

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657104

研究課題名(和文) グラフェンを用いた革新的超高分解能低温電子顕微鏡法の開発

研究課題名(英文) Technical development for high-resolution electron cryomicroscopy by utilizing graphene as a specimen substrate

研究代表者

難波 啓一 (NAMBA, KEIICHI)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：30346142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：試料グリッドの多孔カーボン薄膜上に単原子層グラフェンシートを載せ、その表面に生体分子を吸着させることで、氷薄膜の厚さ制御と同時に膜タンパク質複合体の効率的な画像データ収集を可能にする技術の確立を目指したが、作成委託したグラフェンシート搭載グリッドは小さなフレークが重なり合い使い勝手の大変悪いものであったため、大面積単層グラフェンシートを独自に作成する必要性が生じた。とりあえず代替案として、独自作成の極薄カーボン膜を多孔カーボン薄膜グリッド上に搭載し、赤痢菌ニードル複合体の像を収集し、解像度の高いクラス平均像を得た。

研究成果の概要(英文)：We tried to use a graphene sheet on a holey carbon grid as a specimen substrate for electron microscopy to develop a method to control the thickness of vitreous ice film in which frozen-hydrated particles of protein complexes are embedded. The specimen grids produced and provided by a company upon our specific request, however, were not really useful because many flakes of graphene were piled up to one another. We therefore made ultra thin carbon sheets as a temporary substitute for graphene, collected electron cryomicrographs of Shigella needle complex particles, and obtained a high-resolution image of its side view as a class average.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：極低温電子顕微鏡法 グラフェン 蛋白質 生体分子 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

低温電子顕微鏡法は近年急速に発展しており、巨大なウイルス粒子などでは蛋白質の主鎖側鎖の立体配置を決定できる水準 (3Å 分解能) に近づいていた。我々の研究グループでも、独自の技術開発により、極めて細いために解析が困難であったアクチン繊維で高分解能の立体構造解析 (6.6 Å 分解能) に成功した (Fujii et al., *Nature* 2010)。アクチン分子の主鎖の2次構造をすべて明瞭に見ることが可能になり、水溶液中の構造を反映するアクチンモノマーの結晶構造と比較することにより、細胞骨格の形成や消失のメカニズムの解明に貢献した。

このように低温電子顕微鏡法は、機能状態の生体分子やその複合体の立体構造解析法として近年急速に発展したが、それには電子顕微鏡自体の高性能化とともに、画像解析法の高精度化、計算機の高速度化、画像検出器のデータ読み取り高速化、高感度化、高解像度化など、様々な面における技術改良や進歩が重要な役割を果たしてきた。

低温電子顕微鏡による生体試料観察に用いる試料グリッドの作成手順は以下のようなものである。試料グリッドとして用いるのは多孔カーボン薄膜を搭載した直径 3 mm の金属メッシュで、このグリッド上にごく微量の試料水溶液を載せ、大半を吸い取ることでそれぞれの薄膜孔内に水溶液薄膜を張り、このグリッド全体を液体エタンに突入させて急速凍結する (図1)。この急速凍結操作により、水溶液試料の水は結晶を形成することなくガラス状の氷薄膜となり、生体分子や細胞はその中に凍結包埋されるので、水溶液中の立体構造を保持したままの凍結水和状態を低温電子顕微鏡で観察することが可能になる。この急速凍結グリッドを低温電子顕微鏡の冷却試料ホルダーに挿入し、多孔カーボン薄膜の各孔に張ったガラス状の氷薄膜を撮影すると、氷薄膜に包埋された生体分子や細胞の拡大像を多数記録することができる。生体分子や細胞の低温電子顕微鏡像は、電子線照射損傷をできるだけ抑制するために、きわめて低い電子線量で撮影しなければならず、そのために粒子像の信号レベルより統計ノイズが高いほどで、各粒子像の S/N はきわめて悪い。しかし、同じ立体構造を持つ多くの粒子像をこうして収集し、同じ向きの投影像を集めて整列させ平均すれば、S/N は格段

