

氏名	木 森 義 隆		
学位の種類	博 士 (情報工学)		
学位記番号	情工博甲第183号		
学位授与の日付	平成18年9月30日		
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	急速凍結電子顕微鏡画像を用いた蛋白質分子の構造解析手法の開発		
論文審査委員	主査	助教授	安 永 卓 生
		教授	宮 本 茂 昭
		”	皿 井 明 倫
		助教授	大 橋 健
		教授	片 山 栄 作 (東京大学)

学位論文内容の要旨

生命活動の大部分を担う蛋白質あるいはその複合体は細胞内外で働くナノスケールの分子機械であり、それぞれが単独で、あるいは互いに連携して正しくその役割を果たす。蛋白質の基本的な性状を知るための柱の1つが立体構造の解析である。電子顕微鏡による構造解析法は結晶化しない分子も対象とできるため適用範囲が広く、画像解析システムの発展に伴って著しく進歩した。1980年代初頭にFrankらにより開発された単粒子解析法は、画像の相互相関法に基づく類似度判定により、視野中の個々の分子像を形状別に分類し、それぞれを平均化した後、再構成する手法である。クライオ電子顕微鏡法を組み合わせたこの手法は標準的な構造解析手法の1つとして世界中で多用される。一方、2002年末には、Baumeisterらによって細胞のごく薄い部分をクライオ電子顕微鏡法と逆投影法で再構成して、生きた細胞中の細胞骨格などの分子構築を3次元再構成する試みが初めて報告された。しかし、原理的には申し分のないクライオ電子顕微鏡法も、蛋白質の許容電子線照射量による制約から原画像のS/N比が極めて低く、高分解能を得るには数千から数万に至る膨大な数の均一な粒子の画像を平均化する必要がある。このため分子機械の働きの本質に関わる柔軟性や揺らぎあるいは機能遂行中の構造変化など、重要な構造情報は失われる。そのような情報を得るには、機能中の1個1個の分子を可視化して平均化を経ずに解析することが必須である。溶液中の蛋白質分子や、*in situ*の組織・細胞中における個々の蛋白質分子を1ミリ秒以内の一瞬に凍結固定し、その形状を高いコントラストと高い空間分解能で捉える急速凍結ディープエッチ・レプリカ（以下フリーズレプリカ）電子顕微鏡法はそれが実現できる数少ない、あるいは唯一の手法であろう。その試料の像に見られる機能中の蛋白質分子のスナップショットを素材として詳細な構造解析を行うことにより、蛋白質内部の揺らぎや機能に伴う微妙な構造変化、構成成分間の相互作用など、他の手法では取得不可能な構造情報を評価できる可能性がある。分子の動きや揺らぎがその機能に直結するに違いない分子モーター蛋白質を当面の材料として、生命の維持に不可欠な蛋白質の構造動態を解析する手法を確立し、機能発現におけるその役割を理解することが本研究の最終目標である。目標達成のためには実際の蛋白質分子の構造変化の特性を定量的に評価する必要がある。蛋白質の結晶構造は標準エネルギー状態における平均的な構造と思われ、サブドメインや2次構造の配置、温度因子による揺らぎの程度など、様々な構造情報が付与されている。蛋白質のフリーズレプリカ像を結晶構造と比較対応できれば、それらの情報を、溶液中で機能遂行中の蛋白質の解析に反映させることも可能であろう。本研究では、蛋白質の構造を反映し、異なる質感を有する画像間のマッチングを、計算機を用いて実現するためのシステムを開発した。これは、マシンビジョンの重要な課題を、電子顕微鏡画像に特化して解決を目指すものでもある。

フリーズレプリカ試料は対象分子を回転しながらその表面に重金属微粒子を蒸着(シャドウイング)したものであり、蛋白質表面の凹凸プロファイルを反映すると想定される。それに対応し、結晶構造を表わす原子モデル表面の凹凸プロファイルを最も迅速に画像化するために多方向から光を照射した

状況を想定して計算機上でシミュレーションを行い、実際のレプリカ像を、様々な方向から見たモデルの表面像と比較することで、実像がどの視点からの投影であるかを推定できると考えた。しかし、レプリカ像とモデル像は生成原理が異なるため画質も異なり、単純な相関法による直接比較はできない。そこで、従来のフーリエ解析法とは異なる新たな画像処理法を導入し、レプリカ像とモデル像からそれぞれの特徴パターンを抽出して両画像の画質を均質化する前処理の後、それらを照合してその類似度を評価する新たな手法を開発した。

本手法の特長は、蛋白質分子の輪郭、サブドメイン配置で構成される蛋白質表面の凹凸パターン、分子領域の面積など、幾何学的な形態情報を照合の特徴量として用い、パターン認識を得意とする人間の脳の特性に倣って認識過程を多段階に分け、それぞれのパターンの類似度の評価を統合して照合を行ったことである。構造情報の抽出には Mathematical morphology に基づく非線形フィルタを考案した。これにより、画像の輝度レベルや局所的な濃淡のむらにかかわらず、幾何学的な特性を鑑みた特定領域を抽出し、画像を波形信号として扱うフーリエ法の代わりに人間の脳における認識過程に類似の幾何学的処理を実現した。その結果、蛋白質表面の機能部位や相互作用部位など生物学的意義に関わる構造要素をレプリカ画像中で同定することが可能になった。

対象分子の観察方向を決めるために、まず両画像間で蛋白質分子の輪郭の類似度を比較し、その値の高いモデル像について、実像と一致する領域の面積と表面パターンの類似度を比較した。この工夫により、従来の1段階のみの認識システムに比して、パターン認識能力が高く、劣化に対して頑強なシステムとなった。

