

生体分子の電子顕微鏡法による3次元再構成法

Three-Dimensional Reconstruction Techniques for Electron Microscopy and Life Science

安永卓生, 我妻竜三

Takuo Yasunaga and Ryuzo Azuma

九州工業大学情報工学部, JST・CREST/JST・SENTAN

要旨 生命は、タンパク質、核酸、脂質といった巨大な分子を主成分とし、それらが集積した細胞を単位として成り立つ有機体である。それらは、互いに会合したり、代謝物などの比較的小さい分子と結合したりすることで、生命の物理的、あるいは、化学的反応を引きおこし、生命活動を成立させている。その大きさは、数ナノメートル～マイクロメートル程度であり、通常の光学顕微鏡の分解能限界を超える。一方で、電子顕微鏡により撮影した場合、その情報は2次元の投影像である。実際には、たとえ、超薄切片でも、その切片の中には、タンパク質の大きさからみれば十分に大きい、数十ナノメートルの空間が存在する。投影像は、3次元の奥行き方向の情報をもつ画像であり、その奥行き情報を生かす方法が3次元電子顕微鏡法（3次元再構成法）である。ここでは、透過型電子顕微鏡像からの3次元再構成法を中心に、電子顕微鏡画像の3次元構造解析手法の原理とその留意点を述べる。

キーワード：電子顕微鏡, 3次元再構成法, 電子線トモグラフィ法, 単粒子解析法, 投影像

1. 序

生命は、タンパク質、核酸、脂質といった巨大な分子が非常に高濃度（30%程度）で水の中で拡散し、また、それらが集積した細胞を単位として、組織、生体といった階層からなる有機体である。細胞の中で、巨大分子たちは、互いに会合したり、代謝物などの比較的小さい分子と結合したりすることで、生命の物理的、あるいは、化学的反応を引きおこし、生命活動が成り立っている。したがって、生命活動やその異常活動である病態を理解するには、この分子たちの織りなすナノ世界を覗き観ることが必須である。

これらの大きさは、数ナノメートル～マイクロメートル程度であり、通常の光学顕微鏡の分解能限界を超えている。電子顕微鏡のそもそもの開発目的のひとつがウィルスの観察であったように、このナノ世界を覗き見ることのできる空間分解能をもち、かつ、直接、実像を観察できるものは、電子顕微鏡法しかないといっても過言ではない。そのため、電子顕微鏡法は、医学的にも、生物学的も初見の画像を与え、生命が創り出す活動の現場を観察する方法として、これまでも不可欠の手段であったし、そして、恐らく、これからも重要な位置を占めると信じる。

特に、X線による身体の撮影がそうであるように、透過型電子顕微鏡写真が投影像であることに、本論文では特に着目する。図1に示したように、投影像とは、単純な2次元の

画像とは異なり、奥行き方向の情報が重なった（積分された）画像のことである。たとえば、超薄切片（数十ナノメートル）やタンパク質単体であったとしても、その切片の中には、タンパク質の大きさ（典型的には数ナノメートル）や原子の大きさ（ $\sim \text{\AA}$ ）からみれば十分に大きい空間が存在している。この隠された投影像のもつ情報を生かす方法が3次元電子顕微鏡法（3次元再構成法）である^{1,2)}。このために、目的に応じて、電子線トモグラフィ法（特定の視野の三次元像の構築、細胞内の構造など多型のある構造解析に利用）、単粒子解析法（同一形状の粒子の三次元像の構築）、電子線結晶解析法（膜タンパク質等の2次元結晶の高分解能3次元構造解析）など各種の手法が開発されてきた。

一方で、ミオグロビンやヘモグロビンの構造がX線結晶解析により原子分解能で解かれて以来、詳細な生体分子の構造解析の座は、X線結晶解析の独壇場である。電子顕微鏡自身の分解能の限界は、原子分解能（2-3 \AA ）を超えていくようになった以降でも、とくに、生体分子を観る場合には、その分解能を達成することが困難である。これは電子線損傷が理由である。

これらの生体分子を直接観ようとする、多くの電子線を照射する必要がある。しかし、直接一分子を可視化できるほど物質との相互作用が強いことの引き替えに、生体分子の多くが導電体でないが故に電子線による損傷が大きくなってしまふ。そのために、導電体の物質をみている電子顕微鏡研究者・技術者には、恐らく想像が出来ないくらい低電子線量の写真撮影が必要となる。例えば、後述する単粒子解析電子顕微鏡においては、一枚当たりの電子線量は1000～3000 e/nm²、クライオ電子線トモグラフィ法においては、同一視野の傾斜シリーズの撮影が必要であるが故に、一枚当たり

〒820-8502 福岡県飯塚市川津 680-4
TEL: 0948-29-7826
E-mail: yasunaga@bio.kyutech.ac.jp
2012年5月14日受付

