2P025

Simulated Annealingによる電顕タンパク質粒子画像の自己集積化法による拾い上げ

○小椋 俊彦、佐藤 主税（産総研・脳神経）

最近我々は、単粒子構造解析における粒子拾い上げ方法として、三層階層型 Neural Network (NN) を用いた方法を開発し、極めてノイズが高くコントラストの低い Cryo 電顕画像での粒子の拾い上げを可能にした。しかしながら、この方法では、学習データとする 200~300 枚の粒子画像を目視により拾い上げる必要があるため、ユーザーは極めてコントラストの低い電顕画像内の粒子を認識する能力が要求される。我々はこの問題を解決するために Simulated Annealing アルゴリズムを用いた粒子画像の自動認識法を開発した。この方法は、一枚の粒子が多数存在する電顕画像内にフレームを数百個配置し、このフレームをランダムに動かしながら、全フレーム画像の加算平均を求める。そして、このコントラストが高くなるようにフレームの移動と回転に制約を加える。この制約は、温度パラメータによりコントロールされており、温度を徐々に減少させることで、フレームは粒子の位置に自然に配置される。この時のフレームの平均画像は、粒子に近い形状を示すことになる 1)。この方法は、まさにタンパク質が結晶化する状態を模擬的にコンピュータ上で再現することに近く、タンパク質が結晶化する際により安定な配置を求めて規則的にタンパク分子が集積するように、フレームの平均画像はノイズのみで形状のない状態から徐々に粒子状の構造へと変化していく。そのため、この方法ではノイズに埋もれた形状を予め知る必要がなく、ユーザーは自己集積する環境をいくつかのパラメータで設定するだけで、あらゆる形状の粒子を高精度に拾い上げることが可能となる。1) T.Ogura & C.Sato. (2004). J. Struct. Biol., 146, p344-358

T.Ogura, C.Sato : Auto-accumulation method using simulated annealing enables fully automatic particle pick up

2P027

磁気ビーズを用いたアクチン・ミオシンへの負荷の導入とその状態の電子顕微鏡法による観察

○藤岡 宏子¹、柏木 由紀²、安永 卓生²（¹ 九工大院・情報工・情報科学、² 九工大・情報工・生命）

アクチンとミオシンの相互作用によって筋収縮・細胞分裂が進行していることは広く知られている。ミオシン分子頭部には ATP 加水分解によるモーター活性がある。その加水分解エネルギーを使ってアクチンフィラメントのマイナス端からプラス端へ移動することができる。しかし、その分子メカニズムは依然不明である。そこで、負荷のある状態でのアクチン・ミオシン複合体を電子顕微鏡法で観察することができれば研究の発展が期待できる。今回、本研究ではまず負荷をかけた状態でのアクチン・ミオシン複合体の観察を目指し、アクチン・ミオシン複合体への静磁場を用いた負荷の導入を試みた。まず、モノマー状態のアクチンをビオチンマレイミドと結合させた。このとき、アクチンの Cys 374 残基目の SH 基とビオチンのマレイミド基が特異的に結合する。そのビオチン・アクチン複合体をフィラメント化し f-アクチン・ビオチン複合体を作製した。その後、ビオチンと特異的に結合するストレプトアビジンを用いて、f-アクチン・アビジン複合体を作製した。この際のストレプトアビジンは、あらかじめ磁気ビーズが共有結合しているものを使用した。磁気ビーズとアクチン複合体を電子顕微鏡法で観察し、その結合を確認した。さらに、この f-アクチン・アビジン複合体をローダミンで蛍光標識した後、磁気ビーズで標識したアクチンフィラメントが磁場の影響を受けて動いていることを蛍光顕微鏡法によって確認した。現在、磁気ビーズ複合体及び電磁石の作製法を改良中である。今後、f-アクチン・アビジン複合体とミオシンを相互作用させ、負荷を与えた状態で電子顕微鏡法で観察する予定である。さらに、アクチン・ミオシン複合体の観察結果からアクチンとミオシンの相互作用による筋収縮メカニズムを検討したいと考えている。

H.Fujioka, Y.Kashiwagi, T.Yasunaga : Approach to electron microscopic observation of interaction of actomyosin with leading bound-magnetic beads

