2P273

膜流動性画像の3次元再構成 (2)
PSFの精微化とblind deconvolution

○大場 哲彦、麻生 健、大木 和夫 (東北大院・理)

我々は、膜環境感受性色素 laurdan の、膜流動性変化を感知して発光波長が変わる性質を利用し、細胞やリボソームの膜流動性を画像化するシステムを構築してきた。このシステムは、通常の落射型蛍光顕微鏡のカメラポートに、自作の W 光学系を取り付け、二波長の蛍光画像をひとつのカメラに同時取得することで、膜流動性変化を画像化する。ただし、得られる画像は二次元で、三次元的な試料に適用した場合、非焦点面からの寄与のために、解像度の低下は避けられない。観測した三次元画像 ($i(u, v, w)$) は、真の輝度分布 ($o(x, y, z)$) と顕微鏡の結像特性 (Point Spread Function = PSF) を用いて、

$$i(u, v, w) = \iiint_{-\infty}^{\infty} o(x, y, z) \text{PSF}(u-x, v-y, z-w) dx dy dz \quad (1)$$

と表すことができる。したがって、顕微鏡の PSF を知ることができれば、真の輝度分布を計算により求めることができる。通常の三次元再構成では、得られた真の輝度分布を定性的に評価すること (ボケの減少の程度等) が多いが、我々の目的では、二波長画像のそれぞれに三次元再構成を行った結果を用いて流動性画像を演算するため、得られた真の輝度分布の定量性が重要であり、三次元再構成法の厳しい試金石となる。直径 $1\mu\text{m}$ の蛍光ビーズを用いて、種々の条件下での PSF の変化を観測したところ、W-光学系の片側 (結像位置を移動させている側) で、理想的な PSF からのずれが大きくなり、それが、3次元再構成の定量性を妨げていることがわかった。そこで、今回新たに、(1) 実測のビーズ画像から計算により PSF を算出する方法、(2) PSF と真の画像を同時に変化させながら最適解を得る方法 (blind deconvolution) のふたつの手法を開発した。これらによって、解像度と定量的の両面で大きな改善が見られた。

T.Ohba, K.Aso and K.Ohki : 3D reconstruction imaging of membrane fluidity (2)

2P275

Hilbert 微分電子顕微鏡による細胞内ナノ構造の *in vivo* 観察○永山 國昭¹、Danev Radostin¹、新田 浩二²、金子 康子² (¹自然科学機構・岡崎統合バイオ、²埼玉大・理・生体制御)

in vivo に近い状態の電子顕微鏡像を撮るために急速凍結法や加圧凍結法が開発されてきた。しかしこれらの方法では染色しないため非常にコントラストが低く細胞内構造が見えにくいという欠点を持っていた。我々が開発した位相差電子顕微鏡はこの低コントラスト問題を解決できる可能性がある。そのため昨年発表した微分干渉コントラスト相当の電子位相顕微鏡法、Hilbert 微分コントラスト法 (HDC) を急速凍結したバクテリア試料に適用した。HDC は対物レンズ後焦点面に半円の π -位相板を置くだけで実現される。300kV の場合 π -位相板は 64nm の非晶質炭素膜で実現される。位相板による電子のロス率は約 50 % と見積もられており、全視野では 75 % の電子利用効率となる。こうしたロスはあるものの HDC は図に示すように通常法に比べはるかに高いコントラストを示し、細胞内構造の詳細が 2nm の分解能で見えるようになった。*in vivo* 構造として、ポリリボソーム、ルビスコ、フィコビリソーム、チラコイド、DNA、DNA/RNA 転写コンプレックス等の構造が明らかになった。電子顕微鏡による *in vivo* 構造生物学の今後についても言及したい。

図 シアノバクテリア氷包埋サンプリングの 300kV HDC TEM (JEM3100FPC) イメージ
a. 300kV HDC イメージ (正焦点, 200 e^-/nm^2)
b. 300kV 通常イメージ (15 μm デフォーカス, 200 e^-/nm^2)
いずれもヘリウムスチージを用いた 10kV のエネルギーフィルターのもとで撮影。シアノバクテリア氷包埋はバクテリア懸濁液を電顕グリッドにはり、急速凍結により得た。

