3H1530

単粒子解析のための Neural Network を用いた電子顕微鏡画像における蛋白質粒子の自動認識と拾い上げ
○小椋 俊彦、佐藤 主税（産総研・脳神経情報部門）

近年、電子顕微鏡による蛋白質の単粒子画像より蛋白質構造を決定する単粒子解析法が開発され、これまで結晶化が困難なことが多い膜蛋白質を中心として解析が進められている。この手法では、電子顕微鏡画像より切り出した数千から数万の単粒子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。この生成データを基に三次元構造を再構築する。通常、10 Å レベルの分解能の粒子構造を求めるためには、数万枚の単粒子切り出し画像が必要となり、今後さらなる分解能向上のためには数十万枚の画像が必要とされる。こうした膨大な画像の切り出しは、人が行うにはあまりに多くの時間と労力を必要とする。そのためこれまでに、単粒子電顕像の自動認識、切り出しアルゴリズムがいくつか開発されてきたが、これらは対称性が高く粒子形状も大きな Virus などを対象としたもので、400kDa 以下の小型で非対称な粒子を高精度に認識するアルゴリズムはまだ開発されていなかった。我々は、本研究において三層階層型 Neural Network (NN) を用いることで、200kDa 以下の小型で非対称な蛋白質粒子を高精度に認識することを可能とした¹⁾。本方法では、高コントラストの Negative Stain 像はもとより、コントラストの低い Cryo 電顕像においても極めて高い認識能力を示した。本方法により、単粒子画像の切り出しにかかる莫大な時間と労力を劇的に減少させ、単粒子解析における構造解析速度の飛躍的な向上を可能とした。1) Ogura, T. & Sato, C. (2001). An automatic particle pickup method using a neural network applicable to low-contrast electron micrographs. J. Struct. Biol., 136, 227-238

T.Ogura, C.Sato : An Automatic Particle Pick-up Method using three-layer pyramidal-type Neural Network Applicable to Low Contrast Electron Micrographs

3I0915

出芽酵母成長による誘電スペクトルの変化に関する境界要素法計算

○関根 克尚¹、原 沙緒里¹、木村 美幸¹、浅見 耕司²（¹金大・医・保健、²京大・化研）

細胞形状の変化によって、細胞懸濁体の誘電スペクトルが変化する。我々はこれまで、このことを利用して、培養における酵母の成長のモニターを行い、これによって得られた結果を境界要素法に基づいた計算法を用いて詳細に検討してきた。

本研究では、出芽酵母における娘細胞成長の効果を検討するため、以下の2種類のモデル・手法を用いて誘電スペクトルの計算を行った：

- A 母細胞（球形、サイズ固定）と娘細胞（球形、サイズ変化）を円環体で接続した Doublet 型モデルを用いた境界要素法計算
- B 細胞の軸比だけを考慮した偏長回転楕円体型モデルを用いた従来法による解析的計算

これらの計算により、以下のことがわかった：

- ・ A、Bともに2段の誘電緩和が出現する。
- ・ 娘細胞サイズの増加により、低周波側の誘電緩和の緩和強度が増加し、緩和周波数が低下する。これに対し、高周波側の緩和強度・緩和周波数はほとんど変化しない。
- ・ AとBとの違いは、低周波側の緩和周波数に顕著に現れる。AはBより緩和周波数の低下が激しい。

これらの結果から、娘細胞成長のモニターには低周波側の誘電緩和に着目するのが有効であること、低周波側の緩和周波数から細胞構造に関する詳細な情報が得られる可能性があることが示唆される。

K. Sekine, S. Hara, M. Kimura and K. Asami : Boundary-element calculations to examine the change in dielectric spectra for budding yeasts in suspension with the cell-growth

3I0900

セルスタットのための相関ネフェロメーターの開発

○松岡 真人、伏見 譲（埼玉大・工）

本研究はバクテリオファージの連続培養に基づく自然淘汰型進化リアクターであるセルスタットのシステム制御の要であるネフェロメーターを改良しようというものである。セルスタットでは、上流に宿主菌である大腸菌を生理状態一定で連続培養するタービドスタットを置き、そこから供給される宿主菌の流れの中でバクテリオファージを連続培養する。タービドスタットで対数期大腸菌の連続培養を安定に行なうためには、個体群密度をリアルタイムかつオンラインで測る測定器が必要である。このとき微生物が観測用のセルの内壁に付着し増殖する壁成長の影響を受けやすいという問題がある。そこで、緩やかな変化である壁成長の影響を受けにくい相関ネフェロメーターを開発した。これは半導体レーザー光の焦点内に存在する大腸菌の個体群密度のゆらぎを光散乱の強度のゆらぎとして測定することを基礎とする方法である。散乱光強度のゆらぎの自己相関関数を計算する。ゆらぎの自乗平均は個体群密度に比例し、またゆらぎの緩和時間から流速が求まる。すなわち、タービドスタットからセルスタットへの流路中に観測用セルを置くことにより、セルスタット連続培養における重要パラメータである流入宿主菌個体群密度と連続培養流量とが同時に測定できる。試作した相関ネフェロメーターの性能について報告する。またレーザー光の高輝度性を生かして、セルスタットのガラス培養槽内の宿主菌個体群密度を遠隔測定する可能性を検討している。

M.Matsuoka,Y.Husimi : Development of a Correlation Nephelometer for a Cellstat

3I0930

マイクロ加工と画像処理を用いた大腸菌一細胞の成長過程における運動パターン変化解析技術の開発

○服部 明弘^{1,2,3}、若本 祐一¹、安田 賢二¹（¹東大院・総合文化、²科学技術振興事業団、³シグマ光機）

【目的】細胞運動の経時変化を可視化し比較することは、細胞が環境へ適応するダイナミクスを明らかにする上で重要であると考えられる。実際、細胞の運動能解析については、過去に多くの研究が行われているが、運動能を持つ細胞では他の細胞との相互作用を完全に制御したものは無く、また、特定の細胞を運動させ続けながら数世代に渡って観察しつづけることも難しかった。そこで我々は、マイクロ加工技術と画像処理技術を組み合わせることで、上記問題点を克服して、他の細胞と相互作用をしない孤立化した一細胞の細胞周期に対する運動パターンの変化、培養環境の変化に対する運動パターンの変化、世代間の運動パターンの変化等を長期間連続計測することが可能な計測システムを開発することとした。

【方法】微細加工技術を用いてガラス基板上に作成したマイクロチャンバに大腸菌一匹を封入し、半透膜でシールすることでコンタミネーションや他の細胞との相互作用を防止した観察用細胞培養システムを作成した。マイクロチャンバ内の大腸菌の像は、CCDカメラを通してコンピュータにデジタル画像として入力され、この画像に二値化・ノイズ除去などの画像処理演算を施すことで、特定の細胞の位置（重心座標）をビデオレート（33ms 毎）で記録することができた。

【結果】（運動能を持つ）大腸菌を用いて行った実験では、ほぼリアルタイムで細胞の位置を連続的に追跡することができた。本会では、システムの構成と、このシステムを用いて得られた大腸菌の細胞周期における運動特性の変化について結果を詳しく報告する。

A.Hattori, Y.Wakamoto and K.Yasuda : Development of pattern analysis system for a variation of single cell movement of E.coli using microfabrication and image processing.