

単粒子解析のための TEM データ収集の自動化

Automated TEM Data Collection for Single Particle Analysis

中 村 奈津子

Natsuko Nakamura

日本電子株式会社

要 旨 透過型電子顕微鏡を用いた構造生物学の研究手法の一つに単粒子解析が挙げられる。単粒子解析には試料の結晶化が不要であるという大きな利点があると同時に、膨大なデータ収集が要求されるという課題がある。一般にこの分野においては、支持膜の孔に試料液の薄膜を形成して凍結し回折 (DIFF) モードでのシャドウイメージによって試料探索を行うが、その結果信号ノイズ比が低く、また糸巻きひずみやたる型ひずみを生じるという像の特性を生じ、そのことが自動化を困難にしている。これらの課題を克服して開発に成功した自動データ収集システム JADAS について紹介する。

キーワード：単粒子解析, DIFF シャドウイメージ, ひずみ補正, 自動データ収集, 画像処理

1. はじめに

様々な手法で生体内の分子の構成部品や分子の複合体の構造を解析する研究分野は構造生物学と呼ばれ、代表的な手法として X 線結晶解析, 核磁気共鳴法 (NMR), 透過型電子顕微鏡法 (TEM) の三つが挙げられる¹⁾。

特に TEM に注目すると、電子線結晶解析, 単粒子解析法, トモグラフィの三つの手法が用いられる。電子線結晶解析は試料の二次元結晶 (シート状結晶) に電子線を照射しその透過回折パターンの解析から原子モデルを復元する手法である²⁾。X 線と同様に高分解能な結果を得ることができる上に、X 線を用いる場合と異なり、回折パターンを得たのと同じ視野から像を得ることで位相問題を克服できるという特長がある。単粒子解析法は試料液 (バッファ) 内の孤立粒子の像を多数撮影し、それらの互いの方向を推定して三次元空間で重ね合わせる手法である³⁾。結晶化する必要が無いためにどのような分子についてもすぐに測定を開始でき、また試料粒子の濃度は極めて低くてよく、50 nM 程度のものを 5 μ L 得られれば実験ができる。トモグラフィは単一の試料から複数の方向の投影像を取得して、逆ラドン変換により立体構造を復元する手法である⁴⁾。電子線による試料ダメージが深刻なために撮像中に照射できる電子線量に厳しい制限があり、信号ノイズ比 (S/N 比) の低い像を用いることになる。

本講座ではまず単粒子解析法について手法の概略を俯瞰し、実験を行う上で直面する課題を明らかにする。さらに課題解決に向けて近年筆者が開発した自動データ収集システム JADAS を紹介し、特にその自動試料探索アルゴリズムについて説明する。

2. 単粒子解析法

前述のように、単粒子解析法とは観察対象の粒子を分散させたバッファを薄膜化して TEM で観察し、様々な方向の投影像を三次元空間で重ね合わせることによって立体構造を導き出す手法である^{3,5)}。通常は炭素やシリコン等の軽元素でできた薄い支持膜に 1 μ m 程度の大きさの孔を多数あけたものをメッシュに貼り付けて、その孔の中にバッファを埋め込んで急速凍結し低温に保った状態で撮影を行う。後述するように多数の粒子を撮影しなければならないため、一つのメッシュにつき 100 回から 200 回程度の撮影が行われる。倍率は、撮影の手間と分解能のトレードオフで決定され、典型的には 40,000 倍ないし 60,000 倍程度で行われる。銀塩フィルムに撮影して現像した後、地図用の高精細なスキャナでデジタル化することが従来行われてきたが、近年では CCD カメラで撮影して最初からデジタルデータとして取得することが盛んに行われるようになってきている。撮影された画像から個々の粒子部分を切り出し、切り出された数千から数十万個の粒子像を同じ方向ごとに分類する。それぞれの方向で像を平均化してノイズを減らし、互いにどの方向にあるかを推定して三次元空間で重ね合わせて立体構造を得る。

