

## 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24年 6月 8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

研究成果の概要（和文）：

蛋白質の構造変化を解析するための新規アルゴリズムの開発を進め、電子顕微鏡画像からの3次元再構成の高速化を達成した。さらに、この解析手法を蛋白質の構造解析への適用を進めた。これと平行して走査電子顕微鏡による生物サンプルの構造解析に関する研究を行い、多検出素子による3次元解析システムを開発した。これにより個々の生物サンプルの3次元構造解析を一回の撮像で自動的に行うことが可能となった。

研究成果の概要（英文）：

To reconstruct three-dimensional (3D) structure of proteins, we have developed newly 3D reconstruction algorithm and a high-contrast detection system of the biological samples. Our 3D reconstruction method was composed with the modified Simulated-Annealing algorithm with the high accuracy classification method of the class averages from the protein images by the transmission-electron microscopy. This method enables automatically 3D reconstruction from the protein images. Furthermore, we developed high-contrast and low-damage 3D detection system. This system contains a linear array PD system and new 3D reconstruction method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	11,200,000	3,360,000	14,560,000

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. 研究開始当初の背景

生物の多種多様な機能の多くは、その基本コンポーネントである蛋白質の働きを介して実現されている。個々の蛋白質は、精緻な3次元構造を特異的に形成しており、この構造が変化することで極めて複雑な機能を発現している。そのため、生体内の生理機能や

生化学反応、さらに病理の解明や薬理特性の解析においては、個々の蛋白質の3次元構造だけでなくその構造変化を解明することが極めて重要となる。

現在多くのタンパク質の3次元構造がX線結晶構造解析法により解明されている。この方法は分解能が数Åと極めて高いが、結晶化

された蛋白質サンプルを必要とするため、結晶化が困難な膜蛋白質や構造変化を捉えることは難しい。一方、NMR による構造解析も行われているが、膜蛋白質では疎水性のアミノ酸が多く含まれており、加えて主要な蛋白質の大きさが 100kDa 以上あるため解析が困難である。従って、蛋白質等の生物サンプルを簡便に高分解能かつ低ダメージで個々の 3次元構造を解析する手法を開発することは、構造生物学のみならず、医学・生理学上も極めて重要となる。

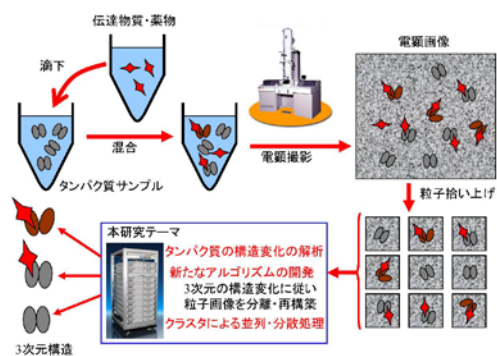


図1 蛋白質電顕画像からの構造変化解析の概要

## 2. 研究の目的

本研究は電子顕微鏡により蛋白質を撮影し、この画像情報より 3次元構造を構築するための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目的とする。蛋白質は、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。本研究は、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、蛋白質の 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指す (図 1)。

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、多くの蛋白質の構造変化と機能の解明を進める。これに加えて、走査電子顕微鏡を用いた新たな生物試料の低ダメージ高コントラスト観察手法の開発を進め、ウィルスや蛋白質複合体レベルで個々のサンプルの構造を解析可能とする。この手法では、走査型電顕内に高感度・高速の検出素子を設置することで、低電子線量で、高コントラストの観察を可能とする。さらに、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・非染色での生物試料の解析を行う。

## 3. 研究の方法

構造変化を伴う個々の蛋白質の構造解析を行うため、透過電子顕微鏡画像から個々の蛋白質を認識しそれぞれを分類した後に、クラス分類毎に 3次元再構成を行う。こうした

画像認識は、幾つかの段階を経て進める必要がある。最初に、クラス平均画像が蛋白質の構造のものか、あるいはノイズ画像かを認識し、ノイズ画像のみを除去する。次に、構造変化を伴う蛋白質がどの構造かを推定する。通常、蛋白質の透過電顕画像は、コントラストが低く、極めてノイズが高いため、各構造の推定が困難である。本研究では、ノイズに対してロバストな焼きなまし法 (Simulated Annealing 法) を応用することで、自動的に各クラス平均画像がどの構造かを推定し、各 3次元構造を構築することを可能とする。さらに、本アルゴリズムを様々な蛋白質電顕画像に適用することで、その 3次元構造を解析する。

