



FOREFRONT REVIEW

米倉研究室は、最先端のクライオ電子顕微鏡による解析とその技術開発を進めています。単粒子解析・電子線三次元結晶解析・電子線トモグラフィーの三つの測定法について研究開発を進め、生体試料から、薬剤候補化合物、有機半導体、有機材料分子まで様々な試料の立体構造を高い精度で解明します。



「クライオ電子顕微鏡」による先端計測 生体超分子や有機化合物の 詳細な立体構造に迫る

タンパク質や有機化合物は、複雑な「立体構造」を形成して機能や特性を発現します。米倉教授が追求するのは生体分子・有機化合物の複雑な「立体構造」が生み出す作動機構や自己組織化の機構。この米倉教授の追求を支える強力なツールが「クライオ電子顕微鏡」であり、その測定手法です。

米倉研究室では、クライオ電子顕微鏡をさらに先鋭化する測定法や制御・解析プログラムを独自に開発しました。代表的な手法である「単粒子解析」では、タンパク質の分子像の画像解析から原子配置に加え水素原子が解像でき、構造変化や揺らぎを捉えた構造ダイナミクス研究も可能となります。

「電子線三次元結晶解析」では、タンパク質に留まらずいろいろな分子の極微小な結晶から得られる回折パターンを測定・解析することで、試料の構造をより詳細に明らかにできます。さらに、試料を傾斜させて像を集める「電子線トモグラフィー」によって、細胞小器官や大きく不均一な複合体の立体構造を調べることができます。

このように、クライオ電子顕微鏡では、扱える試料の形態の制限は緩く、汎用性の高い測定法といえます。生体分子や細胞小器官の自然な動作環境下での構造が得られるため、生命科学、創薬・医療応用に大きく期待されてきました。米倉研究室では、さらに薬剤、材料等の有機化合物への応用も進めています。

これまでに、光化学系タンパク質複合体、膜タンパク質、核酸結合タンパク質、ウイルスなどの生体試料から、薬剤候補化合物、有機半導体、有機材料分子まで様々な試料の立体構造を高い空間分解能で解明してきました。このような複雑な構造を持つ多様な分子の構築・機能メカニズムに迫るため、AI測定や解析などの手法開発も進めています。さらに、放射光も利用し、それぞれの線源から特徴的な情報を引き出す戦略をとります。

多元物質科学研究所
有機・生命科学部
生物分子機能計測研究分野 教授

米倉 功治

YONEKURA, Koji

1969年東京都生まれ。東京工業大学 大学院バイオサイエンス研究科 博士課程修了。1997年松下電器国際研究所 リサーチアソシエイト、1997年JST ERATOプロトニックナノマシンプロジェクト 研究員、形態変換グループ グループリーダー、2002年大阪大学大学院生命機能研究科 助手、2004年カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) Keck fellow、2008年理化学研究所放射光科学総合研究センター 准主任研究員、主任研究員、2018年同 放射光科学研究センター 生体機構研究グループ グループディレクター、同次世代電子顕微鏡開発連携 ユニットユニットリーダー (兼任)、2020年より現職。所属団体/顕微鏡学会(プロジェクト推進委員)、生物物理学会

<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail---id-45587.html>

<http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/yonekura/>

試料を凍結し、低温 (cryogenic) のまま観察することでその名前がついた「クライオ電子顕微鏡」。近年急速に技術革新が進み、手法の開発に貢献した海外のバイオニアの研究者3人が2017年にノーベル化学賞を受賞しています。



独自のソフトウェア・運用技術開発により 世界最高精度の構造解析を実現

らせん状に重合するべん毛の解析で 世界が驚く4Åの分解能を達成

「生体分子などの立体構造の解明に、これまで試料の結晶化が必要でした。溶液の条件をいろいろ振り結晶化させるので、必ずしも生体内の自然な環境下の姿を反映しているわけではないのです」と米倉教授は試料調製の難しさを語ります。以前は、X線回折測定に必要とされる品質の高い結晶が得られないため研究が進まないことも多かったと言います。

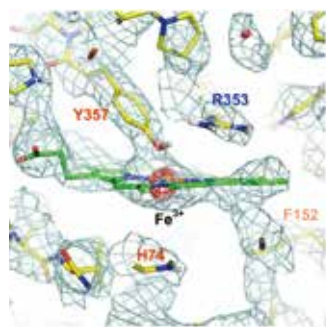
そこで注目されているのが「クライオ電子顕微鏡」による構造解析です。試料を凍結させ、液体窒素冷却下の低温 (cryogenic; クライオ) のまま電子顕微鏡

