3F1030

クライオ原子間力顕微鏡による生体試料のイメージング：フリーズフラクチャー・エッチング技術の適用

○谷 孝二、山本 大輔、五藤 俊明、神山 勉（名大・院理・物質理）

これまでに我々は -160°C の冷却窒素ガス雰囲気中で動作するクライオ原子間力顕微鏡（Cryo-AFM）を開発してきた。今回、急速凍結した試料の表面から水分子を冷却窒素ガス中で昇華させる方法を開発し、生理条件下の構造を保持した生体試料のイメージングを行った。試料のフリーズフラクチャー・エッチングは次のように行った。まず、濃縮した生体試料を直径3mmの凹型金属製のチップの上に載せた。その上に薄い上蓋をかぶせ、液体プロパン中に落下させて凍結後、液体窒素中で上蓋をはがした。試料の載ったチップを低温に保ったままサンプルホルダーに取りつけ、 -160°C のCryo-AFMにマウントした。サンプルホルダーに埋め込んであるヒーターで試料温度を -110°C 付近まで上げて試料表面の水分子を冷却窒素ガス中で昇華させた。このようにして試料表面のエッチングを行った後、再び試料温度を下げAFM観察を行った。図1に大腸菌のペレットのフリーズフラクチャー・エッチング後のAFM像を示す。このとき大腸菌の形状は丸みを帯びており生理的条件下での形状を保持していると考えられる。比較のため大腸菌を乾燥した後に冷却したときのAFM像を示す（図2）。

大腸菌のCryo-AFMイメージ
(1) 表面の水分子を昇華させた後、(2) 乾燥後に冷却した試料
バーは2 μm

K.Tani, D.Yamamoto, T.Goto and T.Kouyama : Imaging of biological materials by Cryo-AFM : Introduction of freeze-fracture etching technique

3F1100

単分子解析における粒子の向き推定問題の考察

○上野 豊¹、浅井 潔¹、高橋 勝利²、佐藤 主税¹（¹電総研・知能情報部、²北陸先端大）

電子顕微鏡による単分子解析（Single Particle Analysis）では、撮影されたタンパク質などの分子の向きを推定して三次元再構成をする必要がある。我々は、これを分子の向きと構造の同時推定問題ととらえ、新規アルゴリズムとプログラムの開発を行っている。コモンライン法による投影角の推定は、二つの画像をある角度のベクトルにそって積分したプロファイル（シノグラム）が一致するベクトルを求めることに相当する。まず、幾何学的なモデル構造をいくつかのオイラー角で投影し、その透過画像からオイラー角の推定を行った。その結果、プロファイルの一致度の尺度が相関関数では正しい解が得られず、平均二乗誤差である必要があった。また、3枚以上の透過像データにおけるオイラー角を推定するため、複数のデータ列を最適に重ね合わせる手法として知られている Iterative Alignment 法を適用した。その結果、Penczekらの主張する angular weight の導入が必要であることが確認された。そして実際に、負染色電圧感受性 Na チャネルの単分子画像において、同じ向きと推定された画像を加算してノイズを除去し、それらのオイラー角の推定と三次元再構成を行った。しかしながら、一致度がほとんど同程度の複数立体構造モデルが可能であり、この段階で一意な構造決定は難しいと考えられた。得られたモデルを観測データに最も一致するように改良することは不可能ではないが、一致度のスコア算出に上述の angular weight が必要となり、既存のプログラムでは正確に計算できないことが判明した。これら未解決の問題点についてさらに検討している。

Y.Ueno, K.Asai, K.Takahashi and C.Sato : Reconsideration of the Angular Reconstitution in Single Particle Analysis.

3F1045

ミミズ腹髄神経節におけるNO作用経路のイメージング

○北村 美一郎¹、永野間 祐一¹、堀田 悠人¹、小川 宏人²、岡浩太郎¹（¹慶大・理工・システムデザイン工学、²埼玉医大・生物）

神経回路中での一酸化窒素（NO）の作用を調べるため、NO測定が多く試みられているが、動物の行動に伴う神経活動によるNO作用を調べた例は極めて少ない。ミミズ（*Eisenia fetida*）の逃避行動時に体軸方向に情報伝達を行う巨大軸索は、腹髄神経節中に存在する。そこで、ミミズ神経回路の情報伝達に与えるNOの影響を考えるためには、神経節中でのNO発生を調べることが有効である。本研究では、神経節中でのNO産生部位をNADPH diaphorase 染色法により確認し、蛍光色素DAF-2 DAにより神経節中で発生するNOの作用経路を調べることを目的とする。麻酔を施したミミズを背部より切開し、4%パラホルムアルデヒド溶液で固定（4℃、30分間）後、神経節を切り出した。NO産生部位を調べるために、1 mM β -NADPH、0.5 mM Nitro blue tetrazolium、0.1 mM dicumarol、1% Triton-Xを含む生理食塩水中で染色した（暗所、室温、60分間）。一方、NO放出を可視化する実験では、50 μM DAF-2 DAと1% Pluronic F-127を含む生理食塩水中で神経節をインキュベートした（4℃、30分間）。生理食塩水中に5分間静置後、高濃度K⁺刺激を10分間行った。また最後に、10 μM NOを添加することにより、DAF-2 DAの神経節への取り込み状態を確かめた。NADPH diaphorase法により、神経節腹側のいくつかの細胞体が強く染色された。この染色パターンは体節毎に繰り返し見られた。高濃度K⁺刺激により、神経節の腹側および背側で経時的なNO放出が見られた。特に腹側では、静置時および高濃度K⁺刺激時ともに、NADPH diaphoraseで強く染色された部位を中心に顕著なNO放出が見られた。

Y. Kitamura, Y. Naganoma, H. Horita, H. Ogawa and K. Oka : Visualization of nitric oxide signaling pathway in the earthworm ventral nerve cord

3F1115

Mechanical unfolding and refolding of carbonic anhydrase B in buffer studied by atomic force microscope

○Wang Tong、猪飼 篤（東工大・院・生命理工）

The atomic force microscope (AFM) was used to mechanically unfold and refold the globular protein, a dimer carbonic anhydrase B (CAB). For this purpose, the protein was engineered to endow it with -SH groups at its -N and -C terminus on two units respectively and was fixed to a silanized surface of a silicon wafer using a cross linker. A silicon nitride AFM tip was modified with a reactive end to -SH and was brought into contact with the protein on the silicon substrate. A native CAB dimer was extended to about 100nm, the length of one monomer unit, and the force increased to 1.6 nN. The other monomer unit could not be extended further. During the unfolding process, there was a middle peak around 30-50nm before the final rupture, which may represent unfolding of the core structure in the first unit, but the other core structure could not be extended due to the tight overall structure of the "knotted" CAB monomer. To confirm the existence of the core structure from the opposite way, CAB dimer was unfolded to a confined extent without breaking the covalent cross-linkers and refolded back. During the repeated unfolding and refolding process, the formation of the core-like structure could also be observed around the similar position, which supports the above conclusion. Meanwhile, the other types of force curves, smooth reversible extension-contraction curves, represent non-specific segmental interactions in the polypeptide chain under physiological environment.

T. Wang and A. Ikai : Mechanical unfolding and refolding of carbonic anhydrase B in buffer studied by atomic force microscope