こうしたクラス平均画像の分類において、個々の蛋白質電顕画像のノイズが大きな問題となる。SN比が極めて低い場合は、画像の認識精度は著しく低下する。そのため、蛋白質を含む生物サンプルを低ノイズで、かつ高コントラストで観察する方法が重要となる。ここでは、走査電顕内に高感度・高速な検出システムを導入することで、観察画像の低ノイズ化と高コントラスト化を目指す。

## 4. 研究成果

(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蛋白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蛋白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。こうした解析アルゴリズムを実際の蛋白質電顕画像に適用し、様々な蛋白質の構造解析を進めた。

(2) 細胞内の酸化ストレス防御機構に関与する Keap1 蛋白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 蛋白質の画像を撮像し、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 (図 2)。

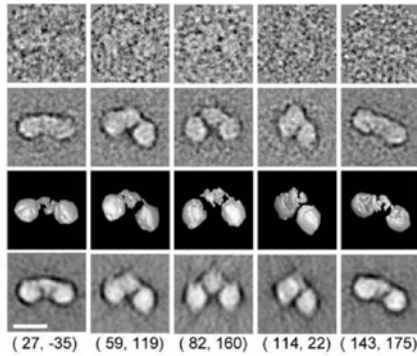


図2 Keap1蛋白質の3次元構造解析結果

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。これ以外にも P2X<sub>2</sub> レセプターや Mitsugumin23 等の蛋白質の解析に適用し、従来に比べて高速かつ高精度な3次元構造解析を行った(図3、4)。

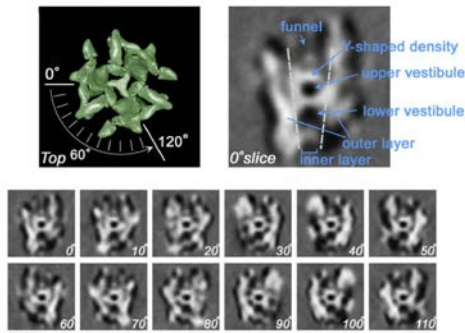


図3 P<sub>2</sub>X<sub>2</sub>蛋白質の3次元構造解析結果

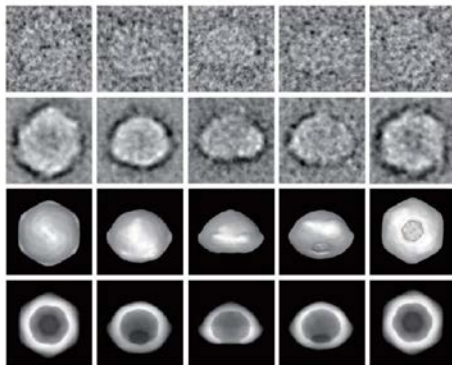


図4 Mitsugumin23蛋白質の3次元構造解析結果

(3) 走査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。生物サンプルの電頭画は、電子線ダメージに弱く、軽元素で構成されるため、観察画は極めてノイズが高く低コントラストとなる。特に、電子線による生物サンプルへのダメージは深刻であり、その照射量を低下させて撮像する必要がある。こうした問題は、直接生物サンプルに電子線を照射することで生じている。従って、本研究では、電子線をサンプル支持膜に照射し、これにより生じる2次的物理線を支