2.1 単粒子解析法の課題

満足する結果を得る上で生じる困難としては、バッファの薄膜化の困難、撮影に大変な手間がかかること、撮影された像から膨大な数の粒子を個別に抽出する困難、そしてこれら膨大な数の粒子像を適切に分類して相互の関係を見出す困難が挙げられる。

まず試料作製の主な困難は凍結する試料の厚みの厳密な制御である。厚すぎても薄すぎても解析に適さないため、マニュアル法の他に市販の膜厚制御装置を用いた試料作製が行われ

る。これは、水溶液の薄膜が安定する厚みが、水溶液の塩濃度と周りの湿度及び気温の関数で表されることを利用したものであり⁶⁾、理論的には厳密に環境を調整したチャンパー内で望ましい膜厚の試料を作製できるはずであるが、現実には必ずしもよい結果が得られるわけでもなく、最適な厚みの試料が得られるまで作製しては TEM に挿入して像を確認する作業を繰り返すことになる。

第二の困難は、撮影枚数の多さである。電子線照射によるダメージを受けやすい試料特性のために撮影は低線量で行われ、得られる像の S/N 比は極めて低い。ノイズを減らして高分解能なデータを得るには、できるだけ多数の投影像を三次元空間上で重ね合わせる必要があり、近年要求される Å オーダーのデータとするためには数万から数十万個の粒子を撮影しなければならない。1枚の写真に写る粒子は通常数十個から百個程度であり、デフォーカス量などの条件がうまく整っていないために使用に適さない写真もある程度の割合で含まれることを考えると、数千枚の写真を用意しなければならないということになる。実際にはウィルスなどは高い対称性を持つことが多く、その場合には1枚の射影を対称的なほかの方向にも当てはめて平均化することができ撮影する写真の枚数を大幅に減らすことも可能であるが、一般には数百枚から1,000枚程度を撮影して、合計数万個の粒子を抽出し、それらの互いの方向を見極めた上で三次元空間上において平均化する必要がある。

三つ目の困難は、ノイズに埋もれた粒子を数千個から数万個抽出しないと見えないということである。様々な自動化の試みはあるが⁷⁾、人間が見ても個々の粒子を識別できないほどの低い S/N 比の画像から自動的に粒子を抽出することに成功するアルゴリズム⁸⁾はまれである。

四つ目の困難は抽出した個々の粒子の位置合わせとクラス分け、方向合わせが難しいことである。同じ方向の投影像ごとにクラス分けを行い像内での回転と位置を合わせて重ね合わせ、さらにそれらのクラスごとの積算像のオイラー角を推定して三次元空間で重ねる。ほとんど見えるか見えないかわからないような像同士を比べてこの作業を一度行うだけではエラーが大きすぎて満足な結果は得られない。そのため、得られた三次元構造を元に各方向の投影像を計算し、それを元にすべての粒子像の位置合わせ、クラス分け、方向合わせをやり直すという繰り返し作業を、分解能がそれ以上向上しなくなるまで何度も行う。

3. 自動データ収集システム

前節で述べたような様々な課題に対してコンピュータを用いた自動化の試みが様々な研究者によってなされてきている。単粒子解析法は電子線結晶解析とは異なり試料の結晶化が不要でありながら、装置や手法の改良、新しいアルゴリズムの開発やコンピュータの計算能力の向上により得られるデータの分解能が Å レベルに達してきている。しかし十分な分解能を得るためには複雑な TEM の操作に習熟し大量の

