2P121

電子顕微鏡における変調関数決定法の開発

○今村 元樹¹、安永 卓生² (¹ 九工大院・情報工・情報科学、² 九州工・情報工・生命)

タンパク質の機能を解析するためには、そのタンパク質の構造を知ることが重要である。電子顕微鏡法はその有効な手法の一つである。しかし、電子顕微鏡撮影では、コントラスト改善のために焦点を外して撮影を行うので、画像はPSF(点拡がり関数)により変調を受ける。シグナル特徴の複雑さ故に、PSFの同定は困難であるが、変調を補正し真の画像に復元することが、高分解能タンパク質構造解析において重要である。これまでこのPSFを推定するための方法が報告された。いずれも、画像をフーリエ変換することによって、CTF(Contrast Transfer Function)として変調関数の推定を行うのが一般的である。しかし、背景のカーボン膜をもたない氷包埋法では、試料のコントラストが低い、S/Nが悪くCTFの自動的な決定は困難であった。我々はこのCTFの新しい推定方法を検討し、よりよい結果を得たので報告する。画像のパワースペクトルとCTF2の極値の位置は一致する。そこで、理論的なCTF2の極値を求め、この極値の位置とパワースペクトルの極値とのずれを比較することによって極値のずれが最も小さいパラメータを決定した。これと同時に、CTF2とパワースペクトルとの相関関係を計算することによってCTFのパラメータを決定する方法を試みた。これらの方法を統合することによって、CTFを見積もった。更に、デフォーカス量が小さい領域やデフォーカス量が倍の領域で不当に高い評価をすることがあり、この不当な評価を取り除くための検討を行った。その結果、10%程度の誤差のCTF推定に成功した。今後は、PSF推定の精度向上のためのアルゴリズムの開発と、さらには推定した変調関数によって画像を復元する方法の開発を行っていく予定である。

M.Imamura, T.Yasunaga : Development of novel automated determination method of contrast transfer function of electron microscopic images

2P123

The effect of local nucleotide structure on the global flexibility of circular DNA deduced from normal mode analysis

○Matsumoto Atsushi¹、Tobias Irwin²、Olson Wilma² (¹Japan Atomic Research Energy Institute、²Rutgers, The State University of New Jersey)

We take advantage of a new approach to study the low frequency normal modes of DNA fragments of a few hundred base pairs in terms of the constituent base-pair steps. The advantage of this approach is that calculations for relatively long DNA fragments are very fast and yet the sequence-dependent local structure and flexibility of the polymer is considered. Initial application of the approach to linear DNA revealed the relationship between global deformations, such as bending and twisting, and sequential variations of the base-pair step parameters. Subsequent extension of the calculations to circular DNA showed remarkable agreement with the theoretically predicted dynamical properties of a circular DNA modeled as an ideal, inextensible elastic rod and revealed new insights into the global configurational rearrangement of the circle to the figure-8 form. We now study more realistically modeled circular DNA and examine the effects of local conformational properties, such as the intrinsic bending, twisting, and flexibility of base-pair steps, on global structure and dynamics. We focus on the intrinsic flexibility of the p53 response element DNA, which has been previously studied in ring closure experiments. We will discuss the origin of this flexibility in terms of local conformational properties.

A.Matsumoto, I.Tobias, and W.K.Olson : The effect of local nucleotide structure on the global flexibility of circular DNA deduced from normal mode analysis

2P122

氷包埋電子顕微鏡試料作成のための温度・湿度管理可能な自動急速凍結装置の作成

○平井 千絵¹、安永 卓生² (¹ 九工大院・情報工・情報科学、² 九州工・情報工・生命)

タンパク質の構造・機能相関を明らかにするには、クライオ電子顕微鏡を使用した観察が有効な方法の一つである。この方法は氷包埋したタンパク質を、生体内に近い状態で観察することができる。しかし、適切な氷包埋急速凍結試料を作成するためには、熟練した技術を要し、再現性が低い。このことが、クライオ電子顕微鏡による構造解析を遅らせる主たる要因のひとつになっている。現在、多くの急速凍結装置では、急速凍結プロセスは手作業であり、かつ温度・湿度管理が困難である。よって、例えば好熱菌のタンパク質など、至適温度の高いタンパク質の構造解析は、困難である。そこで温度・湿度センサをもつ、温度・湿度管理を行うことの出来る凍結装置を開発することにした。湿度90%以上の空気を設定した温度(4~60℃)に保ちつつ、凍結装置内のチャンバーに送風するシステムとした。これにより、高温で活性を持つタンパク質を、活性のある状態で固定することが可能となる。現在、試料を載せたグリッドをピンセットで固定し、液体エタンへ自由落下させることで凍結固定している。この速度を高速かつ一定の落下速度を実現することで、再現性の高い凍結を目指すこととした。そこで、液体エタンへの落下にはWhite, H. Dらが採用したのと同様にエアシリンダを用いた。このエアシリンダは急速に停止させることも可能であるため、今後の時分割凍結法などに拡張も容易である。このために、位置センサを備え、凍結プロセスの管理が可能なシステム構成とした。

現段階での性能を報告し、本開発装置により得られた成果を報告する。

C.Hirai, T.Yasunaga : Fabrication of freezing with controlling apparatus temperature and humidity for electron cryo-microscopy

2P124

DNAのHybridization反応の速度論的解析

○北島 哲郎、瀧ノ上 正浩、陶山 明(東大院・総文・生命環境系)

我々はこれまで、DNA computerで用いられる分子計算反応においてきわめて重要な反応である相補鎖間のhybridization反応に注目してきた。分子計算反応に使うDNAを配列設計する際に、1xSSC, 1μMの条件でnearest-neighbor法による予測融解温度を65℃±2℃の範囲内に保つことによって熱力学的な反応の安定性を概ね一定にし、さらに塩基配列をうまく選ぶことでmiss hybridizationを避けるようにした。これによって、分子計算のエラーが少なくなるような配列300種類以上からなるDNA 23mer正規直交配列のプールを構築することができた。

しかし、現在までに行われてきた配列設計では速度論的な観点が入れられておらず、検証のためにhybridizationの反応速度を予備的に測定した、計算反応を円滑かつ均等に進めるために十分に反応速度が均一であるとは言えないことが分かった。

そこで、この問題を克服するため、速度論に焦点を当てて以下のような研究を行った。

- ・相補鎖間hybridization反応の進行を複数の温度、DNA濃度、配列においてリアルタイムに測定する
 - ・測定された緩和曲線をよく説明できる反応モデルを決定する
 - ・上記測定結果と配列情報の関係がどのようなものになるかを調べる
- その結果、二状態モデルでは十分に良いfittingができなかった。また、一本鎖から二本鎖へ直接に移移するパスと、中間に別の状態を経由するパスの2つの経路を含むモデルから導かれる数式を仮定すると、反応の緩和曲線がよくfittingできた。

本発表ではさらに精密な解析を行い、得られた緩和曲線をよく説明できるモデル及び、fitting結果と配列情報の関係について報告する。

A.Kitajima, M.Takinoue and A.Suyama : Kinetics analyze of DNA hybridization