

# クライオ電子顕微鏡用の試料調製とデータ収集

大嶋篤典

名古屋大学細胞生理学研究センター/名古屋大学大学院創薬科学研究科

世界的な広がりを見せるクライオ電子顕微鏡の単粒子解析は、タンパク質の構造研究において不可欠な手法となりつつある。近年この分野の高分解能化は、データ取得の自動化、ソフトウェアや高性能カメラの開発など、いくつもの要素が合わさって実現されているが、試料調製やクライオ電子顕微鏡像の評価も高分解能に到達するための重要な要素である。特に試料調製においては、対象とするタンパク質そのものの性質やタンパク質が含まれる溶液条件、温度や湿度といった作業環境条件など多くの要素に左右され、絶対的な方法が確立されていないことから、新規タンパク質を対象とした場合は試行錯誤が必要になることが少なくない。膜タンパク質を対象とした場合、通常可溶化段階で界面活性剤が用いられる。この時混入してくるフリーの界面活性剤ミセルはクライオ電子顕微鏡の試料調製の際に支障をきたすことがある。これまでも膜タンパク質を変性させることなく界面活性剤ミセルをできるだけ除去する方法を用いて、膜タンパク質の高分解能構造解析に成功した例が複数報告されている(Liao *et al.* 2013, Gao *et al.* 2016 他)。本研究ではすでに構造解析の報告を行った **innexin-6(INX-6)** を例として、高分解能構造解析に至るために試料調製においてどのような工夫を行い、またどのようなクライオ電子顕微鏡像を取得すると結果が改善したか、を実践的な視点で紹介する。具体的には界面活性剤除去法として **GraDeR**(Hauer *et al.* 2015)を利用した時のクライオ電子顕微鏡像と、取得したクライオ電子顕微鏡像を取捨選択する際にどのような判断基準でクオリティを評価していたか、などを実際に得られたデータを交えて紹介する。本研究で紹介する内容はすべてのタンパク質試料に適用可能とは限らないが、今後クライオ電子顕微鏡を用いてデータを取得する際の参考にさせていただきたい。