データを良い条件で収集したり収集したデータから無数の粒子を抽出する必要があるため、これらの作業を自動化する試みは近年欧米を中心に盛んに行なわれはじめた。取得したデータに対する解析処理については各種の技術^{8,9)}が開発されてきているが、しかしながら、データ収集に関する自動化の試みはあまり成功しているとはいえない。撮影した像からの粒子抽出やそれらの位置合わせといったデータ処理はコンピュータによる計算だけで可能であるのに対して、データ収集はコンピュータソフトウェアだけでは如何ともし難いというのがその理由だと考えられる。すなわち、データ処理ならばソフトウェアのアルゴリズムを工夫することで性能の向上が見込めるが、データ収集は TEM の動作精度によって得られる性能が制限を受けてしまう。そこで、過去にあったいくつかの自動データ収集の試み¹⁰⁾においては、十分な性能を得るために装置メーカーの TEM 開発者と共同で装置自身の様々な改造や内部仕様の修正を行っている。

もっとも大きな問題は倍率である。TEM には一般的に、通常の像観察に用いる MAG モード、回折パターンを観測する DIFF モード、対物レンズ電流をゼロにして低倍を実現する LOWMAG モードがある。MAG モードや DIFF モードでは高分解能を得るために対物レンズに大きな電流を流して試料付近に強い磁場を作るが、これ自体が像を拡大するのでさらに像形成レンズを通った結果はかなり高い倍率の像が観測される。MAG モードで設定可能な最低倍率は、加速電圧 200 kV の装置で通常 2,000 倍程度、加速電圧 300 kV の装置では 5,000 倍程度である。よってより広い視野を確保できる LOWMAG モードで撮影したい試料を検索し、MAG モードや DIFF モードでデータを収集するというのが一般的な TEM 像観察の流れであるが、LOWMAG モードから MAG モードあるいは DIFF モードに切り替えるときに、対物レンズの励磁のヒステリシスのために光軸の設定が狂ってしまうため光軸の再調整が必要となる。この調整には時間がかかり、面倒であるだけでなく調整中に試料を電子線にさらしてダメージを与えてしまうので、単粒子解析のような分野では LOWMAG モードは使用せず、DIFF モードで大きくデフォーカスさせてシャドウイメージを得ることが多い。これにより対物レンズの励磁を変更することなく LOWMAG モード並みに広い視野が得られるが、この状態では投影レンズによる糸巻きひずみやたる型ひずみを生じる。手動操作では大きなひずみがあっても目標物を中心に持ってくるようにステージを操作することは容易である。しかしソフトウェアで自動的にステージを動かすと、ひずみを含む像では不都合を生じる。そのため Carragher らは TEM 内部のレンズに特殊な値を設定することで、MAG モードでありながら LOWMAG モード並みの低い倍率を実現する方針を採用した¹⁰⁾。実際それによって望ましい状態が実現できたかもしれないが、これには装置メーカーのエンジニアによる特殊な改造や保守作業が必要であり、このようなシステムでは一般のユーザが利用するのは困難である。

また像のコントラストが低くノイズが多いこともデータ取

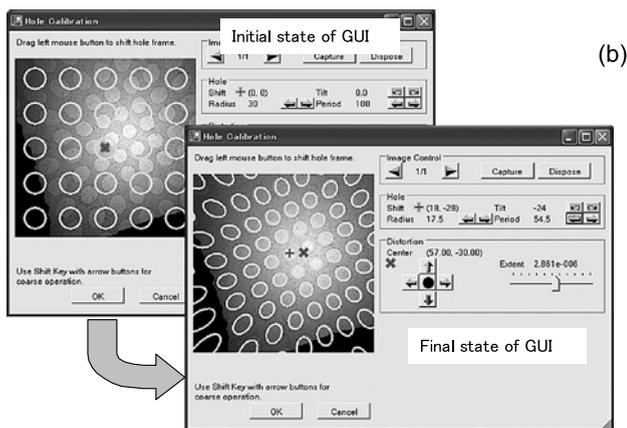
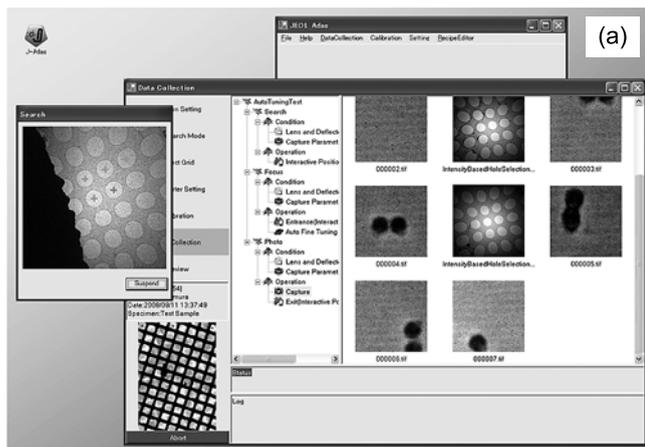


