

# 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

小椋 俊彦

産業技術総合研究所脳神経情報研究部門

## 1. 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。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、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。

タンパク質分子の3次元構造を決定する単粒子構造解析法は、透過型電子顕微鏡で撮影されたタンパク質画像を用いて構造解析を行う。電顕によるタンパク質画像は、タンパク質が電子線に極めて弱いため、電子線照射量を弱めたり重金属による染色を施すため、極めてノイズが高くそのままの画像で構造を調べることは不可能である。そのため、電子顕微鏡画像より切り出し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、これが一致するもの同士を加算平均することでノイズを減少させる。この平均画像を基に3次元構造を再構築する。従って、結晶サンプルが必要なく、精製されたタンパク質さえあれば3次元構造を決定することが可能である。こうした特長は、極めて結晶化が困難な膜タンパク質の構造解析に特に有効である。しかしながら、分解能は15Å程度とX線結晶構造解析よりも悪く、解析期間も人的作業が多数入るため数年を要していた。特に、解析初期の粒子画像の拾い上げや3次元角度の推定は手作業により行われており、多大な時間と労力が必要とされている。こうした問題を解決するためには、画像情報処理方法の自動化と高速・高精度化が必要不可欠である。本研究では、単粒子構造解析にNeural-NetworkやSimulated-Annealing等の柔軟な情報処理の方法論を導入することで従来法を凌ぐ手法の開発に成功した。さらに、新規に開発した手法を用いて様々なタンパク質の構造解析を進めた。現在、新規のタンパク質の解析期間は、本解析手法を用いることで2ヶ月程度に短縮された。しかしながら、より理想的な解析では、その場でタンパク質を観察しその場で解析できることが重要となる。これを達成するためには、実験により観察されるタンパク質の画像ノイズを低下させコントラストを向上させる必要がある。

タンパク質のその場観察を可能とするため、本研究では、タンパク質をダメージ無く高コントラストで観察する新しい方法の開発を進めた。本さきがけ研究の期間中に2種類の測定方法を開発した、一つは2本のプローブを用いた観察方法であり、もう一方は走査型電子顕微鏡(SEM)による新規の観察方法である。これらの方法を生物試料に応用し高コントラストの画像を得ることができた。今後は、こうした新しい観察手法による画像と単粒子構造解析の自動解析技術を融合させることで、その場観察・その場3次元構造解析の実現を目指す予定である。

