

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「計測技術と高度情報処理の融合による
インテリジェント計測・解析手法の開発と応用」
研究課題「クライオ電子顕微鏡法のベイズ高度化と
他計測との融合」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者：光岡 薫
(大阪大学 超高压電子顕微鏡センター
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究提案では、膜タンパク質やその巨大複合体を対象とし、クライオ電子顕微鏡(電顕)を用いた単粒子解析(SPA)法や電子線トモグラフィー(ET)法について、その構造解析手法を、ベイズ推定や機械学習を利用して高度化・汎用化を行った。さらに、他の計測、特に X 線 1 分子追跡法(DXT)やシミュレーションの結果と統合し、巨大複合体や分子動態について、原子レベルの分解能での解析を行うことを目指した。このような研究提案を実現するため、以下のように 3 つの課題に取り組んだので、それぞれの成果について紹介する。

【課題 1】SPA のベイズ推定などを利用した高度化・汎用化

SPA 法の高度化については、情報処理の面から安永グループにより、分散推定アルゴリズムを用いた新たな 3 次元再構成法の提案と変分オートエンコーダ(VAE)を用いたクラス分類を行った。光岡グループは、研究期間中に最新の電子直接検出カメラをセットアップし、それにより得られる電顕画像の質や量を著しく向上することができたが、その評価から、カメラの MTF (Modulation Transfer Function) が分解能の向上と相関しており、解析の高分解能化には粒子の向きの決定が最も重要であることを示唆する結果を得た。そこで安永グループにおいて、投影方向の角度探索のため、確率分布としての角度推定を、尤度を用いて、その分散を推定した。さらに、その高速化のため、勾配降下最適化法を導入した。

また現状、SPA における二次元クラス分類や三次元クラス分類では、その分類クラス数を手入力する必要があるため、そのクラス数の自動決定に安永グループが取り組んだ。VAE を用いて得られた潜在空間に対して、ガウス混合モデルとベイズ情報基準を利用して最適の分類クラス数を同定することができた。

さらに、SPA 法の汎用化について、計測の面から、構造解析の対象となる試料の拡大を目指して、特に多くの膜タンパク質について、その構造解析が可能となる手法の検討に光岡グループが取り組んだ。膜タンパク質のナノディスクへの再構成等を検討し、例えば V-ATPase について、天然に近い活性がある状態での構造解析を行うことができるようになった。

【課題 2】ET などのベイズ推定などを利用した高度化・汎用化

クライオ ET 法の汎用化について、計測の面から光岡グループが、その標準的な試料作製法の検討やデータ収集手法の検討等を行った。この技術を、神経細胞などで形成される成長円錐に存在する糸状仮足について適用し、糸状仮足の形状を決定しているアクチン線維のバンドルを電顕観察した。アクチン束はその線維間をファシンというタンパク質の架橋により形成されており、そのアクチン-ファシン複合体の三次元再構成を行った。また、汎用的な試料作製のため、通常は利用されている金コロイドの位置マーカー無しでの 3 次元再構成や、そして、安永グループにおいて蛍光物質を用いた標的分子の半自動データ収集などの技術開発も行った。

クライオ ET 法の高度化については光岡グループが、計測の面から位相板の利用等を検討し、また、情報処理の面からいろいろな解析手法について検討した。位相板のクライオ電顕においての利用については、自動データ収集ができるシステムを実現した。また、複数の解析ソフトウェアの利用を検討し、アクチン-ファシン複合体について、その分解能が 1.6nm から 1.2nm に向上した。

【課題 3】SPA と ET などのデータ統合の高度化・汎用化

データ統合の高度化については、まずは計測の面から、DXT と SPA を用いてデータ統合を検討できるデータセットを得るため、それぞれの手法の汎用化を進めた。三尾グループにより、DXT について、実験室系でデータ収集を行うことができる回折ブリッキング法(DXB)を開発した。これらの手法を、シャペロンやイオンチャネルなどに応用し時間分解能を持つデータが収集でき、さらに DXB によりタイヤゴムとフィラー成分の分子動態同時計測も行った。このように、DXT と SPA における汎用化を推進することができ、それぞれでほぼ同一の複数試料について、2 手法でのデータ取得を行うことができた。

しかし、例えばイオンチャネルである KcsA については、安永グループによる SPA 解析から重要な動的部位が可視化できないなど、データ統合に適したデータセットが得られなかった。そこで、急速凍結により反応時間を変えた SPA 解析結果について、上述の VAE を用いて分類し、時間情報と関係付けられるか検討した。

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:

SPAにより、天然の状況に近いナノディスクを用いて精製したV-ATPaseとその膜貫通ドメインであるVoについて原子モデルが得られる分解能での構造解析を行った。それにより、Voドメインのみだとプロトン輸送が阻害されるV-ATPaseの自己阻害機構について提案することができた。膜タンパク質複合体について、天然の状況に近い構造の解析を行うことが可能となり、機能と構造の関係解明に寄与する。

2.