図1 JADASの実行画面 (a) とひずみおよび孔の配列のパラメータをキャリブレーションするツール (b)。

集の自動化を困難にしている。前述のように単粒子解析法においては軽元素の薄膜にあいた孔に試料液を埋め込んで凍らせたものを撮影するので、データ収集を自動化するためには個々の孔の位置を自動的に検出する必要がある。しかし後述するように、通常のパターン認識の手法である正規化相関はこのようなノイズの多い画像において個々の孔の位置を検出するには精度が低く実用に耐えない。前述した Carragher らの研究報告においても、このような環境下でいかにして孔を検出しているかについては詳細な記述がなく、高い精度で自動的に軽元素薄膜の孔を検出する手法に関する研究は行われていないようである。

著者らは近年このような課題を克服して自動的に単粒子像を収集するシステム JADAS を開発した¹¹⁾。JADAS においては、DIFF シャドウイメージにおける大きな糸巻きひずみによる像の形状と明るさの変化を定式化し、それを補正してひずみの影響のない像を生成することに成功した。また軽元素薄膜の孔の周期性を利用して正規化相関の精度を向上し、S/N 比の低い画像中においても安定して目的のパターンを検出できる技術を確認した。さらにこれらの開発した技術を、ユーザが独自の撮影手順を組めるような柔軟性を配した設計のフレームワークに組み込み、オートフォーカスなどの既存

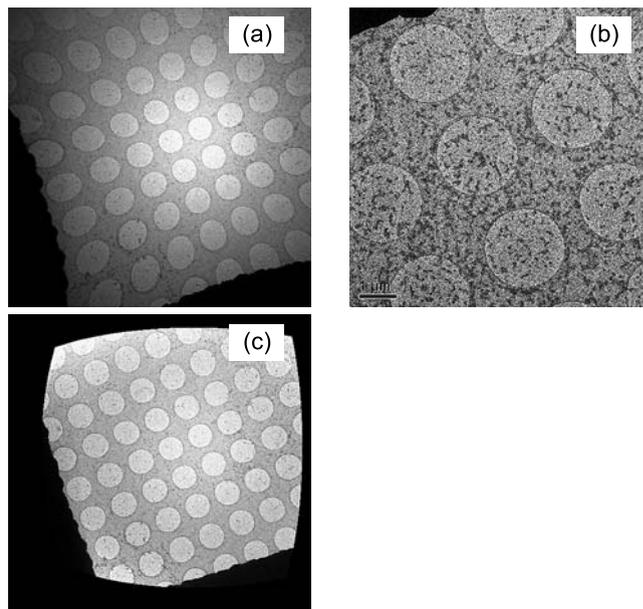


図2 DIFF シャドウイメージ (a)、および同じ試料の MAG 像 (b)、a を JADAS で補正したもの (c)。

技術と組み合わせて自動データ収集を実現した (図 1)。JADAS の応用データについては文献¹¹⁾を参照されたい。この章の残りでは JADAS において行っている糸巻きひずみの補正と支持膜の孔の自動検出の効果を紹介する。詳細なアルゴリズムについては文献¹²⁾にまとめた。

