

クライオ電子顕微鏡法とその限界

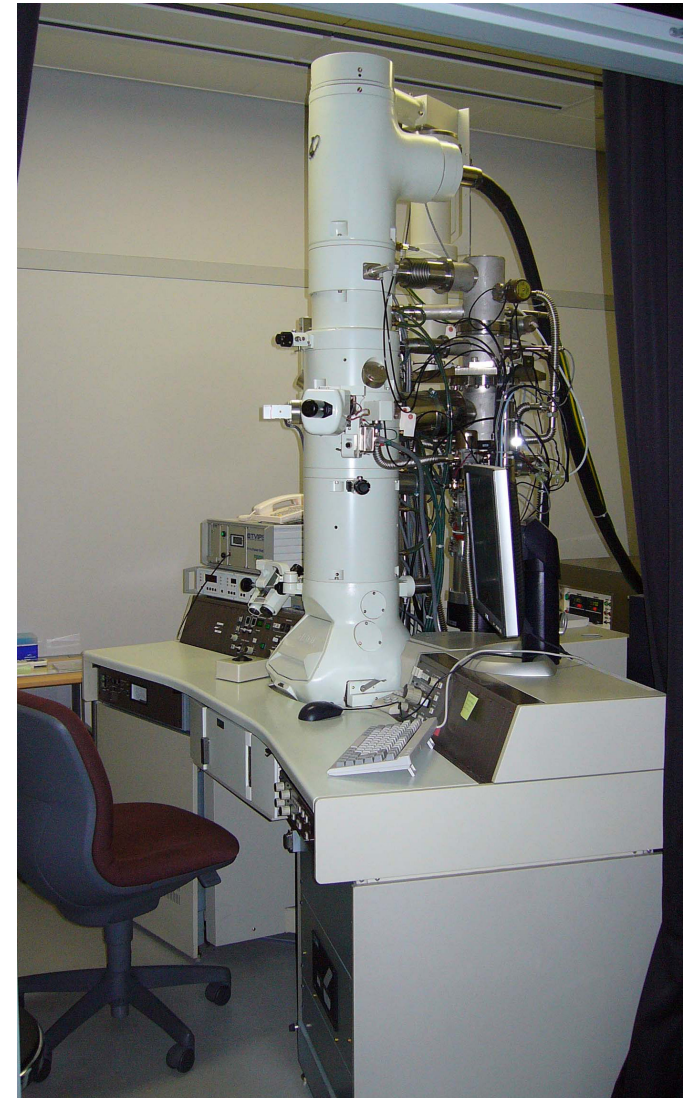
名古屋大学理学系研究科構造生物学研究センター

成田 哲博

透過型電子顕微鏡法 (TEM)

光より波長が短い電子波を使うことで、原子を直接観察することができる。

電子顕微鏡では原子が観察できることがあたりまえ。
しかし、生物試料では不可能。
なぜか。



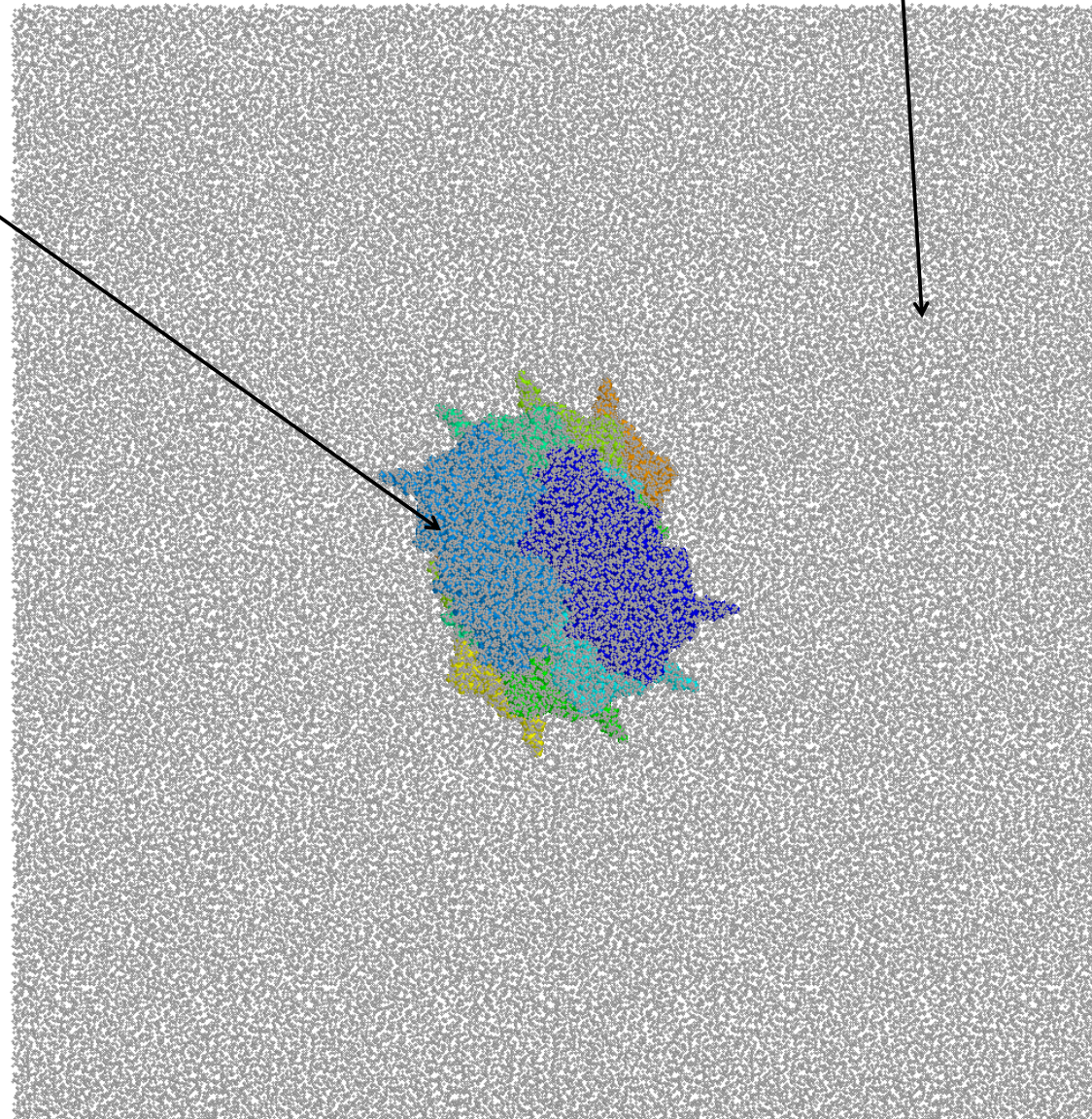
生体分子は水に囲まれている。

アクチン線維

水分子

タンパク質などの生体分子は周囲に水がないと構造を保てない。

水分子のシグナルがかぶるため、原子の直接可視化は不可能。



タンパク質構造は水との相互作用によって保たれている。⁴

タンパク質は1本のポリペプチド鎖

水中では、疎水的な部分が内側に、親水的な部分が外側に

これがタンパク質の構造を決める一番大きなファクターであり、水分子なしに構造を保てない。

しかし、電子顕微鏡で観察するためには試料を真空中にさらさなくてはならない

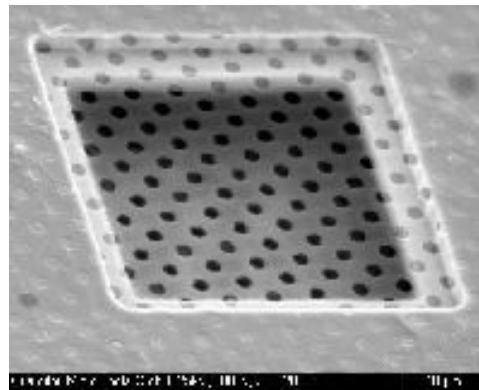
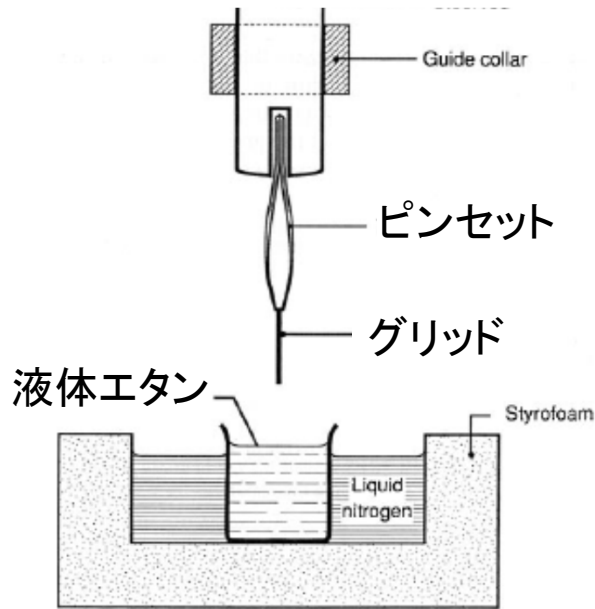
- 真空中にさらすには？ 以下の二種類の方法がある。
 - クライオ法 急速凍結
 - 負染色法 溶液を染色剤に置換、乾燥
- 電子線損傷に弱く、シグナルも弱い。
 - 平均化によるシグナル向上が必須
- 複雑な三次元構造を持つため、一枚の写真からでは構造がわからない。
 - 二次元像から三次元再構成 (単粒子解析、電子線トモグラフィ) をする

タンパク質構造解析法用の試料作成法 (TEM用)

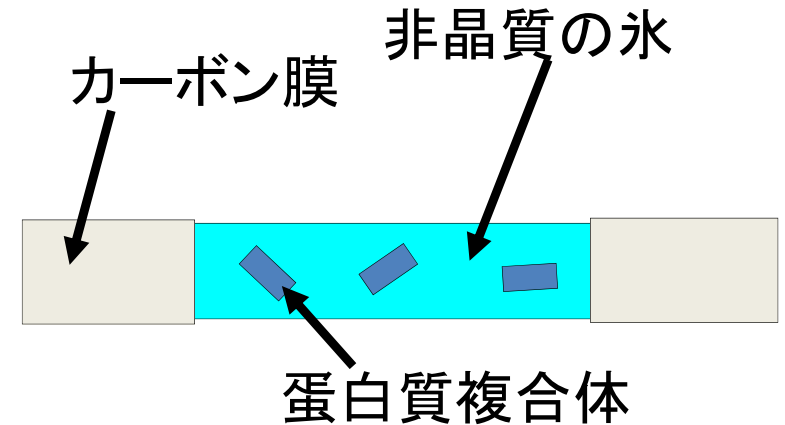
5

真空中に試料をさらすため、液体をそのまま観察することはできない。

クライオ電子顕微鏡法

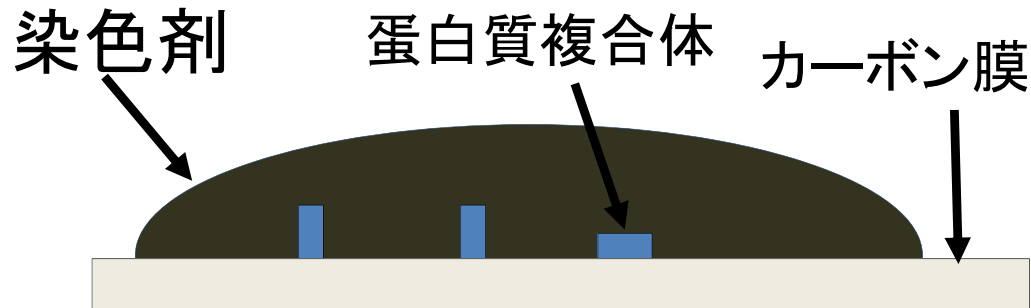


グリッド拡大図 (quantifoil)

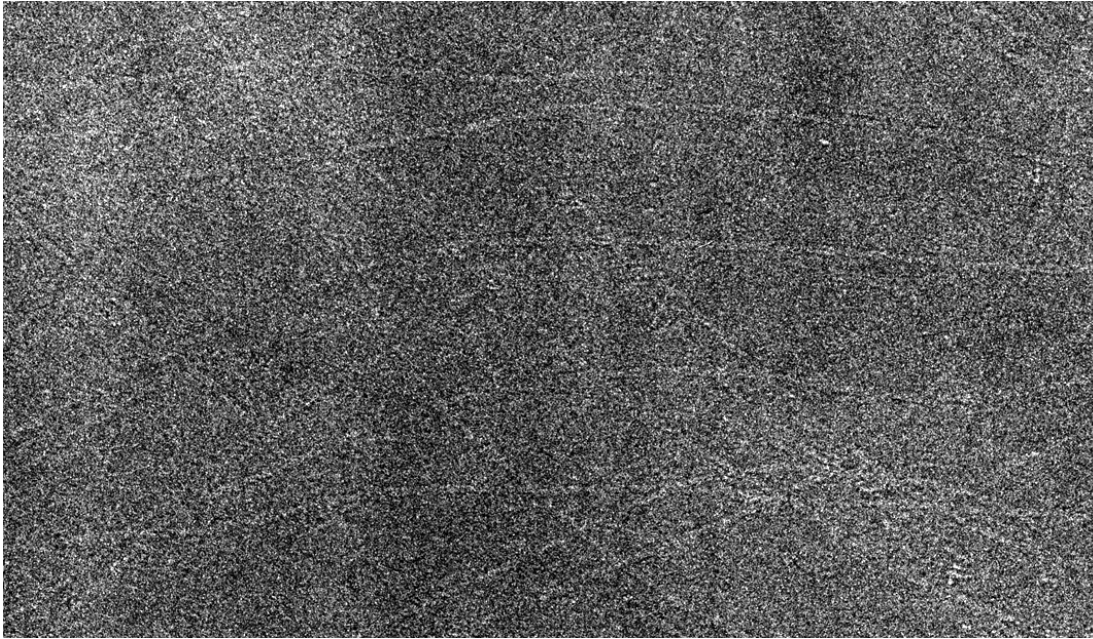


液体エタンの中で急速凍結した溶液をそのまま観察する。生理的な条件で観察できるが、コントラストが小さい。手間がかかる。高分解能構造解析が可能。

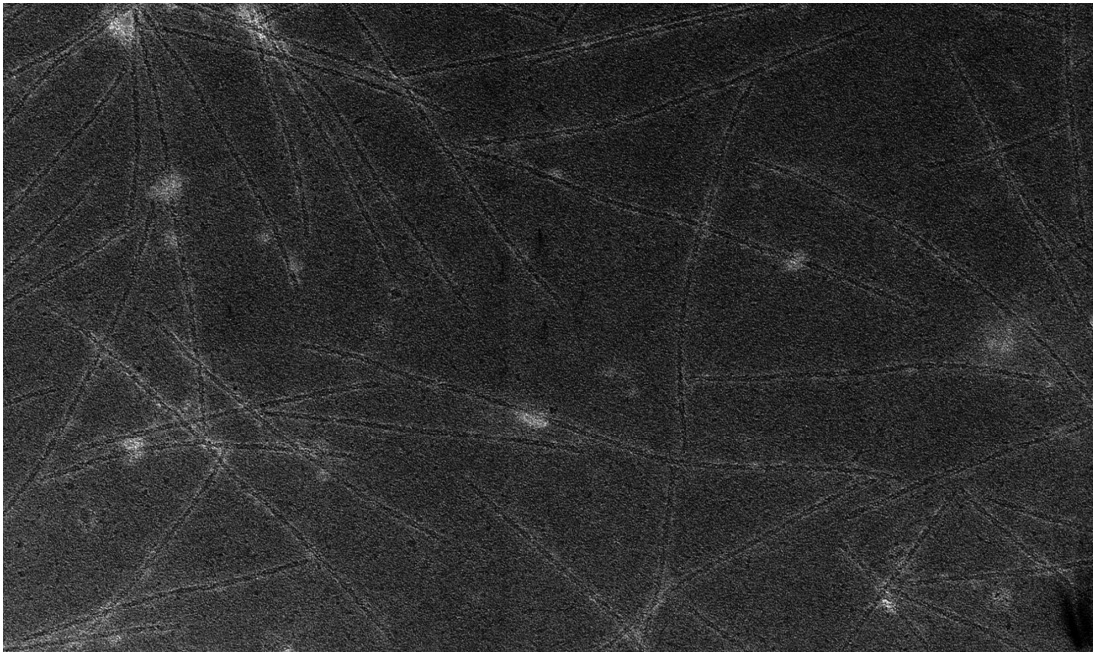
負染色電子顕微鏡法



カーボン膜に吸着させた蛋白質溶液に酢酸ウラン等の染色剤を加え、乾燥して観察する。コントラストが大きく、取り扱いも容易である。分解能は2 nm程度に制限される。吸着、乾燥による変形があるが、酢酸ウランの場合、それは比較的小さいと考えられている。