に向上し、高分解能の像を得ることができる。こういった投影像を多く集めると高分解能の立体像を再構成することができる。到達可能な分解能は、各像の S/N の高さ、解析に投入した像の数に依存するため、できるだけ薄い氷に生体分子を包埋した試料グリッドの作成が重要で、あとは像の数を増やすのみである。

ただここで大きな課題は、氷薄膜の厚さを制御することの難しさである。氷薄膜が厚すぎると像コントラストが悪く、逆に薄すぎると気液界面の表面張力により生体分子の立体構造を歪めるため、高分解能の達成は容易ではない。また可溶化した膜貫通型タンパク質複合体などの疎水性の試料は多孔カーボン薄膜の表面に吸着してしまいがちで、孔に張った氷薄膜中に分散させるのが困難である。

原理的には、わずか一滴 (数マイクロリットル) の微量な水溶液試料があれば高分解能での構造解析を完了できるため、生命科学の様々な分野で必須な技術となりつつあるが、急速凍結試料グリッドを作成する過程にはこのように多くの課題があり、この構造解析技術の汎用化を困難にしている。

技術的な課題はほかにもたくさんあるが、高分解能での構造解析を短期間に高い再現性で達成するために解決すべき課題の中で、最も深刻な問題はやはり凍結水和試料の作成に関するもので、以下の3点である。

- (1) 急速凍結により氷の薄膜 (30 nm ~ 100 nm) の中に生体分子を包埋しその像を観察するため、表面張力、気液界面との相互作用、分子の荷電状態等により、分子の配向が偏る傾向がある。様々な方向の投影像を必要とする3次元立体構造解析法にとって、これは致命的な問題点であり、一部の生体分子において高分解能解析を決定的に困難にしている。
- (2) 低温 (およそ 50 K) で観察するため電気伝導度が悪く、試料は電子照射によって容易にチャージアップする。その結果として像がゆがめられ、高分解能の解析を妨げる。
- (3) アモルファスの氷の中に包埋された生体分子は、電子線照射によってわずかに移動・回転することが知られている。このわずかな分子の動きでも、目指すべき 3 Å レベルの分解能を超える構造解析にとっては不利な要因である。

これらの問題点を克服する工夫として、この申請課題では、試料水溶液を単層の炭素六員環単原子層シート構造であるグラフェンで挟み込み急速凍結することで、上記の問題の解決法を模索した。