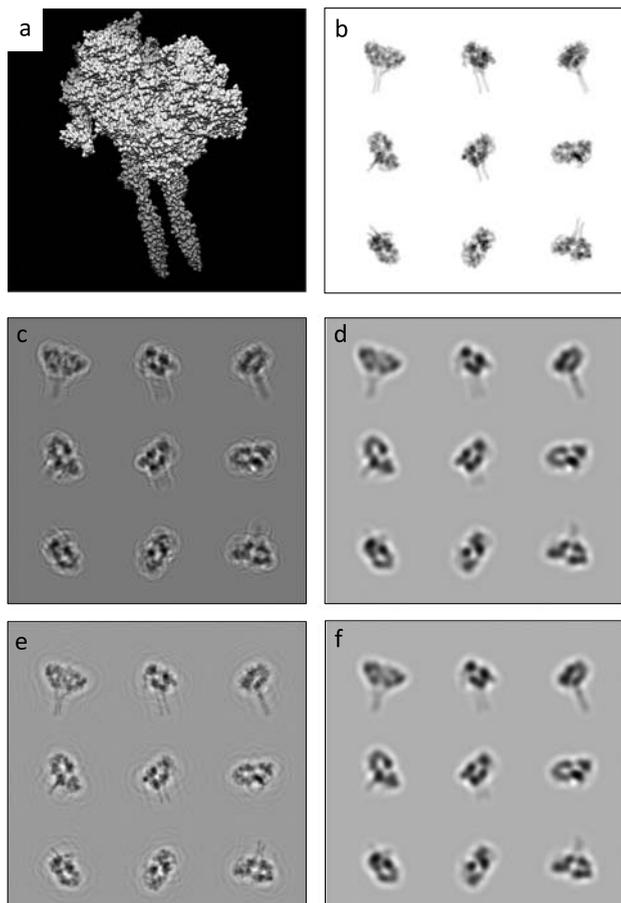


図1 3次元像とその投影画像。(a) 原子モデルから期待されるダイニンタンパク質の3次元画像、(b) 異なる投影軸からなる投影画像、(c)、(d) 電子顕微鏡で観察される際のコントラスト変調を受けた投影画像。それぞれは、200 kV、5 μm の不足電子線量、球面収差係数 $C_s = 2.1 \text{ mm}$ で、位相コントラスト：強度コントラスト = 10 : 1 であり、照射角が 0.02 mrad (例電界放出型銃相当) と 0.3 mrad (LaB₆, スポット大) で異なるもの。(e)、(f) は、(c)、(d) のそれぞれの位相のみ補正したもの。(c) の図では、高周波までの情報をもつストークと呼ばれる下部につきだした2本のコイルドコイルの白黒が反転していることに注意。

の電子線量は典型的には 20 ~ 100 e/nm² となってしまう。このことが、金属試料や特別な導電性環境では可能な、分子内の原子を観察することを困難にしている。

それでもなお、1990年代より、電子線結晶解析法に端を発して、生物試料においても原子分解能の3次元再構成が報告されるようになった³⁾。2012年現在では、単粒子解析法においても原子構造を決定できる分解能に達している。これは偏に、同型をした多分子を平均化することにより実現したものである。一方で、平均化が困難な電子線トモグラフィー法ではその分解能は、特別な例⁴⁾を除けば、現在、4-5 nmにとどまっている。したがって、非常に低いSN比の画像から情報を取り出す必要があるという意味で画像処理手法としても興味深い。

以上の事を踏まえ、本論文では、単粒子解析法、電子線トモグラフィー法を含めた各種電子顕微鏡法の中で利用されている3次元再構成法に共通する、三次元再構成という手法に

重点をおいて解説する。そのためにも、透過型電子顕微鏡法の像の性質について述べよう。

1.1 透過型電子顕微鏡法の像のもつ意味

透過型電子顕微鏡像を解釈する場合に二つのことに気を付けておく必要がある。一つは、透過像(投影像)であるという、透過型電子顕微鏡という名前からも当たり前の事実である。今ひとつは、そのコントラスト形成の物理的原理が故に像が変調を受けているという事実である。

前者は、「透過型電子顕微鏡法が、その対物レンズの口径の小ささ(数十ミリラジアン程度)が故に、被写界深度が深く、投影像である」という事実である。このことは、電子顕微鏡を利用している多くのひとにとって当たり前すぎる事実かも知れない。しかし、当たり前であるが故に、意外に気にしなくなってしまう瞬間がある。もちろん厳密に言えば、特に、厚みがある試料や高分解能の試料では素直な投影像とはいえず、多重散乱や電子線の吸収、厚み方向のデフォーカスの違いを意識した構造解析が必要となる。

しかし、ここで、刮目すべきは、80 nm などの超薄切片の中にさえ、その3次元構造が広がっており、その3次元像の再構成は可能であるという事実である。すなわち、また、投影像では見失っている、というより、隠されている情報を回復することが可能であるといえる。

後者の像の変調については、電子顕微鏡像においてコントラストを作るのは、物質を通り抜けた際の電子線の位相変化量であることに起因している。

ここで述べた2点の詳細は3次元像の再構築に重要な意味を持つが、この点は成書^{1,2)}に譲る。前者の「電子顕微鏡像が投影像である」という事実を前提に、得られた投影像から3次元再構成する際の数学的な裏付けを中心に論じる。そこで、3次元再構成法の中心原理である中央断面定理を解説する。その上で、具体的な3次元再構成法を示しながら、生物試料を対象とした3次元再構成法の実際に関し、留意する点を概説する。

2. 3次元再構成法

2.1 3次元再構成法とは

3次元再構成法とは、一言で言えば、得られた多数の様々な角度からの投影像から、元の3次元構造を再構成する方法である。得られた2次元像が投影像である場合には、その内部の構造も得ることができる。数学的には、X線CT(Computed Tomography)法と同等の計算により、再構成することができる。その原理を以下に記述する。

3次元再構成を一般的に述べれば、図2に示すように、対象となる3次元物体の各ボクセル(3次元空間をサイの目に区切ったそれぞれの空間)の値を要素として持つベクトル x (N-elements) に対して、その投影演算 P_i ($M \times N$ の行列で表現) が投影画像のピクセル値を要素として持つ b_i (M-elements, $N > M$) の n 枚からなるセット ($i = 0, \dots, n-1$) が与えられたとき、

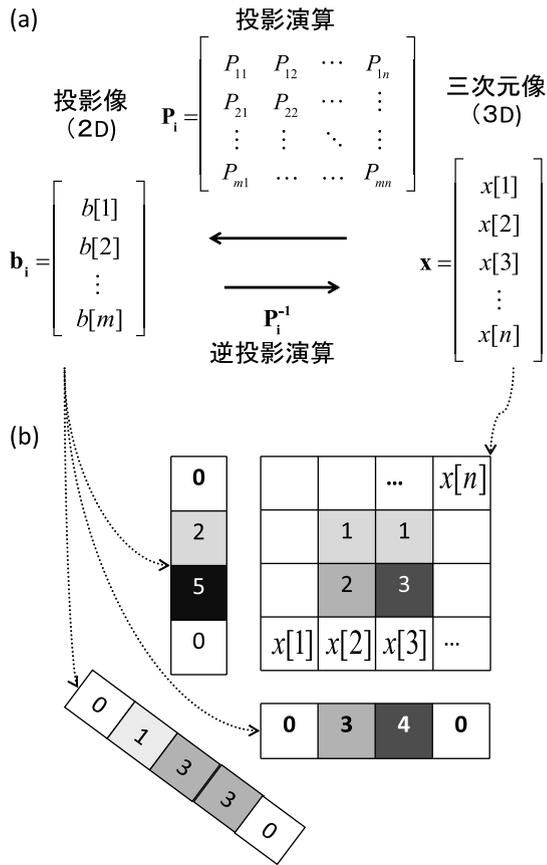


図2 投影と逆投影。(a) 3次元画像の各画素を1次元のベクトルとして捉えたものが x 、それを投影演算 P_i を元に投影したものが b_i である。投影軸の方向を i で表現している。(b) 実際に三つの角度に投影したものを示している。