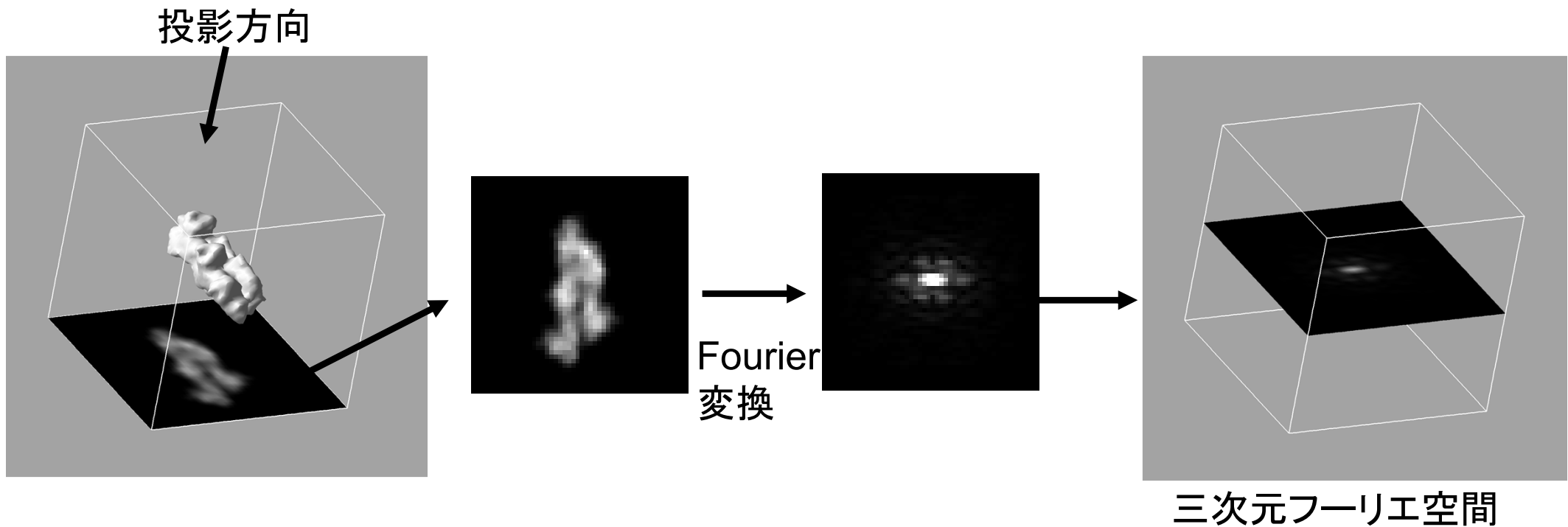


アクチンフィラメントクライオ像
(3 μm defocus)
コントラスト、シグナル/ノイズ比は低いが高分解能情報を持つ。



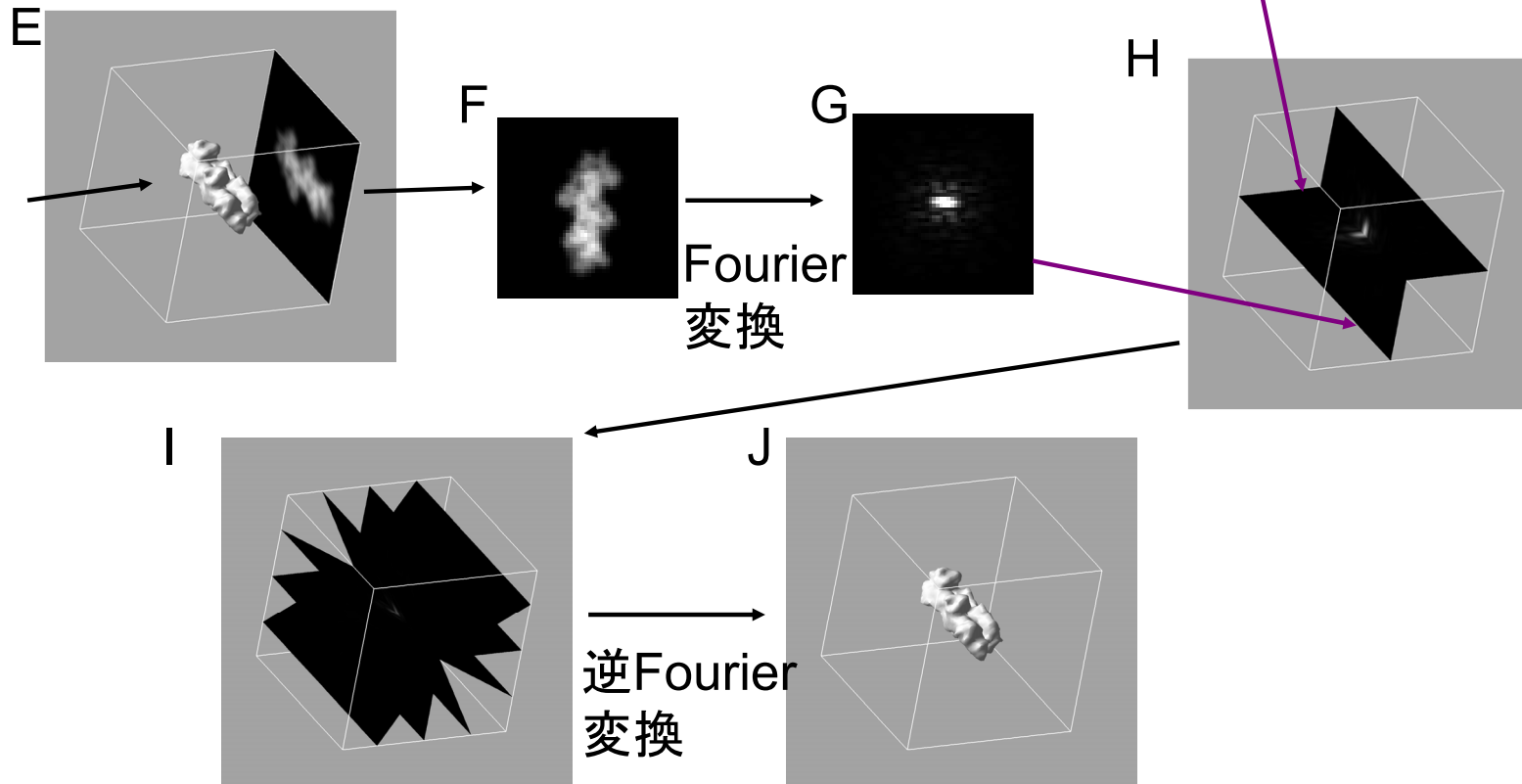
ParMフィラメント負染色像
(1 μm defocus)
コントラスト大だが、タンパク質そのものではなく染色剤を観察するため、低分解能 (~2 nm)

中央断面定理



三次元構造の投影像のフーリエ変換は、もとの三次元構造の三次元フーリエ変換の中の原点を通る1平面に等しい。この平面の法線ベクトルの方向は、投影ベクトルの方向と一致する。

従って、様々な方向の投影像を集めてくると、元の三次元構造のフーリエ変換全体のデータを得ることができる。最後にそれを逆フーリエ変換すれば、元の三次元構造を再現できる。しかし、単粒子解析においては投影ベクトルが自明でない。投影ベクトルをどう決めるかが単粒子解析の中心的な課題である。



三次元構造を得る手法は主に二つある。

単粒子解析法と、電子線トモグラフィーである。

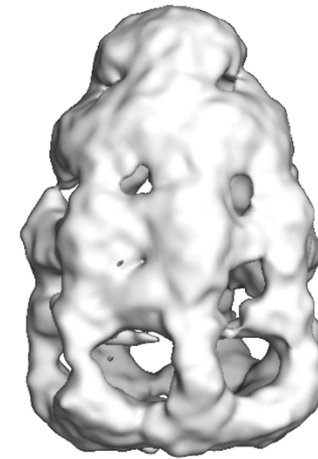
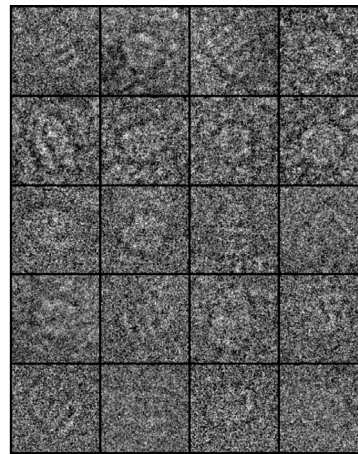
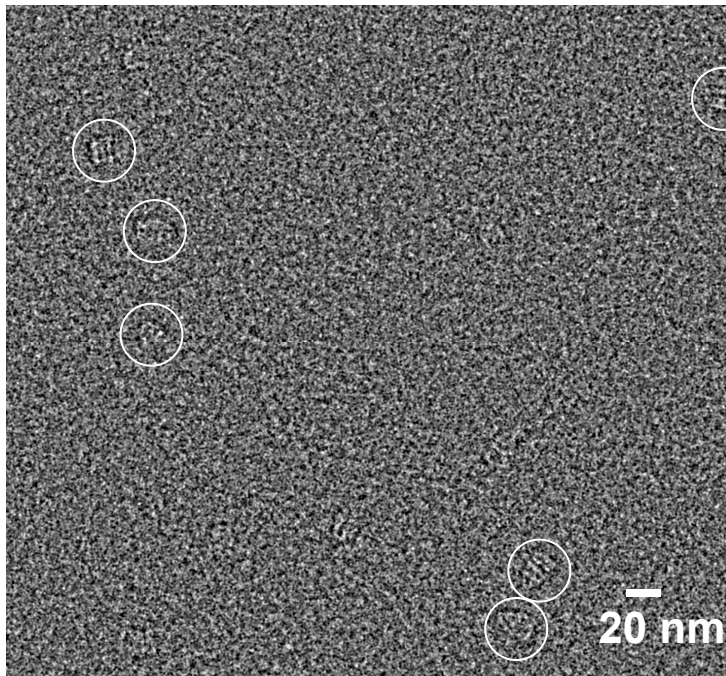
単粒子解析

一つの視野から一枚の写真を撮る。

タンパク質複合体像を写真中から選び、切り出す。

それぞれの画像の投影方向を決定する(最近ではベイズ推定を用いる).

大量の像を平均化するため、高分解能を得ることもできる。



Provided by Prof. Mitsuoka

クライオ電子顕微鏡法

試料に電子線を当てると試料が動く。

Brilot et al., J. Struct. Biol. 2012 177(3) 630-637

高速度CMOSカメラで動画を撮影し、この動きを補正することで飛躍的に分解能が上昇した。

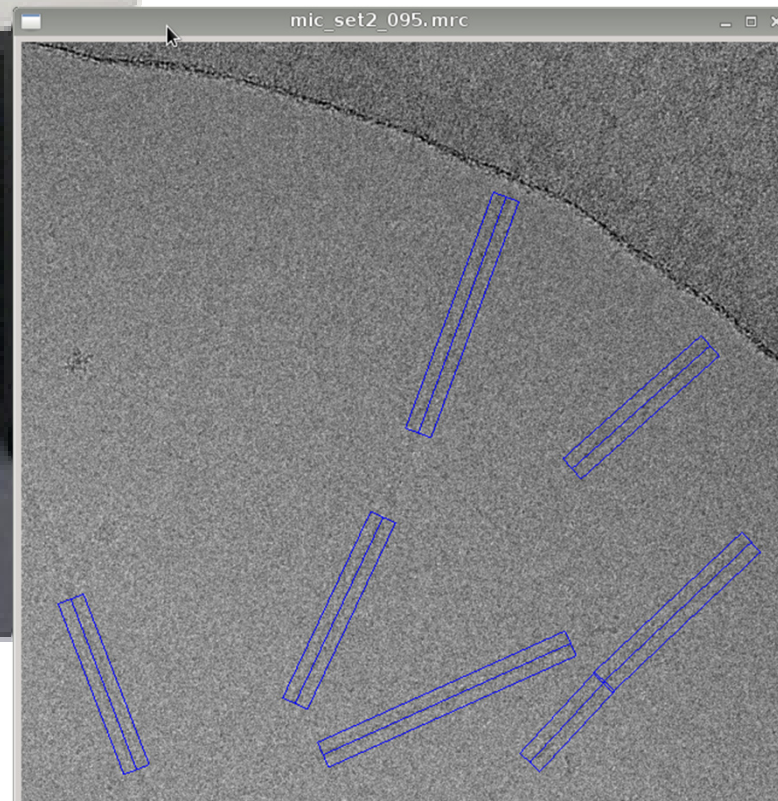
近年、側鎖が見える4Å以上の分解能構造解析が得られるようになった。

次のスライドから、私達の解析の具体例を紹介する。

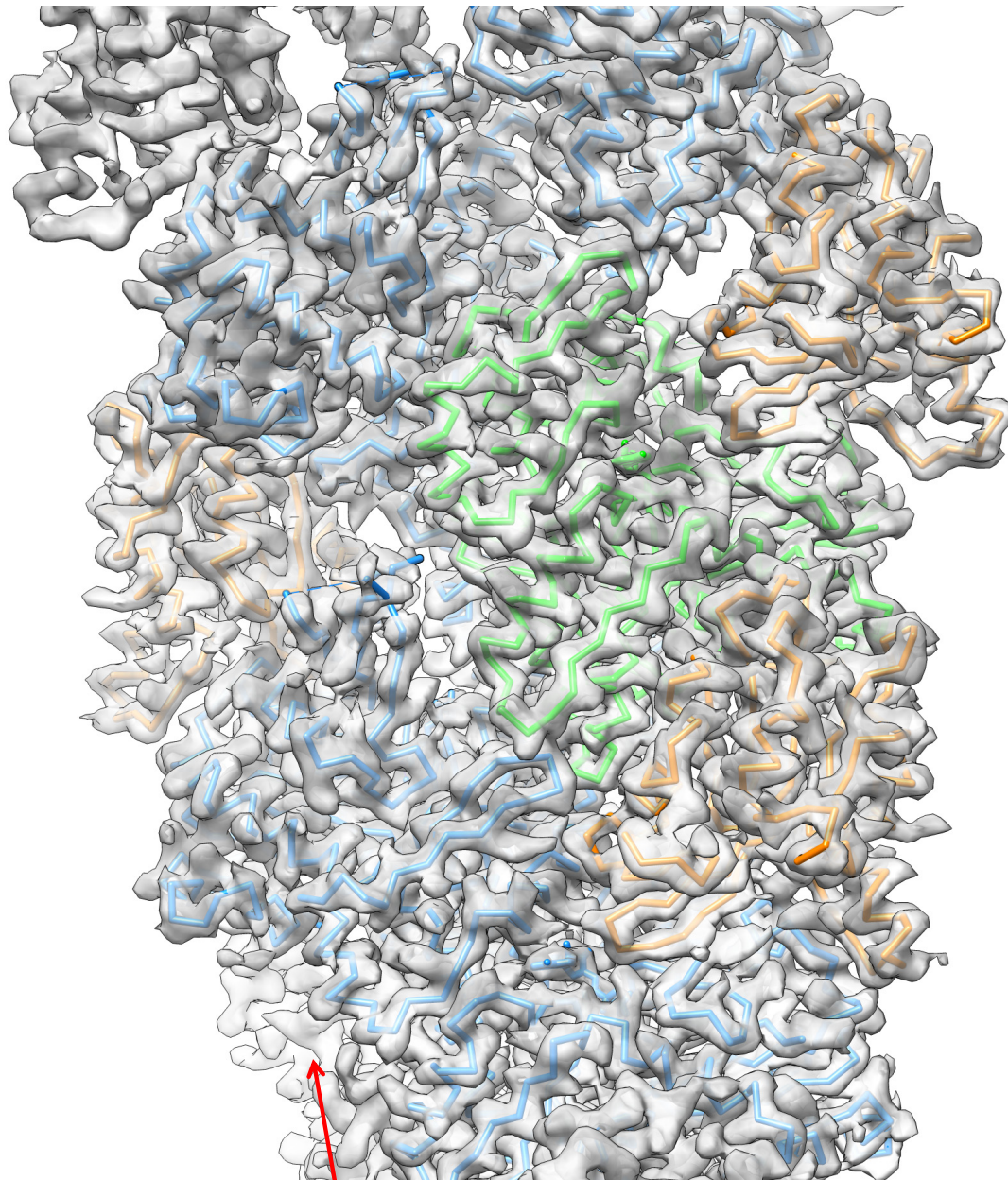
Titan Krios



300 kV、液体窒素ステージ
Falcon II ダイレクトディテクタ
自動撮影機能 (約5分で一カ所の撮影)