で観察します。「電子線は、X線に比べて数万から10万倍も強く試料に散乱されるため、氷中のタンパク質の一分子の像を観察できます」とクライオ電子顕微鏡の特徴を説明します。

「単粒子解析」は、得られた二次元の分子像からコンピュータでその立体構造を再構成する技術で、米倉教授の研究グループでは、様々なタンパク質の立体構造を明らかにしてきました。

「タンパク質の分子像の解析による初期の成果が、2003年に発表した細菌のべん毛繊維の構造解明でした。この解析のため、学生時代から開発を進めたらせん再構成法という手法を高度化し適用しま

した。細菌は、べん毛を高速回転させて前進し、瞬時に方向転換もします。コンフォメーションの異なる2つの構造の違いによって引き起こされる形態変換機構に



2003年、クライオ電子顕微鏡の「らせん再構成」により、べん毛繊維の形態変換機構の分子メカニズムを明らかにしました。米倉教授は30年近くクライオ電子顕微鏡を用いて研究開発を進めています。図は、カタラーゼの電子線三次元結晶構造解析。活性部位の中央にあるヘムの鉄の荷電状態に関する情報 (赤いネット) が得られた。(Yonekura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2015).

関して、共同研究者の眞木さおりさんと共に研究を進め、その分子メカニズムを明らかにしました」。

現在のクライオ電子顕微鏡の普及を促進させた電子直接検出型のカメラの登場前にもかかわらず、4Å (1Åは100億分の1メートル) という当時の基準で、桁違いに高い分解能で原子の配置を決定しました。その結果は、世界中に大きな反響をもたらし、米倉教授は眞木研究員と共にこの業績などにより2009年にエルンスト・ルスカ賞を受賞しています。

「単粒子解析」に加えて研究開発を進めるのが、「電子線三次元結晶構造解析」で、微小で薄い結晶から電子回折を測定します。「同じ電子でも電荷を持ったものと中性のもので散乱のされ方が異なります。この特徴を活かし、タンパク質の活性部位にある金属原子の酸化状態や、アミノ酸側鎖に水素が結合しているかの判別も可能になるという成果も出ています」。

干渉性の高い電子線を採用し 世界最高の分解能を実現

「このように大きな可能性を持つクライオ電子顕微鏡ですが、その専用装置は高価な上、海外の一家に独占されている状態でした。2018年、日本電子株式会社の新しいクライオ電子顕微鏡CRYOARM 300

山登りを楽しんでいました

関東、関西、米サンフランシスコなどを生活の拠点としてきました。それぞれの場所で山に登っています。学生の頃は北アルプス、東北地方では飯豊連峰を縦走したことがあります。西日本には高い山は少ないのですが、大山、氷ノ山、雪彦山、六甲山、後山、剣山などに登りました。アメリカではヨセミテ、グランドキャニオン、ザイオン、クレータレーク、イエローストーン、シャスタ山、セドナなどを巡りました。最近、猫を飼いはじめたので山に行けません。いつか剣岳、槍ヶ岳にも登頂したいですが、険しくとても危険な岩場に躊躇しています。



西穂高独標

MY FAVORITE

TERM INFORMATION

クライオ電子顕微鏡

タンパク質などの生体分子を、水溶液中の生理的な環境に近い状態で観察し、構造解析を可能にするために開発された電子顕微鏡。試料を含む水溶液を急速凍結し、アモルファス(非晶質、ガラス状)な薄い水中に分子を閉じ込め、液体窒素(-196℃以下)を使った冷却下で観察する。冷却することで電子線の照射による試料の損傷を大幅に低減できる。液体窒素冷却下もしくはそれ以下の温度での電子顕微鏡観察や、その装置自体のこともクライオ電子顕微鏡と称する。

