

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310079

研究課題名（和文）アモルファス氷層技術と相関顕微鏡法の改良による生体材料の分子分解能観察

研究課題名（英文）Development of vitreous ice technique and correlative microscopy to observe biological specimens at a molecular resolution

研究代表者

岩崎 憲治（KENJI IWASAKI）

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：20342751

研究成果の概要（和文）：電子線トモグラフィーのための傾斜像取得時、傾斜角センサを使用した傾斜角の実測をすれば、最も広く使われているマーカー法によって得られる角度と同等の精度で傾斜角が得られることを示した。これにより、アモルファス氷層試料のように十分な数のマーカーが使用できない場合も電子線トモグラフィーの再構成計算を行う上で有効な手段が増えた。

研究成果の概要（英文）：We attempted to gage the tilt angle using a capacitive liquid-based inclinometer when the projection images for tomographic reconstruction were acquired. As a result, the tilt angle measured has the same accuracy as those obtained by the marker-based alignment, which is most popular alignment method in tomography. When the enough fiducial markers are not available in the projection images, measuring the tilt angle will be the useful method to obtain the better tomogram.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2012年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：電子線トモグラフィー、相関顕微鏡法、CEMOVIS

## 1. 研究開始当初の背景

サブナノスケールからサブミリスケールまでにわたる生物試料の観察には、(1)光学顕微鏡技術の発達によるサブミクロンでの細胞観察、(2)電子顕微鏡によるオルガネラ等の微形態の観察、さらには(3)X線結晶構造解析による原子構造の観察の3つが主に使われてきた。これら異なるスケールの情報間には大きなギャップがある。それをつなぐものと

して期待されてきたのが、透過型電子顕微鏡であった。特にそこには、点としての分解能ではなく、分子形状を明らかにできる分解能をもっているという特徴が関係している。アモルファス氷層に試料を固定すれば、水和したままの天然に近い状態の構造を、染色剤でなく、生物試料そのものの位相コントラストとしてとらえることができるためより一層の高分解能観察が期待できる。一方で電子顕

微鏡の欠点であるラベル技術については、光学顕微鏡の分野が抜きんでており、ここから得られた画像との相関をとることで、補うことができる。細胞・組織における高次構造観察が新しい構造生物学として捉えられており、このような技術の進展が望まれていた。

## 2. 研究の目的

当研究の第一目的は、我々が日本で初めて報告を行ったクライオ電子線トモグラフィー、アモルファス氷層切片作製技術を使用して、「in situ 分子分解能電子顕微鏡イメージング」を実現し、“見えるものを見る”から“見たいものを見る”ことへの転換をはかることである。電子顕微鏡での生体試料の観察は、組織・切片ならば、オルガネラ等の微形態の可視化を指し、精製蛋白質ならば、ナノメートルのオーダーの三次元再構成を指すのが一般的である。しかし、我々が目指しているのは生物材料、すなわち実際の細胞・組織における分子の形の可視化である。さらには、第二目標としてクライオ技術を使用しての電子線-蛍光イメージングによる相関顕微鏡法の確立をあげる。これも現在報告準備中の成果を踏まえ、分子分解能での観察を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 傾斜角厳密測定への取り組み

液体の静電容量の変化を読み取ることによって角度を読み込む装置を購入し、本学共同利用施設の電子顕微鏡に取り付ける。どのメーカーも電子顕微鏡本体に付属の傾斜表示もしくは、目盛りを用意しているが、これらは、ギアのバックラッシュを考慮したのではなく、そのうえ精度が悪く解析には全く使えない。シリアル通信により傾斜角を読み取り、実測を行う。同時に撮影した傾斜像シリーズの画像解析から得られる角度と比較する。この際に使用する解析ソフトウェアは、コロラド大学の「IMOD」と日本電子システムテクノロジーズの「Tomography」である。当研究室だけでなく、当部局には電子顕微鏡がないため、共同利用施設のものを使用する。そのため、改造は限られているが、それでも使用可能な測定装置を京都工繊大の陣内博士より教授して頂いている。ゴニオメーターの評価測定には、この傾斜角測定装置に付属のソフトを始めは使用する。ホルダーを回転傾斜可能なものに変えて、同様な測定を行う。このホルダーは、既に本学共同利用施設にあり経験済みである。付属のソフトウェアでは、解析プログラムへの即時取り込み等が困難であるので、直接RS232Cから信号を読み取り、適切なフォーマットで書き出すプログラムを書く。