私達の解析例



アクチン-コフィリン複合体

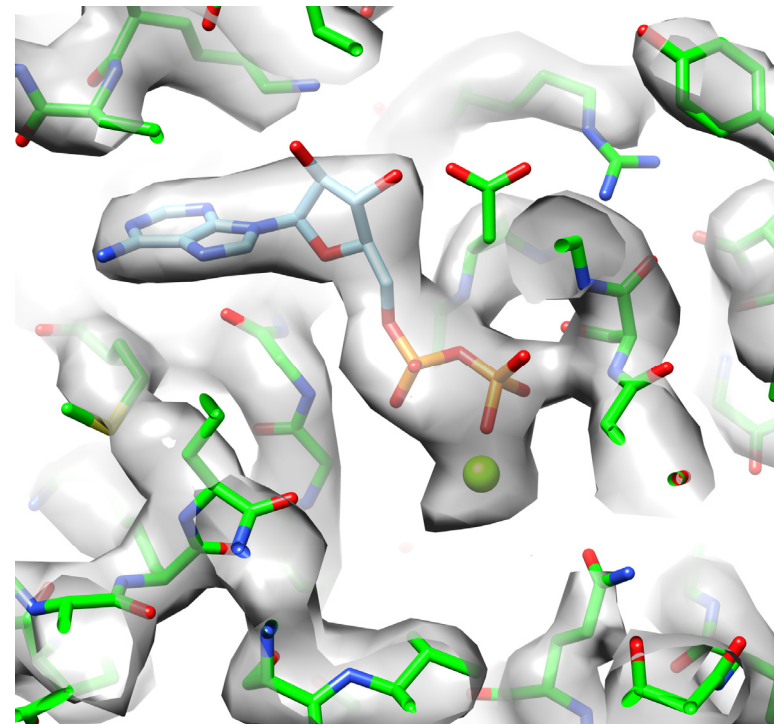
1111枚の電子顕微鏡写真

86388 particles 分解能3.8Å

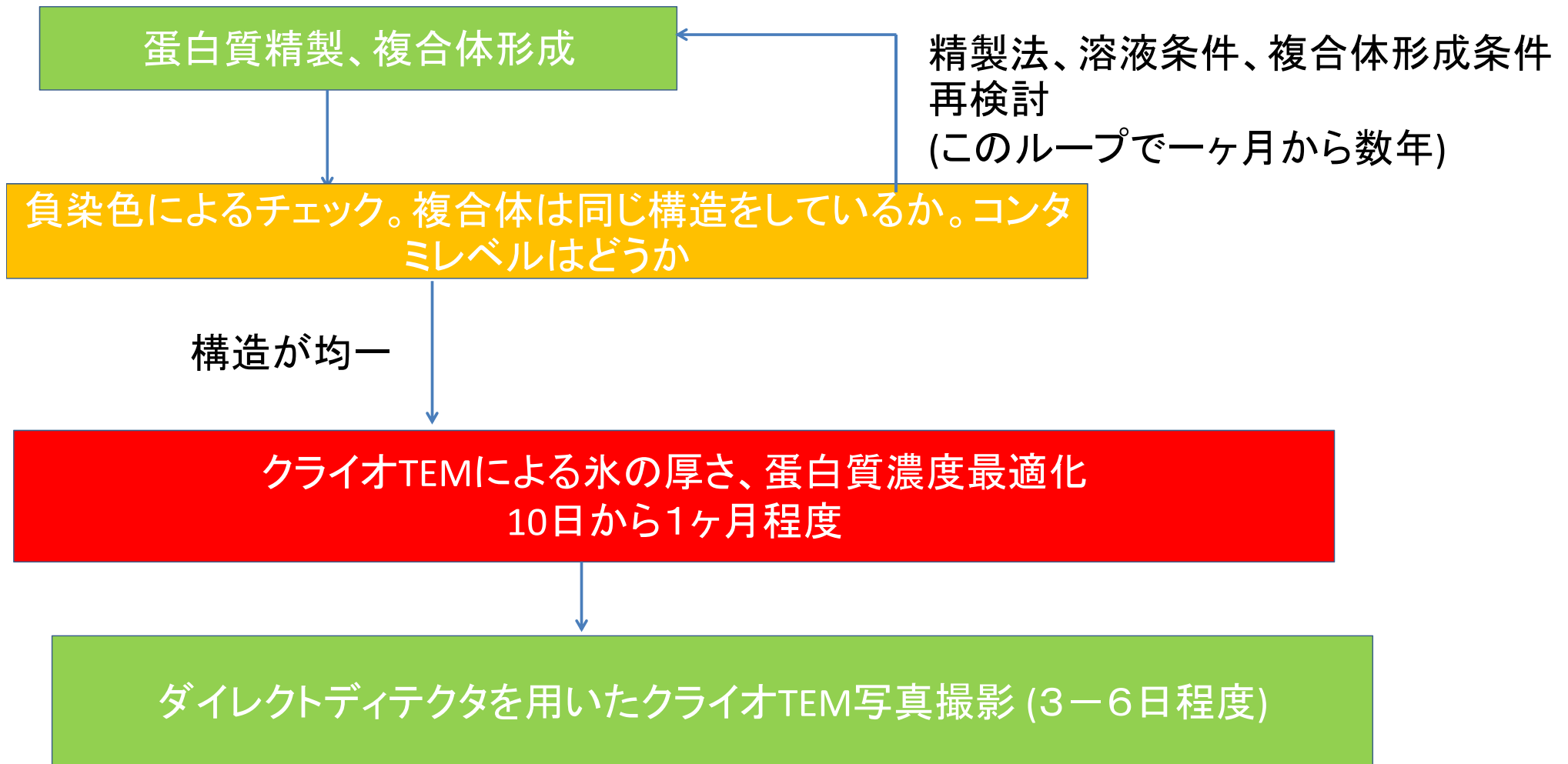
主鎖が完全に観察される

多くの側鎖の方向が見える

ADPに結合したマグネシウム原子が
ダイレクトに見える



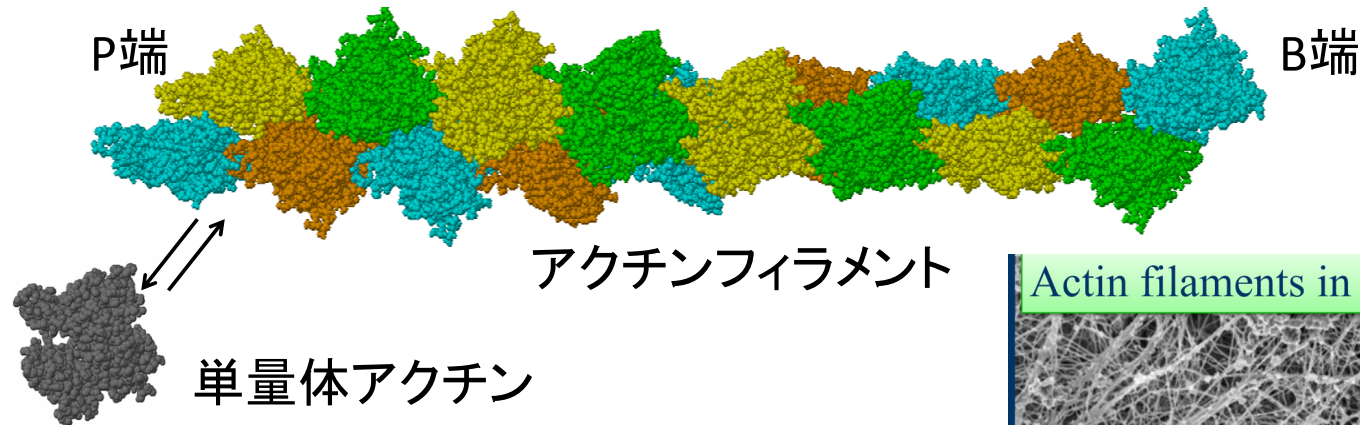
クライオ電子顕微鏡高分解能構造解析の流れ¹³



1111枚の電子顕微鏡写真は、グリッド二枚からそれぞれ三日程度かけて撮影されたものから選択した。

最後のクライオ電子顕微鏡撮影以外のところが時間がかかる。

アクチンとは



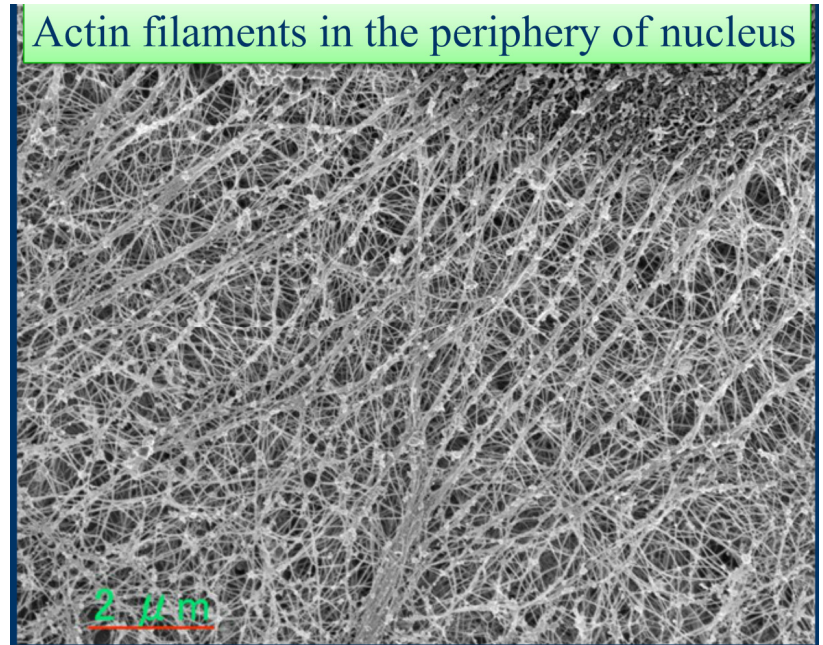
375-377残基の球状蛋白質

重合してフィラメントをつくる

全ての真核生物の全ての真核細胞に存在

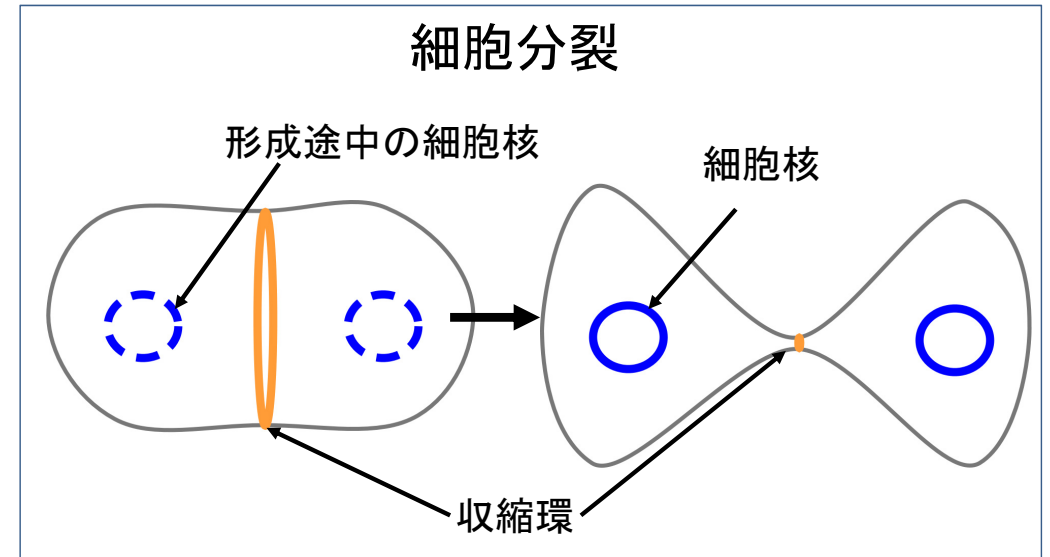
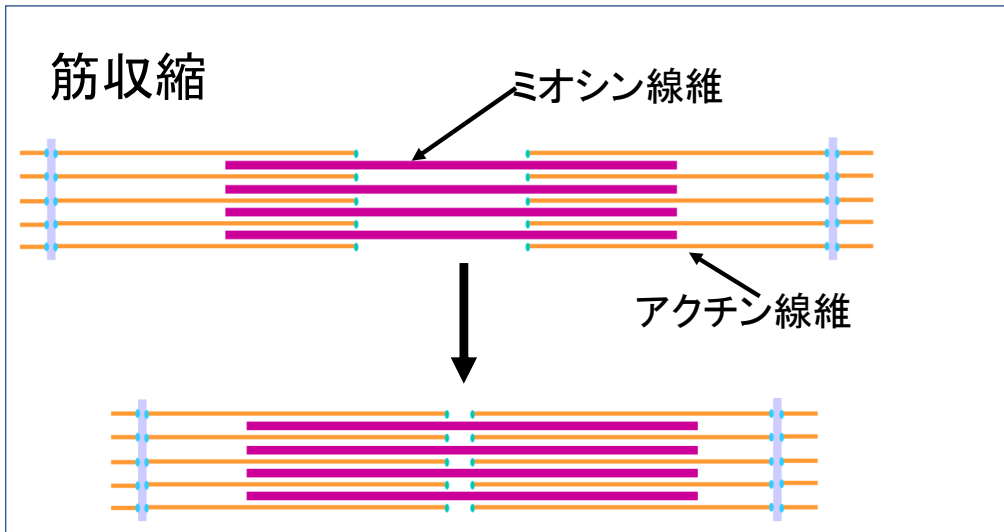
非常に保存性が高く、酵母とヒトのidentityは84 %
鳥類、は虫類、ほ乳類においては保存性100 %

全タンパク量の10%程度がアクチン(ストライヤー
生化学第七版)

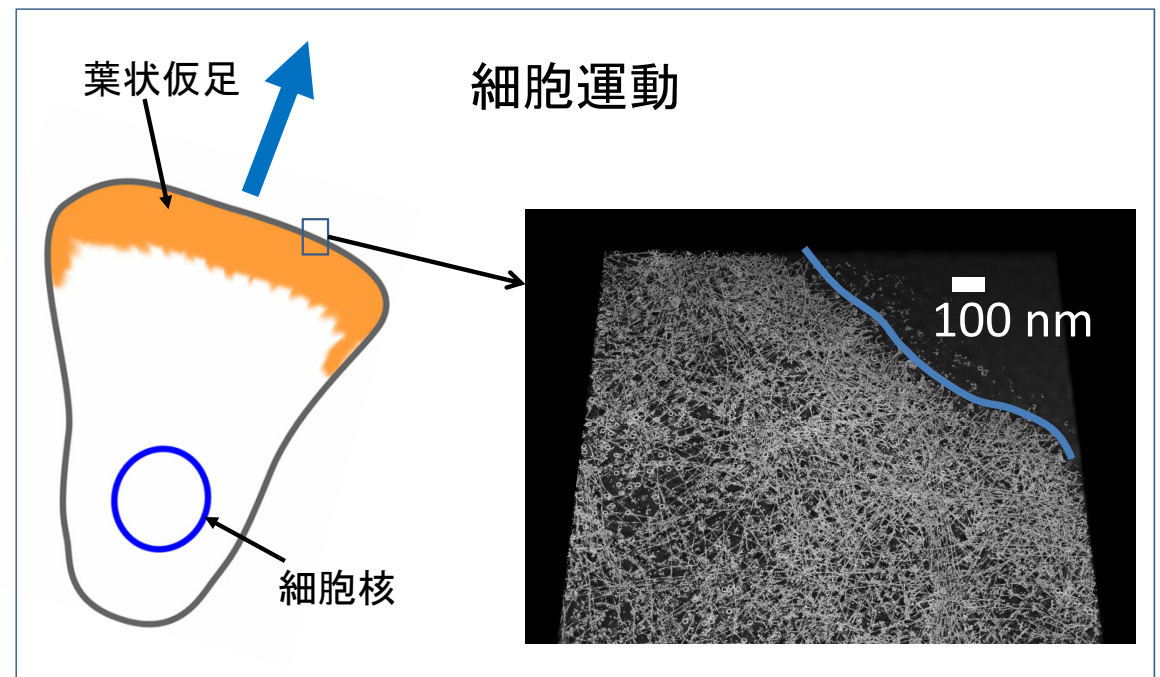
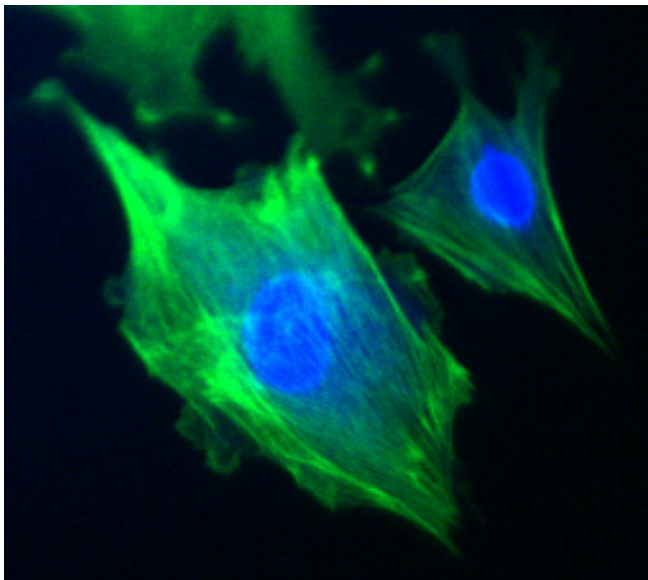


細胞膜の周りのアクチン線維
細胞の中には高濃度のアクチン線維が
存在
(臼倉治郎先生より提供)

