3P025

Single Particle Analysis of Image Data Acquired by Zernike Phase Contrast Transmission Electron Microscope

○ Danev Radostin、永山 國昭 (岡崎統合バイオ)

We discuss the application of Zernike Phase Contrast Transmission Electron Microscope (ZPC-TEM) to acquisition of image data for single particle analysis of biological samples.

The ZPC-TEM utilizes a Zernike phase plate [1-3] which consists of a thin film with a small hole in the center. It is positioned at the back-focal plane of the objective lens. This phase plate introduces half pi phase shift to the scattered electrons leaving the central beam of unscattered electrons intact. The resulting images exhibit much higher overall contrast due to the presence of low spatial frequencies which are strongly attenuated in images acquired using a conventional TEM. The ZPC-TEM has overall “flat” frequency response compared to the “band-pass” filter characteristics of the conventional defocus phase contrast TEM.

Data and results of single particle analysis using ZPC-TEM images are presented. Theoretical and practical aspects in the application of ZPC-TEM are discussed.

1. K. Nagayama, J. Phys. Soc. Jpn., 68 (1999) 811.
2. R. Danev, K. Nagayama, Ultramicroscopy 88 (2001) 243.
3. R. Danev, K. Nagayama, J. Phys. Soc. Jpn., 70 (2001) 696.

R. Danev and K. Nagayama : Single Particle Analysis of Image Data Acquired by Zernike Phase Contrast Transmission Electron Microscope

3P027

Single particle analysis of non-selective cation-permeable channel TRPC3

○三尾 和弘¹、小椋 俊彦¹、原 雄二²、森 泰生²、佐藤 主税¹ (¹産総研・脳神経情報研究部門、²京大院工学研究科・合成生物)

TRPC3 plays important roles in neuronal differentiation and immune cell maturation by mediating the cationic current in response to phospholipase C activation, Ca²⁺ depletion, and diacylglycerol stimulation. Here, we purified the TRPC3 channel as a glycosylated tetramer and observed the structure using electron microscopy. Negatively stained specimens demonstrate homogeneous protein particles containing an internal cavity-like structure. These particle images were picked up by automated pick-up programs, aligned, and classified by the growing neural gas network (GNG) method. Similarly oriented projections were averaged to decrease the signal-to-noise (S/N) ratio. The averaged images progress from the top view to the side views, which are representative of their raw images. The top view confirmed the hypothesis of a four domain structure, and the side view demonstrates a large cytoplasmic domain with a capped structure at the bottom, which is near a predicted locus of ion release. The total image of the protein is a blunt edged trapezoid of 200 x 200 x 235 Å. This large dimension of TRPC3 is also supported by the Stokes radius (92 Å) obtained from gel filtration chromatography.

K.Mio, T.Ogura, Y.Hara, Y.Mori and C.Sato : Single particle analysis of non-selective cation-permeable channel TRPC3

3P026

単粒子解析法における電子線照射量の影響

○加藤 貴之¹、吉田 卓也²、大久保 忠恭²、小林 祐次³、難波 啓一^{1,4} (¹JST・ICROP・超分子ナノマシン、²阪大院・薬、³大薬大・創薬基盤、⁴阪大院・生命機能)

極低温電子顕微鏡像からの単粒子解析法による構造解析は、生体高分子の構造を知る上で有益な手段の一つに挙げられる。単粒子解析法はX線結晶構造解析やNMRによる構造解析に比べ分子量に対する制限が緩く、結晶を必要としない。また溶液中での構造を反映しているため、生体中で大きな構造変化を起こす複合体の構造解析に適している。しかしその反面、他の手法に比べ分解能は低く、特に対称性の低い分子では2次構造が確認できる程度である。これは電子顕微鏡像のS/Nが低いことが主因であり、像のS/Nの改善は高分解能での立体構造解析の可能性を示唆している。一般に単粒子解析のための電子顕微鏡像の観察は、照射損傷を考慮して試料温度93K、電子線照射量 $\sim 20 \text{ e}/\text{\AA}^2$ 程度で行われることが多い。しかし試料ステージを4.2 Kまで冷却すると照射損傷が93 K時に比べ約1/4に軽減されることが報告されているため、照射量を4倍増加しても一般的な観察時と同程度の損傷量であると考えられる。照射量の増加はS/Nの向上に直接つながるため、より高分解能での構造解析が期待される。そこで本研究では、単粒子解析における分解能の改善を目的に、Heステージを持つ極低温電子顕微鏡(JEM-3200FSC)を用いて、電子線照射量が分解能に及ぼす影響を評価した。観察用試料はリボソームを用いた。リボソームは分子量2.5 MDaを越える超分子複合体で、極低温電子顕微鏡観察において適度なコントラストが得られるが、対称性がないために高分解能での解析が困難である。また、すでに電子顕微鏡とX線での構造解析がなされているため、電子線照射による立体構造の損傷が評価しやすいという観点からも本研究に適していると考えられる。年会では電子分光法の利用による分解能の改善についても併せて報告する。

T. Kato, T. Yoshida, T. Ohkubo, Y. Kobayashi, K. Namba : The effect of electron dose in single particle image analysis

3P028

離散ウェーブレット変換を用いた一分子時系列における動力学的階層性の解析

○佐藤 祥子¹、馬場 昭典^{1,2}、小松崎 民樹^{1,2,3} (¹神戸大理、²JST/CREST、³分子研理論)

生体分子の運動は、これまで主に平衡統計力学の範囲で扱われてきたが、実際に、生体分子のような多自由度の系について、非平衡的な挙動がどの程度存在するかについては十分に確認されてこなかった。特に、生体分子の機能の発現に関わる、大規模な遅い構造変化において、それぞれの自由度がどの程度の時間、非平衡性を維持しているかを調べ、運動の周波数ごとに階層的な役割分担が行われているかどうかを確認する。今回我々は、46 ビーズ BLN モデルの折れ畳み運動について、主成分解析を用いて反応座標に対応する振幅の最も大きい運動を抽出し、その運動方向での速度の時系列について、離散ウェーブレット変換を用いた多重解像度解析を行い、それぞれの階層での速度が平衡に近いかどうかを、短時間分布がガウス分布からどれだけ離れているかによって評価した。これをさまざまな温度条件で、折れ畳みの起きている時系列と、ある状態に滞在している時系列について比較し、各階層での局所平衡への接近の速さと構造変化との関連について考察する。

S. Sato, A. Baba, T. Komatsuzaki : The dynamical hierarchy of single molecule time series using a discrete wavelet transform analysis