3.1 DIFF シャドウイメージのひずみ補正

図 2 は、炭素薄膜に直径 $2\ \mu\text{m}$ 程度の孔のあいたものにさらに薄い連続支持膜を重ね、そこにウィルスを負染色で固定した試料を加速電圧 $200\ \text{kV}$ の TEM (JEM-2100) で撮影した様子である。DIFF シャドウイメージを (a) に、MAG モードの像を (b) に示す。MAG モードにおいては、JEM-2100 の MAG モードにおける最低倍率である 2,000 倍で撮影を行った。図から容易に見取れるように、DIFF シャドウイメージにおいては通常の MAG モードでの観察に比べて広い視野が得られる上にコントラストも向上するが、大きな糸巻きひずみを生じて正方格子に整列しているはずの円形の孔が変形して見え、像の明るさも変化を受けて外周部が暗くなっている。自動的に試料を検索するためには、図 2 (c) のように補正する必要がある。

JADAS においては、ひずみのパラメータはデータ収集を開始する前に図 1 (b) に示した GUI ツールを用いて測定しておく。このツールでは TEM に装着されたデジタルカメラから取得した DIFF シャドウイメージに人工的な孔の配列を重ねて表示され、ユーザがその孔の大きさや配列の傾き、ひずみのパラメータを調整して人工的な孔の配列を像の実際の孔にあわせこむことによってソフトウェアにそれらのパラメータを理解させる。

3.2 孔の自動検出

試料の自動検索のためには、個々の孔の位置を自動的に検

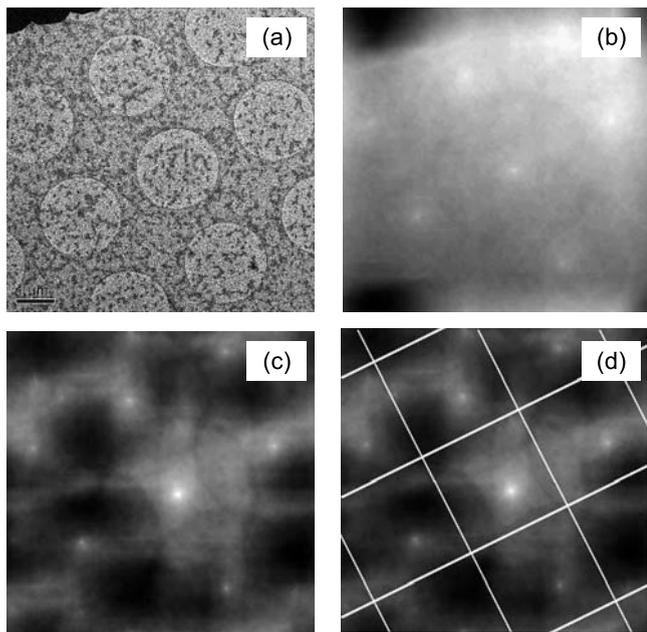


図3 孔あき炭素薄膜に固定された試料の像 (a) と人工的な単一の孔の模式図と a との正規化相関 (b), 人工的な孔の配列の模式図と a との正規化相関 (c), 単位格子を切り出す様子 (d).

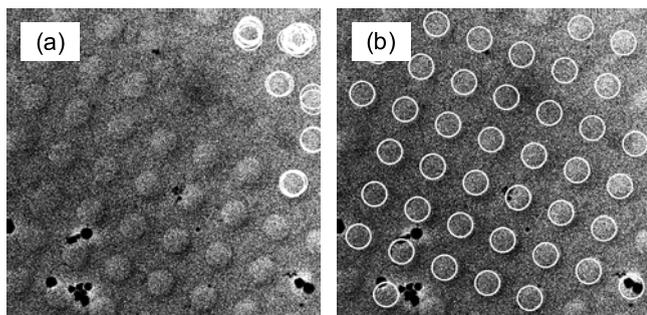


図4 氷包埋の試料の像に対して, 単一の孔の模式図によって孔を検出した様子 (a) と孔の配列の模式図を用いた場合の様子 (b).