K.Nagayama, R.Danev, K.Nitta and Y.Kaneko : *In vivo* Observation of Subcellular Nano-Structures with Hilbert Differential Electron Microscopy

2P274

急速凍結フリーズレプリカ電子顕微鏡像のシミュレーションに基づく蛋白質表面プロファイルの解析

○木森 義隆¹、小口 洋介²、市瀬 紀彦³、馬場 則男²、片山 栄作¹ (¹東大・医科研・分子構造解析、²工学院大・電気工学、³駒女大・映像コミュニケーション)

急速凍結ディープエッチレプリカ電子顕微鏡法は、生体材料を一瞬に凍結固定し、軽く掻き取った表面に重金属をロータリーシャドウイングすることにより像を得る方法である。溶液中の蛋白質分子や *in situ* の組織・細胞中における分子構築に適用すれば、それらの表面の凹凸プロファイルを高い分解能と高いコントラストで画像化できるので、個々の蛋白質分子の機能に伴う構造変化を捉えて、その詳細な解析を行うことも可能かも知れない。我々は、蛋白質分子のレプリカ像を X 線結晶回折に基づく原子モデルと比較照合することにより、レプリカ像の投影方向を精密に決定するとともに、その表面プロファイルの微妙な異同を検出する画像解析法を開発した。その過程は概ねつぎの 2 つの段階からなる。1) 特徴量の抽出: Mathematical Morphology に基づく抽出フィルタを設計し、レプリカ像とモデル像から、特徴量としての表面の凹凸パターンを様々な分解能で抽出した。2) 類似度の評価: 前処理で得られた複数の特徴量を統合した多段階認識により両画像を照合し、正規化相互相関法により特徴空間内での距離を計算した。それに基づき類似度を評価した。この手法を様々な条件におけるミオシン頭部のレプリカ像に対して適応した結果、*in vitro* 滑り運動中のミオシン頭部の多くが、分子内の 2 個の反応性 SH 基を、ADP 存在下、2 価性試薬 ($\text{N}_3\text{N}'$ -p-phenylene dimaleimide) で架橋したミオシン頭部と同等の構造を取っていることが判明した。これは、昨年の年会での報告を支持する結果である。さらに、投影方向を精密に決定することにより、レプリカ像におけるミオシン頭部のサブドメインの配置を決定することができた。これにより、モデルとの構造の差異、すなわち溶液中のミオシン頭部表面の構造ゆらぎを検出し定量的に解析できる可能性ができた。

Y.Kimori, Y.Oguchi, N.Ichise, N.Baba, E.Katayama : Analysis of protein's surface profile through simulation of its quick-freeze deep-etch replica image.

2P276

走査型プローブ顕微鏡による染色体及びタンパク質の観察

○杉山 滋、七里 元晴、吉野 智之、関口 博史、佐宗 めぐみ、萩原 昌司、大谷 敏郎 (食品総合研究所)

我々は、数年前から原子間力顕微鏡 (AFM, Atomic Force Microscope) や走査型近接場学原子間力顕微鏡 (SNOM/AFM, Scanning Near-field Optical/Atomic Force Microscope) を用いた染色体構造解析を進めており、本学会でも、これまでに SNOM/AFM によるオオムギ染色体蛍光バンドやテロメア FISH シグナルの光学顕微鏡を超える分解能での検出について報告してきた。しかし、これらはすべて染色体の DNA を対象とした計測であった。そこで、今回は、染色体上のタンパク質を対象とした SNOM/AFM 計測を試みた。図 A は、抗ヒストン H4 抗体を用いてヒト染色体を免疫蛍光染色した後、SNOM/AFM によって計測した蛍光像である。図 B は同時に取得した形状像である。この結果は、蛍光強度が染色体全体にわたってほぼ一様であることを示しており、実際のヒストン H4 の分布と対応している。他にも、AFM によるシラン修飾マイカを基板としてタンパク質の液中観察実験を進めている。図 C に予備的に行なったフェリチン分子の液中観察結果について示した。

本研究は、科学技術調整費総合研究、NEDO 基盤技術研究促進事業により行われている。

S. Sugiyama, M. Shichiri, T. Yoshino, M. Sasou, H. Sekiguchi, S. Hagiwara and T. Ohtani : Observation of chromosomes and proteins by scanning probe microscopy.