アクチンには無数の役割がある

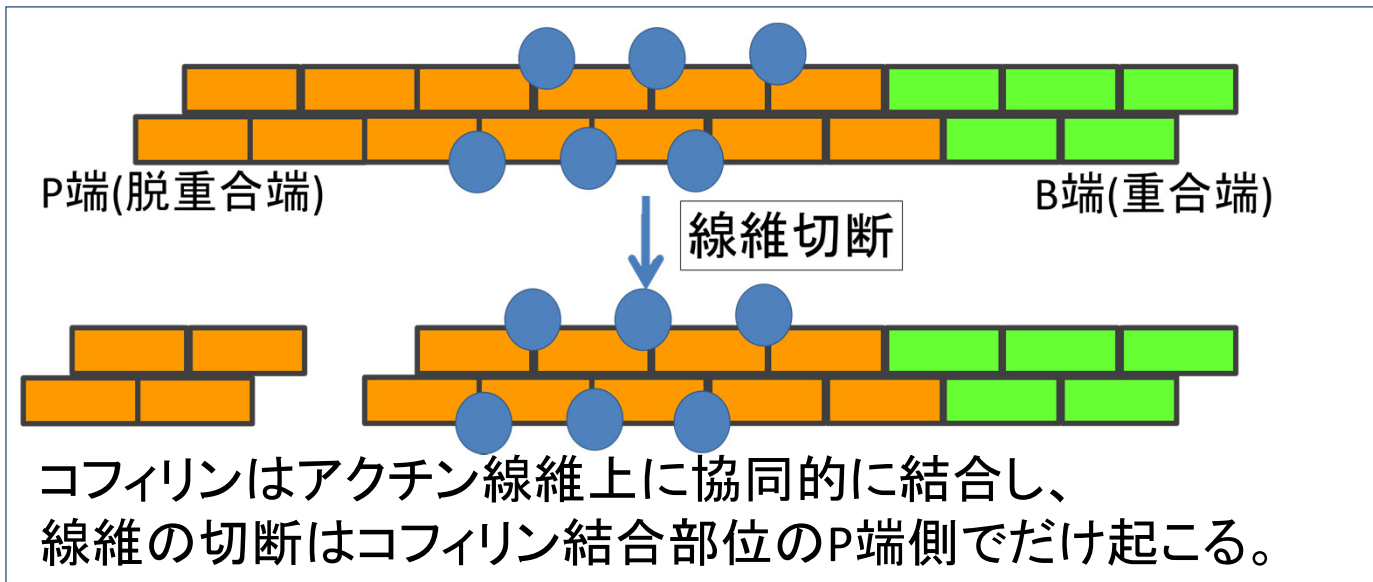


細胞形態形成



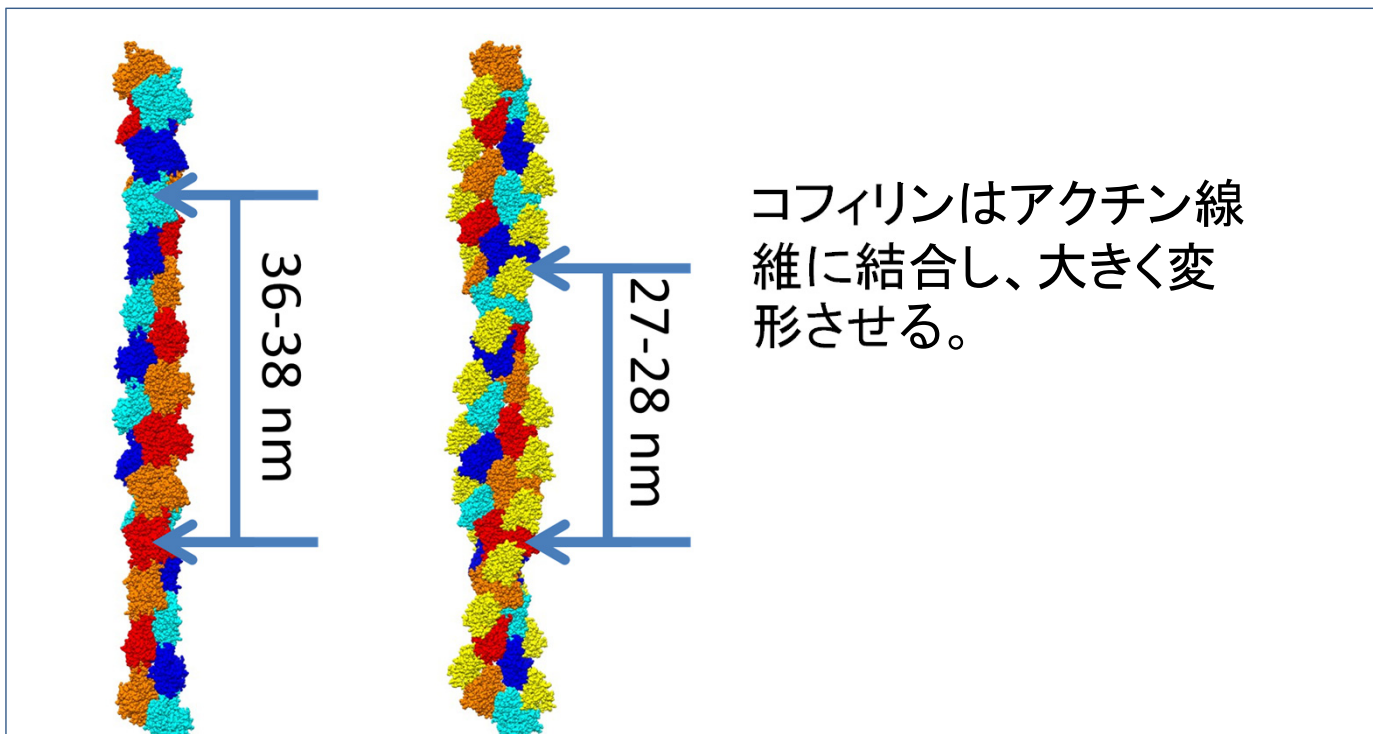
コフィリン

コフィリンは ADP アクチン線維に結合して、線維を切断、分解する。

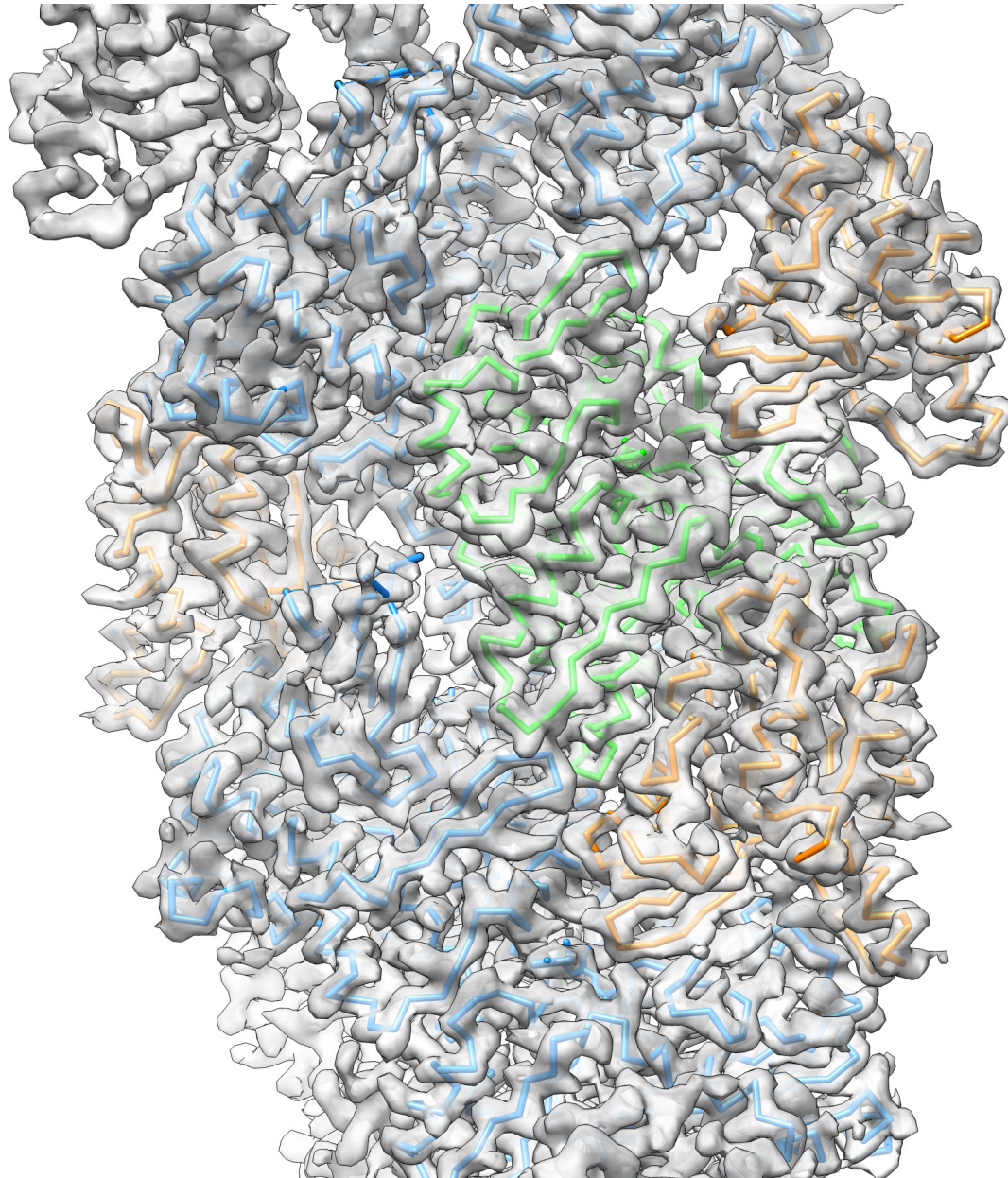


先行研究の分解能は9Å。十分ではない。

アクチンと結合状態の高分解能構造が必要！



私達の解析例



アクチン-コフィリン複合体

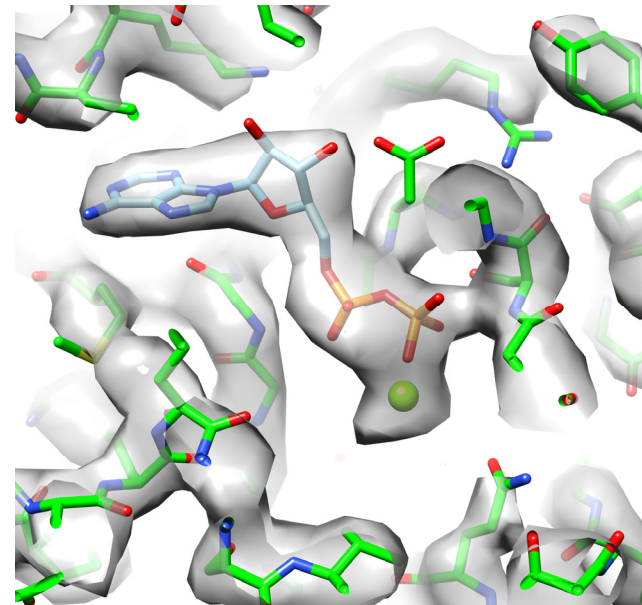
1111枚の電子顕微鏡写真

86388 particles 分解能3.8Å

主鎖が完全に観察される

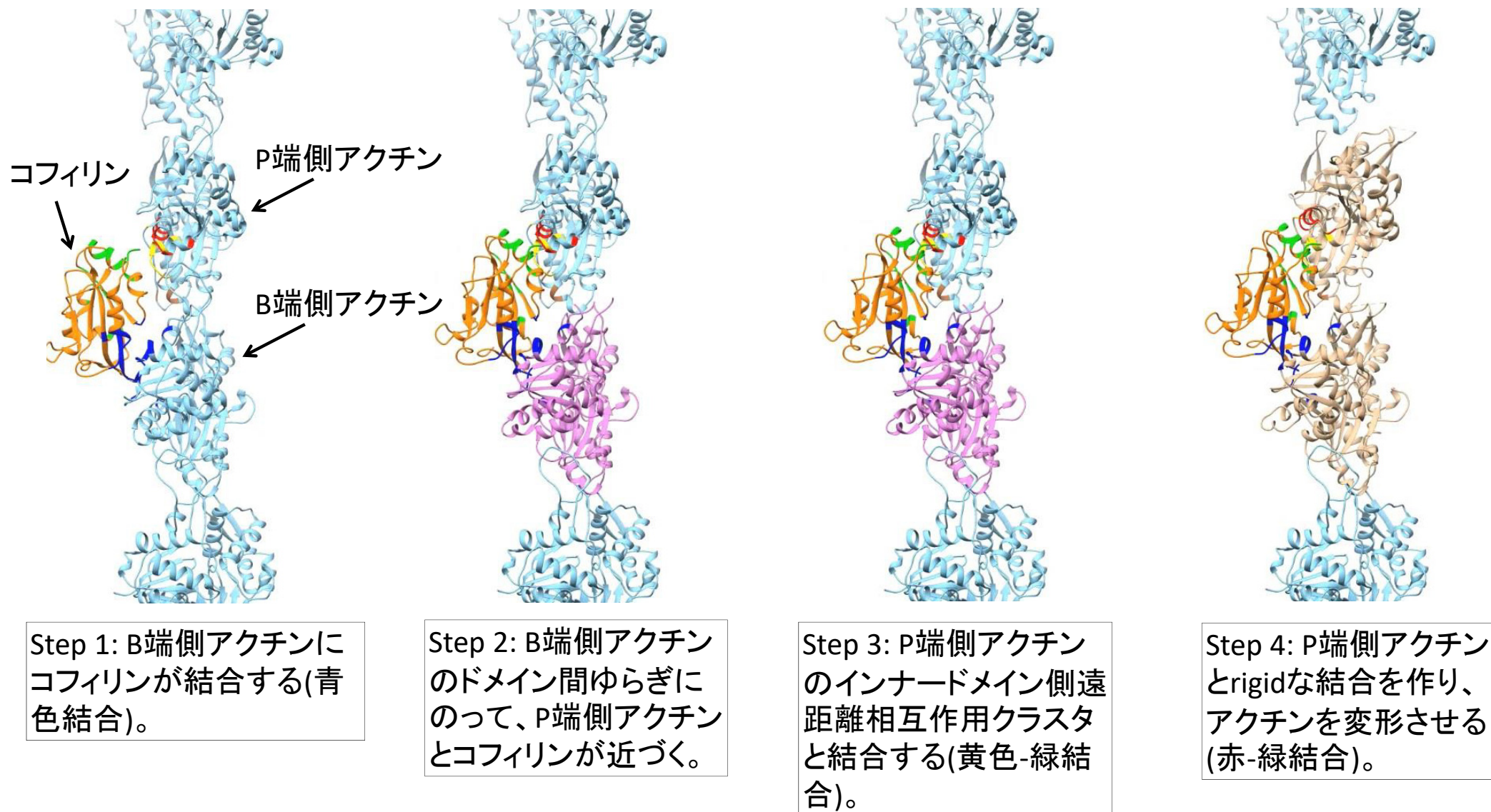
多くの側鎖の方向が見える

ADPに結合したマグネシウム原子が
ダイレクトに見える



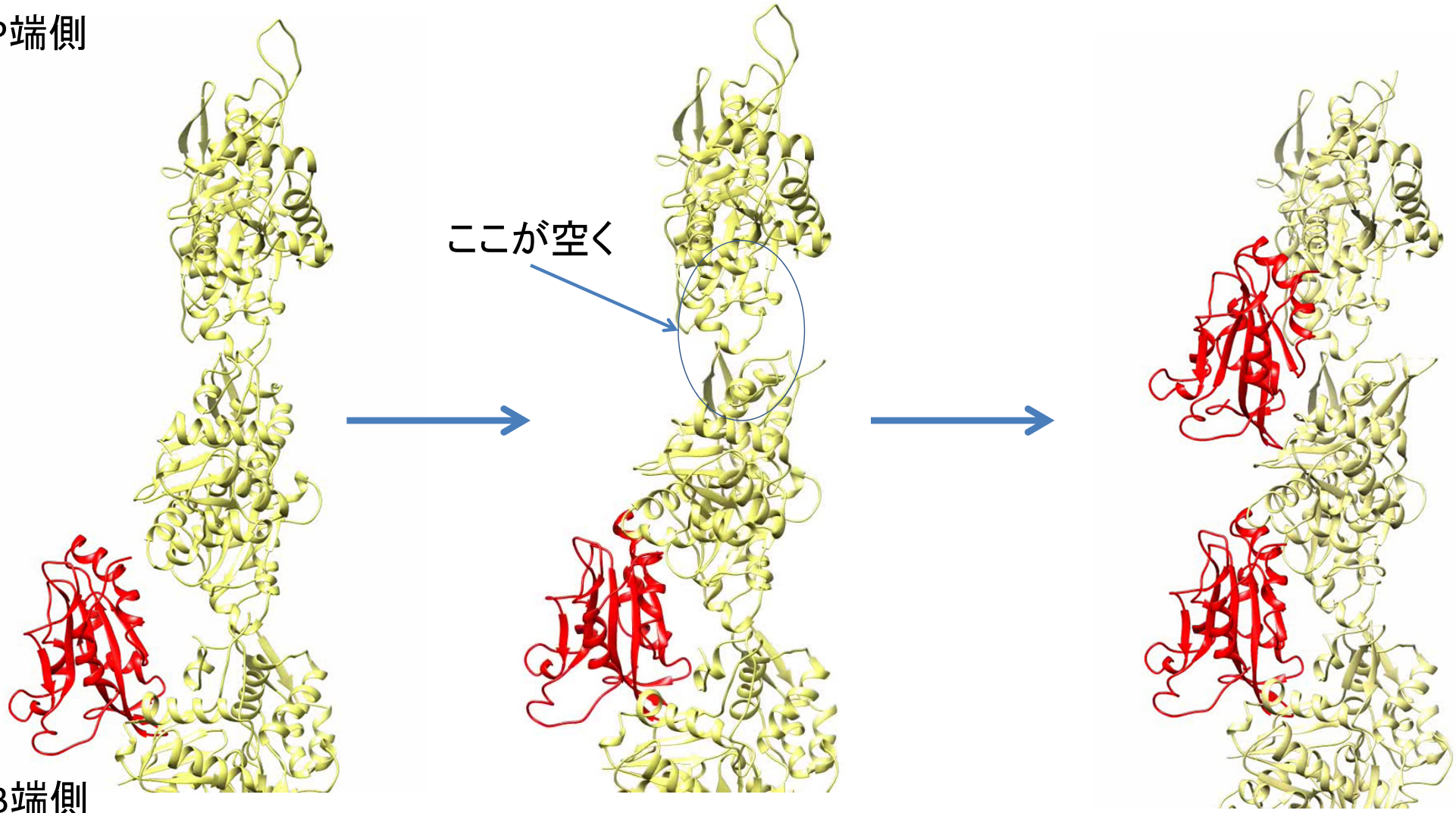
コフィリンによるアクチンの構造変化モデル

前提:アクチンが好むADP状態アクチンは、ドメイン間のゆらぎが大きい。



コフィリンが結合した場所のとなりには次のコフィリンが結合できる。

P端側



コフィリン結合部位のP端側のアクチン分子の構造が変化し、コフィリンの結合部位が露出する。

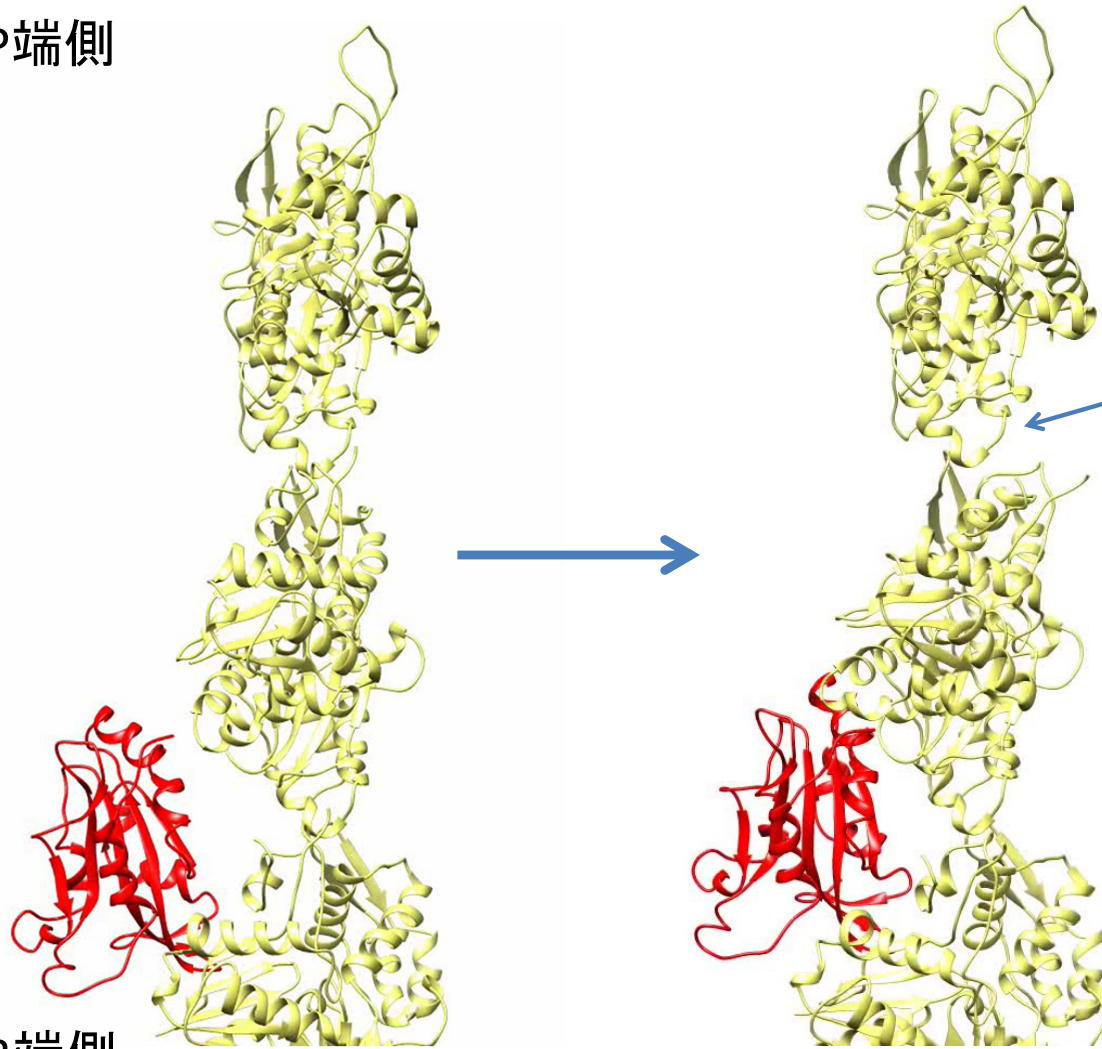
コフィリンが結合した場所と結合していない場所のP端側²⁰ はアクチン線維が不安定になる

