造変化に対応するよりロバストなシステムの開発を進める。さらに、この今回新規に開発するアルゴリズムでは、このクラス間ネットワークの情報に3次元構造情報を結びつける予定である。具体的には、クラス間ネットワークの構造から3次元構造情報の差異を予測し、それぞれの3次元構造に再度分類し直す。こうした情報を自動3次元構造構築アルゴリズムに取り入れることで、それぞれの3次元構造の最適化を進める。さらに、こうした情報をSimulated Annealing を用いた３次元構造解析法に取り入れることで、３次元角度推定の精度向上を図る。また、SAによる3次元角度推定アルゴリズムにも、複数の3次元構造を同時に分離しながら再構築するよう改良を加える。

(2) 電子顕微鏡により撮影する生物サンプル画像の SN 比をより向上させるため、複数の検出素子からなる新規の高感度検出システムを開発し走査電子顕微鏡内に設置する。これにより、生物サンプルの画像ノイズをこれまで以上に低減させ、構造変化のあるタンパク質粒子画像の分類や加算平均等の画像情報処理を容易にする。さらに、生物サンプルにカーボンや金属のコートを行い、電子線のダメージの低下と導電性の付加、コントラストの向上を行う手法を開発する。その目的で様々な金属のスパッターターゲットを購入する予定である。こうしたシステムにより、これまで透過型電子顕微鏡によるタンパク質画像で解析を進めていたが、これを走査型電子顕微鏡による画像でも行えるよう新たな処理システムの開発を進める。

５． 代表的な研究成果

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計６件）

① Toshihiko Ogura, High-resolution x-ray observation of unstained samples by a newly developed SGXM, Nanotechnology 21, 295501 (7 pagees) (2011) 査読有り

② Toshihiko Ogura, Kit I. Tong, Kazuhiro Mio, Yuusuke Maruyama, Hirofumi Kurokawa, Chikara Sato, Masayuki Yamamoto, Keap1 is a forked-stem dimmer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 2842-2847 (2010) 査読有り

③ Toshihiko Ogura, Direct observation of unstained wet biological samples by scanning-electron generation X-ray microscopy, Biochem. Biophys. Res. Commun, 391, 198-202 (2010) 査読有り

④ Toshihiko Ogura, Measurement of the unstained biological sample by a novel scanning electron generation X-ray microscope based on SEM, Biochem. Biophys. Res. Commun., 385, 624-629 (2009) 査読有り

⑤ Toshihiko Ogura, A high contrast method of unstained biological samples under a thin carbon film by scanning electron microscopy, Biochem. Biophys. Res. Commun., 380, 254-259 (2008) 査読有り