## 2. 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)。

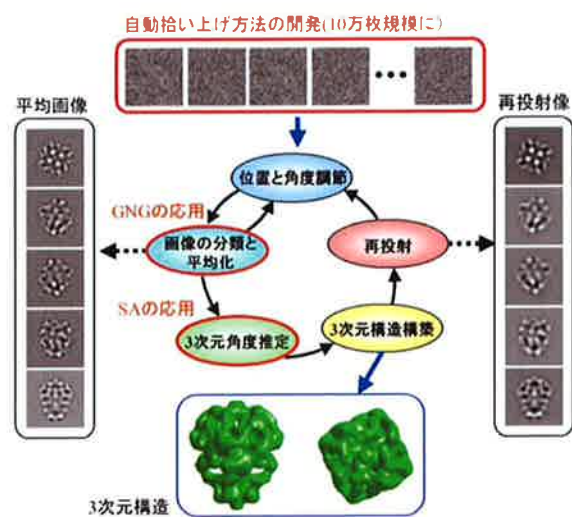


図1 単粒子構造解析の概要、数千から数万枚のタンパク質電顕画像から100クラス程度の平均画像を求め、ここから3次元構造を解析する。

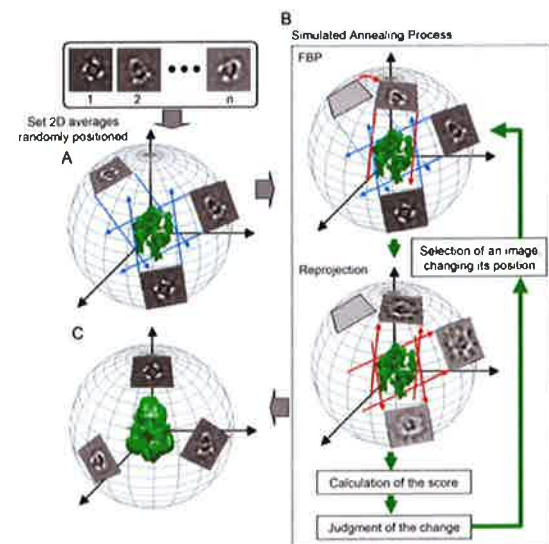


図2 Simulated-Annealingを応用した3次元角度推定方法の概要、数十枚の平均画像のオイラー角を自動的に決定する。

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  $\gamma$ -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 チャネルの解析を行い、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 チャネル(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。

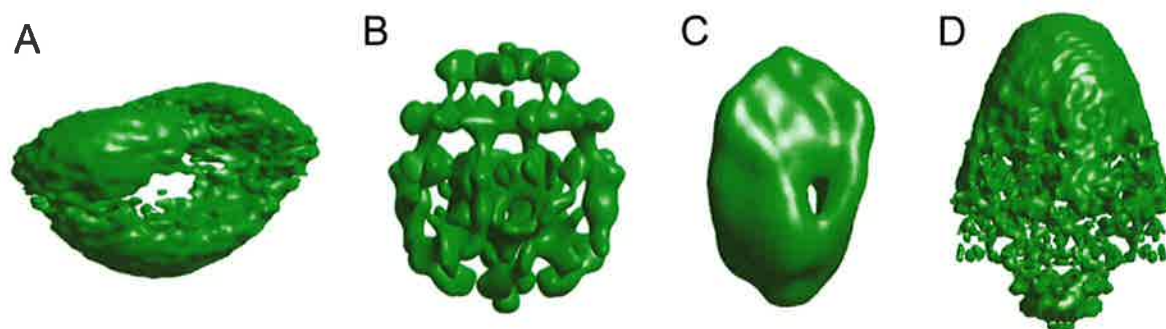


図3 本手法を用いた様々な膜タンパク質の単粒子構造解析の結果、A:アルツハイマー病関連膜タンパク質γセクレターゼの構造、B: TRPC3チャネルの構造、C: 筋細胞の細胞内小胞に存在するTRICチャネルの構造、D: TRP-M2チャネルの3次元構造。

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2本のプローブを備えた非接触走査型 Dual-probe 顕微鏡の開発と SEM による非染色・低ダメージ観察法の二種類の観察方法を開発した。

非接触型プローブ顕微鏡では、先端を鋭敏に研磨したタングステンプローブと自己検知型カンチレバーをサブミクロンオーダーの隙間を設けて固定する。測定サンプルは、この隙間の中に設置し、ステージによりXY軸に走査させる。タングステンプローブには、入力信号としてカンチレバーの機械的な共振周波数と同じ周波数の交流信号を加える。これによりサンプルを透過したタングステンプローブからの微小なクーロン力は、自己感知型カンチレバーにより電気信号として検出される。サンプルをXY軸方向にスキャンさせることにより、サンプルの各位置での検出信号の振幅や周波数変化を計測し、その値をプロットすることで画像を構成した。タングステンプローブとカンチレバーは、ナノマニピュレータにそれぞれ固定されており、目的の場所へとマニピュレータを操作することで移動することが可能である。こうした、マニピュレータとサンプルステージはSEM内に設置され、サンプルの位置をSEM画像で確認しながらマニピュレータを操作し、プローブとカンチレバーを目的の位置へと移動することが可能である。本方法により、カーボンメッシュの構造やT4ファージ等の観察を行い、極めて高コントラストで計測が可能であることが確認された。

一方、SEMを用い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。

以上のように、本研究では、単粒子構造解析の高速化・高精度化を達成し、様々なタンパク質の3次元構造解析に応用した。さらに、非接触走査型 Dual-Probe 顕微鏡と SEM による ISEC 法の開発を行った。今後は、こうした測定方法と単粒子構造解析のアルゴリズムを融合することで、タンパク質のその場観察・その場3次元構造解析へと開発を進める予定である。

