

研究課題別評価書

1. 研究課題名

蛋白質電顕画像を用いた自動 in silico 擬似結晶構造解析法の開発

2. 氏名

小椋 俊彦

3. 研究のねらい

生物の多様な機能の多くは、その基本コンポーネントであるタンパク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することで極めて複雑な機能を発現しているため、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、タンパク質の3次元構造を解明することが極めて重要となる。本研究では、こうしたタンパク質の構造解析手法として、電子顕微鏡画像から3次元構造を解析する単粒子構造解析法の新規アルゴリズムの開発とこれを用いた膜タンパク質の構造解析を進めた。これと平行して、生物サンプルをダメージ無く高コントラストで観察する新しい実験手法の開発を行った。

4. 研究成果

タンパク質粒子の電子顕微鏡画像は極めてノイズが高くコントラストが低いため、この画像から3次元立体構造を構築するにはいくつかの画像情報処理を経る必要がある。まず、電顕画像内に点在するタンパク質粒子部分の画像を選択的に拾い上げる。こうして拾い上げた数千から数万のタンパク質粒子画像の位置や角度を推定し、それぞれに適合した角度や位置で加算平均を掛けることで、バックノイズを減少させる。こうしてS/N比の向上した平均画像を基に3次元構造を再構築する(図1)。構築される3次元構造の分解能や精度は、解析に用いた粒子画像枚数とその分類精度、さらに平均画像の3次元投射角度の推定精度に依存する。これまでの研究では、この粒子画像の拾い上げに Simulated-Annealing と Neural-Network を用いることでより高精度・高速に粒子画像を拾い上げることを可能とした。粒子平均画像から3次元構造を構築するためには、この平均画像を様々な角度から投射したプロジェクション画像と捉え、そのオイラー角や回転角を推定する必要がある。こうした画像情報のみから角度を推定する方法として、中央断面定理に基づくシノグラム法が従来から用いられてきた。しかし、この方法では、2次元画像を回転させながら1次元へと投射するため情報が大幅に減少し極めて精度が悪かった。従って、この方法では、対称性が高く推定角度を大幅に絞り込める粒子に対しては有効であるが、対称の極めて低い粒子に対しては角度推定が困難である。

本研究では、こうした、2次元画像から3次元構造を求める問題を2次元画像の3次元オイラー角への最適配置問題と捉え、Simulated-Annealing アルゴリズムを応用することで自動的に解析する方法を開発した。この方法により、評価曲面内の多くのローカルミニマムから抜け出し、より最適な解を導くことが可能となった。この Simulated-Annealing を用いた3次元モデルの再構成方法の概要を図2に示す。単粒子構造解析の初期に得られるプロジェクションのクラス平均画像は、それぞれ様々な回転角度や位置ずれがあり、その値は未知である。こうした各画像の回転角度、位置、オイラー角を推定し、3次元モデルを再構成する必要がある。本方法では、まず各平均画像のオイラー角をランダムに設定し Back-projection により3次元モデルを作成する(図2左中)。初期のオイラー角は真値とまったく異なっているため、実際の構造から大きくかけ離れている。次に、画像を一枚ランダムに選択し、オイラー角と画像の回転角、中心位置をランダムに変化させる(図

2右上)。そして、この位置で再度 Back-projection を行い3次元モデルの再構成を行う。この再構成画像から全ての平均画像の対応するオイラー角へと再プロジェクションを行い、それぞれの平均画像との相関スコアを計算する(図2右下)。この全体のスコアが、この移動によって向上する場合はこの移動が確定する。もし、低下する場合は、遷移確率 $P(\Delta L)$ を計算し確率的に移動の可否を確定する。こうした一連のサイクルを繰り返しながら、徐々に温度係数を指数関数的に低下させることで、平均画像と再プロジェクション画像が徐々に類似するよう、回転角と位置が変化していき、それと同時に3次元構造も最適な形へと成長する(図2左下)。