P端側

分子間結合が弱まる。

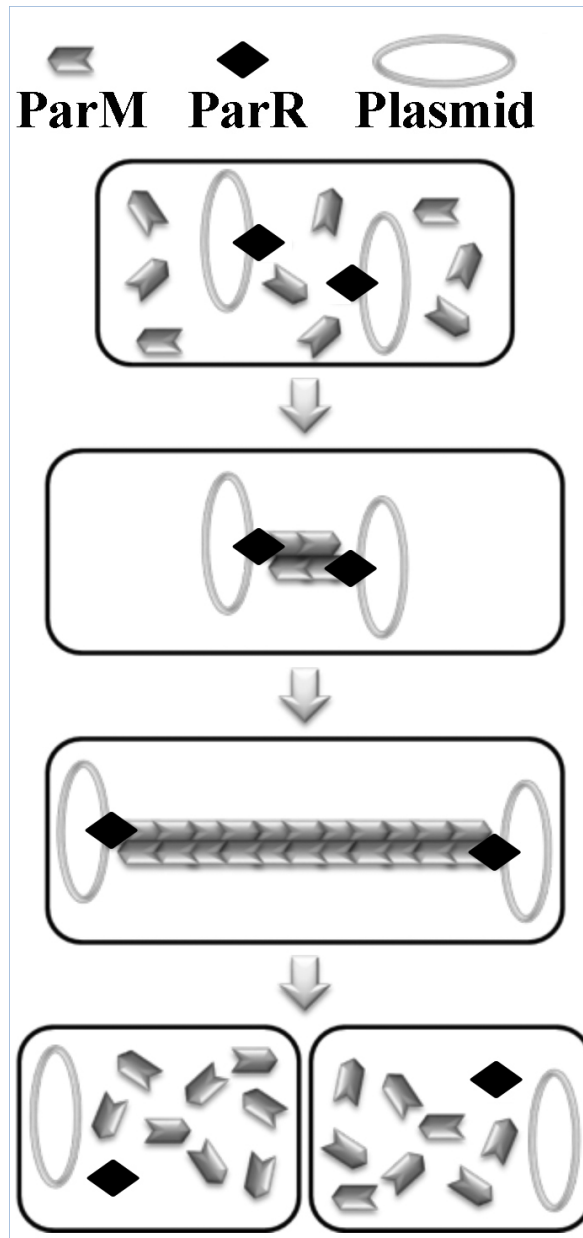
B端側

同時にアクチン分子間の結合が弱まり、コフィリン結合部位のP端側で線維が切断される。



バクテリアアクチンホモログParM線維

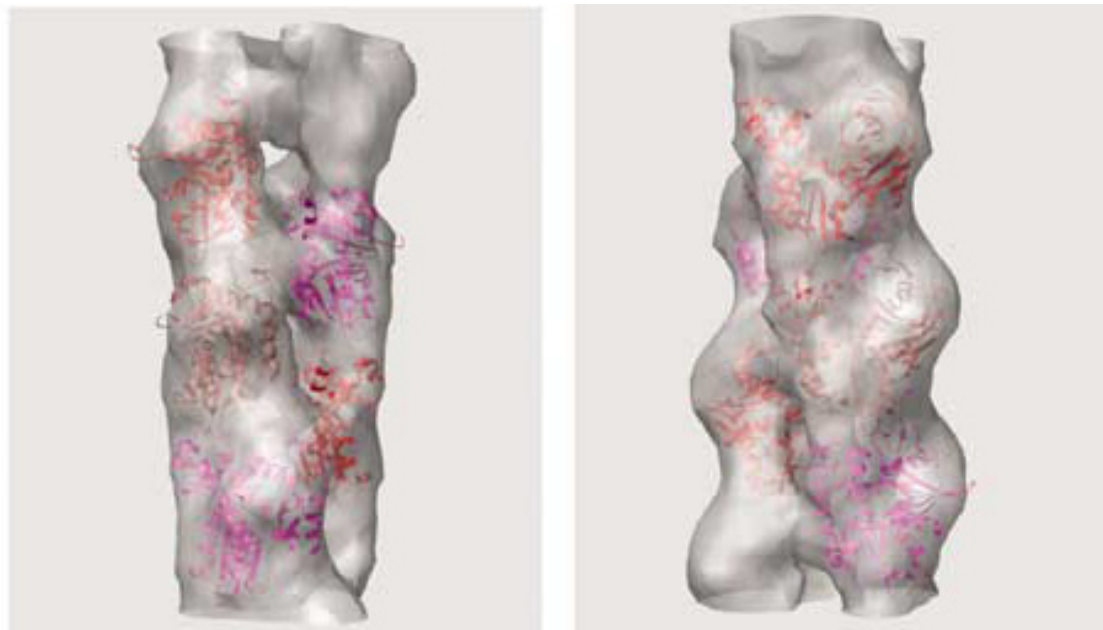
21



バクテリアのプラスミドを分配する。

ParRがプラスミドとParMの両方に結合。

ParMの伸長により、プラスミドが引き離される。



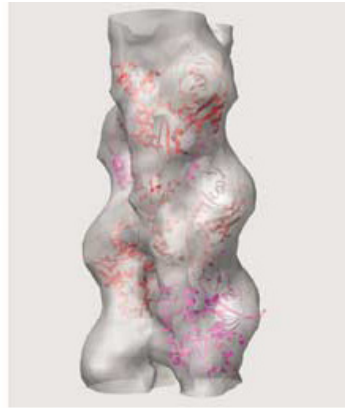
最初に解かれたParM線維構造。Popp et al., 2008
アクチンに似ているが...

Bacterial actin filament ParM

その構造は極めて多様。

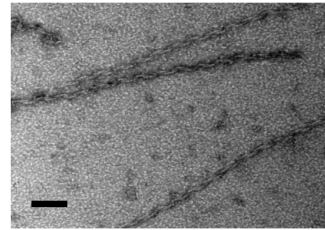


ParM R1 from *E. coli* (Popp et al., 2008)



Bacillus thuringiensis ParM

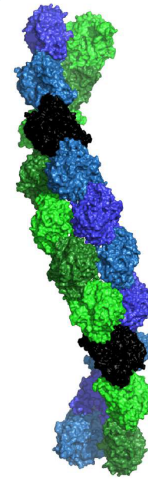
A



B



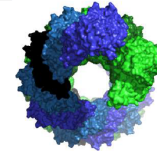
C



D

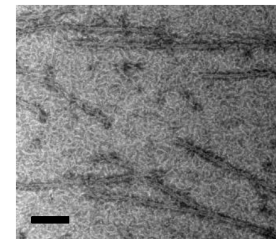


E

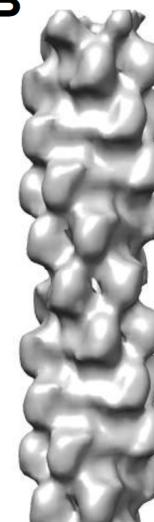


Bacillus thuringiensis ParM+ParR

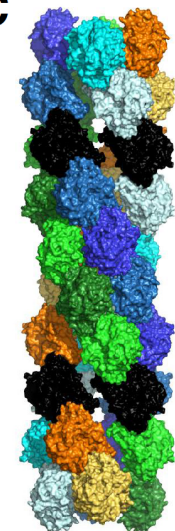
A



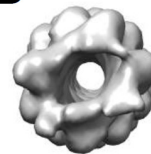
B



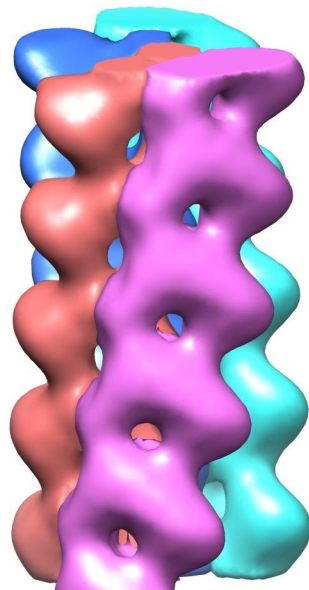
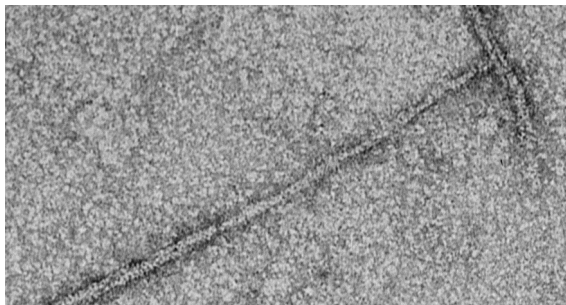
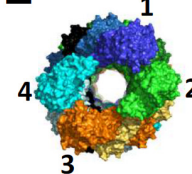
C



D



E

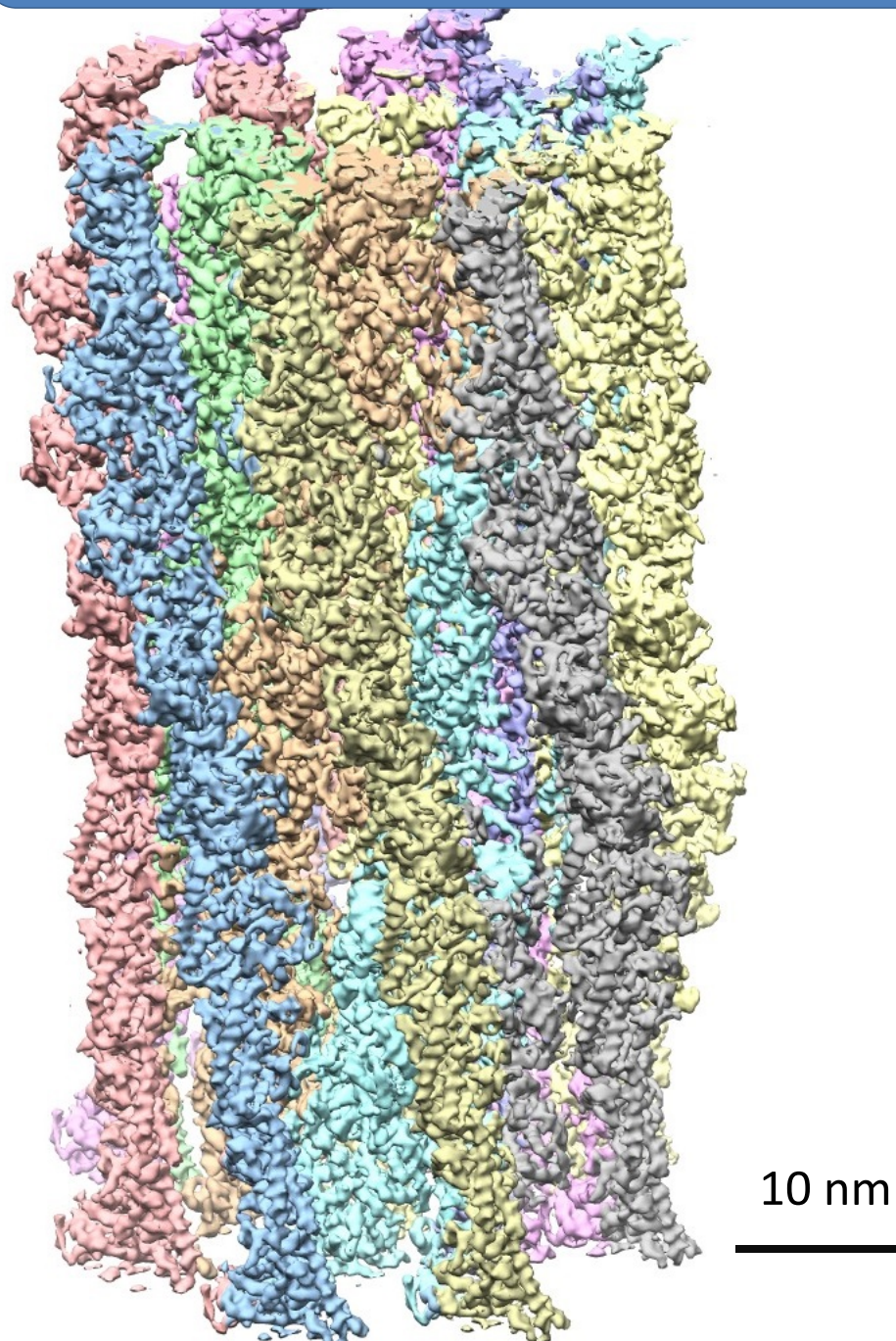


Alp12 from *Clostridium tetani* (Popp et al., 2012)

Jiang et al., 2016

バクテリアアクチンホモログParM線維

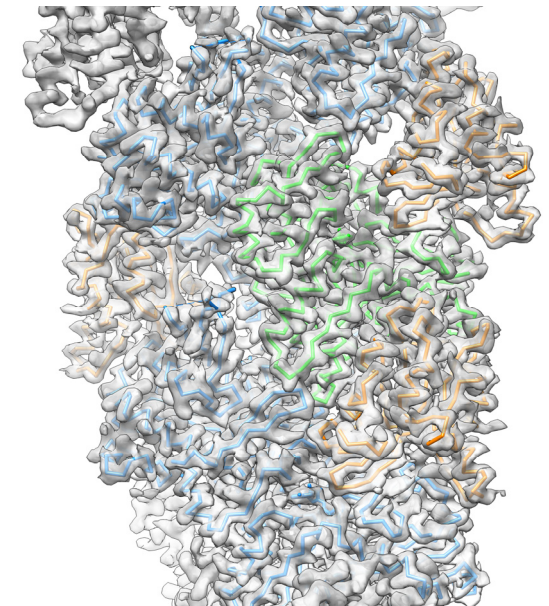
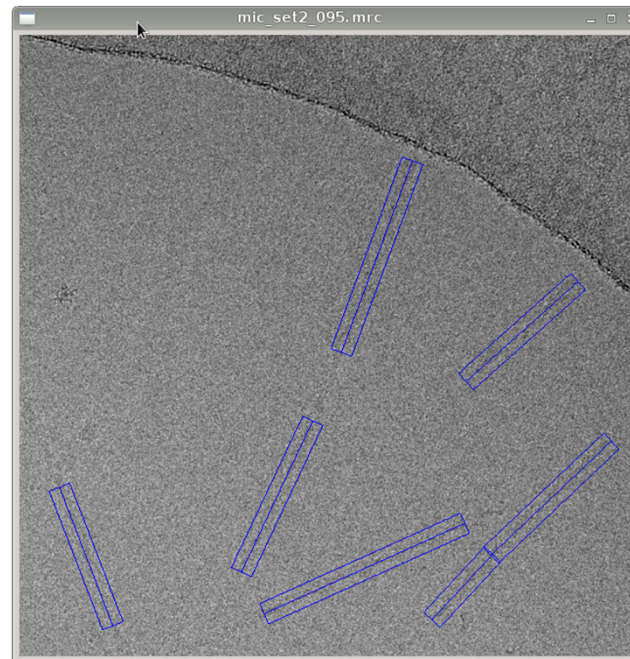
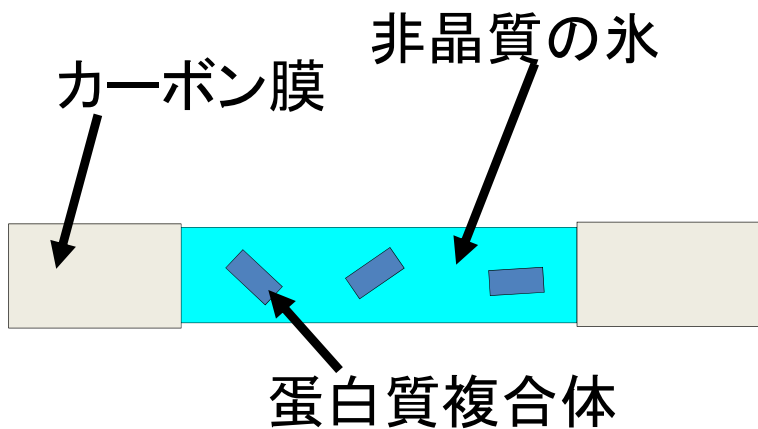
23



ParMの一種分解能4.2 Å
15本のストランドから成る、
従来観察されたことのない
複雑な構造がたった一種
類の蛋白質の自己集合に
よって構成されている。
Koh et al., 2019

全てのParMに共通してい
るのは、プロトフィラメント
がその構成単位となってい
て、その構造は良く似て
いる。

- 1: クライオ電子顕微鏡法は、タンパク質溶液を急速凍結して電子顕微鏡観察する技術。
- 2: 単粒子解析は、大量のタンパク質像をコンピュータ解析することによって三次元構造を得る技術。
- 3: CMOSカメラを使うダイレクトディテクタによって、試料の動きが補正され、大幅に分解能が伸びた。
- 4: Titan Kriosを使うと良い試料があれば6日程度で3.8Å分解能を達成するデータを収集できる。
- 5: しかし、良い試料を作るといところのほうが重要で、時間がかかる。

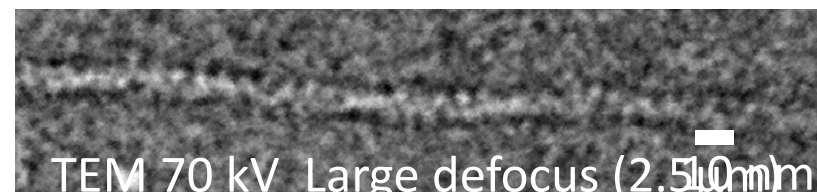
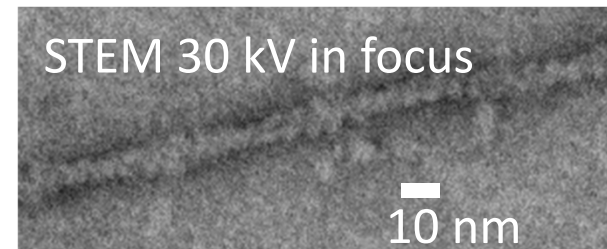


