

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業
(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfers.

研究開発課題名： (日本語) 生細胞ナノ空間構造解析用 Cryo-FLM-in lens-S(T)EM の開発
(英語) Development of Cryo-FLM-in lens-S(T)EM for the analysis of nano-structure in living cells.

研究開発担当者 (日本語) 名古屋大学 理学研究科 研究員 臼倉治郎

所属 役職 氏名： (英語) Nagoya University Researcher Jiro Usukura

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) Cryo-in lens S(T)EM の製品化に向けた要素技術開発と作製

開発課題名： (英語) Development of elemental technology for manufacturing Cryo-in lens S(T)EM.

研究開発分担者 (日本語) (株) 日立ハイテクノロジーズ 部長 多持 隆一郎

所属 役職 氏名： (英語) Hitachi High-Technologies Corporation General Manager Ryuichiro Tamochi

分担研究 (日本語) 酵母など菌類を用いた Cryo-S(T)EM の応用研究

開発課題名： (英語) Applied study of Cryo-S(T)EM using fungi including the yeast.

研究開発分担者 (日本語) 日本女子大学 客員研究員 大隅正子

所属 役職 氏名： (英語) Japan Women's University Guest Researcher Masako Osumi

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

チームリーダー臼倉治郎(名古屋大学名誉教授・研究員)は名古屋大学グループの研究担当者である成田哲博准教授、松本友治研究員、臼倉英治研究員、およびサブリーダー多持隆一郎(日立ハイテクノロジーズ・部長)、研究分担者大隅正子(日本女子大学・客員研究員)らとともに、簡便なSTEM、SEM同時計測可能なクライオ電子顕微鏡開発のために、以下に述べる要素技術開発をおこない準プロトタイプ機を完成させた。

平成 28 年度に行った要素技術開発と応用研究

1. クライオトランスファーホルダー

クライオトランスファーホルダーの開発は開発計画の中で最も重要な要素技術である。アームの 2 / 3 ほどを二重パイプ化し、冷却速度を向上させた。また、世界初のスラッシュ化窒素を利用することで、 -190°C の冷却効果を得られた。また、熱ドリフトを軽減するために試料ステージを 4 点保持から 3 点保持へと改めた。

2. アンチコンタミネーショントラップ

これまでの開発でスラッシュ化窒素を利用することで -200°C まで冷却することに成功した。このため 28 年度には抜本的開発は行わないで、先端部の形状を改良し、トラップ効果を高めた。

3. クライオステーション

クライオステーションは生物試料をクライオトランスファーにセットするための周辺装置であり、プロジェクト採択時点では開発計画に入れるのを失念していた。しかし、これがないと、凍結試料をクライオトランスファーホルダーに装着することが出来ないので、急遽開発した。予算の都合上、多くの試作は出来ないが、2 年前の試作 1 号機の使い勝手を改良した第 2 号機を開発する。

4. 応用研究

STEM では対物レンズが直接結像に関与しないため、contrast transfer function (CTF) の補正をしないで、像の平均化が可能である。本開発クライオ電顕では透過像はすべて STEM 光学系で得られるため、単粒子解析など計算科学による構造解析には最適であることが判明した。実際、アクチンフィラメントの分子構造解析において、通常の 100KV 透過型電子顕微鏡写真 100 枚以上の写真から求められた分子構造より、さらに高分解能の分子構造をわずか 10 枚程度の画像から導き出すことに成功した。分子構造解析が少数でおこなえると言うことは、分離精製タンパク質ではなく、細胞内散在する少数の標的分子の構造解析ができることを意味しており、細胞を標的とするクライオ電顕開発の方向性が正しかったことを物語っている。

一方、本プロジェクトにおいて開発した細胞膜剥離装置は細胞膜の裏打ち構造の観察を可能にする。この長所を利用し、インフルエンザウイルス (IAV) 感染細胞内において、増殖した IAV の RNP がどのように細胞膜の裏側に集積し、如何にウイルス粒子として脱出するかを明らかにした。さらに詳細に調べることにより、平成 29 年中には論文化できる見通しとなった。

Team leader, Jiro Usukura (professor emeritus at Nagoya University, researcher) together with Drs Akihiro Narita, Tomoharu Matsumoto, Eiji Usukura in Nagoya University group, and by cooperation of sub-leader Ryuichiro Tamochi (Hitachi Hi-Technologies General manager) and Masako Osumi (Japan Women's University, guest researcher) developed several elemental technologies as follows for development of convenient cryo-electron microscope that is enable to observe images of STEM and SEM simultaneously.