以上の自動拾い上げ方法や角度推定方法を用いて、様々なタンパク質の3次元構造解析を行った(図3)。まず、アルツハイマー病の要因となる膜タンパク質複合体 γ -secretase に関して、負染色法による粒子画像により3次元構造解析を行った。この結果、特異的なアームを供えた興味深い構造が示された(図3A)。さらに、温度や化学物質、機械刺激等の外部刺激により、細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの流入を行う TRPC3 チャンルの解析を行い、世界に先駆けて 15 Å 分解能で3次元構造を決定した(図3B)。この研究では、氷包埋サンプル画像に対してこれまで開発した自動解析アルゴリズムを駆使することで、粒子画像 14 万枚規模での解析を進めた。これ以外にも、筋細胞等の細胞内膜に存在し、カチオンイオンを透過させる TRIC チャンル(図3C)や TRP-M2(図3D)等の生理学的にも重要なチャネルやレセプタ等の解析構造解析を行い2ヶ月程度で3次元構造を決定することができた。今後は膜タンパク質だけでなく、タンパク質複合体や薬品が結合した状態などの解析にも応用を進める予定である。

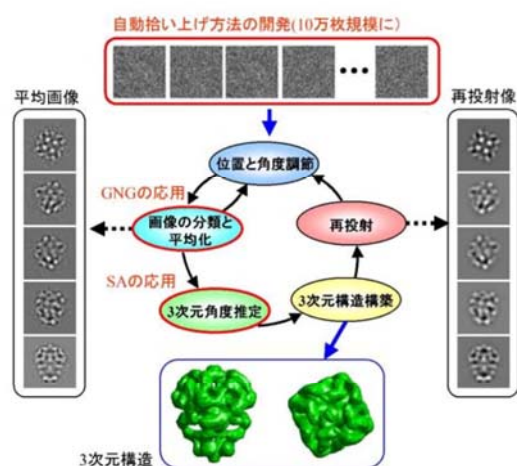


図1 単粒子構造解析の概要、数千から数万枚のタンパク質電顕画像から100クラス程度の平均画像を求め、これから3次元構造を解析する。

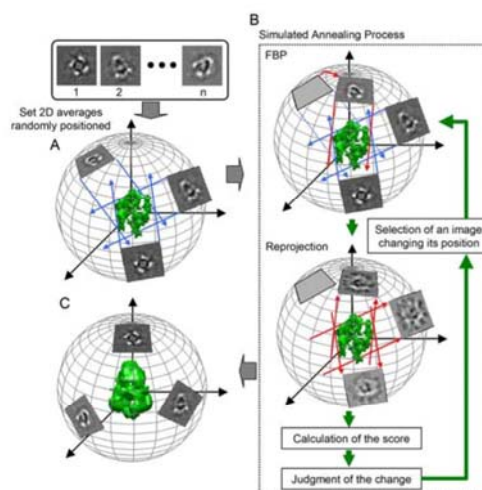


図2 Simulated-Annealingを応用した3次元角度推定方法の概要、数十枚の平均画像のオイラー角を自動的に決定する。

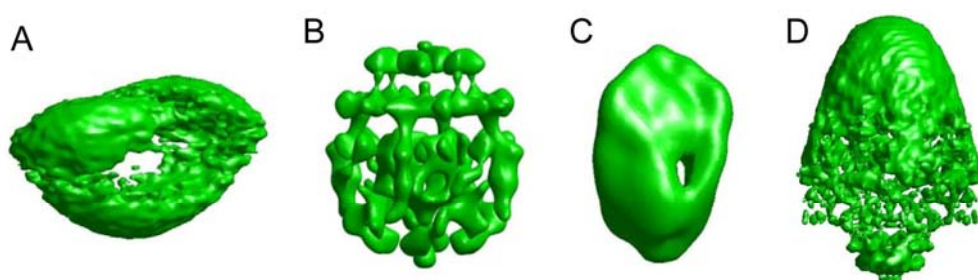


図3 本手法を用いた様々な膜タンパク質の単粒子構造解析の結果、A:アルツハイマー病関連膜タンパク質 γ セクレターゼの構造、B: TRPC3チャネルの構造、C:筋細胞の細胞内小胞に存在するTRICチャネルの構造、D:TRP-M2チャネルの3次元構造。