概要:

DXB技術を用いて、生きている細胞上でのタンパク質の分子内部運動の計測が可能になった。 $\mu\text{sec}\sim\text{msec}$ レベルの運動を分けて解析が可能であるため、電顕データの他、他の1分子計測技術や分子シミュレーションをつなぐ可能性も示唆された。

3.

概要:

天然に近い環境で機能している回転型ATPaseについて、SPAを用いて構造解析を行い、その多くの中間体の高分解能構造を明らかにし、ATPのエネルギーを用いた回転機構に関する知見を得た。さらに、それらのクライオ電顕データを用いて複数構造と時間変化の対応付けが可能かVAEを用いて検討した。これにより、クライオ電顕を用いて得られた複数構造の応用解析に寄与できると考えている。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1.

概要:

深層学習を用いたアルゴリズムを検証し、それを用いて複数構造と構造変化の関係づけが可能であることを示し発表した。加えて、クライオ電子顕微鏡法を中心とした巨大システムに関して調査し、そのシステムの方向性と検討すべき内容について報告した。

2.

概要:

位相板を用いたクライオ電顕からの画像データ収集を行い、得られた画像を用いて単粒子クライオ電顕法による構造解析を検討した。その際に、最適なデータ収集を行うため実時間で位相変化量を決定できるシステムを構築した。さらに電子線トモグラフィー法において、このシステムを用いることで、最適な条件でのデータ収集が可能となった。

3.

概要:

DXB技術は当初タンパク質のダイナミクス計測を目的に開発されたが、回折輝点をもつ結晶性材料にも活用できることが分かった。DXB技術を用いてタイヤゴム中のカーボン微粒子と高分子(ポリブタジエン)の動きの同時観察に成功し、論文発表とプレス発表を行なった。他材料系へも広く展開も期待される。

<代表的な論文>

1. H. Sekiguchi, M. Kuramochi, K. Ikezaki, Y. Okamura, K. Yoshimura, K. Matsubara, J. Chang, N. Ohta, T. Kubo, K. Mio, Y. Suzuki, L. M. G. Chavas & Y. C. Sasaki (2018) Diffracted X-ray Blinking Tracks Single Protein Motions. *Sci. Rep.* **8**, 17090.

概要:

ミリ秒から103秒の広い時間範囲の分子内部運動の観察を可能とする新規のX線1分子技術を提案した。単色X線回折実験中に、水溶液中のブラウン運動のため、単一ナノ結晶の動きからX線回折強度が点滅する。これは回折点がブラッグ条件を満たしたり外れたりすることで観察される。結果として、ナノ結晶でラベルされたタンパク質分子のライブ運動をこの回折X

線点減手法を用いて時間的軌道から抽出できる。

2. N. Mamizu & T. Yasunaga (2022) Estimation of Projection Parameter Distribution and Initial Model Generation in Single-Particle Analysis. *Microscopy* **71**, 347.

概要:

SPA での三次元再構成における投影パラメータの決定問題について検討した。今回、分散推定を用いる事により、角度刻みによるグリディングに依存しない投影角を決定することができた。さらにこの手法を用いて、参照画像を用いる事なく、初期モデルの構築ができた。また、この手法を用いることで、従来法のグリディングを用いる手法に比べて、角度決定のアーティファクトを少なくすることができた。

3. A. Nakano, J. Kishikawa, K. Mitsuoka & K. Yokoyama (2023) Mechanism of ATP hydrolysis dependent rotation of bacterial ATP synthase. *Nat. Commun.* **14**, 4090.

概要:

F-ATPase の水溶性部分は、その中心軸である γ サブユニットが ATP のエネルギーを利用して回転する回転モーターである。 γ サブユニットは、 $\alpha_3\beta_3$ サブユニットにより約 120 度ずつ回転する。その 120 度回転は、80 度と 40 度のサブステップに分けられるが、我々はその回転のほとんど全ての中間体構造について、SPA によりヌクレオチドの状態が分かる高分解能で決定した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 光岡グループ

研究代表者: 光岡 薫 (大阪大学超高压電子顕微鏡センター 教授)

研究項目

- SPA 電顕データ収集・構造解析
- ET 電顕データ収集・解析アルゴリズム検討・構造解析
- データ統合アルゴリズム応用

② 安永グループ

主たる共同研究者: 安永 卓生 (九州工業大学大学院情報工学研究院 教授)

研究項目

- SPA 解析アルゴリズム開発
- ET データ収集効率化・構造解析
- データ統合のための構造解析
- MicroED 解析アルゴリズム開発

③ 三尾グループ

主たる共同研究者: 三尾 和弘 (産業技術総合研究所先端オペランド計測技術オープンイノベーションラボラトリ ラボチーム長)

研究項目

- SPA 解析試料作製
- DXT データ収集・アルゴリズム開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

1 分子動態解析 DXB 技術に関し、材料評価や劣化評価に関する資金提供型共同研究を2社とおこなっているが、さらに予備的検討を数社と行っている。