

# 国産クライオ電子顕微鏡の最近の進歩と将来の展望について



企業レポート

牧野 文信\*

Recent Progress and Future Prospects of Made-in-Japan Cryo-Electron Microscopy

Key Words : Cryo-Electron Microscopy, Single particle analysis, JEOL

## はじめに

原始的な生物である細菌・酵母などの微生物から植物、昆虫、動物、ヒトに至るまで、すべての生命活動はタンパク質や核酸などの生体高分子の立体構造と相互作用による複雑なネットワークの活動により維持されている。生命科学とは複雑な生体メカニズムを生体高分子の構造・動態・相互作用に基づいて解明することである。そのためには数多くの生体分子やそれらが形成する様々な複合体の立体構造を可視化することが必須である。

X線結晶構造解析法と核磁気共鳴分光法 (NMR) は構造解析手法として重要な役割を果たしてきた。これらの手法により解析された生体分子の立体構造情報は分子モデルの原子座標としてデータベース Protein Data Bank (PDB) に年間1万数千件程度登録され医学・生命科学・創薬研究に役立っている。ただ、X線結晶構造解析法には試料の結晶化が必須であり、NMRでは解析可能な試料の分子量上限が50 kDa程度であることが大きな制約である。こういった制限を取り払うことで一気に構造解析技術のメインストリームになったのがクライオ電子顕微鏡法 (クライオ電顕法) である。

2013年に実用化された電子を直接検出しカウンティング可能なCMOSベースのカメラによる動画撮影と、同時期に開発された最尤法およびベイズの

定理を使った画像処理法の登場により到達分解能が劇的に向上し、原子分解能での構造解析が可能になった。結晶化の難しい膜タンパク質や様々な立体構造を取り得る分子複合体も解析できるようになった。こうして構造生物分野に革新をもたらした結果、2017年にはこの分野に大きく貢献したパイオニア3名にノーベル賞が授与された。

## 日本電子製クライオ電顕 CRYO ARM™ について

クライオ電顕法では水溶液試料の急速凍結により非晶質氷薄膜に試料分子を包埋し、透過型電子顕微鏡内で液体窒素により100K以下に冷やして観察する。クライオ電顕像は様々な方位を向いた試料分子の3次元構造を投影した2次元像であるため、立体構造を再構成するためには様々な向きで広く投影方向をカバーする必要がある。しかも生体分子は電子線照射ダメージに弱く低温でも構造に大きな損傷を与えず照射できる電子線量は $20\text{--}30\text{ e}^-/\text{\AA}^2$ が限界で、分子と非晶質氷の密度差も小さいため、得られた画像はSN比が極めて低く、高分解能構造情報を得るためには数万から数十万の分子像を分類して平均化する必要がある。よって高分解能構造解析には高品質で高解像度のクライオ電顕像を高速かつ効率的に撮影できるクライオ電顕とカメラが必須である。大阪大学生命機能研究科日本電子YOKOGUSHI協働研究所 (難波研究室) の難波啓一教授 (現・特任教授) と加藤貴之助教 (現・大阪大学蛋白質研究所教授) は2010年、日本電子とともに材料研究用原子分解能透過型電顕JEM-ARM200Fをベースに、撮影自動化と高分解能化を目指してクライオ電顕CRYO ARM™の開発を開始した。その結果、日本電子は2017年にCRYO ARM™シリーズをリリースし、2010年ごろから大きく広がり一社独占が続いていたクライオ電顕市場に本格参入した。



\* Fumiaki MAKINO

1984年5月生まれ  
大阪大学大学院 生命機能研究科  
生命機能専攻 博士後期課程  
(2012年)

現在、日本電子(株) 技術開発  
大阪大学大学院 生命機能研究科  
招へい准教授 工学博士

TEL : 06-6879-4625

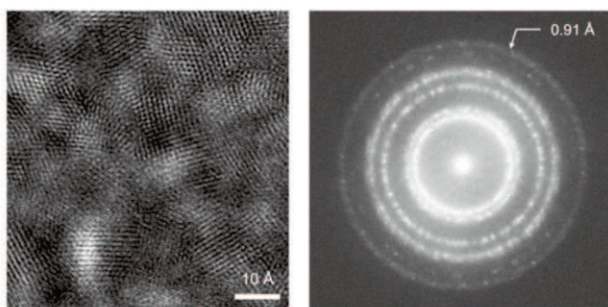
E-mail : fumakino@jeol.co.jp

makino.fumiaki.hfb@osaka-u.ac.jp



## Cold FEG による高解像度化

電顕像の解像度を決める重要な因子の一つは電子線の干渉性である。干渉性が高いほど解像度は高い。干渉性を上げるには電子線のエネルギー幅を小さくする必要がある。日本電子が CRYO ARM™ に標準搭載する Cold FEG は Thermal FEG に比べてエネルギー幅が約 1/2 の 0.35-0.4 eV である。Thermal FEG 搭載 300 kV クライオ電顕による Pt/Ir 像ではそのフーリエ像で観察される Thon リングは 1.8 Å 程度で消失するが、Cold FEG を搭載した CRYO ARM™ 300 ではこれが 1.1 Å まで伸びた。そして第 2 世代の CRYO ARM™ 300 II ではこれが 0.9 Å まで伸びた (図 1)。この高分解能撮影条件を満たせばタンパク質でも 1.0 Å を超える解析が可能であることを意味する。