回折

電子線やX線が結晶性の試料に散乱され、干渉して回折を示す現象のこと。分子の並びを反映した規則的な回折点の並びなどの特徴的なパターンが観測される。

干渉性の高い電子線

エネルギーの分布の小さな電子線で、高い空間分解能まで非常に良く試料の情報を保持し、高分解能構造解析に威力を発揮する。

電子直接検出型カメラ

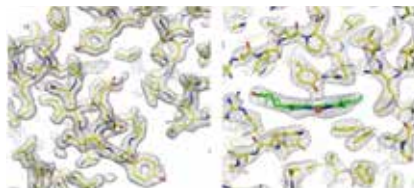
電子顕微鏡像の記録には、従来、フィルムや、放射線をあてると発光するシンチレーター層で電子線を受光するタイプの検出器が用いられてきた。2013年頃より、シンチレーターが無く素子で直接電子線を受ける、いわゆる電子直接検出型の導入が始まった。従来に比べ、隣接する画素への信号の染み出しが少なく高精細な画像が得られる。同カメラにより、クライオ電子顕微鏡像から得られる構造の分解能が格段に改善される結果に繋がった。

yoneoLocr

AI技術であるディープラーニングを利用し、試料形状やデータの質を自動判定し、電子顕微鏡を制御しながら、単粒子解析と微小結晶からの電子回折データの自動測定を実現するソフトウェア。これを用いることで、撮影の失敗がなくなり、人間の監視を必要とせず、高品質なデータの自動測定が実現できる。実時間での物体認識に定評のあるソフトウェアYOLO(You Only Look Once)をベースに開発。You Only Navigate Em (Electron microscope) Once to LOCcate in Real timeからyoneoLocrと名付けられた。
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/09/press20210917-01-EM.html>



開発したシステムParallEM (左)とそれを用いて測定した機能性材料の回折パターン(右)
(Takaba et al., J. Struct. Biol., 2020).



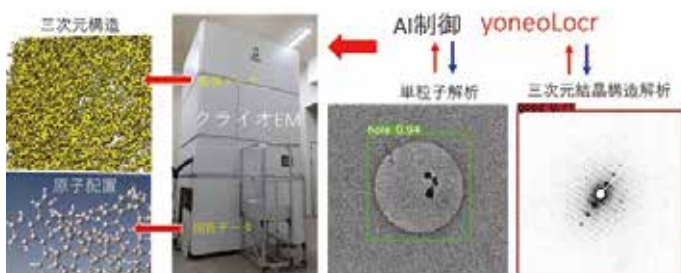
単粒子解析(左)と電子線三次元結晶構造解析(右)により得られたタンパク質の構造
(Yonekura et al., J. Structl. Biol., 2019;
Hamaguchi et al., J. Structl. Biol., 2019).

を基に、干渉性が格段に優れた電子線を発生するなどの特徴を生かし、『単粒子解析』と『電子線三次元結晶構造解析』の両方が最適な性能を発揮できるようにシステムを構築しました」と研究開発の大きな転機を生み出した当時の状況を語る米倉教授。

新しいクライオ電子顕微鏡の最大の特徴である高干渉性の電子ビームにより、従来装置に比べて、高い空間分解能で、非常に良いS/N比(信号対雑音比)を得ることができました。

「しかし、この方式の電子銃は時間とともに電子ビームが減衰するという欠点も持ちます。そこで、装置を効率良く運用するため『ParallEM』と名付けたソフトウェアを開発し、両手法による解析で世界最高品質のデータの取得に成功しました」。

生体内で鉄を貯蔵する役割を持つヒトのアポフェリチンというタンパク質の構造は、1.1Å台の非常に高い分解能で明らかになりました。タンパク質に含まれる多くの水素原子も解像できます。さらに、従来に比べて少ない数の分子像から、構造が未知のウイルスの構造決定にも成功しました。



開発したAIソフトウェア「yoneoLocr」によるクライオ電子顕微鏡のデータ測定制御の仕組み(Yonekura et al., Commun. Biol., 2021).

これらの研究成果により国産機への注目が集まり、同型機の普及が進むと共に、創薬研究への本格的な応用も始まりました。

AIによる自動測定システムの開発

進化を続けるクライオ電子顕微鏡の解析技術ですが、多数のデータを取得することが必要です。電子線をあてると試料は損傷を受けるため、一つの試料に付き一回しか撮影できません。撮影に失敗することも多く、解決すべき課題として残されていました。

「対象となる分子が含まれる視野に位置を合わせ、撮影を繰り返すのですが、撮影に数日かかることもあるので、AIによる制御を考えました。データ測定をAIで制御するソフトウェア『yoneoLocr』を開発し、人が操作する時間を短縮するとともに、撮影の失敗も大幅に減らすことができました」と米倉教授はAIによるクライオ電子顕微鏡の新たな展開を語ります。