持膜下面に付着させたサンプルに間接的に照射することで、電子線ダメージを大幅に低下させることに成功した(図5)。この方法を間接2次電子コントラスト法(ISEC法)と名づけた。支持膜として、40nm厚のカーボン膜を使用し、この上部に1.5kVの低加速の電子線を照射することで、入射電子のほとんどがカーボン薄膜内に吸収され、下面に付着している生物サンプルには到達しない。従って、一次電子線によるダメージをほぼ防ぐことが出来る。一方、電子線が照射された部位のカーボン薄膜下面からは、2次電子が放出される。2次電子は、エネルギーが10eV程度と極めて弱いため、生物サンプルの炭素や窒素等の軽元素にも良く遮蔽され、染色することなく高いコントラストを形成できる。加えて、2次電子のエネルギーが弱いため生物サンプルへのダメージも軽微である。この方法を用いることで、バクテリアやウイルスを染色処理なしに高コントラスト・低ダメージで観察することに成功した(図6)。

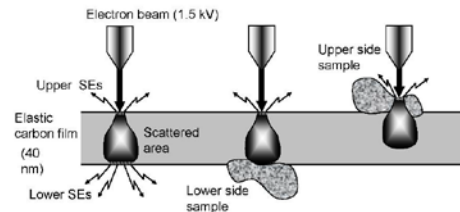


図5 間接照射法による生物サンプル観察の概要

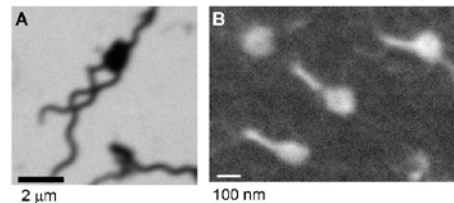


図6 間接照射法によるバクテリアとウイルスの観察

本方法では、薄膜を改良することで、電子線に伴う様々な2次的物理線を使用することが可能となる。例えば、薄膜上部に軟X線を高効率で放射する金属層を形成することで、照射した電子線を軟X線に変換し、これを生物サンプルへと照射し観察することが可能となる(図7)。さらに、サンプル下面に複数の検出器を設置することで、電子線照射部位から検出器の設置角度に従った傾斜画像を観察することができる。ここでは、1

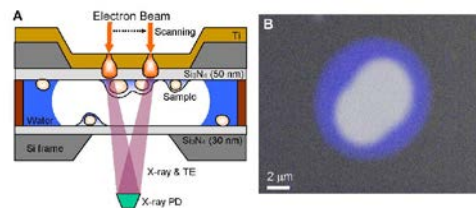


図7 X線照射薄膜による観察システムと酵母の観察結果



次元リニアアレイ検出器を使用することで、 $-45$ 度から $+45$ 度までの7枚の傾斜画像を一回の撮像で観察することが可能となった(図8)。さらに、こうした傾斜画像から、3次元構造を高精度に求めるアルゴリズムを開発した。3次元再構成処理において、通常は観察画像を逆投射することで3次元構造を解析しているが、本方法では3次元構造自体を直接変化させながらこの投射像と観察画像の差が低下するように3次元構造を変えて行く新たな方法を開発した(図9)。こうした3次元構造の変化を Simulated Annealing アルゴリズムを応用することで、7枚の観察画像においても高精度な3次元構造を構築することが可能となった。これにより、個々の生物サンプルの3次元構造を自動的に解析することができ、本研究の目的をほぼ達成したものと考えている。

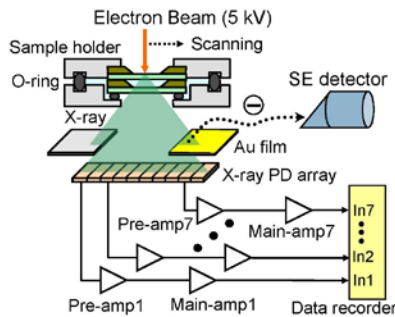


図8 リニアアレイ検出器による3D観察装置

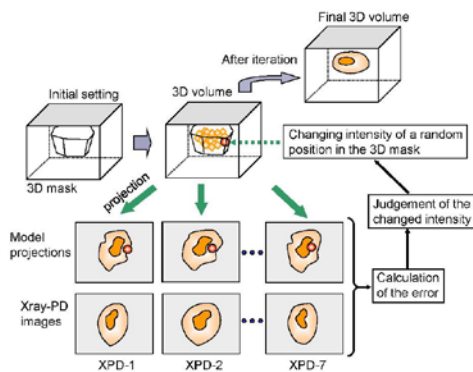


図9 Simulated-Annealing法を応用した3D自動解析法

## 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 11 件)

- ① Toshihiko Ogura, “Direct observation of the inner structure of unstained atmospheric cells by low-energy electrons” *Measurement Science & Technology*, Vol.23, 085402 (8pages) (2012) (査読有り)  
DOI: 10.1088/0957-0233/23/8/085402