今回のさきがけ研究により単粒子構造解析の解析期間は2ヶ月程度まで短縮することができた。しかし、今後より解析速度を向上させ、その場観察・その場3次元構造解析へと到達するためには、よりノイズが少なく高コントラストな新たな計測手法を開発する必要がある。もし観察画像が単粒子の平均画像の S/N 比と同等のレベルに達すれば、多数の画像を拾い上げ、位置を調整し加算平均等の処理の必要が無くなる。すなわち、観察画像から直接3次元構造を求めることが可能となり、大幅な解析期間の短縮に繋がる。こうした観察方法では、タンパク質をダメージ無く非染色で測定する必要があるため、透過型電顕以外の計測手法を検討した。本研究では走査型電子顕微鏡(SEM)による非染色・低ダメージ観察法の開発を進めた。

SEM を用いた生物試料の観測方法では、直接電子線をサンプルに照射するのではなく、間接的に照射することで電子線によるダメージを大幅に低下させ、さらに非染色で極めて高いコントラストでの観察を可能とした。この方法では、薄いサンプル支持膜(カーボン膜)の下部表面にサンプルを付着させ、サンプル支持膜上部より低い加速電圧の電子線を照射する(図4)。電子線はサンプル支持膜の内部で拡散しながら広がり、膜の下面付近に到達する。これにより、サンプル支持膜の下部表面より2次電子が放出される。これが、膜下のサンプルに吸収されることで極めてクリアな画像を得ることができる。2次電子のエネルギーは、数十 eV と極めて弱く、生物サンプルのようなコントラストの付き難い試料においても高いコントラストの画像を得ることが可能であり、かつ電子線を直接試料に照射していないためダメージも極めて少ない。こうした SEM の観察条件及びその画像は、間接2次電子コントラスト(ISEC)条件および ISEC 画像と名づけた。本方法では、ウィルスの非染色観察も容易に可能であり、その分解能はモンテカルロ・シミュレーションにより1nm 程度まで向上することが示唆された。

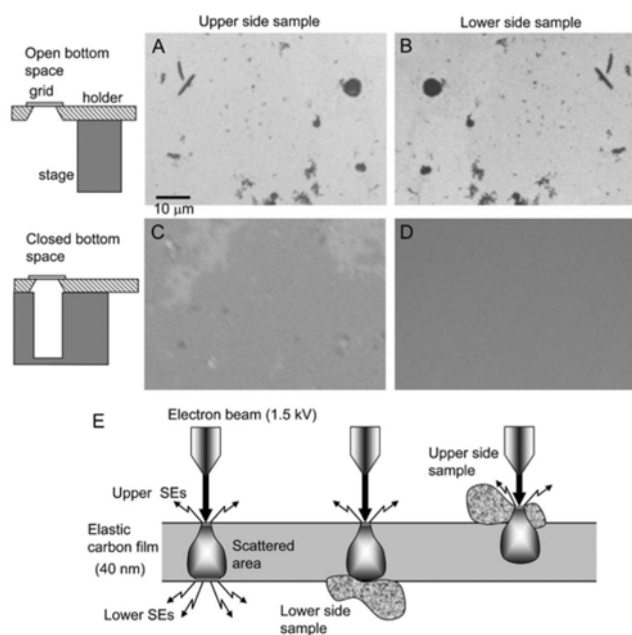


図4 SEMによるカーボン薄膜の非染色バクテリアサンプルの観察画像とISEC条件の概要。A:片持ち状態のカーボン薄膜上の画像。B:カーボン薄膜下の画像。C:アルミチューブ上にカーボン薄膜を設置し、薄膜上にサンプルを固定した時の画像、サンプルのコントラストが消失。D:アルミチューブ上でカーボン膜下のサンプル画像、完全にコントラストが消失。これらの画像は、40nmカーボン膜を用いて1.5kV加速条件で観察した。E:ISEC条件の概念図、40nmカーボン膜に1.5kVの電子線を照射すると、膜内を電子が散乱しカーボン膜内に吸収される。しかし、下部表層に到達した電子により下面より二次電子が放出される。カーボン膜下のサンプルは、この2次電子を吸収することで高いコントラストが生じる。

5. 自己評価

本研究では、タンパク質やウイルス等の生物試料の構造解析方法に関して、電子顕微鏡画像から3次元構造を解析する単粒子構造解析法とSEMによる方法の開発を進めた。

単粒子構造解析の研究では、新たな3次元角度の推定方法を開発し、これまで困難であった非対称タンパク質の3次元構造解析の自動化を可能とした。さらに、この方法を用いることで、研究期間中に8種類の膜タンパク質の構造解析を行い、それぞれ国際誌に発表している。当初予定していた研究目標をほぼ達成したものと考えるが、まだ解析手法の完全自動化には至っていないため、達成率は80%程度と捉えている。