複数構造が混ざっている場合、ローカルな構造変化がある場合に解析が難しい。

大量の像が解析に必要。

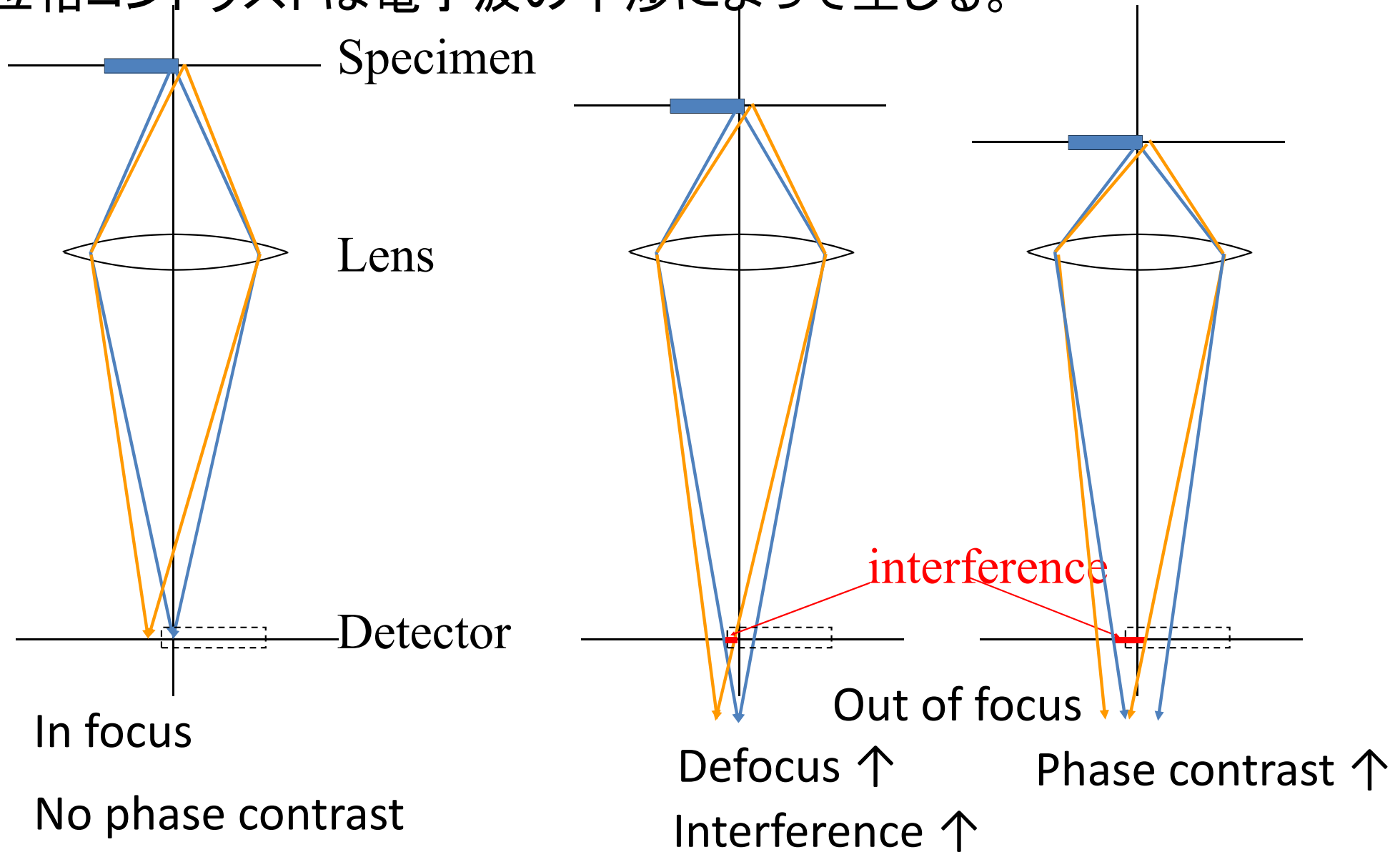
→ これは、TEM像にはCTFによる、フォーカスずれ依存のひずみがあるから。

→ ひずみの無い像を撮影できれば対象は大きく広がる。



透過型電子顕微鏡(TEM)の結像原理

透過型電子顕微鏡の主なコントラストは位相コントラスト。
位相コントラストは電子波の干渉によって生じる。



電子顕微鏡写真の像は干渉縞である

TEM image is deformed by CTF.

I : Fourier Transform of EM photo,

$$I(\vec{R}) = T(\vec{R})CTF(\vec{R}, \Delta z)$$

T : Fourier Transform of true image without deformation

CTF : Contrast transfer function

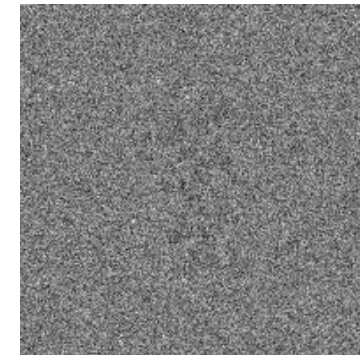
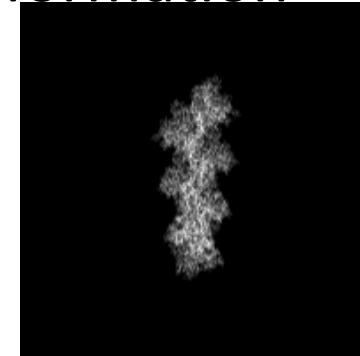
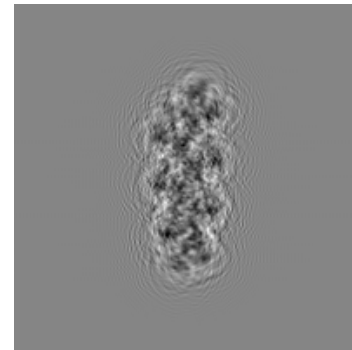
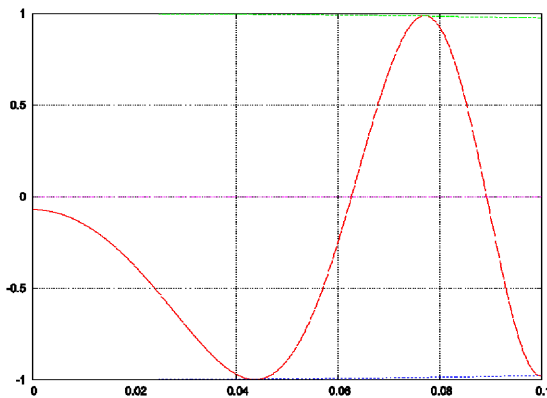
\vec{R} : Vector in the reciprocal space

Δz : Amount of defocus

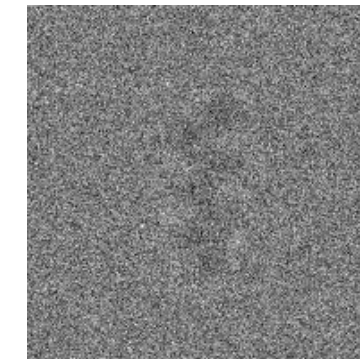
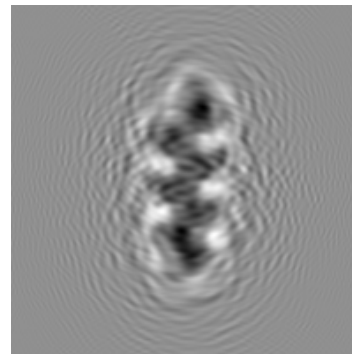
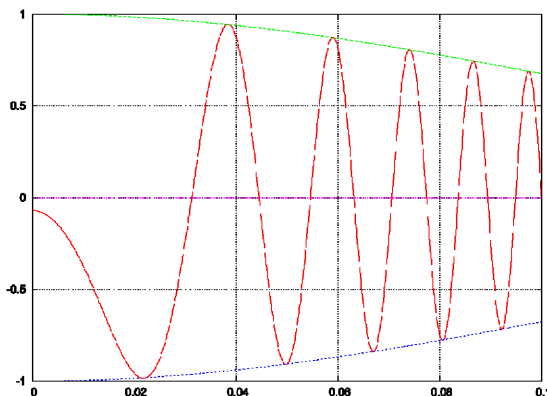
原理的に像が大きくひずんでいる。