$$P_i \cdot x = b_i \quad (1)$$

から、 x をもとめる線形方程式を解く問題にあたる。この問題が解けることの数学的保証は、後述する中央断面定理により想像できるが、現実の問題となると検討しなければならないことが多い。

特に、この問題の難しさは、 P_i が与えられた場合、 x から、 b_i を求める方法は順問題として比較的容易であるが、その逆は、必ずしも容易ではない逆問題として振る舞う点にある。すなわち、かならずしも、式 (2) に占めしたような適切な P_i^{-1} が設定できるとは限らないことにある。

$$x = \sum_i P_i^{-1} \cdot b_i \quad (2)$$

さらに、トモグラフィ法では、電子線による試料の損傷のために、異なる角度からの撮影枚数 n を十分に得られない場合があること、また、全方位から撮影できない場合には、与えられる P_i に偏りがあり、得られない情報の領域（ミッシングエリア）があることなどは留意しておく必要がある。また、投影演算以外に、試料のドリフトや回転によるアフィン変換の演算が加わることも気にしておく必要がある。（X線CTでは、現在の分解能であれば人を固定して、しばらく動く

などという指示で十分な分解能ではあるが、ナノメートルを超える分解能をもつ電子顕微鏡では、同等のレベルで停止し、同一視野を撮影する必要がある。実際には、それは困難なので、実際には撮影した画像から移動量等を推定する必要が生じる。）

更に、後述する単粒子解析法では、投影角そのものを推定する過程が重要になってくる。すなわち、真の像の密度ベクトル x のみならず、投影演算である P_i そのものを推定しなければならない。電子線トモグラフィ法でも、傾斜角度、投影軸等の推定が必要となるが、その初期値が手に入る点が異なる。この問題は誠にもって難しく、たまにその3次元像に大きなアーティファクト（ランダム誤差ではなく、システム誤差による歪み）を生み出す。

2.2 3次元再構成を保証する中央断面定理

中央断面定理は、3次元再構成の可能性を保証している重要な定理の一つである。この定理の意味は、図3に示したように、「3次元の物体をある軸方向に投影した2次元画像は、元の3次元物体のフーリエ変換の原点（中央）を通る、投影軸に垂直な面（断面）に一致する」ということである。これをフーリエ変換の定義から導くことは難くない。

今、3次元物体の密度分布 $f(x, y, z)$ を z 軸方向に投影した画像 $g(x, y)$ とし、それぞれのフーリエ変換を $F(X, Y, Z)$ 、 $G(X, Y)$ としたときに、 $G(X, Y) = F(X, Y, 0)$ (Z 軸に垂直な中央断面) となることを導いてみよう。

投影像 $g(x, y)$ は、 z 軸方向の投影として、式 (3) のように定義できる。

$$g(x, y) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y, z) dz \quad (3)$$

これをフーリエ変換すると

$$G(X, Y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} g(x, y) e^{-2\pi i(xX + yY)} dx dy \quad \text{であるので、}$$

$$\begin{aligned} F(X, Y, 0) &= \iiint_{-\infty}^{+\infty} f(x, y, z) e^{-2\pi i(xX + yY + z \cdot 0)} dx dy dz \\ &= \iiint_{-\infty}^{+\infty} f(x, y, z) e^{-2\pi i(xX + yY)} dx dy dz \\ &= G(X, Y) \end{aligned} \quad (4)$$

となり、式 (4) により等しいことが証明される。

これは、フーリエ空間の $Z=0$ の面が、実空間の z 軸方向に関する投影像のフーリエ変換であることの証明である。図3に示すように、軸を回転と組み合わせれば、それぞれ異なるフーリエ空間の中央断面を求めることが出来る。したがって、様々な向きからの投影像を求めることが、3次元フーリエ空間の中央断面にそれぞれ対応させることが出来る。全方位からの投影像があれば、3次元フーリエ空間の全ての点の値を求めることができるので、3次元逆フーリエ変換により、元の3次元像を得ることが出来ることになる。

理論的な理解としては、本稿で解説する3次元再構成法はいずれも、上記の中央断面定理とフーリエ変換で十分である。しかし、具体的なコンピュータによる計算となると、その撮影方法の制限等により、考慮すべき点がある。そのため、2次元

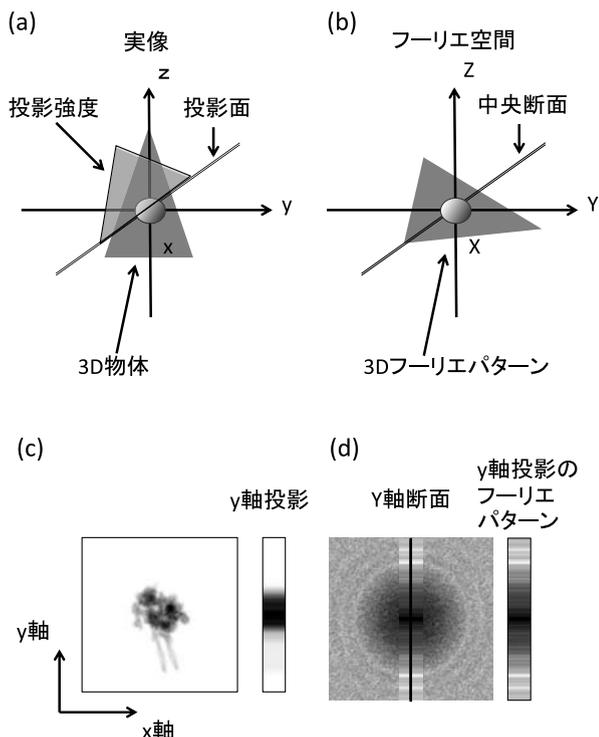


図3 中央断面定理. (a) x軸の正の向きからみたときの3D物体. 投影面(投影軸)に対して投影したものが、投影強度である. (b) (a)をフーリエ変換すると、中央断面の値と等しくなる. (c) 2次元の画像とy軸投影. (d) (c)のフーリエパターンとそのY軸(断面). フーリエパターン内の強度分布と(c)のy軸投影のフーリエ変換を示している.