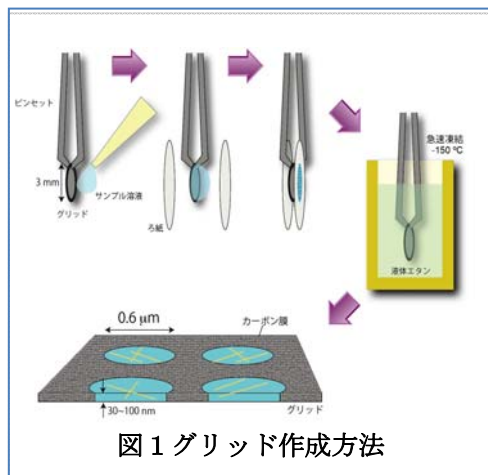


図1 グリッド作成方法

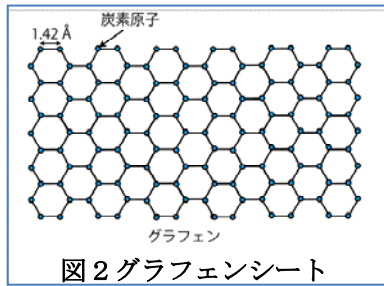


図2 グラフェンシート

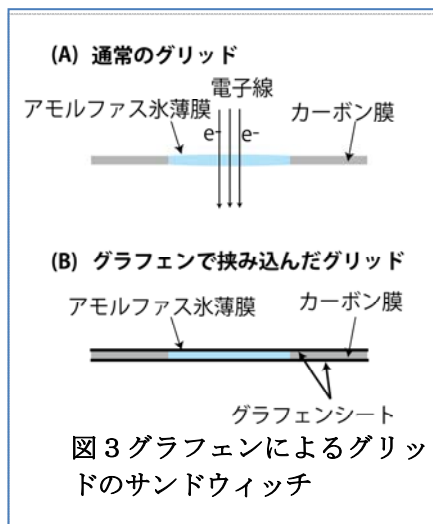


図3 グラフェンによるグリッドのサンドウィッチ

2. 研究の目的

急速凍結氷包埋した生体分子試料の低温電子顕微鏡観察と画像解析法は、生体分子の機能状態での立体構造解析手法として近年急速に発展してきた。電子顕微鏡の高性能化や画像解析法の高度化、計算機の高速度化、画像検出器の高解像度化など、様々な面での技術改良や進歩が重要な役割を果たしている。同時に、撮影対象となる試料自体のさまざまな問題点が原子分解能での解析を困難にしていることもクローズアップされてきている。

この問題を克服するために、炭素原子の2次元六方格子構造である単層グラフェンシートを基盤とすることにより、低温電子顕微鏡像収集の効率化と高品質化を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

直径 3 mm の電子顕微鏡試料グリッドの全面を覆う大面積グラフェンシートの自作は容易ではない。大面積グラフェンシートを試験的に作成している研究グループを探索したが、あまりよい情報は得られなかった。そこで、以前より多孔カーボン薄膜グリッドを購入しているメーカー企業の Quantifoil に相談したところ、グラフェンシートを搭載した多孔カーボン薄膜グリッドを試作しており、数ヶ月後には試作品を供給できるとのことであった。そこで、試作グリッドの供給を待ち、届き次第それを用いて、サルモネラ菌のべん毛基部体や赤痢菌のニードル複合

体など、膜貫通型の大きな複合体を対象とした低温電子顕微鏡観察と構造解析を進めることとした。

4. 研究成果

Quantifoil の試作試料グリッドを待つ間にも大面積グラフェンシートを作成している研究グループの探索は続けたが、やはり思いがけない情報は得られなかった。本研究を開始した年度中に、Quantifoil と何度かやりとりし、試作グリッドの作成状況を確認したが、彼らにとっても予想外の困難が多々あり、急速凍結氷包埋グリッドの作成に使えるグリッドの供給は大幅に遅れそうであるとのことであった。結局は当該年度中に試作グリッドが届かなかったため、補助事業期間延長申請を行った。

Quantifoil の試作グリッドが次年度の中頃になってようやく届いたため、まずは試作グリッド自体を電子顕微鏡で観察し、グラフェンシートがどのような状態にあるか観察した。その結果、小さなフレーク状のグラフェンシートが折り重なるようにして多孔カーボン薄膜の上に載っており、一層のグラフェンシートがグリッド全面を覆っているという理想的な状況からは全くほど遠いものであった。よってやはり、大面積単層グラフェンシートの本格的な作成技術の習得から取り組む必要が生じた。ただこれには相当の時間と労力が必要で、しかもグラフェンシート作成装置のセットアップにもかなりの経費の投入が必要と判断したため、とりあえずの代替案として以下のような作戦変更を実施した。

グラフェンシートの代わりに、マイカ表面上に極薄カーボン膜を作成し、それを多孔カーボン薄膜グリッド上に搭載して試料グリッドとした。解析対象とした生体試料は赤痢菌のニードル複合体である。細胞膜と外膜の両方を貫通する最大直径約 25 nm のリング状の基部体を持ち、基部体から細胞外に伸びた直径約 7 nm、長さ 40~50 nm のニードルと呼ばれるチューブ構造を有する。赤痢菌が宿主の腸の上皮細胞などに進入して感染する際に、宿主細胞の細胞骨格の形態を乱す病原性因子を、このニードル複合体の基部にある 3 型蛋白質分泌装置によりニードルを通して細胞内に分泌し、細胞膜の形状を変えることで菌の侵入を可能にする装置である。赤痢菌を界面活性剤で処理することで細胞膜と外膜を溶かし、ニードル複合体を可溶化して精製したものを試料とした。