(2) フォーカス量による倍率誤差の評価とレンズ電流値取り込みによる解析プログラ

ムの作製

レンズ電流に依存した画像の回転、倍率変動を評価し、それらに基づいた画像補整プログラムを開発する。

### (3) トモグラム評価基準の考案

本方法の遂行は課題進行中に出てきたテーマである。(1)や(2)の方法により、トモグラムの品質を改善しても、現在トモグラムの評価基準が存在しないために、定量的な評価ができない。そこで、生物試料の電子線トモグラフィー撮影では、必ず使用するマーカーを使用してトモグラムの精度を評価するプログラムを開発する。

### (4) (1) - (3) を使用した光-電子相関顕微鏡観察

(1)および(2)を使用してアモルファス氷層に固定した試料から精度の高いトモグラムを作製し、蛍光顕微鏡観察により相関をとる。

## 4. 研究成果

### (1) 傾斜角厳密測定への取り組み

試料傾斜は、電子顕微鏡用カメラを制御するソフトを通して、通信によって電子顕微鏡本体のシステムを制御して行った。この際に入力する傾斜角をインプット角と名付けて理想値とし、その値からのずれを評価した。一つは、実測値からのずれである。ゴニオメータに工作して取り付けた高精度の測定器からの読み取り値とインプット角のずれを計算した。また、試料上に付着させた金コロイド粒子を使用して、撮影画像自身から計算した傾斜角との比較も行った。これは、現在電子線トモグラフィーを生物試料で行う上で最も広く一般的に使われている方法である。この傾斜角算出方法で最も精度が悪い場合として、金コロイド粒子を3つだけ使用して角度を算出し、精度が高い場合として、100個を使用して角度を求めた。最後に金コロイド粒子のようなマーカーが利用できない場合に使用されているマーカーフリーアライメント方法によって角度を算出した。これら実測値を含む4種類の傾斜角とインプット角との差をインプット角に対してプロットし、その評価を行った。理想値からのずれは、どの場合も全体として約40度の周期をもった振動を示した。試料ホルダーを変えても同様な傾向が見られた。統計学的解析によりこれらの値には有意な差が存在しないことがわかった。よって、アモルファス氷層試料のように、十分なマーカーを取得画像中に得るのが困難な場合においても、実測により、撮影画像に影響されず解析ができることが示唆された。

(2) フォーカス量による倍率誤差の評価とレンズ電流値取り込みによる解析プログラ

ムの作製

フォーカスの変化量に応じた倍率変動の評価測定では、表示倍率8万倍（取得画像では、0.22nm/pixに相当）にて-60度から+60度まで試料を傾斜させながらフォーカスを調整したところ、20マイクロメートルのフォーカス変化量が傾斜像シリーズ取得中にあり、これにより約4%程度の倍率変動が起きたことが判明していたが、倍率の見積が撮影画像に依存しているため、つまり、試料そのものに依存しているため、正確な見積方法や、測定時の条件の統一等、再現性に問題があり、信頼ある結果を得るための実験の実現に難航した。よって、電流値に応じた再現性のある倍率変動のテーブルを作製し、それによって、画像のピクセルサイズを調整するという当初計画していたプログラムの作製まで至らなかった。

### (3) トモグラム評価基準の考案

金コロイド粒子のトモグラム中のスライス像が、傾斜像のアライメント精度に応じて変形することを利用して評価基準のプログラム作成に取り組んだ。

### (4) (1) - (3) を使用した光-電子相関顕微鏡観察

アモルファス氷層試料の観察への取り組みとして、まずはCOS細胞を用いて実験を開始した。細胞の培養状態を保持したままの相関観察は、光学顕微鏡による観察と電子顕微鏡による観察の間にラグタイムがあり、非常に難しいことが、当初予想していた以上であることがわかった。相関実験の当初からアモルファス氷層を用いた観察を行うよりも、弱蛍光だが、蛍光を保持する新しい樹脂包埋方法を使用する方がその操作方法からも、効率的であるという考えに至った。結果的に(3)の評価基準作製への取り組みに時間がかかり、十分な相関観察までは完了できなかった。

### 5. 主な発表論文等

(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1件)

1. Matoba, K., Takagi, J., Yasunaga, T., Jinnai, H. and Iwasaki, K. (2012) Tilt-angle measurement of a sample stage using a capacitive liquid-based inclinometer. J. E. M., 61, 193-198. (DOI:10.1093/jmicro/dfs034). (査読有)

[学会発表] (22件)

1. 岩崎憲治, 「分子分解能電顕イメージング」, 第二回バイオイメージングセミナー, 九州工業大学大学院情報工学研究院,

飯塚キャンパス, Mar 18, 2013.