の電子顕微鏡画像の3次元再構成法には、大きく、フーリエ空間補間法、逆投影法、ラドン変換法、繰り返し法の4つの方法がある。以下、そのそれぞれについて簡単に触れてみよう。

2.3 フーリエ空間補間法

この方法は、純粋に上述の中央断面定理に則った方法である。図4に示すように、電子顕微鏡により得られた2次元画像をフーリエ変換し、対象とする物体の3次元フーリエ空間を、投影方向に垂直で、かつ、原点を通る面上にそのフーリエ変換されたスペクトル像をおいていく。実際には、直交3次元フーリエ変換の点と2次元画像のフーリエ変換の点が必ずしも一致しないこと、また、全ての近傍点が求められるとは限らないため、補間法によって推定することになる。

そのため、この方法の最大の問題は、フーリエ空間では隣り合う点が似ていることを仮定することが困難であり、補間方法が非常に難しい点が挙げられる。

一方で、単粒子解析などの生体高分子を取り扱う場合には、その高分子の大きさが仮定でき、実空間で有界であることが保証できるので、フーリエ空間の足りない点を周辺の点から補完できる可能性がある⁵⁾。

あるいは、実空間を十分に広い画像とすること(周辺を0で埋めることを意味し、パディングと呼ぶ。)で、フーリエ空間を細かく区切ることにより、補間をする必要がなく、かなり近傍の点の情報を得ることができる。このパディングを

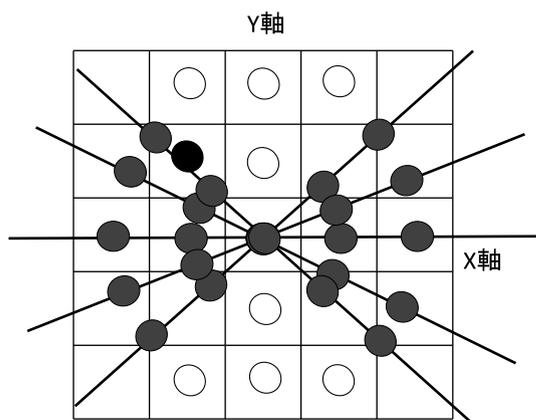


図4 フーリエ補間法を用いた3次元再構成法の原理(2D). フーリエ空間と投影像のフーリエ変換により求められた中央断面(直線と灰色の○). X軸上では、フーリエ空間の刻み幅と投影像のフーリエ変換の刻み幅が同じであるため、そのままフーリエ変換の値を手に入れることができるが、それ以外の投影像からのフーリエ変換の場合には、必ずしもフーリエパターンの格子とあわないため、補間が必要となる。例えば、●で示した点のデータは、ちょうどその真上となる点が存在しないため、近傍、もしくは、周辺の点から補間する。また、全方位の傾斜像がないため、中央断面も全方位とならない。そのため、データの無いミッシングエリア(白の○)が存在する。

用いる方法は、他のフーリエ変換を用いる手法に於いても同様の効果を生み出すので、十分な計算機資源がある場合には試してみることをお勧めする。

2.4 逆投影法

逆投影法は、投影演算の逆演算である演算(逆投影演算)を実空間で行うための手法である。図5にその概要を示す。数学的には、一枚の投影像からの2次元フーリエスペクトルで、3次元フーリエ空間を埋めることに等しい。したがって、フーリエ補間法と原理は同じである。しかし、演算としては、実空間での補間ですむため、(シャノンの標本化定理で許される範囲の分解能で考えれば、)アーティファクトを生み出しにくい。

単純逆投影法は、上述に従って、投影画像である2次元画像から3次元空間に逆に投影する逆演算のみを実行する方法である。この場合、実空間の補間が必要ではあるが、演算が比較的容易である。しかし、この方法は、図4が示すように、上述のように数学的には、個々の中央断面を足し合わせることであり、重なりが大きい低周波領域の情報が強調され、ぼけた画像が得られる。その重なり方は、一軸投影の場合、フーリエ変換において傾斜軸からの距離に逆比例する。これを解決するために、フィルター付逆投影法、重み付き逆投影法などの手法がある。

フィルター付逆投影法は、投影画像をフーリエ変換した後、上記の、傾斜軸からの距離に逆比例するぼけを解消するために、 ρ フィルターと呼ばれる傾斜軸からの距離に比例したフィルターをかけ、逆フーリエ変換した画像を使って、逆投影を行うものである。この場合、空間周波数の高周波を強調しすぎることになり、多くの場合、雑音を強調する。そのため、ローパ