極薄カーボン膜を搭載した多孔カーボン薄膜グリッドにこのニードル複合体の水溶液を 3 μ l ほど載せ、その大半を濾紙で吸い取った後に液体エタンに突入させて急速凍結した。これを日本電子 (株) 社製の低温電子顕微鏡 JEM-3200FSC の液体窒素冷却試料に挿入し、加速電圧 200 kV で像を観察し、TVIPS 社製の画素数 8000×8000 の CMOS カメラ

(F816)により倍率約8万倍で像を撮影した。収集した約5万枚の像を多くのクラスに分けてそれぞれを平均し、ニードルの軸にほぼ垂直に投影した像を図4に示す。これは2017枚の粒子像を整理平均した像で、これまでに他研究グループが発表したサルモネラ菌ニードル複合体とほぼ同じ構造的特徴が確認できており、さらに詳細な構造が見えそうである。立体構造解析は現在進行中であるが、2次構造を確認できる高い分解能が期待できそうである。

グラフェンシートの代わりに極薄カーボン膜を使用した結果でも、このように高画質で高分解能の像を得ることができたため、当初の目標どおりグラフェンシートを使うことができれば、極薄カーボン膜による背景ノイズをほぼ完全に除去できるため、さらなる高画質化による高分解能立体構造解析が可能になると期待される。今後は是非とも大面積グラフェンシートの作成法を確立することで、低温電子顕微鏡法では最も困難な、急速凍結氷包埋試料の氷薄膜の厚みをできる限り薄く制御する方法を確立し、再現性の高い生体分子複合体の高分解能立体構造解析法の実現を目指す。

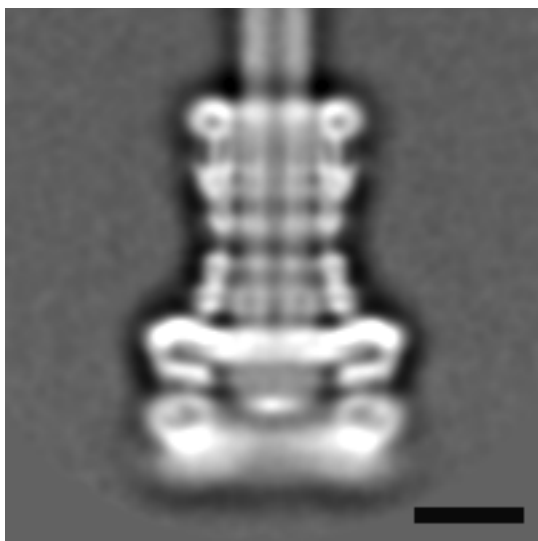


図4 赤痢菌ニードル複合体のクラス平均像。平均した粒子像数は2017。スケールバーは10 nm。

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 Gayathri, P., Fujii, T., Namba, K., Löwe, J. Structure of the ParM filament at 8.5Å resolution. **J. Struct. Biol.** 184, 33-42, 2013. 査読有
doi:10.1016/j.jsb.2013.02.010

[学会発表] (計32件)

- ① 難波啓一. 生体ナノマシンの動作原理の解明. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会 解剖学会・顕微鏡学会合同シンポジウム「最近の顕微鏡法が拓く機能分子解剖学の新展開」, 2014. 3. 29. 自治医科大学 (栃木県・下野市)
- ② 難波啓一. 生命を支える超分子ナノマシンの機能構造の解明に向けて. 日本顕微鏡学会・関西支部「若手の会」設立記念講演会, 2013. 12. 7. KKR ホテルびわこ (滋賀県・大津市)
- ③ 難波啓一. クライオ電子顕微鏡による生体超分子ナノマシンの機能構造の解明に向けて. High-resolution high-throughput cryoEM image analysis of macromolecular assemblies. 第36回日本分子生物学会年会フォーラム, 2013. 12. 3. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ④ Kajimura, N., Cheung, M. P., Kato, T., Blocker, A. J., Namba, K. 赤痢菌ニードル複合体の極低温電子顕微鏡による構造解析. (Structural analysis of needle complex from *shigella flexneri* by cryo microscopy.) 第51回日本生物物理学会年会, 2013. 10. 28. 国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑤ Namba, K. CryoEM image analysis of macromolecular motor assemblies. ComBio 2013, 2013. 9. 30. Perth Convention and Exhibition Centre (Perth, Australia)
- ⑥ 難波啓一. クライオ電子顕微鏡による超分子・細胞の3Dイメージング. 日本学術会議公開シンポジウム「医学・生命科学の革新的発展に資する統合バイオイメージングの展望」, 2013. 9. 17. 日本学術会議 (東京都・港区)
- ⑦ Namba, K. CryoEM image analysis of macromolecular motor assemblies. BSCB Autumn Meeting, 2013. 9. 3. Low Wood Bay Hotel (Windermere, UK)
- ⑧ 難波啓一. クライオ電子顕微鏡による生体超分子ナノマシンの機能構造の解明に向けて. 第7回細菌学若手コロッセウム, 2013. 8. 8. 広島エアポートホテル (広島県・三原市)
- ⑨ Namba, K. CryoEM helical image analysis of various macromolecular assemblies. GRC on Three Dimensional Electron Microscopy, 2013. 6. 26. Colby-Sawyer College (New London,