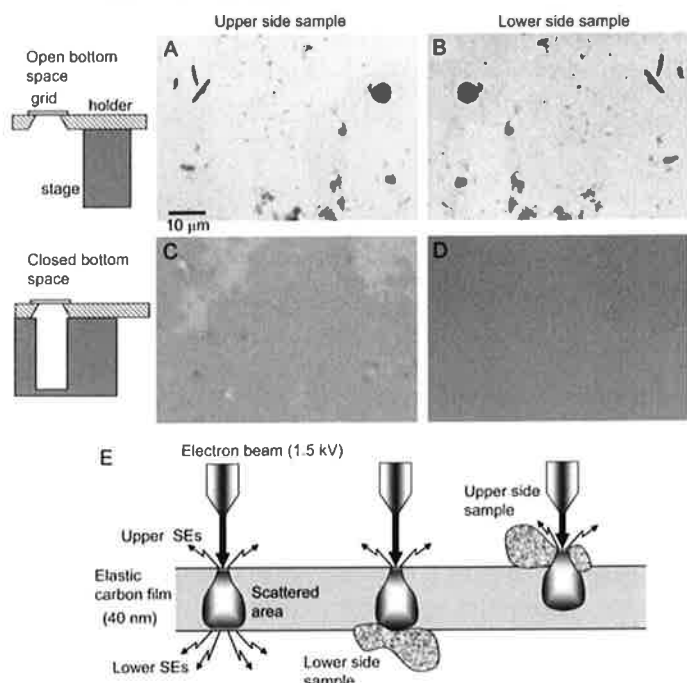


図4 SEMによるカーボン薄膜の非染色バクテリアサンプルの観察画像とISEC条件の概要。A:片持ち状態のカーボン薄膜上サンプルの画像。B:カーボン薄膜下の画像。C:アルミチューブ上にカーボン薄膜を設置し、薄膜上にサンプルを固定した時の画像、サンプルのコントラストが消失。D:アルミチューブ上のカーボン膜下のサンプル画像、完全にコントラストが消失。これらの画像は、40nmカーボン膜を用いて1.5kV加速条件で観察した。E: ISEC条件の概念図、40nmカーボン膜に1.5kVの電子線を照射すると、電子が膜内を散乱しながらカーボン膜内に吸収される。しかし、下部表層に到達した電子により下面より二次電子が放出される。カーボン膜下のサンプルは、この二次電子を吸収することで高いコントラストが生じる。

### 3. 主な論文

- T. 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)
- K. Mio, Y. Kubo, T. Ogura, T. Yamamoto, F. Arisaka and C. Sato, 'The motor protein prestin is a bullet-shaped molecule with inner cavities', *J. Biol. Chem.*, Vol.283, p1137-1145 (2008)
- Y. Maruyama, T. Ogura, K. Mio, S. Kiyonaka, K. Kato, Y. Mori and C. 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)
- M. Yazawa, C. Ferrante, J. Feng, K. Mio, T. Ogura, M. Zhang, P. Lin, Z. Pan, S. Komazaki, K. Kato, M. Nishi, X. Zhao, N. Weisleder, C. Sato, J. Ma and H. Takeshima, 'TRIC channels are essential for  $Ca^{2+}$  handling in intracellular stores', *Nature*, Vol.448, p78-82 (2007)
- K. Mio, T. Ogura, S. Kiyonaka, Y. Hiroaki, Y. Tanimura, Y. Fujiyoshi, Y. Mori and C. Sato, 'The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas', *J. Mol. Biol.*, Vol.367, p373-383 (2007)
- T. Ogura and C. 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)
- T. Ogura, K. Mio, I. Hayashi, H. Miyashita, R. Fukuda, R. Kopan, T. Kodama, T. Hamakubo, T. Iwatsubo, T. Tomita and C. Sato, 'Three-dimensional structure of the  $\gamma$ -secretase complex', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.343, p525-534 (2006)

### 4. 特許

- 小椋 俊彦、非接触型プローブ顕微鏡、特願 2008-115128、出願人：産業技術総合研究所