Defocus

1 μm



4 μm



集光した電子線で試料をスキャンする

散乱した電子

-> 暗視野像

散乱しなかった電子

-> 明視野像

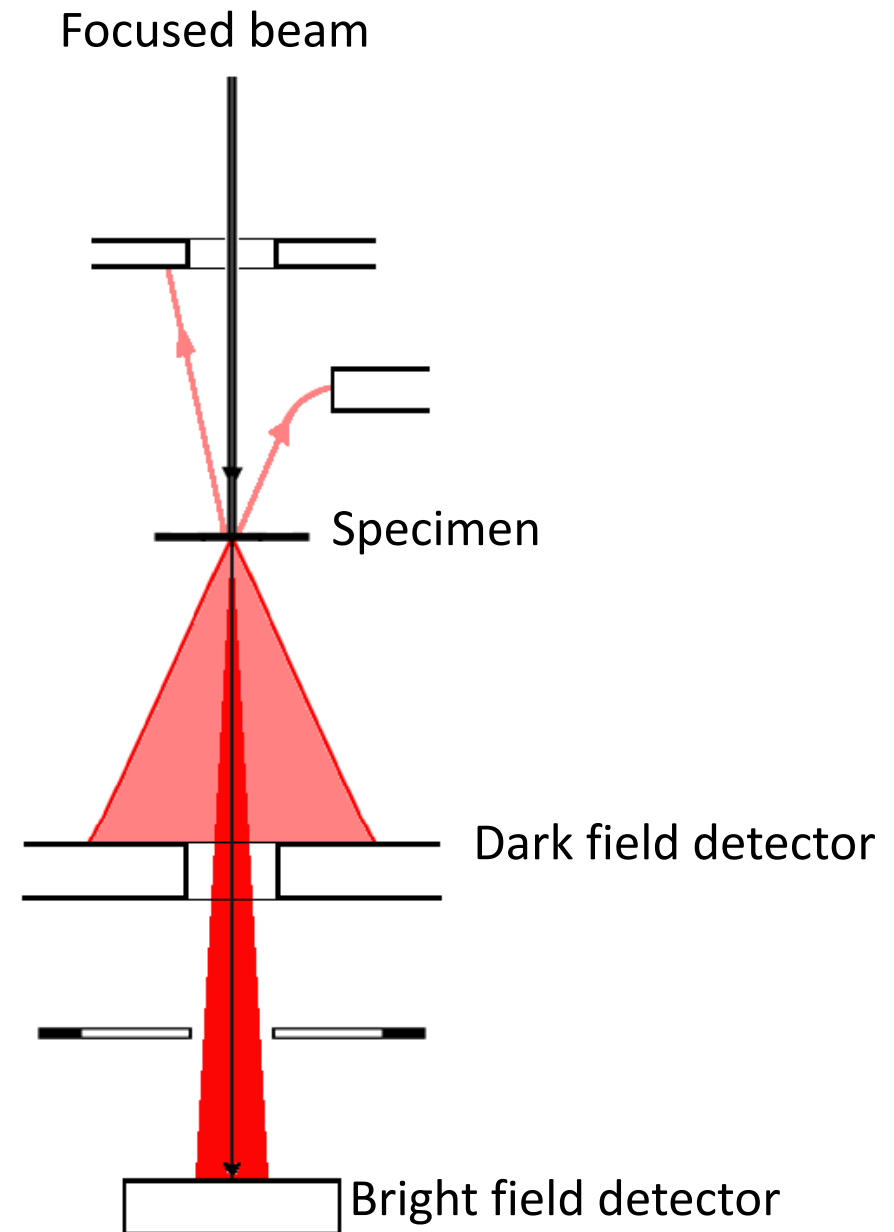
悪い点

位相コントラストが使えない

良い点

歪みがない

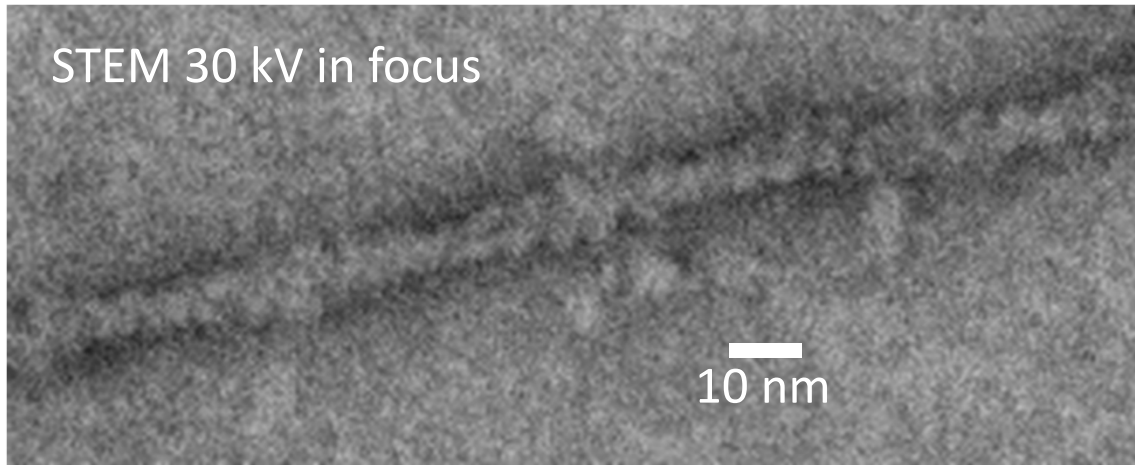
非弾性散乱もシグナルである。



コントラストは比較的low加速な電子を使うことで向上できる

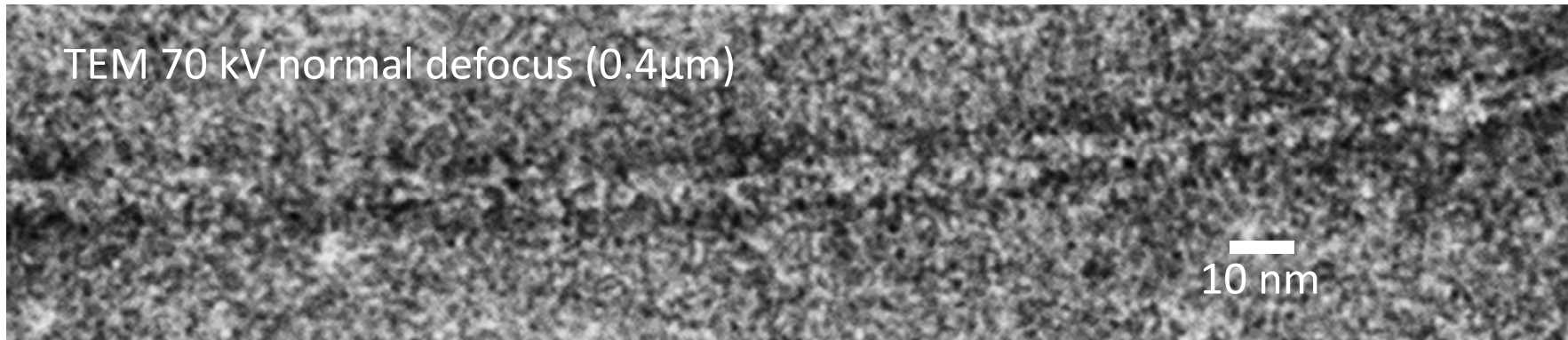
STEM像はCTFによるひずみがない

STEM 30 kV in focus

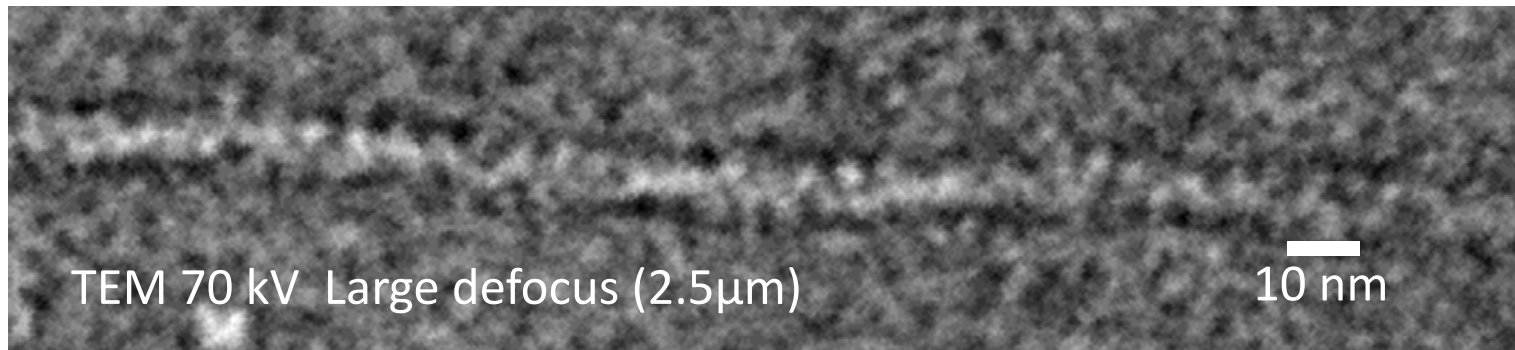


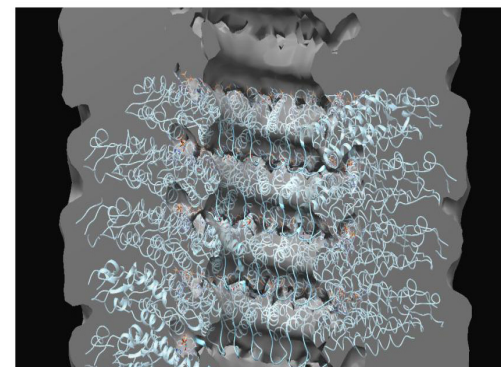
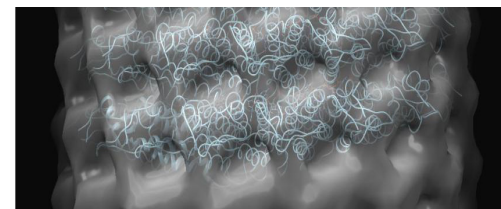
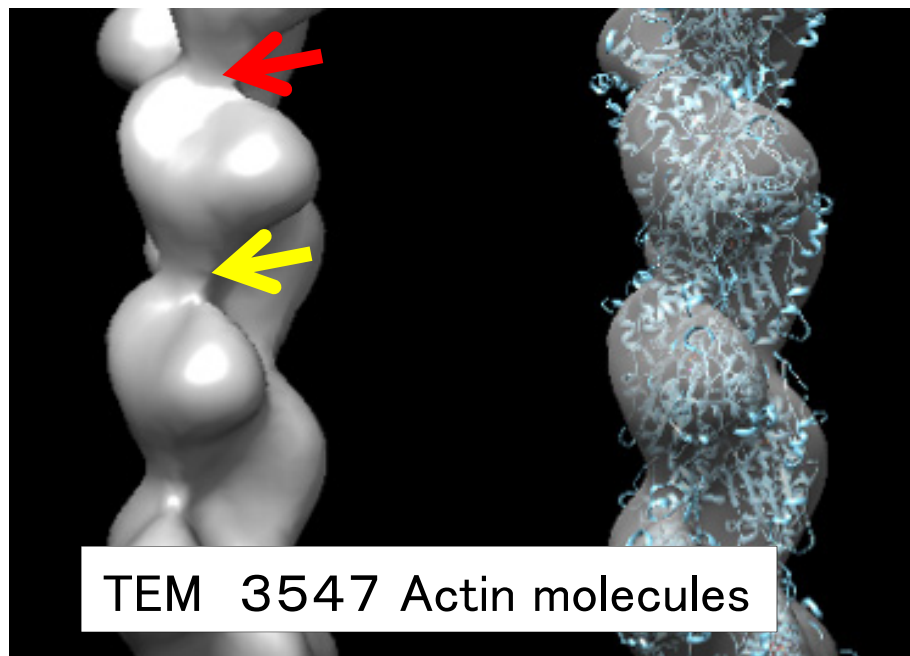
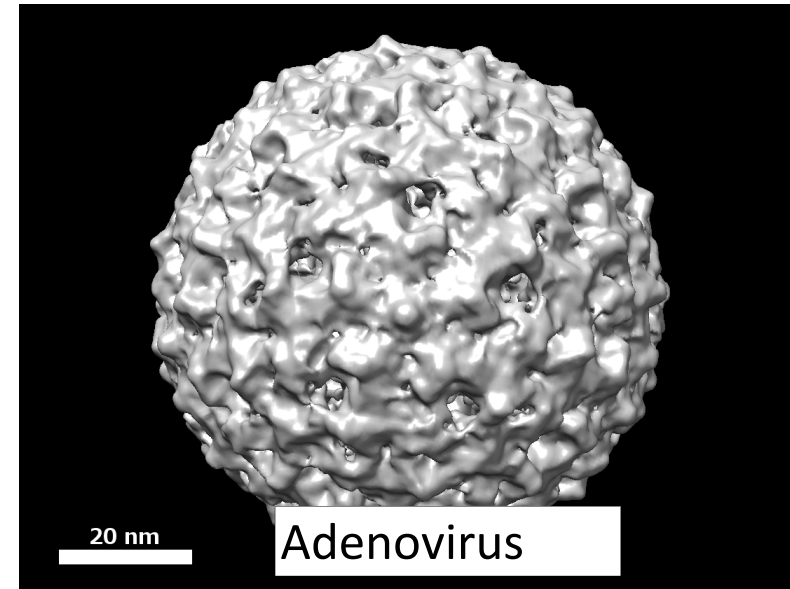
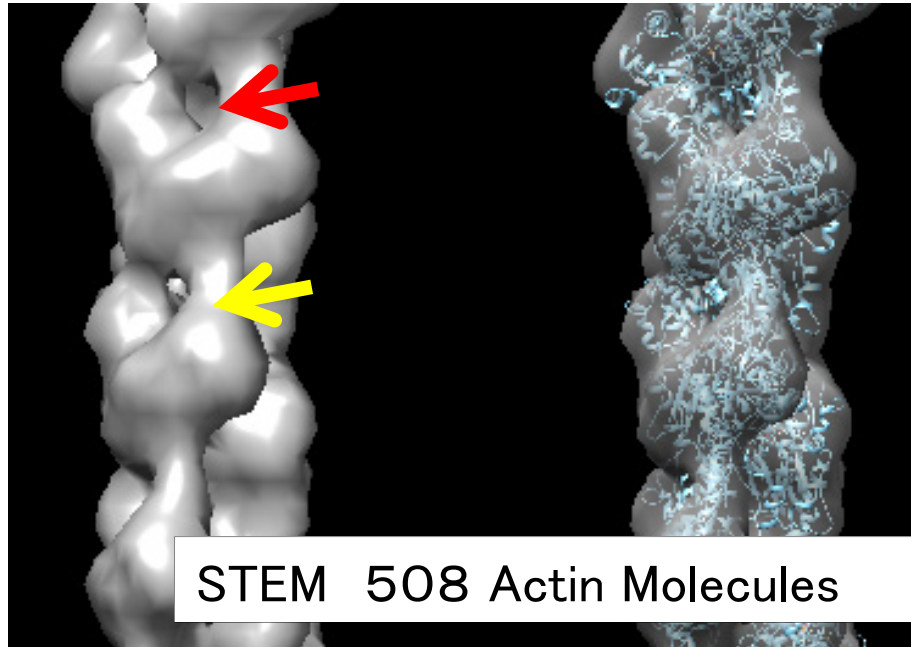
Negatively stained Actin filaments

TEM 70 kV normal defocus (0.4 μ m)



TEM 70 kV Large defocus (2.5 μ m)





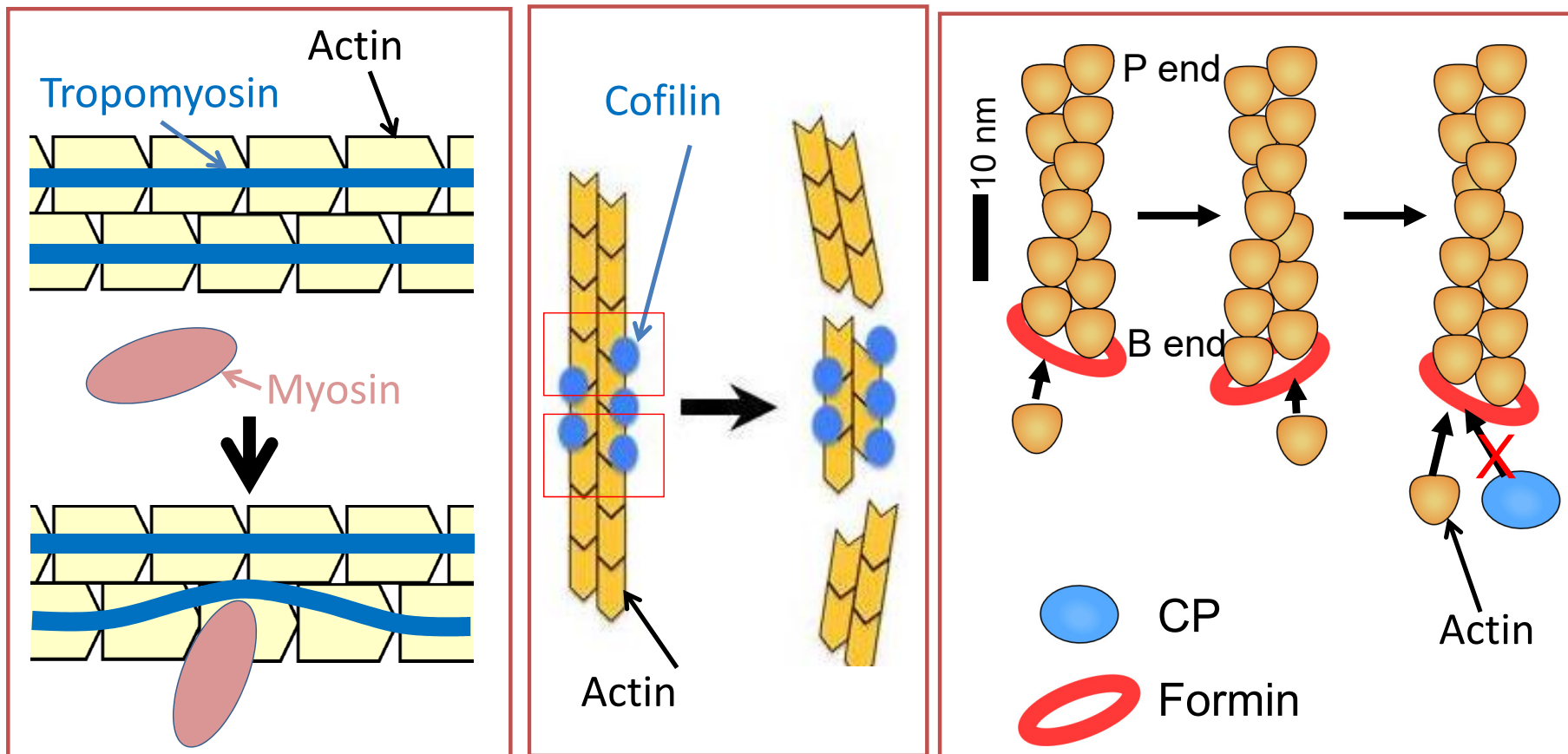
Tabacco mosaic virus
from 8 viruses

像の数がひとけた少ない！

CTFによるひずみがない。
低分解能成分の大きなシグナル
2 nm分解能が可能

小数像からの構造解析

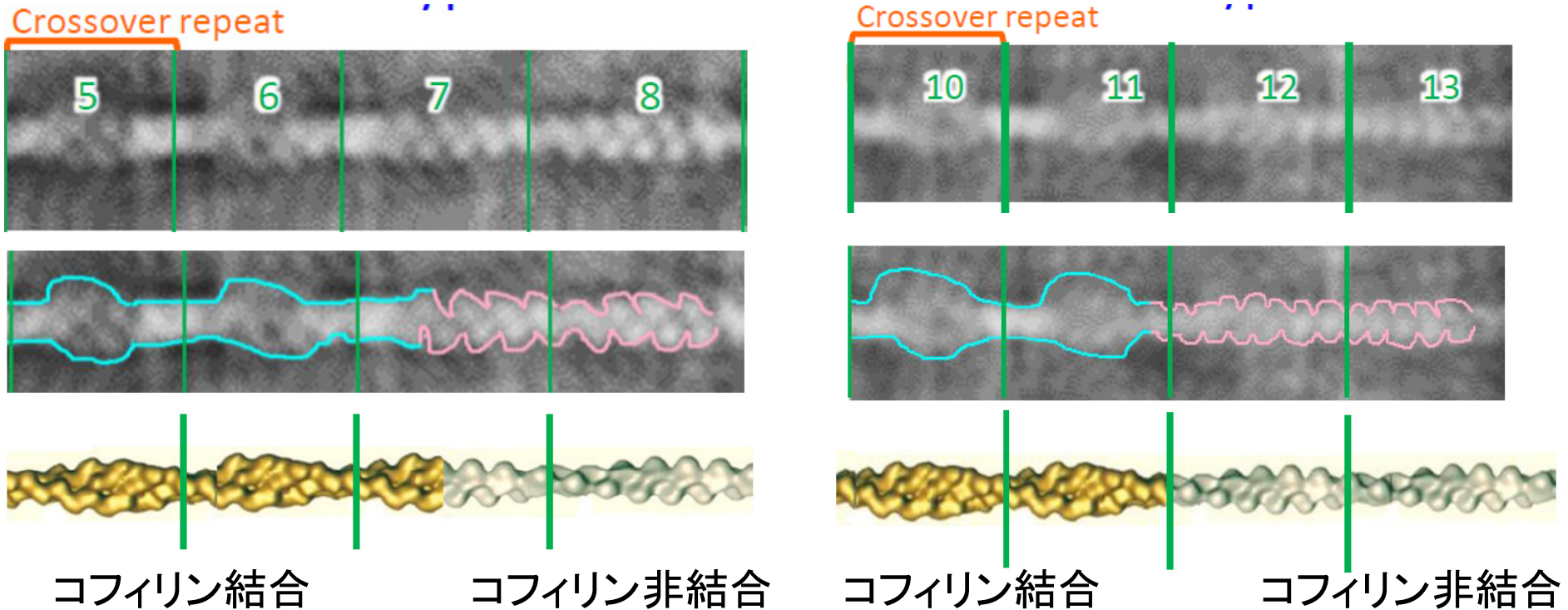
ローカルな構造変化や、違う結合状態を
認識可能



クライオでもトライする。

いままで像の歪みにより認識ができなかったコフィリンクラスタ境界をダイレクトに可視化
アクチン線維の動態や切断様式の解明

アクチン線維上のコフィリンクラスタ境界 (B端側)



線維の端、1つだけ線維に結合したミオシンやダイニンの周辺構造など、位置の同定や平均化が困難な場合に有効。

TEM像は原理的にひずんでいる。

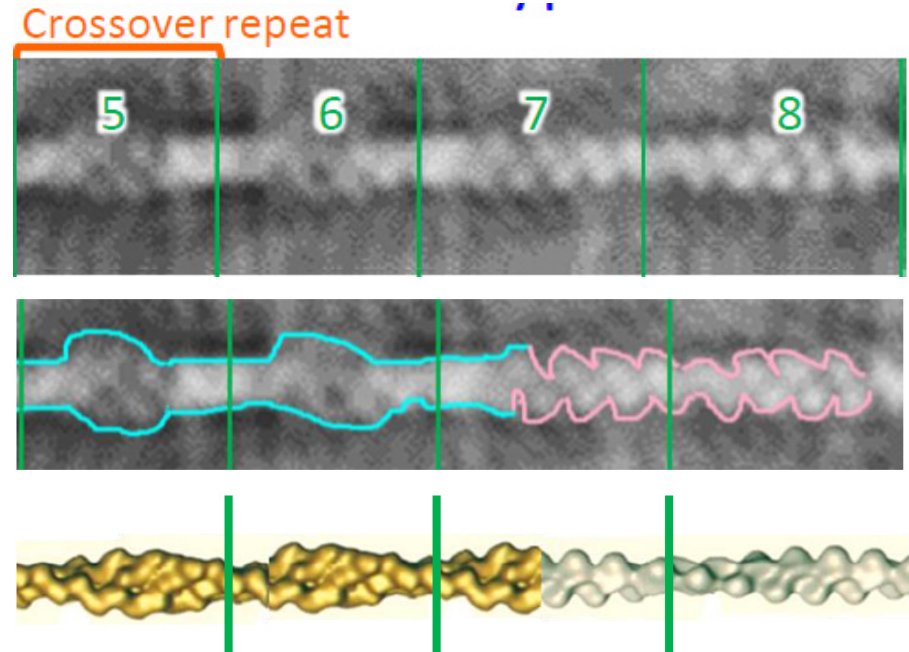
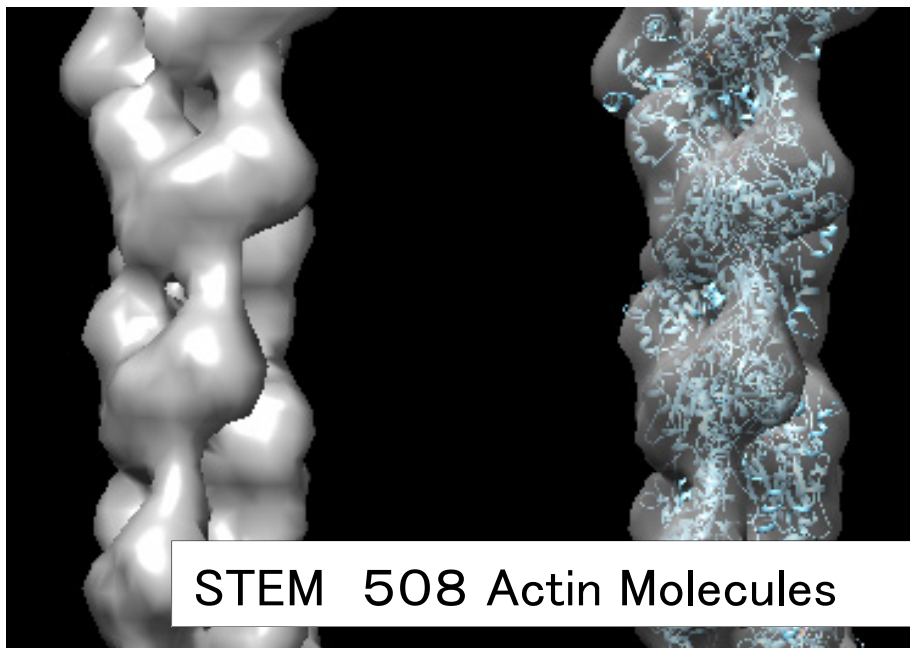
ひずみを補正するのに大量の像が必要。

構造多型を分類するのも難しい。

STEM像であればひずみがない。

小数の像から構造解析ができ、TEMでは認識が難しい対象の位置も同定できる。

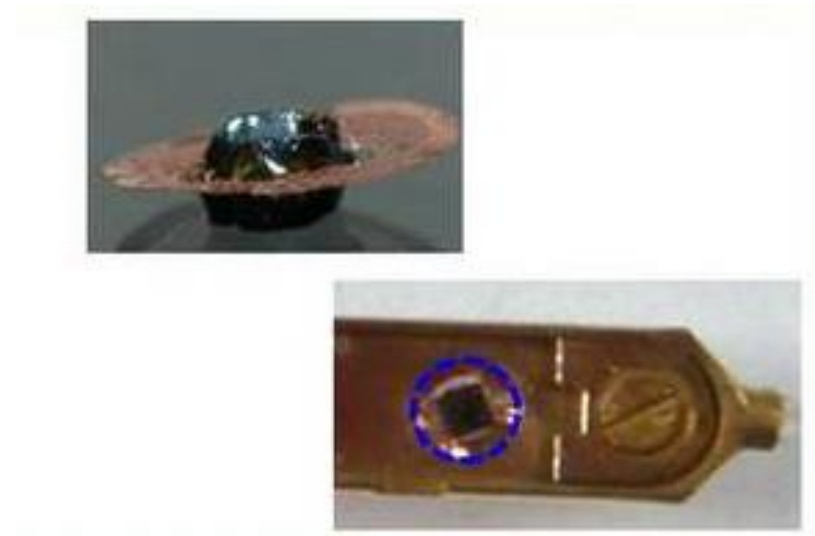
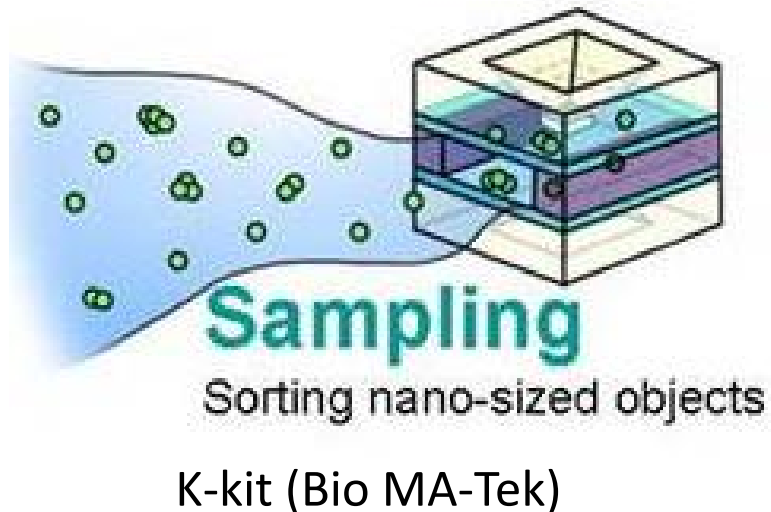
現在クライオ法用の試料ステージを開発中