2P026

電子分光クライオ電子顕微鏡を用いたグルコシルトランスフェラーゼのドメイン構造の可視化

○矢治 智彦¹、安永 卓生²、小松 英幸²、児玉 孝雄^{2,3}（¹ 九工大院・情報工・情報科学、² 九工大・情報工・生命、³ JST）

口腔連鎖球菌 *Streptococcus sobrinus* の Glucosyltransferase-I (GTF-I, Mr=175k) は、N 端側の触媒ドメイン (GSd, Mr=120k) と C 端側のデキストラン結合ドメイン (DXBd, Mr=55k) で構成されている。DXBd は 1 回が約 100 残基の 6 回繰り返し配列を有しており、この繰り返し数はグルコシル基アクセプターであるデキストランとの結合力と相関がある。GSd および DXBd は、単独でそれぞれスクロース分解およびデキストラン結合の機能を有するが、GSd の作用によるスクロースからデキストランへのグルコシル基転移には DXBd との相互作用が必須であることが、DXBd の長さを系統的に欠損させた変異体を用いた酵素化学的・物理化学的解析で明らかになっている。

現在、GTF-I の結晶構造は分かっておらず、電子顕微鏡観察においてもドメイン間相互作用の詳細なメカニズムを議論できる結果を得られていない。そこで今回、ドメイン間相互作用を構造学の観点から明らかにすることを目的として、単一分子のタンパク質を直接観察することのできる電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いて観察を行った。単粒子のコントラストを増強するために、デフォーカスした条件 (2 μm ~ 9 μm) で撮影し、像のボケは計算機上で補正した。その結果、何れの像にもリング状構造を観察できた。更に、このリング状構造から突出した別のドメイン構造も観察できた。これらは、恐らく GSd と DXBd に対応するものである。今後、DXBd の長さを系統的に欠損させた変異体を観察・解析することにより、各ドメインの同定と、DXBd の配列・構造関連の決定を行う。また、画像をクラスター解析によって分類し、投影方向の異なる粒子の平均像を得ることで、DXBd の構造的特長を解析する予定である。

N.Yaji, T.Yasunaga, H.Komatsu and T.Kodama : Visualization of domain structure of glucosyltransferase-I by electron cryo-microscopy

2P028

蛍光相互相関分光法による非筋細胞ミオシン II アイソフォームのダイナミックな会合・脱会合の解析

○三橋 万梨子¹、坂田 啓司²、金城 政孝³、高橋 正行¹、矢澤 道生¹（¹ 北大院・理・化学、² 研究成果活用プラザ北海道、JST、³ 北大・電子研・超分子分光）

非筋細胞ミオシン II は様々な細胞運動に密接に関与し、脊椎動物には 3 つの異なる重鎖からなる 3 種類のアイソフォーム (IIA, IIB, IIC) が存在する。3 つのアイソフォームのうち IIA, IIB は細胞内で異なる局在を示す場合があり、異なるモーター活性を持つことから同じアイソフォーム同士からなるホモフィラメントを形成することが予想されるが、実際の細胞内におけるフィラメントの会合様式は明らかではない。我々は、まず *in vitro* での会合様式を調べるため、フィラメント形成に必要な長さをもち、アイソフォーム間の一次構造の違いが集中している重鎖 C 末端フラグメント (ARF-296, BRP-305) を用いた実験を企画した。これらのフラグメントを蛍光標識し、蛍光相互相関分光法 (FCS) と蛍光相互相関分光法 (FCCS) により解析したところ、予想に反し、単純にフラグメントを混合しただけではヘテロな会合様式をとっていることが示された。

次に、ホモ会合体を作る要因を探さべく、Ca²⁺ 依存的に IIA のみと結合し、IIA 会合体の脱会合を促進する S100 family protein の mts-1 に注目し、FCCS による解析を行なった。蛍光標識した ARF-296, BRP-305 のヘテロ会合体に 0.2 mM Ca²⁺ 存在下で mts-1 を加えると、選択的に ARF-296 のみが脱会合状態になり、その結果 BRP-305 のホモ会合体が形成され、さらに、そこに 1 mM EGTA を添加すると再びヘテロ会合体が形成された。このことから、ミオシン IIA, IIB は細胞内でそれ自体ではヘテロ会合体を形成し得るが、mts-1 を始めとする様々な因子によって修飾を受け機能発現することが予想される。FCS, FCCS を用いてアブローチした、ダイナミックで可逆的かつ選択的な会合・脱会合の様子を示した結果を報告する。

M. Mitsuhashi, H. Sakata, M. Kinjo, M. Takahashi and M. Yazawa : Dynamic assembly properties of nonmuscle myosin II isoforms as assessed by fluorescence cross-correlation spectroscopy