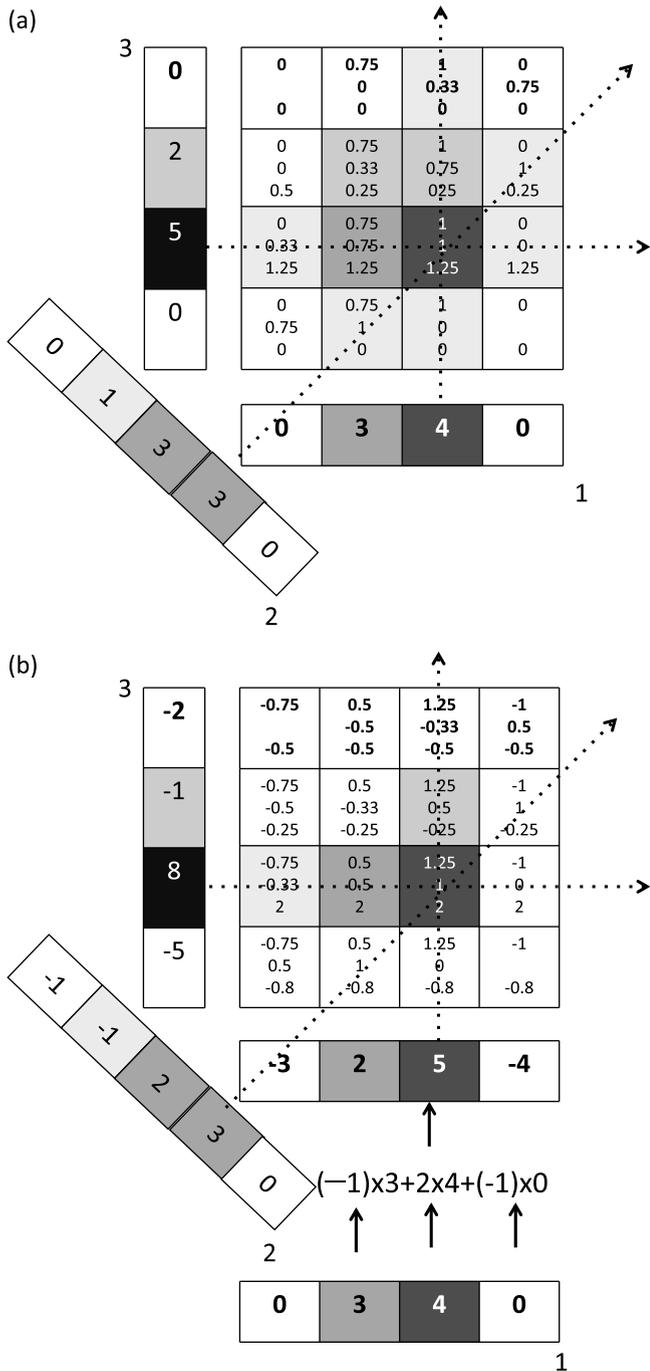


図5 逆投影法を用いた3次元再構成法。(a)単純逆投影法。1, 2, 3のそれぞれの投影方向からそのまま逆に投影した値を記述している。この値をすべて足し合わせれば3次元空間の密度を求めることができる。斜めの矢印は、2の投影方向からの逆投影を特に示している。投影像が3であり、3つの画素に逆投影するので、1という値が逆投影されている。(b)重み付き逆投影法。ρフィルタに対応する(-1, 2, -1)というカーネルを使って、投影像と畳み込みを行っている。下部に記した計算式がカーネルを用いた計算方法を示している。単純逆投影と比較すると周辺のボケがなくなり、シャープな画像が得られていることが分かる。

スフィルタと組み合わせる等の工夫が必要である。一般に、一定の空間周波数以内のみをρフィルタとし、それ以外を0とするRam-Lakフィルタや、Ram-Lakフィルタが生み出しや

すいアーティファクトを抑える意味から、Shepp-Loganフィルタなどが提案されている。まだまだ工夫の余地があるであろう。また、単粒子解析法などの全方位からの投影像が得られている場合には、フーリエ空間での中央断面の重なりをカウントすることで、そのフィルタ関数を求めることもできる。

重み付き逆投影法は、畳込逆投影法とも呼ばれる^{6,7)}。前者のフィルタを逆フーリエ変換することによって得られる関数の近似関数を実空間で畳み込んだ画像から逆投影する。実空間で、近傍の点のみを使って行うので高速な再構成が可能である。こちらも近似関数が各種提案されており、今後も工夫されることになる。

2.5 ラドン変換法

3次元ラドン空間とは、3次元空間の原点を通る、(θ, φ)の二つの角度により決定される直線を軸sとした場合に、その軸を法線ベクトルとし、s=s0を通る面の値を積分した値をもつ空間である⁸⁾。結果として、(s, θ, φ)で規定される座標がラドン空間であり、それぞれの点が投影密度を与える。このとき、フーリエ変換との関係でいえば、(θ, φ)により規定される一つの軸sのフーリエ変換は、対象物体のフーリエ変換の原点を通り、(θ, φ)により規定される一本の軸に等しいことになる。従って、ラドン空間の情報が得られることは、3次元フーリエ空間の原点を通る軸で埋めることと等価である。

逆に、逆ラドン変換を通して、3次元空間に逆投影する。その際、(s, θ, φ)で示される一つの点が、もとの3次元空間においては、3次元空間ひとつの面へ逆投影されることになる。

2.6 繰り返し法

繰り返し法は、一般的に、線形問題を解くための解法(solver)としてよく用いられ、電子顕微鏡像の3次元再構成においては、SIRT (Simultaneous Iterative Reconstruction Technique: 同時逐次再構成法)法^{9,10)}やART (Algebraic Reconstruction Technique: 代数的再構成法)法^{11,12)}がよく用いられている。そのほかに、ILST (Iterative Least Squares Technique)法も提案されている。基本的には、投影、逆投影の演算を繰り返しの中で、実際の2次元投影像と推定された3次元構造から得られた2次元投影像との差分の2乗が小さくなるようにする、最小自乗法の考え方に即している。すなわち、Eq. 1で示された3次元画像xが下記の値が最小となるものを満たすことになる。

$$L(x) = \sum_i \|P_i x - b_i\|^2 \quad (5)$$

今、初期値として3次元画像をx₀で与え、k回目の3次元画像をx_kとし、次のように、x_{k+1}を求め、収束するまでくり返すことにする。いま、Δx_kを修正ベクトルとすると、

$$x_{k+1} = x_k + \lambda_k \Delta x_k \quad (6)$$

として、一般に記述できる。

修正ベクトルに関しては、投影の逆演算(逆投影)が定義できるとして、P_i⁻¹として定義できるとしたとき、ART法では、一枚ごとの電子顕微鏡写真に対して、演算を順次実施するので、