そのために、分子の像撮影と電子回折パターン測定に必要な画像データを、ディープラーニングで機械学習させました。この学習結果に基づいて撮影を制御する一連のシステムを開発し、完全自動での測定が可能になりました。

AIによる制御システムの開発の成果について米倉教授は、「これまでの電子顕微鏡の操作には、熟練と長い作業時間が

必要でしたが、AIの活用によって、この敷居はかなり低くなりました。生命科学の分野だけでなく、材料の開発などにも役立てて行きたいと思います」と話します。

クライオ電子顕微鏡の発展に伴い、その重要性は増していくと予想されています。生命科学、医療、創薬、工学、材料科学などの分野への応用が見込まれ、広い分野の研究開発に不可欠なツールになるものと期待されます。

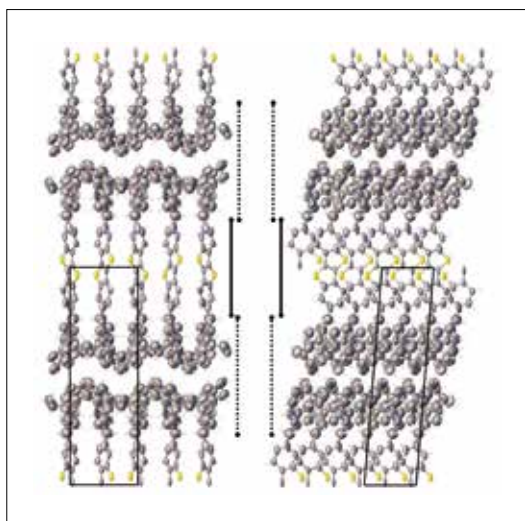


トロンクスの展開に向けた新たな基盤になると考えられます。

クライオ電子顕微鏡が切り拓く世界 材料科学への応用も

秩序と乱れが共存する構造から より高性能な有機半導体へ

様々な試料の立体構造の解明に役立つクライオ電子顕微鏡。その応用例の一つに、電子線三次元結晶構造解析によって新たに捉えることに成功したものがああります。それは、新しい有機半導体の分子配列構造の解明です。



クライオ電子顕微鏡を用いた電子線三次元結晶構造解析により捉えた有機半導体の層状結晶構造。秩序と乱れが層状に繰り返すこれまで知られていなかった構造が観察された。(Inoue et al., Chem. Mater., 2022).

有機半導体は、シリコンなどの既存の無機半導体とは違い、軽い・柔らかい・塗れるという特長を持っています。この特長により電子デバイスの軽量化・ウェアラブル化や製造の省資源化が可能で、応用が期待されています。半導体として機能するためには分子の配列が重要で、原子配置を詳細に調べることが必要です。

これらの分子は薄片状の微小結晶を形成する特性を持っており、X線回折が適用できないものも多くあります。

「私たちの研究グループは、東大の長谷川研究室で設計・合成されるいろいろな有機半導体分子の構造解析を行いました。そして、得られた試料の内部で分子配列の秩序と乱れが層状に繰り返す様子を、クライオ電子顕微鏡の三次元結晶構造解析により初めて捉えることができました」。

このような構造はこれまでに知られておらず、ソフトマターエレク

藻類の光合成の仕組み解明により カーボンニュートラル実現へ

クライオ電子顕微鏡による複雑なタンパク質の構造解明は、さらなる展開を拓いています。藻類による光合成の仕組みの解明もその一つです。

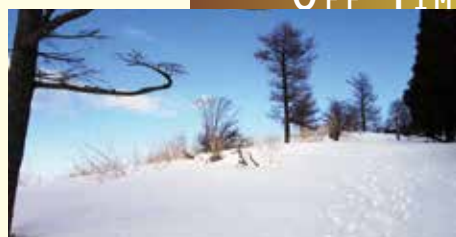
「シアノバクテリアや紅藻、灰色藻といった藻類は、光捕集タンパク質複合体『フィコビリソーム』を用いて、太陽光エネルギーを高効率に吸収し、生命活動に利用しています。大きなポイントの一つは単一もしくは少数の発色団しかなくても、様々なスペクトルを吸収し、光化学系タンパク質へと光エネルギーを伝達できることです。この特異なシステムを明らかにするために生化学・分光学解析が行われてきましたが、フィコビリソームの分子量は非常に巨大であるため、これまでその立体構造解析には手が届きませんでした」。

