

2020 クライオ EM 講習会

包 明 久 柳 澤 春 明 吉 川 雅 英

東京大学大学院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を作製することにより、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るため、一般の研究者に普及させるには、一連の基本的な知識や実習体験が必要と思われる。

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、発展させることを期待したい。

2. 参加者およびプログラム

参加者：12名

(内訳) 東京大学：4名 他大学：5名 公的研究機関：2名 企業：1名

プログラム(初日は Zoom による遠隔講義、2 日目以降は実験室およびセミナー室で実施)

- 11月16日 10:00 電子顕微鏡の構造
11:30 試料作製法
12:20 昼 食
13:30 単粒子解析の基礎
14:30 トモグラフィーの原理と応用 (15:30 終了)
- 11月17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18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19日 10:00 三次元再構成の基礎(RELION)
Tutorial data (apoferritin)
12:00 昼 食
13:00 単粒子実習 (17:30 終了)

3. Reebush を活用したデータ解析実習

透過型電子顕微鏡の画像として得られるのは、三次元の生体分子の二次元投影像である。単粒子解析では、各粒子の投影像の向きを計算機上で求めることで、大量の投影像から三次元構造を再構成する。この計算をするためのプログラムはいくつか公開されているが、今回は最も広く使われているオープンソースのソフトウェアである RELION(ver3.1)を使用し、チュートリアルデータとして配布されている 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 搭載の計算機を用意することが望ましい。現在では比較的安価(100-200 万円)で購入することが可能であるが、必要な構成を理解したりプログラムをインストールするのが難しいというユーザーも多いであろう。今回の実習では東京大学が提供する 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。参加者はほぼ全員が RELION に触れたことのない未経験者であり、Linux の使用経験も少ないという方も多かったが、一日の講習で一連の処理をおこない、電頭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 枚程度の電頭像から 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、1 日程度の実習の中ですべておこなうことが可能である。しかし、実際の構造解析ではこのようなデータが得られることは稀であり、通常は数百から数千枚程度の電頭像を処理することが必要となる。単粒子解析では「このフローチャートに従えばどのような構造でも解析できる」といった解法はなく、得られたデータセットに対して常に各処理の順番や回数、パラメータなどを最適化する必要がある。参加者には今後、今回のチュートリアルデータの処理を基本として、より難しいデータの解析を試行錯誤して見てほしい。

4. 利用者へのアンケート結果

12 名中 10 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	3.2	非常にわかりやすかった。
試料作製法	2.9	講義で使用する資料が予め手元があれば良かった。
単粒子構造解析の基礎	3.5	予備知識がなく、理解が難しいところもあった。
トモグラフィーの原理と応用	3.2	発展途上の技術であることが分かった。
試料作製実習	3.0	クライオ電頭サンプルの作製も体験できればよかった。
ネガティブ染色試料観察	3.6	電頭操作の流れは理解できた。
クライオ試料観察	3.8	もっと時間が欲しかった。
データ解析実習	3.7	フローチャートで一連の流れを示してほしかった。

講習会の満足度 (10 点満点) : 9.5

[クライオ電子顕微鏡 Krios の見学]



[データ解析実習の様子]