CryoTEM	CRYO ARM 300 II	Magnification (pix size)	300k (0.17 Å/pix)
Acceleration voltage	300 kV	Exposure time	12 sec
Sample	Pt/Ir	Dose (total)	8 e-/pix/s (~6000 e/Å²)
Camera	Gatan K3	Defocus	-1000 nm

図 1 Pt/Ir の Thon リングによる CRYO ARM™ 300 II の Information limit の評価。左は Pt/Ir の倍率 300k でのクライオ電顕像。右は 0.91 Å まで伸びる Thon リングを示すフーリエ変換像。下部の表は撮影に使用したパラメータ。

## データ収集の高速化

クライオ電顕法のもう一つの重要な要素はデータ収集の高速化である。高分解能の構造解析に必要な数万から数十万の分子像の収集のため数千枚のクライオ電顕像撮影が必要であるからである。2000 年代には試料グリッドを自動装填可能な装置や試料ステージをコンピュータ制御可能な装置が登場し、2010 年代前半には自動撮影の技術開発が進んだ。凍結試料グリッド上のカーボン薄膜上にはミクロンレベルのホールが規則配列し、各ホールには厚さ数十ナノメートルの非晶質氷薄膜に包埋された試料分子が存在する。2010 年代前半には撮影のたびに試

料ステージを移動させ、移動ドリフトが収まるまで数十秒間待ってからようやく一枚撮影するというプロセスであったため、2013 年の電子直接検出型のカメラ登場後でも 1 日 1,000-1,500 枚程度が限界であった。しかし、2010 年代後半からビーム傾斜とイメージシフトを用いたマルチスポット撮影が標準となり、試料ステージを移動させることなく 3 × 3 または 5 × 5 といった複数ホールを撮影することが可能になった。倍率が高い場合は各ホール内のマルチショット撮影も併用することでさらなる高速化が実現した。その結果、私達日本電子のクライオ電顕 CRYO ARM™ でも高分解能情報を犠牲にすることなく撮影速度の著しい向上を実現し、2019 年には 1 日 7,000 枚 (250 枚/時)、2020 年には 23,000 枚 (1,000 枚/時)、2021 年には 30,000 枚/日 (1,300 枚/時) の撮影が可能になった [1] (図 2)。

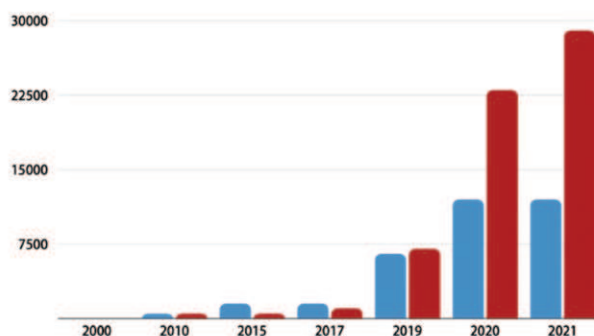


図 2 クライオ電顕法のデータ収集スループット向上の歴史。棒グラフは下部に示した各記録更新年において 1 日に撮影できる電顕像の最大数を示している。シアン色はライバル社による記録。赤色は当研究室の日本電子製クライオ電顕 CRYO ARM™ 300 による記録。

## 日本電子製クライオ電顕 CRYO ARM™ の成果

CRYO ARM™ は高干渉性の Cold FEG と撮影速度の高速化に加えて、非弾性散乱電子によるノイズをカットできる Ω 型インカラムエネルギーフィルターによる SN 比の向上と、自動液体窒素供給システムを備えたコンピュータ制御冷却試料ステージと自動クライオグリッド装填装置を組み合わせることで、高解像度データの収集効率が高く使い勝手に優れたクライオ電顕となった。2020 年には最新の電子直接検出型 Gatan K3 カメラを搭載し日本電子製の新型高精度チラーを装備した改良版 CRYO ARM™ 300 が大阪大学に設置され、自動撮影ソフト SerialEM



をベースに日本電子提供の電顕システム制御用 python ライブラリー PyJEM を活用して、マルチホール・マルチショット撮影により撮影速度の向上を図った結果、上記のとおり最速 30,000 枚/日という劇的な高速化を実現した (図 2)。