Application and elemental technologies developed in 2016

1. Cryo-transfer holder

The development of Cryo-transfer holder is the most important elemental technology in this research program. 2/3 of arm in cryo-transfer holder consists of double pipe for introducing liquid nitrogen close to specimen stage, and thereby improved a cooling rate. Furthermore, specimen

temperature arrived at -190°C by using slash liquid nitrogen. Also, we changed holding mechanism of specimen stage from four points to three points to reduce thermal drift.

2. Anti-contamination trap

In previous research, we succeeded already in cooling off the tip of anti-contamination trap to -200°C by using slash nitrogen. Therefore, further development was not performed on cooling system in 2016. Only the tip shape of anti-contamination trap surrounding the specimen area was improved for enhancing a trap effect.

3. Cryo-station

Cryo-station is a peripheral device but necessary to set a frozen sample to cryo-transfer holder, which was not organized in this project at the time of the project adoption. However, we developed in a hurry because frozen samples were not assembled on to the cryo-transfer holder without the station. In this year, improved version of cryo-station that was raised convenience against previous version was developed.

4. An applied study

It is possible to average the images without correcting contrast transfer function (CTF) because an object lens is not involved directly in image formation in STEM optics. Since cryo-electron microscope developed in this project employed STEM optics for transmission imaging, it should be suitable for structure analysis by the calculation science including the single particle analysis. Actually, the molecular structure of actin filaments averaged from 100 images taken in developing microscope was more high-resolution comparing to the structure averaged from 1000 photographs taken in conventional 100KV transmission electron microscope. Molecular structural analysis is able to obtain in small number of samples in STEM optics. It suggests that single particle analysis is applicable to the molecules in situ in cells without isolation and purification, and also our project developing cryo-electron microscope with STEM optics targeting molecular structure of the cell is quite to the point. On the other hand, unroofing device which we developed in this project enables observation of the undercoat of the cell membrane. Using this advantage, we revealed how RNPs of influenza A virus (IAV) multiplied were accumulated on the cytoplasmic side of the cell membrane in IAV infected cells, and how they are budded off as virus particles. We will publish these finding as an article after examining further in detail in 2017.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 2 件)

1. Makihara M, Watanabe T, Usukura E, Kaibuchi K, Narita A, Tanaka N, Usukura J
A new approach for the direct visualization of the membrane cytoskeleton in cryo-electron microscopy: a comparative study with freeze-etching electron microscopy. *Microscopy* 2016 65 488-495
2. Usukura E, Narita A, Yagi A, Ito S, Usukura J

An unroofing method to observe the cytoskeleton directly at molecular resolution using atomic force microscopy. Sci. Rep. 2016 6: 27472

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. クライオトランスファーシステムの開発 ポスター
長久保康平、丹波裕介、波多野治彦、水尾考志、生瀬義久、砂押毅志、臼倉治郎
日本顕微鏡学会 2016/6/15 国内
2. A new approach for the direct visualization of the membrane cytoskeleton in cryo-electron microscopy: a comparative study with freeze-etching electron microscopy. Poster
Usukura J, Makihara M, Watanabe T, Usukura E, Kaibuchi K, Narita A, Tanaka N
Microscopy & Microanalysis 2016 2016/7/26 国外
3. A new approach for the direct visualization of the membrane cytoskeleton in cryo-electron microscopy: a comparative study with freeze-etching electron microscopy. Poster
Usukura J, Makihara M, Watanabe T, Usukura E, Kaibuchi K, Narita A, Tanaka N
EMBO meeting 2016 2016/9/11 国外
4. High resolution imaging of sub-cellular structures: the cytoskeleton as you have never seen it before. Platform, Usukura J, Monday lecture, Helsinki University
2016/10/31 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 生細胞ナノ空間構造解析用 Cryo-FLM-in lens-S(T)EM の開発、臼倉治郎、BioJapan 2016,
2016/10/12、国内

(4) 特許出願