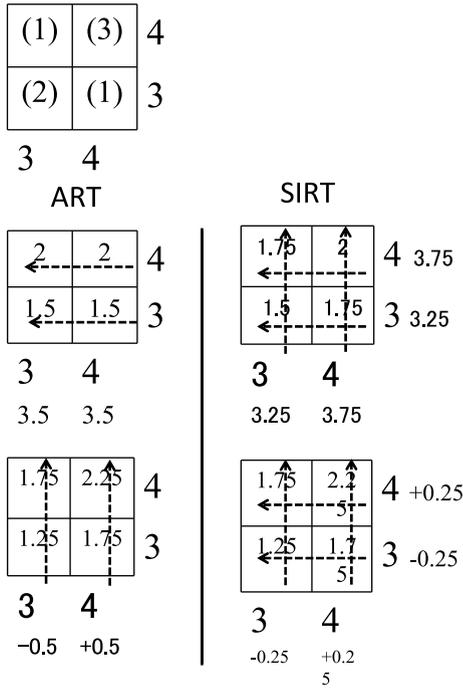


図6 繰り返し法による3次元再構成法. ART法とSIRT法による実際. 左上は, 画像とその投影(右, 下の枠の外). ART法(左段)では, 投影方向毎に逆投影を行う. まず, 右から逆投影する. 次に, 下に投影する. 次に, その差分を計算し, 差分を逆投影する. ここでは, $\lambda=1$ としている. SIRT法(右段)では, 一度に逆投影を行う. その後, 全て投影し, その差分を計算し, その差分を再び逆投影する. いずれもこの繰り返し演算をくり返し, 差分が一定以下になるまで繰り返す.

$$x_{k+1,i} = x_{k,i} + \lambda_k \Delta x_{k,i}$$

$$\text{,where } \Delta x_{k,i} = P_i^{-1}\{P_i x_k - b_i\} \quad (7)$$

として, 傾斜画像毎に修正をかける.

一方, SIRT法では, 下記のように, 全ての角度の画像と推定投影像との差分を同時に修正ベクトルとして取り扱う.

$$x_{k+1} = x_k + \lambda_k \Delta x_k$$

$$\Delta x_k = \sum_i P_i^{-1}\{P_i x_k - b_i\} \quad (8)$$

このため, 一般にART法の方が収束が速いが, 発散しやすいという性質をもつ. 一般に, どちらの方法でも, λ_k の値を小さくしておけば, 収束は遅いが, 発散は抑えられる. ILST法では, 毎回の λ_k を収束が早くなるように変更する点異なる. 繰り返し法は, 逆投影法のように一度で求める方法に比べて, 情報量が少ない場合(投影角に制限がある, 投影像の数が少ない)でもアーティファクトの少ない3次元再構成像が得られる.

一方で, 繰り返し法ならではのメリットは, 先験的な知識を繰り返しの中に組み込むことができることである. その先験的な知識による拘束条件を一般に Q_k とすれば,

$$x_{k+1} = x_k + \lambda_k Q_k \Delta x_k \quad (9)$$

と記述できる.

発散を抑えたり, 存在しない情報を先験的知識から推定したりすることなどが可能である. 後者に関しては, 例えば, 薄膜切片の3次元再構成であれば, 実空間の厚みを取り込むことができるし, 単粒子解析であれば, 対象物の存在領域を分子量等により制限することもできる. このことは, 結果として, 超解像法(super resolution)と呼ばれる方法をとった事に対応し, 内部の空間の密度分布の分解能をあげることに繋がる.

2.7 3次元再構成における障害

理想的な3次元再構成と比較して, 電子顕微鏡法の3次元再構成は困難を極める場合が多い. 特に, 生物試料においては, 電子線照射量の低さによるSN比の悪さがその理由である場合が多い. それぞれの3次元再構成法においては, 個々の手法特有の障害もある. 以下にそれを述べる.

• 電子線CT法

CT(Computed Tomography)法は, X線CT法やMRI等でも利用されている手法であり, 比較的構造決定が容易であり, 同一視野を傾斜しながら撮影することで, 様々な方位からの傾斜像を手に入れることができる. また, 傾斜角度等の推定が元来必要ない. しかし, 実際の問題としては, 分子・原子分解能での電子線CTを実現するためには, 画像の傾斜軸のX, Y方向の移動量とその角度, そして, 傾斜角度をできる限り厳密に求める必要がある. そのずれは, そのまま画像の劣化に繋がる.

もう一つの大きな問題は, 図4で示したような, ミッシングエリアというフーリエ空間の中で情報がない領域が存在することである. 半導体試料等で棒状の形状に削ることができる場合を除けば, その撮影できる傾斜角に限界があることに起因している. 超薄切片など, 電子顕微鏡用の試料では, 試料面に水平な方向からの撮影が出来ないため, 試料面に垂直な方向にぼけを生じる. これは, 2次元結晶を使う電子線結晶解析法などでも生じる問題である. このぼけは, 超解像法等を用いる事により一部改善する.

• 単粒子解析法

単粒子解析法は, タンパク質やその複合体の電子顕微鏡写真から, それぞれの粒子が同じ形状をしていることを前提として, その投影角が異なるという条件のもとで, その構造解析を行う手法である. 2次元の画像のままで行う方法と3次元画像を再構成する方法がある.

3次元再構成には, 投影軸の推定も伴うことから, 参照像が無い場合には, その推定には困難を伴う場合が多い. 更に, 複数の構造他型をもっている場合には, その構造解析は困難を極める.

比較的構造解析が容易な方法については, ランダムコンニカル傾斜法という方法がある. これは, 同一視野の非傾斜像と傾斜像を撮影することで, 傾斜像における投影軸の決定を容易にするものであり, 非傾斜像での面内回転角度を用いる.

単粒子解析法の詳細は, 文献2を参考にしてもらいたい.