2. Atsushi Matsumoto, Junichi Takagi, Kenji Iwasaki. "Superimposition of a crystal structure over EM images", Structural Analysis of Supramolecular Assemblies by Hybrid Methods, KeyStone Symposia Conference, Granlibakken Resort, Tahoe City, California, USA, Mar 3-7, 2013.
3. Atsushi Matsumoto, Kenji Iwasaki, Junichi Takagi. "Atomic model building from low resolution electron microscope images of integrin", Biophysical Society, 57th Annual Meeting, Philadelphia, USA, Feb 2-6, 2013.
4. Iwasaki, K. "In situ molecular analysis by electron microscopy", IPR International Symposium 2012, -Toward the Molecular Comprehension of Life System-, Senri Hankyu Hotel, Nov 22, 2012.
5. 岩崎憲治, 宮崎直幸, 伊関峰生, 長谷川浩司, 成田哲博, 足立伸一, 渡辺正勝, 「ミドリムシ光センサー器官の細胞内構造」電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用 -高次元機能イメージングの最先端-, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, Oct 24-25, 2012.
6. 岩崎憲治, 宮崎直幸, 伊関峰生, 長谷川浩司, 成田哲博, 足立伸一, 渡辺正勝, 「ミドリムシ光センサー器官の細胞内構造」電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用 -高次元機能イメージングの最先端-, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, Oct 24-25, 2012.
7. Naoyuki Miyazaki, Mineo Iseki, Koji Hasegawa, Akihiro Narita, Shinichi Adachi, Masakatsu Watanabe and Kenji Iwasaki. 「精製タンパク質の構造から in situ の構造まで: 電顕を使用して」, 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋大学, Sep 22-24, 2012.
8. Kenji Iwasaki. 「EM imaging techniques toward molecular resolution within cellular context.」, 沖縄科学技術大学院大学, Jly 4, 2012.
9. 岩崎憲治. 「電顕イメージング: 単粒子解析からCEMOVISまで」, ワークショップ「高分解能電子顕微鏡イメージング法の生物試料への応用」, 奈良先端大学院大学, バイオサイエンス研究科・大講義室, 生駒, Jly 2, 2012.
10. 的場京子, 三原恵美子, Samuel

- Thompson, 岩崎憲治, 高木淳一. 「Wnt 共受容体 LRP6 の電子顕微鏡単粒子解析」, 第 12 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 名古屋, Jun 20-22, 2012.
- 1 1. 岩崎憲治, 宮崎直幸, 伊藤喜子, 的場京子. 「CEMOVIS の実際」日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会, つくば国際会議場, つくば, May 14-16, 2012.
  - 1 2. 岩崎憲治. 「クライオ電子線トモグラフィと CEMOVIS による水和試料の高分解能観察」, 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 山梨大学甲府キャンパス, 甲府, Mar 26-28, 2012.
  - 1 3. Iwasaki, K. “Visualizing the viral life cycle with EM imaging techniques”, Joint Seminar Center for BioImaging Sciences-Structural biology division of Japan EM, National Singapore University, Singapore, Jan 12-13, 2012.
  - 1 4. Iwasaki, K. “Electron microscopy imaging: from cryo-EM to CLEM”, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, Dec 21, 2011.
  - 1 5. 岩崎憲治. 「分子分解能観察を目指した電子顕微鏡イメージング法」, 超高压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, 阪大吹田キャンパス, Nov 22, 2011.
  - 1 6. 岩崎憲治. 「電子線トモグラフィ法による細胞内超分子構造の可視化」, 包括脳ネットワーク研究会・蛋白研セミナー共催セミナー/第 2 回 神経科学と構造生物学の融合, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, Nov 21-22, 2011.
  - 1 7. 岩崎憲治. 宮崎直幸, 的場京子. 「分子分解能電子顕微鏡イメージング」, 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, Nov 14, 2011.
  - 1 8. 岩崎憲治. 「水和した細胞の電子顕微鏡観察」, 第 49 回生物物理学会年会, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス, 姫路, Sep 16-18, 2011.
  - 1 9. Iwasaki, K., Miyazaki, N. and Omura, T. 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 Jun 21-22, 2011.
  - 2 0. Iwasaki, K. 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 Oct 25, 2010.
  - 2 1. 岩崎憲治. 「電子顕微鏡イメージング—細胞・組織における分子分解能観察を目指して—」, 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 2 0 4 号室, Sep 29, 2010.
  - 2 2. 岩崎憲治. 「電子顕微鏡イメージング—細胞・組織における分子分解能観察を目指して—」, 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—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, Sep 17, 2010.
- 〔その他〕  
ホームページ等  
なし
6. 研究組織
  - (1) 研究代表者  
岩崎 憲治 (KENJI IWASAKI)  
大阪大学・蛋白質研究所・准教授  
研究者番号: 20342751
  - (2) 研究分担者  
なし
  - (3) 連携研究者  
高木 淳一 (TAKAGI JUNICHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号: 90212000