SEMを用いた生物サンプルの非染色・極低ダメージの観察方法は、これまでのSEMによる観察方法とは異なり、カーボン薄膜下にサンプルを付着させ、間接的に2次電子が照射される条件(ISEC条件)により観察する。このため、従来の観察条件とは異なり、電子線によるダメージが殆んどなく、非染色サンプルを非常に高いコントラストで観察可能である。現在は、この方法によりウイルスを高コントラストで観察可能であり、その分解能もモンテカルロ・シミュレーションにより1nm程度まで向上することが示唆されている。この分解能のレベルに達すると、タンパク質やその複合体が非染色でかつ簡単に観察可能となる。本研究は、さきがけ研究と同時に開始したテーマであり、約3年の研究期間で新たな物理的観察手法の開発を行ったことは評価に値すると考えている。そのため、当初の目標はほぼ達成することができた。

6. 研究総括の見解

電子顕微鏡画像から3次元構造を求めるための単粒子構造解析法を改良するために、本研究者は3次元画像再構成のための新しいアルゴリズムを考案し、解析時間を大幅に短縮することに成功した。いまだ完全自動化には至っていないが、それに近づいているので早期の達成を望む。この手法により8種類もの膜タンパク質の構造を解析している。高く評価したい。また、SEMによる新しい観測方法は興味深い。早くユニークな成果を期待したい。

7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Toshihiko Ogura and Chikara Sato, “A fully automatic 3D reconstruction method using simulated annealing enables accurate posterioric angular assignment of protein projections”, J. Struct. Biol., Vol.156, p371–386 (2006)

・Yusuke Maruyama, Toshihiko Ogura, Kazuhiro Mio, Shigeki Kiyonaka, Kenta Kato, Yasuo Mori and Chikara Sato, “Three-dimensional reconstruction using transmission electron microscopy reveals a swollen, Bell-shaped structure of transient receptor potential melastatin type2 cation channel”, J. Biol. Chem., Vol.282, p36961–36970 (2007)

・Kazuhiro Mio, Toshihiko Ogura, Muneyo Mio, Hiroyasu Shimizu, Tzyh-Chang Hwang, Chikara Sato and Yoshiro Sohma, “Three-dimensional reconstruction of human cystic fibrosis transmembrane regulator chloride channel revealed an ellipsoidal structure with orifices beneath the putative transmembrane domain”, J. Biol. Chem., Vol.283, p30300–30310 (2008)

・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, p79–84 (2008)

・Toshihiko Ogura, “Analyzing indirect secondary electron contrast of unstained bacteriophage T4 based on SEM images and Monte Carlo simulations”, Biochem. Biophys. Res. Commun., 308, p 254–259 (2009)

(2) 特許出願

・発明者: 小椋 俊彦

発明の名称: 非接触型走査プローブ顕微鏡

出願人: 産業技術総合研究所

出願日: 2008 年 4 月 25 日(未公開)

・発明者: 小椋 俊彦

発明の名称: 走査型電子顕微鏡およびその使用方法

出願人: 産業技術総合研究所

出願日: 2008 年 10 月 17 日(未公開)

・発明者: 小椋 俊彦

発明の名称: 非接触型走査プローブ顕微鏡

出願人: 産業技術総合研究所

出願日: 2008 年 12 月 22 日(未公開)

・発明者：小椋 俊彦

発明の名称：非接触型走査プローブ顕微鏡

出願人：産業技術総合研究所

出願日：2009 年 2 月 16 日 (PCT出願、未公開)

その他 国内特許出願 1 件 (未公開)

(3) 著書

・三尾和弘、小椋俊彦、佐藤主税、“イオンチャネル・受容体の単粒子構造解析”、細胞工学
Vol.25, No.3 p236-241、2006

(4) 学会発表

・小椋 俊彦、“電子顕微鏡画像を用いたタンパク質の自動 3 次元構造解析技術の開発”、第
六回産学官連携推進会議、2007/6/16-17

(B) その他の主な成果 なし