上記の手法を、代表的な分子モーターであるミオシン頭部のフリーズレプリカ像に適用し、その有効性を検証した。ミオシン分子の観察方向の推定ならびにコンフォメーションの識別、さらにはサブドメインの同定も可能となった。本手法により、機能遂行中の蛋白質分子の構造の揺らぎを定量的に計測できる可能性も現実味を帯びてきた。今後は、複合体中の蛋白質などより複雑な系に適用できるように改良を重ね、参照モデルとの微妙な形状の差異の検出や、複合体中の別の構成要素との結合様式の解析などを可能とする、より包括的アルゴリズムの構築を目指す。

学位論文審査の結果の要旨

生命活動を担う蛋白質あるいはその複合体は細胞内外で働くナノスケールの分子機械であり、それぞれが単独で、あるいは互いに連携してその役割を果たす。機械の作動原理を理解するためには、その構成部品である各蛋白質の立体構造の解析が不可欠である。蛋白質分子の形状を直接画像化できる電子顕微鏡を用いた構造解析法は、結晶化できない蛋白質でも対象となるため適用範囲が広く。画像解析システムの発展と相俟って、近年著しく進歩してきた。著者は、溶液中や *in situ* の組織・細胞中における個々の蛋白質分子を1ミリ秒以内に凍結固定し、その形状を高いコントラストと高い空間分解能で捉えることのできる急速凍結ディープエッチ・レプリカ電子顕微鏡法（以下、フリーズレプリカ法）により得られた蛋白質画像からの新たな構造解析方法を検討した。

フリーズレプリカ法を用いれば機能中の蛋白質1分子のスナップショットを捉えられるため、蛋白質内部の揺らぎや機能に伴う微妙な構造変化、構成成分間の相互作用など、他の手法では取得不可能な構造情報を評価できる可能性がある。著者は分子の動きや揺らぎが機能に直結する分子モーター蛋白質を対象に、レプリカ画像から対象の構造動態を解析する手法を確立し、機能発現におけるその役割を理解することを目標とした。本論文で、著者は、電子顕微鏡で得られた実画像と原子モデルから作成した人工画像間のマッチングにより両者の異同を定量的に評価するためのシステムを開発した。これは、マシン・ビジョンを、電子顕微鏡画像に特化して解決を目指すものといえる。

電子顕微鏡観察用のレプリカ試料は、材料を回転しながらその表面に重金属微粒子を蒸着して得られるので、蛋白質表面の凹凸を反映すると想定される。そこで著者は、結晶構造より得られた原子モデル表面の凹凸を表わす計算機シミュレーションを行い、様々な方向から見たモデルの表面像を構築し、レプリカ像がどの視点からの投影であるかを推定する試みを行った。レプリカ像とモデル像は生成原理が異なるため画質も異なり、単純な相関法による直接比較は困難であった。そこで著者は、従来のフーリエ解析法とは異なる新たな画像処理法を導入し、レプリカ像とモデル像から特徴パターン

を抽出し両画像を同一質画像に前処理後、その類似度を評価する新たな手法を開発した。

著者が開発した手法の特長は、蛋白質分子の輪郭、サブドメイン配置で構成される蛋白質表面の凹凸パターン、分子領域の面積など、幾何学的な形態情報を照合の特徴量として用い、パターン認識を得意とする人間の脳の特性に倣って認識過程を多段階に分け、それぞれのパターンの類似度の評価を統合して照合を行うことにある。また、構造情報を抽出するために、Mathematical morphology に基づいた非線形フィルタを考案した。これにより、幾何学的な特性に基づいた特定領域の抽出に成功し、また、人間の脳における画像認識過程に類似の幾何学的処理を実現した。これにより、蛋白質表面の機能部位や相互作用部位など生物学的意義に関わる構造要素をレプリカ画像中で同定することを可能とした。更に、対象分子の観察方向を決定するために、蛋白質分子の輪郭の類似度、実像と一致する領域の面積と表面パターンの類似度を多段に用い、従来の 1 段階のみの認識システムに比して、パターン認識能力が高く、画像の劣化に対して頑強なシステムを構築した。

上記の手法を、代表的な分子モーターであるミオシン頭部のフリーズレプリカ像に適用してその有効性を検証した。ミオシン分子の観察方向の推定ならびにコンフォメーションの識別、分子内サブドメインの同定も可能であった。

上述のように、著者は、フリーズレプリカ像の解析法として、蛋白質の向き及び構造の違いを認識するための新しい画像処理法とシステムを構築した。更に、その有効性を実際の画像を用いて検証した。このことは、電子顕微鏡による分子構造解析に新たな手法を付加し、生物機能発現の分子メカニズムの解明に有効な手段となりうると判断する。主目的である生命機能の研究の一方で、像の回転を考慮した非線形フィルタなど、他の種々の領域にも応用が可能な新規アルゴリズムを開発している。

よって、本論文は博士（情報工学）の学位論文に値するものと認めた。

本論文に関し、調査委員から、解析方法の新規性とその検証、結果の生物学的意義や今後の進展の可能性などについて質問がなされたが、いずれも著者から満足（明確）な回答が得られた。また、多数の出席者があった公聴会においても種々の質問がなされたが、いずれも著者の説明によって質問者の理解が得られた。

以上の結果により、著者は試験に合格したものと認めた。

以上により、論文調査及び最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が、博士（情報工学）の学位に十分値するものであると判断した。