- USA)
- ⑩ 難波啓一. ナノスペースでの生命のしくみ. 医学振興銀杏会総会, 2013. 5. 25. 大阪大学銀杏会館 (大阪府・吹田市)
- ⑪ 難波啓一. クライオ電子顕微鏡による生体超分子ナノマシンの機能構造の解明. (High-resolution high-throughput cryoEM helical image analysis of macromolecular assemblies.) 第六回風戸賞受賞講演会. 2013. 5. 20. ホテル阪急エキスポパーク (大阪府・吹田市)
- ⑫ 牧野文信. 低温電子顕微鏡による細菌べん毛キャップ連結部の 3 次元再構成. (Structure and domain movement of FliD cap from Cryo-EM map of cap-junction complex.) 2012 年度べん毛研究交流会, 2013. 3. 5. よろこびの宿 しん喜 (群馬県・渋川市)
- ⑬ 當間頌子. サルモネラ菌における FljB と FliC のべん毛繊維の構造比較. Differences between the *Salmonella typhimurium* FljB and FliC flagellar filament structures. 2012 年度べん毛研究交流会, 2013. 3. 5. よろこびの宿 しん喜 (群馬県・渋川市)
- ⑭ Namba, K. Structural insight into torque generation mechanism of the bacterial flagellar motor. Biophysical Society 57th annual meeting, 2013. 2. 6. Pennsylvania Convention Center, (Pennsylvania, USA)
- ⑮ Namba, K. High-resolution high-throughput cryoEM helical image analysis of macromolecular assemblies. Nagoya Symposium -Frontiers in Structural Physiology-, 2013. 1. 24. Nagoya University (愛知県・名古屋市)
- ⑯ Miyata, T., Kato, T., Fujii, T., Nakamura, S., Morimoto, Y.V., Minamino, T., Matsunami, H. and Namba, K. Structural analysis of the flagellar hook-basal body with the C ring by electron cryomicroscopy. Nagoya Symposium -Frontiers in Structural Physiology-, 2013. 1. 22-24. Nagoya University (愛知県・名古屋市)
- ⑰ Makino, F., Miyata, T., Kato, T. and Namba, K. Structure and domain movement of FliD cap from Cryo-EM map of cap-junction complex. Nagoya Symposium -Frontiers in Structural Physiology-, 2013. 1. 22-24. Nagoya University (愛知県・名古屋市)
- ⑱ Toma, S., Kato, T., Namba, K. Cryo-EM analysis of the FljB filament-implications for immune escape. Nagoya Symposium -Frontiers in Structural Physiology-, 2013. 1. 22-24. Nagoya University (愛知県・名古屋市)
- ⑲ Kato, T., Ueta, M., Miyata, T., Wada, C., Yoshida, H., Wada, A. and Namba, K. Structural analysis of 100S ribosomes in two different types of bacteria. Nagoya Symposium -Frontiers in Structural Physiology-, 2013. 1. 22-24. Nagoya University (愛知県・名古屋市)
- ⑳ 加藤貴之. 電子顕微鏡で捉えた運動マシーナリー: 高速回転モーターの謎. 第 85 回日本生化学会, 2012. 12. 15. 福岡国際会議場他 (福岡県・福岡市)
- ㉑ 宮田知子, 加藤貴之, 藤井高志, 中村修一, 森本雄祐, 南野徹, 松波秀行, 難波啓一. 細菌べん毛モーター・スイッチ複合体の極低温電子顕微鏡による構造解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 13. 福岡国際会議場他 (福岡県・福岡市)
- ㉒ 加藤貴之, 上田雅美, 宮田知子, 吉田秀司, 和田千恵子, 和田明, 難波啓一. 飢餓的ストレス条件下における細菌の生存戦略. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 13. 福岡国際会議場他 (福岡県・福岡市)
- ㉓ 難波啓一. 生体超分子モーターの立体構造と動作機構. 大阪大学ナノ理工学人材育成産学コンソーシアム 平成 24 年度第 3 回ナノ理工学情報交流会「ナノバイオメティックスの新展開」, 2012. 12. 4. 大阪大学 (大阪府・豊中市)
- ㉔ Kato, T., Ueta, M., Miyata, T., Yoshida, H., Wada, A., Namba, K. 飢餓的ストレス下での 100S リボソーム形成による細菌の生存戦略. Survival strategy of bacteria under the starvation stress by 100S ribosome formation. 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012. 9. 24. 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)
- ㉕ Makino, F., Kato, T., Miyata, T., Namba, K. 低温電子顕微鏡による細菌べん毛キャップ連結部の 3 次元再構成. The structure of the flagellar cap-junction complex by electron cryomicroscopy. 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012. 9. 24. 名古屋大学 (愛知

