

2019 クライオ EM 講習会

西澤知宏¹ 柳澤春明² 濡木理¹ 吉川雅英²

¹ 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻、² 医学系研究科生体構造学教室

1. 目的

クライオ電子顕微鏡による生体分子の構造解析は、電子顕微鏡の高精度な自動制御、単粒子解析法の発展や電子直接検出器の実用化によって大きく進展することになった。これにより従来のX線解析法に頼っていた構造解析が、結晶化の過程が不要となり、分散性の良好な凍結試料が作製できれば、構造解析を行うことが可能になった。

しかしながらクライオ電子顕微鏡の利用においては、試料作製のノウハウや高度な構造解析手法が必要とされ、一般の研究者にとっては敷居が高く、どこから着手して良いかわからないのが現状である。

そこで、電子顕微鏡の構造、原理や試料作製法、単粒子解析法などの基本的なところから講義と実習を行い、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析手法の概観を把握してもらうことを目的に講習会を開催することにした。参加者には、講習会への参加を機に、それぞれの手法を習熟、発展させることを望む。

2. 参加者およびプログラム

参加者：19名

(内訳) 東京大学：10名 他大学：7名 企業：2名

プログラム

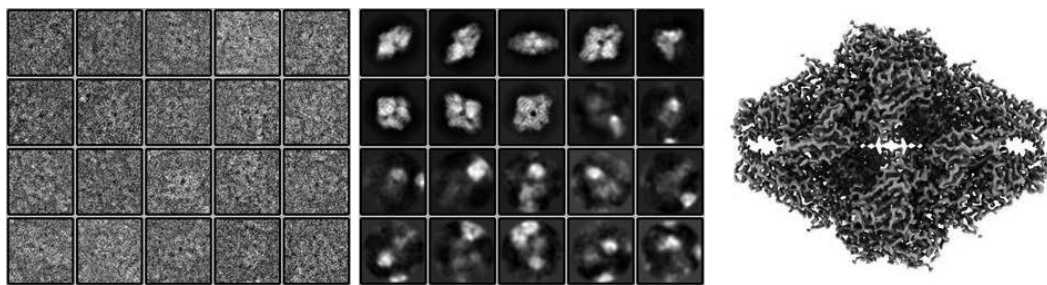
- 11月19日 10:00 電子顕微鏡の構造
 - 11:00 試料作製法
 - 12:00 昼食
 - 13:00 単粒子解析の基礎
 - 14:00 トモグラフィーの原理と応用
 - 15:00 試料作製 (ネガステ、クライオ)
- 11月20日 10:00 ネガティブ染色試料のロード、軸合わせ、基本操作
 - 12:00 昼食
 - 13:00 画像収集 (17:00 終了)
- 11月21日 10:00 クライオ試料のロード、軸合わせ、基本操作
 - 12:00 昼食
 - 13:00 各種試料の観察 (17:00 終了)
- 11月22日 9:30 三次元再構成の基礎(Relion)
 - Tutorial data (apoferritin)
 - 12:00 昼食
 - 13:00 単粒子実習 (14:00 終了)

3. Reebush を活用したデータ解析実習

単粒子解析法では、電子顕微鏡により撮影された一つ一つの粒子の向きを計算機上で求めることで三次元構造を再構築する。現在では経験ベイズ法を用いるプログラムが一般的となっており、代表的なものには RELION1)、cisTEM2)、CryoSPARC3) などが知られている。今回は、これらのプログラムの中でも、もっとも一般的に使用されている RELION3.0 を使用して、チュートリアルデータである β -galactosidase の解析処理を行うことで、単粒子構造解析のフローチャートを学んでもらった。

RELION の動作のためには GPU 搭載の計算機が必須となるが、現在では比較的安価 (100-200 万円) に購入することが可能である。しかし、各種必要なプログラムを個人でインストールするのが難しいというユーザーも多くいると思う。今回の実習では東京大学の提供する Reebush を使用して、あらかじめこれらの設定を整えた環境を提供することで、各自の事前準備を最低限にして実習を行うことができた。多くの参加者はこれまで Relion に触れたことのない未経験者ではあったが、一連の処理を通して、電顕像から三次元構造が得られる過程を体験してもらえたと思う。今回使用したチュートリアルデータは 20 枚程度の電顕像から 3 Å 程度の分解能の立体構造まで到達できるものであり、計算時間もわずか半日程度の実習の中ですべて行うことが可能である。しかし、実際にはそのような対象は限られており、数百から数千枚程度の電顕像を処理することが必要となる。このような場合、測定したデータを分割して一通り処理してパラメータの最適化などを行うことも、効率よく計算機を使用するためには必要となる。今後は自分たちで撮影したデータの解析などを通して、より難しいデータに挑戦してほしい。

- 1) Zivanov J., Nakane T., Forsberg B. et al. eLife 7, e42166 (2018). 2
- 2) Grant T., Rohou A., Grigorieff, N. eLife 7, e35383 (2018).
- 3) Punjani A., Rubinstein J. L., Fleet D. J., Brubaker M. A. Nat Methods. 14, 290-296 (2017)



クライオ電顕画像から切り出した粒子像(一部)

2次元平均化・分類の結果

3次元再構成像(解像度 3Å)

4. 利用者へのアンケート結果

19 名中 9 名から回答が得られた。

各講義・実習の難易度と意見

講義・実習	難易度 1:簡単→5:難しい	代表的意見
電子顕微鏡の構造	2.8	説明がとても分かり易かった。
試料作製法	2.6	理解しやすかった。

単粒子構造解析の基礎	2.8	説明がとても分かりやすかった。
トモグラフィーの原理と応用	3.1	sub-tomogram averaging の話をもっと聞いたかった。
試料作製実習	2.4	初めて実際の grid 作製を行ったので、イメージが明確になった。
ネガティブ染色試料観察	2.8	自動でない操作が多かった分、行うべき操作の意味が理解しやすかった。
クライオ試料観察	2.9	最新装置での試料観察法の実習はものすごくためになりました。
データ解析実習	4.0	もう少し時間があると、より良かった。

講習会の満足度 (10 点満点) : 8.9