これに対し米倉教授の研究グループは、クライオ電子顕微鏡を用いた解析に取り組みました。独自ソフトウェアを作製する等、撮影を高度に制御する技術開発などから、多くの高品質な画像を取得し、その

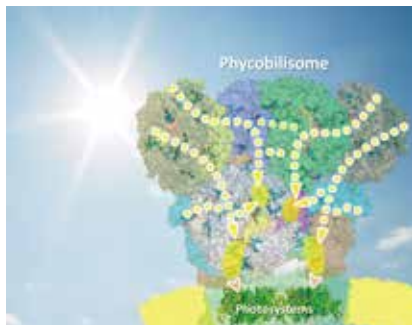
プログラミング、テレビなど

中学生の頃からPCで始めたプログラミングは、クライオ電子顕微鏡の画像処理に役立ちました。当時は自分で一から作るしかなく、いろいろ作りました。最近は時間が取れず作れませんが、特に忙しい時は今でも無性にプログラムが書きたくなります。読書、釣りなども好きなのですが時間が取れず、週末にNHKで放送しているアニメが唯一の娯楽となってしまいました。『進撃の巨人』、『キングダム』など内容がとても素晴らしく、次のシーズンが楽しみです。民放深夜の『ゴールデンカムイ』は、日露戦争後すぐの話で今の時代だから考えさせられ、興味深く視聴しています。勿論、科学番組も好きです。『笑わない数学』はとても面白いシリーズでした。

OFF TIME



『ゴールデンカムイ』の舞台、北海道、樺太を彷彿とさせる冬の日名倉山。学生時代は雪山には行きませんでした。良さが分かってきました。遭難しかけたが…



クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって、藻類のフィコビリソームの三次元構造の解明に成功。光エネルギーを光化学系タンパク質へと効率よく伝達する仕組みが明らかになりました。(Kawakami, Hamaguchi et al., Nat. Commun., 2022)。

三次元構造の再構成に成功しました。

「川上さん、濱口さんと共に研究を進めた結果、各色素分子の周辺環境の詳細が明らかとなりました。複合体内の環境の違いによって発色団の吸収波長が変化し、一方向へ高速に光エネルギーを伝達するメカニズムを明らかにできました」。

この研究で得られた知見を、人工光合成などに応用することも考えられます。他にも光合成に関係する膜タンパク質複合体の構造がいろいろ明らかにされており、その中には反応中心の個々の原子が解像されるような高い分解能も得られています。カーボンニュートラルの実現へと発展することも期待されます。

ナノテラスとの相補利用で 広がる可能性に期待

可能性に満ちた「クライオ電子顕微鏡」。さらに展開を見せるのが、現在東北大学青葉山新キャンパスに建設中の次世代放射光施設「ナノテラス」との相補利用です。

「極めて明るい放射光(X線)を発生させ、物質や生物を観察する「巨大な顕微

鏡」です。放射光は透過力が高く、大きな試料を扱うことができます。一方、電子線は、試料との強い相互作用のため、薄い試料しか扱うことができません。両者で散乱される実態も異なるため得られる情報も異なり、相補利用が威力を発揮すると考えます。実現に向けた研究を眞木さん、高場さんと進めています」と可能性を語る米倉教授。

東北大学多元物質科学研究所では、「クライオ電子顕微鏡」を新規に大学として導入し、2022年6月から学内外に共用を開始しました。今回新たに導入した顕微鏡は、AI制御でデータを自動測定できる「yoneoLocr」を実装した装置であり、AIでデータ測定を行える世界で唯一のシステム構成です。

「この装置は、タンパク質のみならず、有機材料への応用を目指した生命系・材料系二刀流の装置であり、世界初の試みです。これにより、東北大学では硬い材料から柔らかい材料までを測定・可視化し、学術研究に限らず産業界での研究開発にも利用し、さまざまな成果を生み出すものと期待しています」。



これまで見えなかった世界を可視化するクライオ電子顕微鏡。材料研究でも大きな成果が得られる可能性があります。

TERM INFORMATION

ウェアラブル化

“Wearable”で、「着用できる」、「身に着けられる」の意。やわらかい素子の特性を活かすことで、常に身に付けて使用する等、用途が広がると考えられている。

光捕集タンパク質複合体

光合成などにエネルギーを供給するため、光エネルギーを捕集するアンテナの役割を果たすタンパク質。

発色団

分子中で、色をつける原因となる部分。