県・名古屋市)

- ②⑥ Miyata, T., Kato, T., Fujii, T., Nakamura, S., Morimoto, Y., Minamino, T., Matsunami, H., Namba, K. 細菌べん毛モーターの回転方向変換制御機構の解明. Elucidation of the directional switching mechanism of the bacterial flagellar motor. 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012. 9. 23. 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)
- ②⑦ Namba, K. High-resolution high-throughput cryoEM helical image analysis of macromolecular assemblies. Department seminar, Research Institute of Chemical and Process Engineering, University of Pannonia, 2012. 9. 18. (Pannonia, Hungary)
- ②⑧ Namba, K. Structural changes of actin and myosin upon rigor complex formation. Actin Dynamics Meeting 2012, 2012. 9. 15. Kongress- und Kulturzentrum Kolpinghaus Regensburg, (Regensburg, Germany)
- ②⑨ 難波啓一. 極微の世界に秘められた生命のしくみを解き明かす夢. 香川いちよう会総会, 2012. 7. 29. J R ホテルクレメント高松 (香川県・高松市)
- ③⑩ 牧野文信, 加藤貴之, 宮田知子, 難波啓一. 低温電子顕微鏡による細菌べん毛キャップ連結部複合体の3次元像再構成. 第 9 回 21 世紀大腸菌研究会, 2012. 6. 22. 長浜ロイヤルホテル (滋賀県・長浜市)
- ③⑪ 難波啓一. 生体超分子ナノマシンの構造と機能. ナノ学会第 10 回大会, 2012. 6. 15. 大阪大学会館 (大阪府・豊中市)
- ③⑫ Makino, F., Miyata, T., Kato, T., Namba, K. Structural analysis of the flagellar hook-filament junction by electron cryomicroscopy. Gordon Research Conference on Three Dimensional Electron Microscopy, 2012. 5. 30-31. Les Diablerets Conference Center (Les Diablerets, Switzerland)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/02/result/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 啓一 (NAMBA KEIICHI)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号: 30346142

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

藤井 高志 (FUJII TAKASHI)

理化学研究所・生命システム研究センター

・基礎特別研究員

研究者番号: 10582611

加藤 貴之 (KATO TAKAYUKI)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号: 20423155

梶村 直子 (KAJIMURA NAOKO)

日本電子株式会社・嘱託職員

研究者番号: 40403175