一般的なタンパク質分子の試料では高分解能構造解析に数千枚の電顕像が必要で、以前はデータ収集に数日かかっていたが、イメージシフトによる高速撮影機能により 1 日で複数データセットの取得が可能となり、製薬企業が熱望する構造ベースの創薬化合物スクリーニングが効率的に実現可能になった。我々の細菌べん毛回転子リングの構造論文の発表においても複数の構造解析が迅速に実施できたことが重要であった [2]。このような高速データ収集においても、ビーム傾斜によるコマ収差を最小限に抑えて高分解能情報を保持することで原子分解能の構造解析が可能になった。例えば、アポフェリチンのテストデータ収集・解析では 15 時間で撮影した 7,500 枚の画像から 1.29 Å 分解能を達成した [3]。分解能 1.2 Å 台の達成に要する画像数は一般にこの半分以下であるため、原子分解能構造解析のデータ収集が数時間以内に完了することを意味する [3-5] (図 3)。

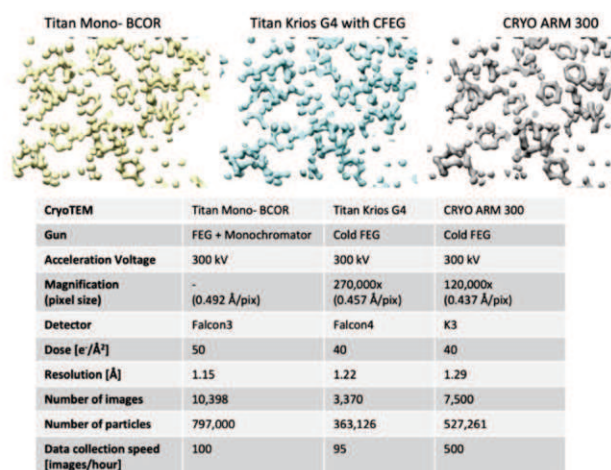


図 3 原子分解能を達成した 3 つのクライオ電顕構造解析の比較。上段はアポフェリチンの 3 次元密度マップの一部。3 つのクライオ電顕の名称とデータ収集条件を下段に示す。

## 次なる課題

次の課題は完全自動撮影による人手不足の解消や試料グリッド凍結条件探索に要する時間と労力の軽減である。我々は現在、SerialEM と PyJEM、そし

て AI を活用したロバストな完全自動撮影の実現に挑戦すると同時に凍結試料グリッド作成法の改良にも挑戦している。グリッド上に搭載した CVD グラフェン表面を光活性化  $\text{ClO}_2\cdot$  を用いて酸化し、さらにエピクロロヒドリンによる化学修飾によりエポキシ化してタンパク質を効率的に吸着させる、グラフェングリッド (EG-grid™) を開発した [3]。GroEL、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、β ガラクトシダーゼ、アポフェリチン、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質ナノボディ複合体など、数多くの試料の構造解析に応用したところ、いずれも粒子密度が高く配向の偏りも小さく、各々数個のグリッド作製で 2 Å 分解能を超える構造解析が可能であった [3]。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質ナノボディ複合体ではタンパク質濃度 0.1 mg/ml の試料水溶液でも効率的な電顕像撮影が可能で、3.03 Å 分解能の構造からウイルス中和活性の高いナノボディが認識するエピトープを同定した [6]。EG-grid™ の量産化とロバストな完全自動撮影を実現させれば、クライオ電顕構造解析を一層加速させる強力なツールを日本から発信できる。

## おわりに

私自身は 2019 年に日本電子に就職して以来、難波研究室においてアカデミアと企業を繋ぐ役割を果たしてきた。アカデミアが望むものを必ずしも企業が提供しているわけではないため、そのミッシングリンクを埋めるのが私の重要な役割である。その成果は想定以上のものが得られたと自負している。それはハードウェア的に強い日本電子の機器に適切なワークフローと適切なソフトウェアをつなぎ、そのポテンシャルを十二分に引き出す仕事であった。クライオ電顕法はまだ発展途上の技術である。その秘めたポテンシャルを最大限に発揮させる技術開発は人類社会の将来にとって最も重要な課題の一つと信じ、業界全体の底上げになればと切に願う。

## 参考文献

- 1) Namba K and Makino F, (2022) Recent progress and future perspective of electron cryomicroscopy for structural life sciences, *Microscopy*, Volume 71, Pages i3-i14,
- 2) Kawamoto A, *et al.*, (2021) Native flagellar MS

- ring is formed by 34 subunits with 23-fold and 11-fold subsymmetries. *Nat. Commun.* **12**, 4223.
- 3) Fujita, J., Makino, F., Asahara, H. *et al.* (2023) Epoxidized graphene grid for highly efficient high-resolution cryoEM structural analysis. *Sci Rep* **13**, 2279.
  - 4) Nakane T, *et al.*, (2020) Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature* **587**, 152-156.
  - 5) Yip K M, *et al.*, (2020) Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature* **587**, 157-161.
  - 6) Maeda, R., Fujita, J., Konishi, Y. *et al.* (2022) A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron. *Commun Biol* **5**, 669.