出する必要がある。既知の形状を抽出するパターン認識において一般的な従来の手法は正規化相関を用いる方法である¹³⁾が、TEM 像のような S/N 比の低い状態の画像においては単純な正規化相関ではうまく機能できない。図3に示すのは加速電圧 200 kV の TEM を用いて 2,000 倍で撮影した孔あき炭素薄膜の試料（負染色のもの）の像 (a) と人工的な孔の模式図を用いて計算した正規化相関 (b) である。正規化相関 (b) においては、元の画像 (a) の個々の孔の中心に対応する位置にそれぞれ明るい強度のピークが見られるが、元の画像 (a) の S/N 比が低いためにピークはいずれもぼやけていて、それらを自動的に検出することは困難である。

そこで JADAS の構築に当たっては孔が等間隔な正方格子になっていることを利用して、正規化相関のピークを強調する方法を開発した。すなわち、正規化相関の計算に単一の孔の模式図を用いる代わりに、正方格子を形成する孔の配列の模式図を用いることで正規化相関のピークを識別しやすくし (図3c), その位置が周期的であることを利用して相関像を

単位格子に切り分けて積算することで、個々のピークを高精度に自動検出する (図3d)。

図4に示したのは、加速電圧 300 kV の cryo-TEM (JEM-3200FSC) を用いて撮影した氷包埋試料の像に対して、単一の孔の模式図による正規化相関のピーク位置から個々の孔の位置を推定した様子 (a) および筆者らが開発した上述の方法で推定した様子 (b) である。画像から部分的にはみ出す孔は無視したが、それ以外の孔について正確に検出されている様子が伺える。

4. おわりに

本稿では、単粒子解析法をターゲットにデータ収集の自動化について解説し、筆者らが開発した自動データ収集システム JADAS において用いられている像ひずみの補正方法と低 S/N 比の氷包埋試料像におけるパターン認識を紹介した。構造生物学において TEM の存在意義が増すにつれ、多くの研究者がより効率のよいデータ収集手段や解析手段を探索するようになってきている。研究者人口が増えるにつれ各種の作業の自動化はますます重要さを増しているが、取得されたデータに対する解析作業の自動化は盛んに試みられている一方で、装置の各種デバイスの動作特性から結像原理まで幅広い理解を必要とするデータ収集の自動化はまだ多くの課題と十分な開発の余地を残していると思われる。

5. 謝 辞

日本電子株式会社の技術顧問として長年にわたり構造生物学に関する技術指導を賜っている産業技術総合研究所の佐藤主税先生および小椋俊彦先生に厚く感謝を申し上げます。また JADAS の動作確認や仕様決めにご協力いただいた Baylor College of Medicine の Wah Chiu 教授および Junjie Zhang さんにこの場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- 1) Sali, A. *et al.*: *Nature*, **422**, 216–225 (2003)
- 2) 藤吉好則, 光岡 薫: *細胞工学*, **16** (11), 1677–1689 (1997)
- 3) Frank, J.: *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*, Oxford University Press (2006)
- 4) Frank, J. (Ed.), *ELECTRON TOMOGRAPHY 2nd Ed.*, Springer, New York (2006)
- 5) van Heel, M. *et al.*: *Quarterly Reviews of Biophysics*, **33**, 4, 307–369 (2000)
- 6) Frederik, P.M. and Sommerdij, N.: *Spatial and temporal resolution in cryo-electron microscopy—A scope for nano-chemistry*, Elsevier Ltd (2005)
- 7) Umesh Adiga, P.S. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **145**, 15–18 (2004)
- 8) Ogura, T. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **145**, 63–75 (2004)
- 9) Ludtke, S.J. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **128**, 82–97 (1999)
- 10) Carragher, B. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **132**, 33–45 (2000)
- 11) Zhang, J. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **165**, 1–9 (2009)
- 12) Nakamura, N. *et al.*: *J. electron microscopy*, Submitted for publication
- 13) Sonka, M. *et al.*: *Image Processing, Analysis and Machine Vision*, Chapman and Hall (1993)