分子の動きをリアルタイムに追えない。

水中の分子はブラウン運動する。

パルス電子銃で水中の分子をぶれずに観察する。



フォトカソード:

光を当てると電子が出てくる半導体

フォトカソード電子銃

1: パルスレーザーで励起すればパルス電子が出る。

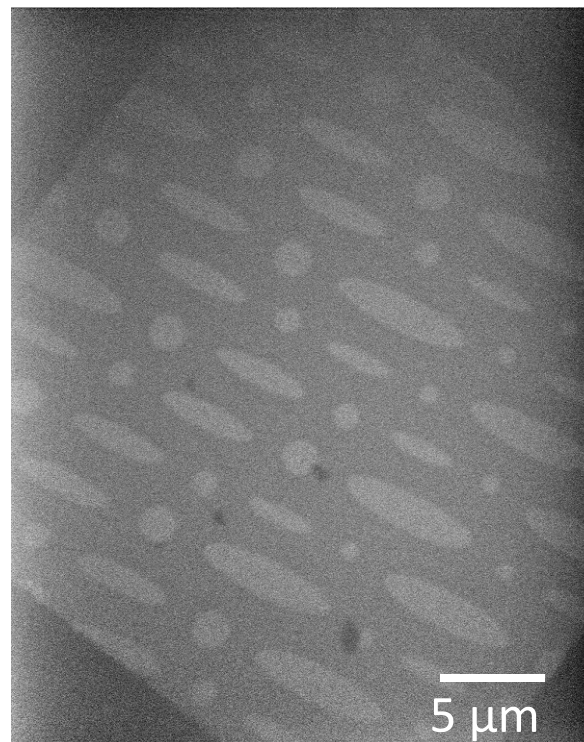
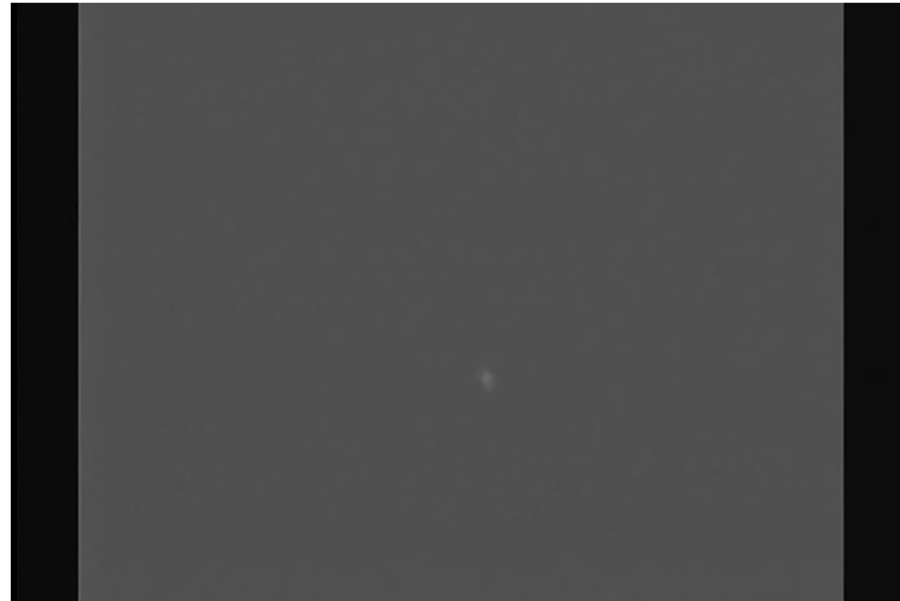
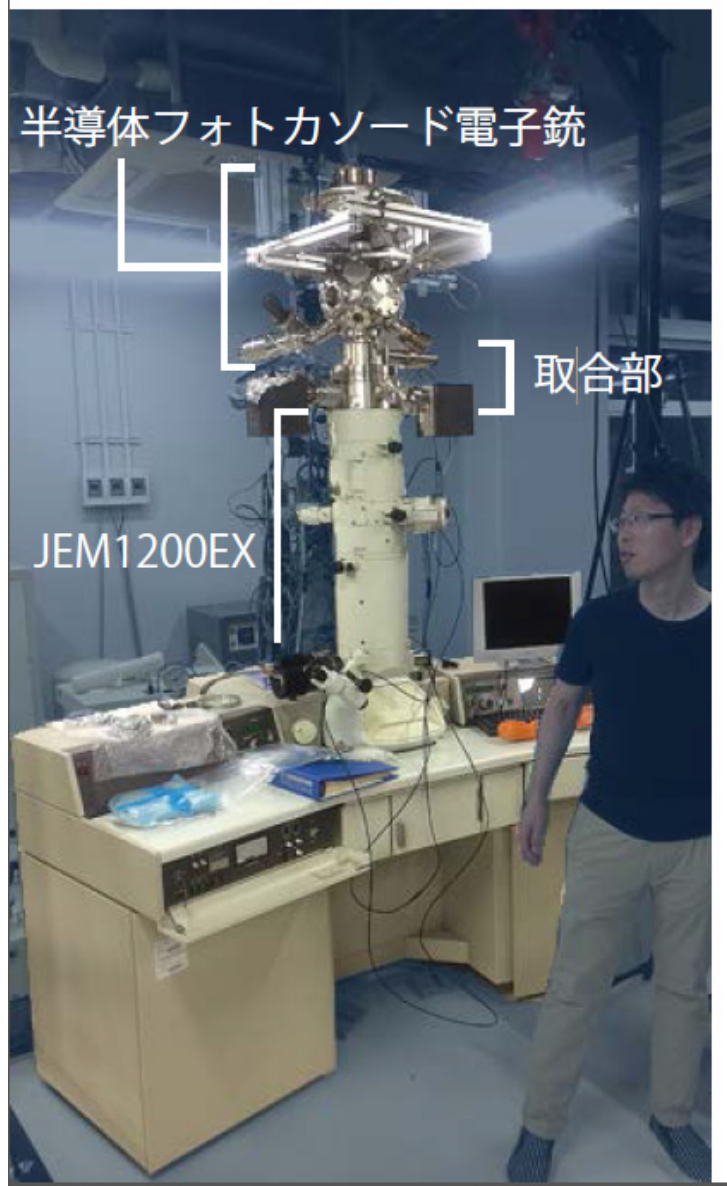
2: 1ミリ秒20nCのパルスを既に実現。(1枚の写真に0.1 nC必要)

目的:

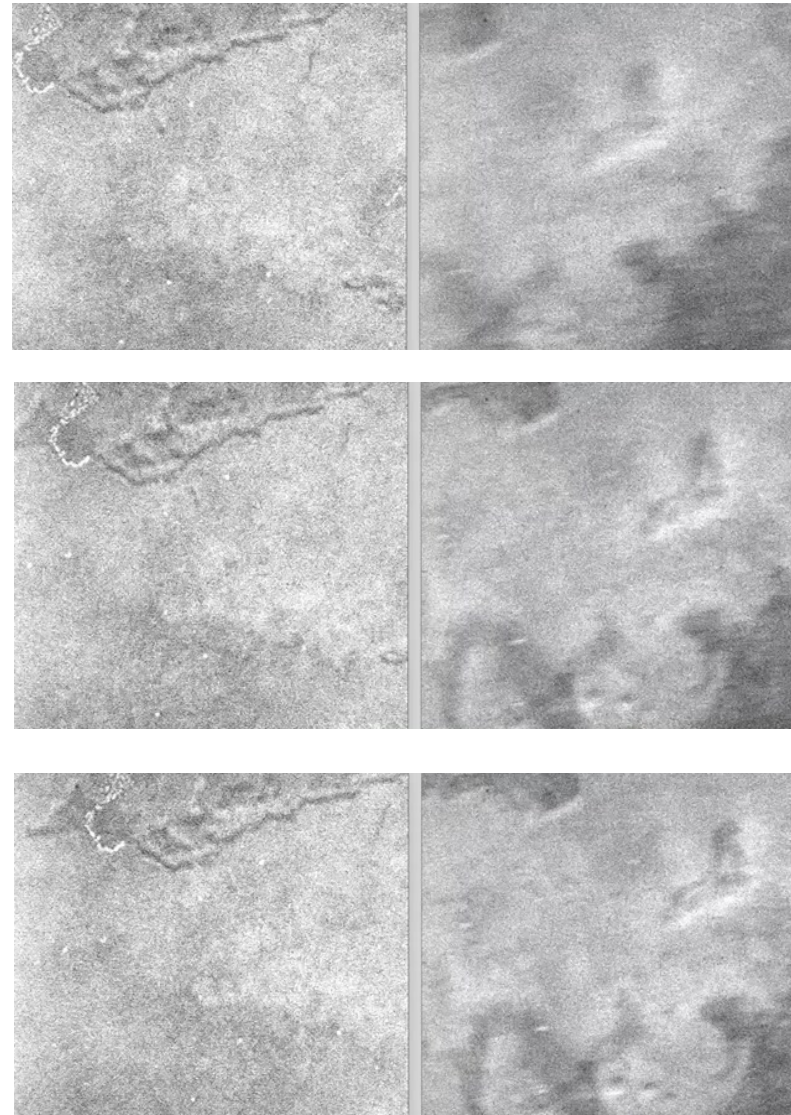
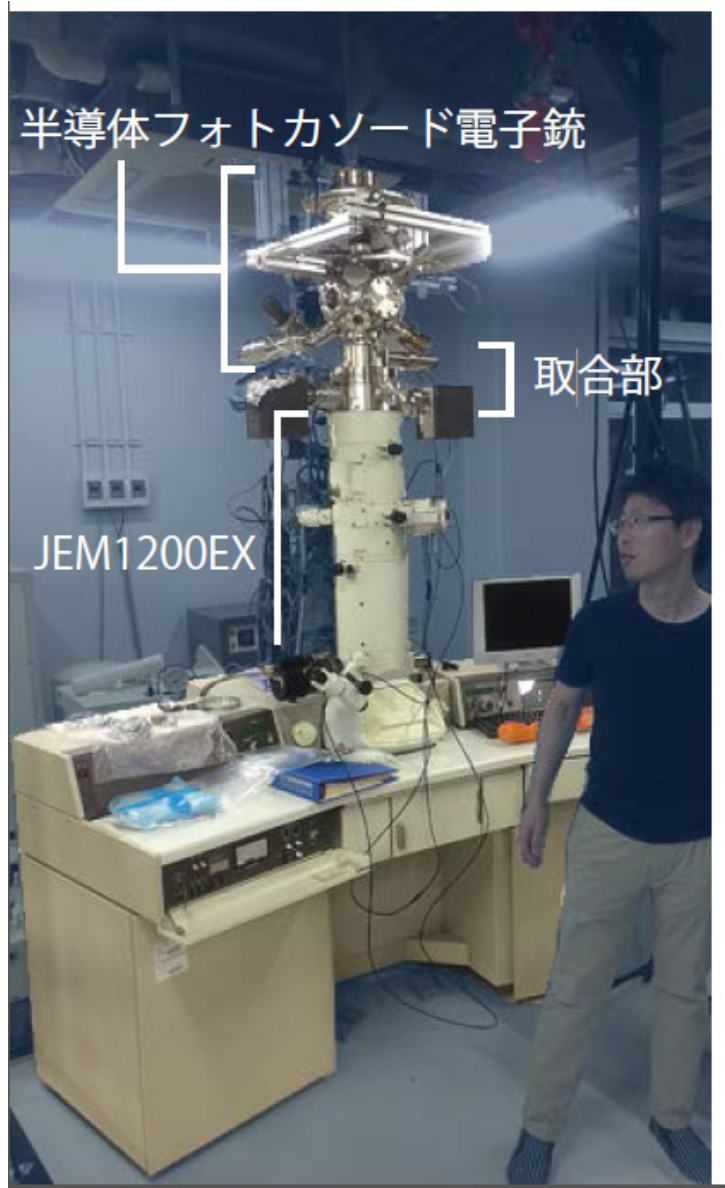
1ミリ秒のパルスでの電子顕微鏡撮影

1 pixel/1 ms以内の動きは無視できる。

JEOL, 名古屋大学工学部、東京理科大などとの共同研究



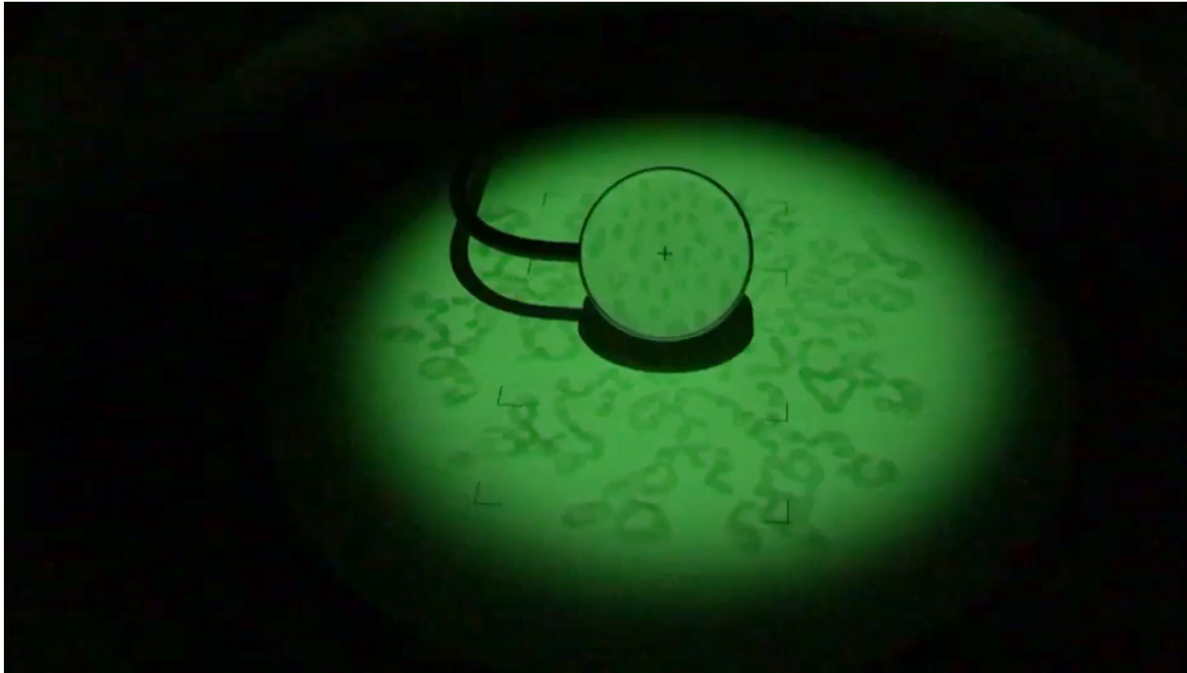
First image by the pulse EM.
C-flat holy carbon.



ステージを動かしながら撮影。1フレーム100 msec。
左パルス電子顕微鏡 (5 msec パルス)
右通常の電子線

パルス電子顕微鏡であれば、動いているものもぶれずに捉えられる。

300 mM NaCl and 20 mM NaPB



MA-tek 日本マーテック株式会社

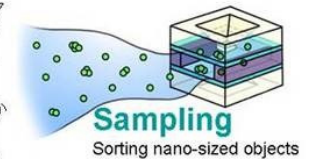
K-kit / 液中のナノ粒子観察を可能に

TEM(透過型電子顕微鏡)を用いた観察用ホルダー

Bio MA-Tek (台湾 Materials Analysis

Technology Inc.グループ企業 / 日本法人: 日本マーテック株式会社)は、TEMを用いた液中のナノ粒子観察を可能にするホルダーの開発に成功しました。

これまで乾燥法や凍結法でしか観察が出来なかった液中のナノ粒子評価に、新しく液状のままに観察する手法を加える事で、ナノ粒子を用いた製品の開発を新たなステージへと進める事を可能にしました。

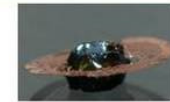


K-kit の主な仕様

- ◆アダプター Copper grid
- ◆チップサイズ 1.3mm x 1.3mm
- ◆専用ホルダー 不要

✓ISO/TR13014規定適合

✓各種TEMホルダーに対応



K-kit: 200 nm thickness of water.

After radiation of EM strong beam

パルス電子顕微鏡と水を保持するチャンバの組み合わせで、蛋白質の水中の動態を探ることを目指しています。

- 1: クライオ電子顕微鏡法は、タンパク質溶液を急速凍結して電子顕微鏡観察する技術。
- 2: 単粒子解析は、大量のタンパク質像をコンピュータ解析することによって三次元構造を得る技術。
- 3: CMOSカメラを使うダイレクトディテクタによって、試料の動きが補正され、大幅に分解能が伸びた。
- 4: Titan Kriosを使うと良い試料があれば6日程度で3.8Å分解能を達成するデータを収集できる。
- 5: しかし、良い試料を作るといふところのほうが重要で、時間がかかる。
- 6: TEM像は原理的にひずんでいる。
- 7: ひずみを補正するのに大量の像が必要。構造多型を分類するのも難しい。
- 8: STEM像であればひずみがない。
- 9: STEMを使えば、小数の像から構造解析ができ、TEMでは認識が難しい対象の位置も同定できる。
- 10: 水中の分子動態を観察するにはパルス電子顕微鏡が重要。
- 11: 現在フォトカソードを用いた電子顕微鏡を開発中。

- 1: 高分解能構造解析には多くの像が必要。
 - > データ収集後に数ヶ月オーダーの時間がかかる。
- 2: 狭い視野
 - > 見たいところを観察者が選ぶ。
 - > バイアス、偏りの可能性。統計をとるのは困難。
- 3: 薄い試料
 - > 100-200 nmの試料が限界
 - > 試料の前処理が必要
- 4: 真空中に試料をさらす
 - > K-kitなどの環境チャンバはあるが、観察窓もノイズ源。様々な限界。
- 5: 長時間観察が困難
 - > 電子線のダメージが大。
 - > パルス電子顕微鏡である軽減はできる。

名古屋大学

田中康太郎
西谷智博
臼倉治郎
臼倉英治
松本友治

Singapore A*STAR

Robert Robinson
David Popp
Adrian Koh

大阪大学

光岡 薫
梶村 直子
岩崎 憲治
宮崎 直幸

Jeol

Photo electron soul
日立ハイテク