- ② Toshihiko Ogura, “Three-dimensional X-ray observation of atmospheric biological samples by linear-array scanning-electron generation X-ray microscope system” *PloS ONE*, Vol.6 e21516 (9 pagees) (2011) (査読有り)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0021516
- ③ Elisa Venruti, Kazuhiro Mio, Miyuki Nishi, Toshihiko Ogura, Toshio Moriya, Samantha Pitt, Kazutaka Okuda, Sho Kakizawa, Rebecca Sitsapesan, Chikara Sato and Hiroshi Takeshima “Mitsugumin 23 forms a massive bowl shaped assembly and cation-conducting channel”, *Biochemistry*, Vol. 50, pp.2623-2632 (2011) (査読有り)  
DOI: 10.1021/bi1019447
- ④ Toshihiko Ogura, “High-resolution x-ray observation of unstained samples by a newly developed SGXM” *Nanotechnology* Vol.21, 295501 (7 pages) (2010) (査読有り)  
DOI: 10.1088/0957-4484/21/29/295501
- ⑤ Toshihiko Ogura, Kit I. Tong, Kazuhiro Mio, Yuusuke Maruyama, Hirofumi Kurokawa, Chikara Sato, Masayuki Yamamoto, “Keapl 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*, Vol.107, pp.2842-2847 (2010) (査読有り)  
DOI: 10.1073/pnas.0914036107
- ⑥ Toshihiko Ogura, “Direct observation of unstained wet biological samples by scanning-electron generation X-ray microscopy”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 391, pp.198-202 (2010) (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.11.031
- ⑦ Toshihiko Ogura, “Measurement of the unstained biological sample by a novel scanning electron generation X-ray microscope based on SEM” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.385, pp.624-629 (2009) (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.107
- ⑧ Akira Omura, Tomoko Matsuzaki, Kazuhiro Mio, Toshihiko Ogura, Mako

Yamamoto, Akiko Fujita, Katsuya Okawa, Hitoshi Kitayama, Chiaki Takahashi, Chikara Sato and Makoto Noda, "RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase catalyzed cleavage of fibronectin" J. Biol. Chem., Vol.284, pp.3461-3469 (2009) (査読有り)  
DOI: 10.1074/jbc.M806212200

⑨ Toshihiko Ogura, "Analyzing indirect secondary electron contrast of unstained bacteriophage T4 based on SEM images and Monte Carlo simulations" Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.380, pp.254-259 (2009) (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.046

⑩ Kazuhiro Mio, Toshihiko Ogura, Tomomi Yamamoto, Yoko Hiroaki, Yoshinori Fujiyoshi, Yoshihiro Kubo and Chikara Sato "Reconstruction of the  $P_2X_2$  receptor reveals a vase-shaped structure with lateral tunnels above the membrane" Structure, Vol.17, pp.266-275 (2009) (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.str.2008.12.007

⑪ Toshihiko Ogura, "A high contrast method of unstained biological samples under a thin carbon film by scanning electron microscopy", Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.377, pp.79-84 (2008) (査読有り)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.09.097

[学会発表] (計2件)

① 小椋俊彦「走査電子顕微鏡を用いた非染色生物試料の高コントラスト・低ダメージ観察方法」日本顕微鏡学会第68回学術講演会、2012年5月16日、つくば (依頼講演)

② 小椋俊彦、佐藤主税「柔軟な情報処理を用いたタンパク質粒子画像の自動拾い上げ方法と分類」日本顕微鏡学会第66回学術講演会、2010年5月24日、名古屋 (依頼講演)

## 6. 研究組織

### (1) 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