2.8 電子顕微鏡のコントラスト形成について

どんな画像入力装置についても同様であるが、電子顕微鏡がつくり出す画像についても、コントラストの変調が生じていることについて気を払う必要がある(図1c, d)。近年、位相差をそのままコントラストにする位相電子顕微鏡が少しずつ実用の域に達しつつあるが、未だ従来の電子顕微鏡法では、そのコントラスト形成に注意を払う必要がある。

電子線トモグラフィ法においては、高傾斜画像でもアンダーフォーカスを維持することを目標とするために、大きいデフォーカス量(5-20マイクロメートル)で撮影するケースが多く、電子線の点光源性の悪さに依存するばけが画像に存在する(図1参照)。一方で、デフォーカス量を小さくすると、位相コントラストに由来する位相変調の影響を大きく受ける。単粒子解析の場合にも、高分解能とコントラストを求めて、1-5マイクロメートル程度のデフォーカスで撮影するケースがおおく、コントラスト変調(コントラスト伝達関数: Contrast Transfer Function: CTF)の影響を受ける。CTFの変調も考慮した3次元再構成法も報告されているので、試行する価値がある¹³⁾。

2.9 画像の信頼性(分解能)の問題

単粒子解析法において、画像の信頼性(分解能)を点検するのに主として用いられるのは、FSC(Fourier Shell Correlation)法、FSPC(Fourier Shell Phase Correlation)法、FOM(Figure of Merit)法などである。これらは、いずれもデータを二つのセットに分けて、3次元再構成を行い、フーリエ空間での空間周波数毎にいずれかの相関があるかを求めるものである。

$$FSC(R_0[nm^{-1}]) = \frac{\sum_{R=R_0}^{R_0+\Delta R} F_1 \cdot F_2^*}{\sqrt{\sum_{R=R_0}^{R_0+\Delta R} |F_1|^2 \sum_{R=R_0}^{R_0+\Delta R} |F_2|^2}} \quad (10)$$

これに対して、電子線トモグラフィ法においては、その信頼性(分解能)評価は難しい。同一の分子がくり返し存在していたり、あるいは、それぞれの3次元構造を比較したりすることにより、上記と同様の手法をとって評価することができよう。一方で、画像上にユニークに存在する対象では、原子レベルまでの化学的に妥当な構造を見出すことができるレベルまで分解能があがらなければ、その評価をすることは困難である。その場合には、構造の妥当性を2次元画像もしくは3次元再構成像との無矛盾性に頼って評価するしかない。例えば、傾斜像を二つのセット(偶数番目と奇数番目等)に分割し、それぞれから再構成された3次元像のFSCを計算する方法や特定の2次元画像とそれを除く2次元画像から3次元再構成された像からの投影像とを2次元FSCとして比較する方法などがあげられる。

3. 3次元電子顕微鏡法の可能性

これまで、3次元電子顕微鏡の原理やその周辺技術に関して述べてきた。ここでは、3次元電子顕微鏡法の可能性につ

いて、「ブラウジング効果」と「ナノ解剖学」という観点から考えてみよう。

3.1 ブラウジング効果

電子顕微鏡をつかって、3次元構造をみることの最大の長所はなんだろうか。著者は、「ブラウジング効果(閲覧効果)」であると考えている。ブラウジング効果とは、図書館学の用語の一つであり、「ぶらぶらと図書館を閲覧することにより、目的とする本だけではなく、その周辺の本に出会うこと」の重要性を示した言葉である。2012年の現在、アマゾンドットコムがあれだけ流行るひとつに理由は、目的の本を的確に探せる検索環境に加えて、ハイパーテキスト形式からなるウェブ環境のブラウジング効果にあるといえる。ちょっと本の中身を覗き見る演出も加わった、我々が広大な「本」の空間を飛び回ることでできる環境こそが著者を魅惑してやまない理由である。

さて、生物試料、特に、細胞や組織を観察する電子顕微鏡法、そしてそれをを用いた構造生物学においては、このブラウジング効果が有効である。蛍光顕微鏡法は、最近著しい分解能の向上をもたらした。生物学者は、ナノメートルオーダーで、ターゲット・タンパク質の細胞内、器官内、生体内での位置、分布を知ることができるようになった。しかも、電子顕微鏡法では困難な、ライブで、生きたままの状態をみることが出来る点ではるかに優れている。更に、下村博士のノーベル賞受賞にも繋がった、遺伝的標識法である蛍光タンパク質GFPをもたらした、確実でかつ比較的生体に易しい蛍光標識法はある種の革命であった。しかし、蛍光顕微鏡だけでは、たとえ、多色の蛍光標識を使って、複数のターゲットを可視化したとしても、その原理が故に、標識のない周辺環境や目的のタンパク質そのものの構造を観ることはできない。

現在、相関顕微鏡法(CLEM: Correlative Light and Electron Microscopy)と呼ばれる両者の顕微鏡法の優れた点を組み合わせ、生物の本質に迫ろうという方法が提案され、報告されている¹⁴⁾。これは、蛍光標識により、ターゲット・タンパク質の在処や分布を観察するとともに、その高解像の同一視野像を、電子顕微鏡法により得ようとする方法である。器官や細胞の全体は、電子顕微鏡にとってははとてつもなく広い視野であるといえる。したがって、この電子顕微鏡のもつ難点をカバーする適切な組み合わせが必要であるといえる。昨今、電子顕微鏡法のコンピュータ制御の技術の向上と共に、蛍光顕微鏡とのコンビネーションが各種提案されている。今後、更に発展が期待される分野である。

更に、電子顕微鏡観察法そのものの工夫も要求されている。細胞という30%がタンパク質等の生体分子からなる分子クラウドとも呼ぶべき環境のなかで、その中にあるターゲット・タンパク質を観察することが必要とされている。これは、細胞内のような分子クラウドの状況においては、タンパク質の構造が異なることがその理由である。物理的に考えれば、溶媒としての水と溶質がこの比率になってくると、水のもつエントロピーを支配する排除体積効果が大きく効く。そのため、層分離をおこす事すら示されている。したがって、細胞内の

生体分子の振る舞いを理解するには、どうしても細胞を非侵襲で観る技術が必要である。その中でターゲット・タンパク質を、他と区別して観察するためには、GFPのように、遺伝的かつ電子顕微鏡向けに標識する方法が必要となる。これもまた、近年、メタロチオネイン等の金属結合タンパク質を用いた方法が報告され、これからの展開に期待が高まっている¹⁵⁾。

また、ブラウジング効果をより活かすには、できる限り広い範囲の空間を検索できることが重要である。その意味では、DualBeam SEMが注目されている^{16,17)}。特に厚み方向に連続的に切削しながら、観察することができるので、連続切片法に替わる新たな手法となる可能性がある。特に、広い視野を観察できる点で将来性がある。今後の分解能の向上やクライオ技術等と組み合わせた氷包埋試料の撮影などへと展開することが期待できる。

3.2 ナノ解剖学

上述のブラウジング効果を活かす電子顕微鏡法のもう一つの重要なことは、本稿で示した電子顕微鏡法のもつ高分解能(ナノ分解能)で実空間を三次元像として観ることができる技術であることである。この3次元再構成法を駆使して、電子線トモグラフィ法では、ナノメータ分解能で標的タンパク質の周辺とその中身を、単粒子解析法では、タンパク質や複合体の中身を覗き見ることができる。ターヘルアナトミア(解体新書)は、実際に人間を解剖することで、我々に、我々自身の体の構造を目に見えるものとした。一方で、X線CTやMRIは、今や実際に体を開くことなく、我々の体の中をコンピュータの上に映しだしている。後者と同様に、電子顕微鏡法とその3次元再構成は、各々をナノメータ分解能で、場合によっては原子が可視化できる分解能で、開くことなく、非侵襲の状態、我々に器官、細胞、タンパク質の中身を示してくれるのである。これらは、まさに、「ナノ解剖学」とよぶべき技術である。

ここで示した「ブラウジング効果」と「ナノ解剖学」。これらを両者持ちうる技術が電子顕微鏡であり、これらによる発見的観察こそが電子顕微鏡法の真骨頂である。この利点を活かし、ニーズ、アプローチを次々と創発していくことこそが、電子顕微鏡を用いた我々にとって重要であり、課せられた使命といえる。

4. まとめ

これまで3次元再構成法の概要を示してきた。全てを述べるには紙面が足りないが、実際にこれらの3次元再構成を試してみればその理解はより進む。これらの解析には、購入できるソフトウェア(Inspect3D, TEMography, Imagicなど)もあるし、学術的な利用に限定される場合もあるが、無料で手に入れることのできるソフトウェア(IMOD, Spider, B-soft等)もある^{18,19)}。筆者もまた、電子顕微鏡画像処理のためのEosという総合画像処理環境を提供してきた²⁰⁾。此さえあれば、すべて画像処理が終わるといえるものはそのいずれにもないが、互いが切磋琢磨しながら、よりよい電子顕微鏡3次元

像を得るための手法の開発を進めている。ホームページ上にはこれらのソフトウェアの一覧も用意されている^{18,21)}。日本電子顕微鏡学会・生体構造解析分科会ではそうしたソフトウェアのチュートリアル・ワークショップも近年開催してきた。また、今後も継続的に開催する予定である。日本においても、生体分子の3次元再構成を始めとする電子顕微鏡画像処理法のコミュニティが立ち上がっていくことが筆者の希望である。

ナノ以下の構造から、マイクロメータを超える構造を、シームレスに観ることができる電子顕微鏡法はこれからも必要とされるし、一方で、著者らも又、電子顕微鏡法をシーズとして、ユーザーのニーズを掘り起こすと共に、新しいニーズを創発し、新しいアプリケーションを提供し、新たなユーザーを開拓し続けることが必要であろう。まだまだ、電子顕微鏡法の可能性はあると信じてやまない。

文 献

- 1) Frank, J.: Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies. Oxford University Press, New York (2006)
- 2) 岩崎憲治, 光岡 薫, 安永卓生: 長谷俊治, 高木淳一, 高尾敏文(編) タンパク質をみる一構造と挙動, 197-226 (2009)
- 3) Chiu, W., Baker, M.L., Jiang, W., Dougherty, M. and Schmid, M.F.: *Structure*, 13(3), 363-372 (2005)
- 4) Bostina, M., Bubeck, D., Schwartz, C., Nicastro, D., Filman, D.J. and Hogle, J.M.: *J. Struct. Biol.*, 160, 200-210 (2007)
- 5) Penczek, P.A., Renka, R. and Schomberg, H.: *J. Opt. Soc. Am. A*, 21, 499-509 (2004)
- 6) Harauz, G. and van Heel, M.: *Optik*, 73, 146-153 (1986)
- 7) Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A. and Frank, J.: *J. of Microscopy*, 141, RP1-RP2 (1986)
- 8) Deans, Stanley R.: The Radon Transform and Some of Its Applications, John Wiley & Sons, New York (1983)
- 9) Gilbert, H.: *J. of Theor. Biol.*, 36, 105-117 (1972)
- 10) Penczek, P., Radermacher, M. and Frank, J.: *Ultramicroscopy*, 40, 33-53 (1992)
- 11) Gordon, R., Bender, R. and Herman, G.T.: *J. of Theor. Biol.*, 29, 471-481 (1970)
- 12) Marabini, R., Herman, G.T. and Carazo, J.M.: *Ultramicroscopy*, 72, 53-65 (1998)
- 13) Zhu, J., Penczek, P.A., Schröder, R. and Frank, J.: *J. Struct. Biol.*, 118, 197-219 (1997)
- 14) Van Rijnsoever, C., Oorschot, V. and Klumperman, J.: *Nature Methods*, 5, 973-980 (2008)
- 15) Nishino, Y., Yasunaga, T. and Miyazawa, A.: *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, 53(3), 93-101 (2007)
- 16) Kato, M., Ito, T., Aoyama, Y., Sawa, K., Kaneko, T., Kawase, N. and Jinnai, H.: *J. Polymer Sci.*, 45(6), 677-683 (2007)
- 17) Ohta, K., Sadayama, S., Togo, A., Higashi, R., Tanoue, R. and Nakamura, K.: *Micron*, 43(5), 612-620 (2012)
- 18) Smith, R. and Carragher, B.: *J. Struct. Biol.*, 163(3), 224-228 (2008)
- 19) Carragher, B. and Smith, P.R.: *J. Struct. Biol.*, 116(1), 2-8 (1996)
- 20) Yasunaga, T. and Wakabayashi, T.: *J. Struct. Biol.*, 116(1), 155-160 (1996)
- 21) WIKIBOOKS: http://en.wikibooks.org/wiki/Software_Tools_For_Molecular_Microscopy