

クライオ電子線トモグラフィ法による真核生物鞭毛の構造解析

3D Structural Analysis of Eukaryotic Flagella by Electron Cryo-tomography

石川 尚

Takashi Ishikawa

スイス連邦工科大学チューリヒ校

要旨 クライオ電子線トモグラフィ法はタンパク質や核酸の生体内での立体構造を解析できる手法として近年注目を集めている。本稿では筆者らが行っている真核生物鞭毛を例に解説し、クライオ電子線トモグラフィ法の手法と生物学的意義について議論する。

キーワード：クライオ電子顕微鏡法、電子線トモグラフィ、鞭毛、ダイニン

1. はじめに

1.1 クライオ電子線トモグラフィ法とは

生命機能のメカニズムを解明する上で、各々の機能を担う生体高分子の立体構造情報は欠かせない。三次元電子顕微鏡法は透過型電子顕微鏡像を画像解析して三次元構造を再構成する手法であり、特に氷包埋の試料を用いるクライオ電顕法は無染色、無固定で生きた分子のスナップショットを観察できる手法として広く用いられている。二次元結晶やチューブ状結晶を用いた解析では生体高分子の構造・機能連関をアミノ酸残基レベル（または塩基レベル）で議論することを可能にし、また結晶化が不要な単粒子解析では、複合体形成やその動的変化を議論することができる¹⁾。条件を整えば単粒子解析でも7-8 Åの分解能が得られ（球状ウィルスのように高度の対称性を持つ試料の場合、単粒子解析でも原子レベルの構造解析が可能な場合もある）二次構造レベルで生体高分子の機能を論ずることができる。このように三次元電子顕微鏡法はX線結晶構造解析やNMRと共に、生体高分子またはその複合体の三次元構造を解析してそれらの分子の機能を論ずるという目的に大きく貢献してきた。

一方、これらの生体高分子は実際の細胞の中で複雑な相互作用を伴って高次の機能を実現する。例えば後述する真核生物の鞭毛では300種類以上のタンパク質が共存し、屈曲運動とその制御を行っている²⁾。このような高次機能のメカニズムを解明するには単体としての分子や分子複合体の情報だけでは足りず、多様な分子のネットワークを解明しなければならない。システムバイオロジーはこれらのネットワークを機能的に解明しようとする新しい学問領域だが、構造生物学に

においても多彩な分子の相互作用を三次元で可視化することが高次機能の解明に多大な貢献をもたらす。電子線トモグラフィ法はこのような要望に応じて登場した、細胞内・組織内の複雑な生体高分子の構造と相互作用を透過型電顕で三次元的に解析する手法である。

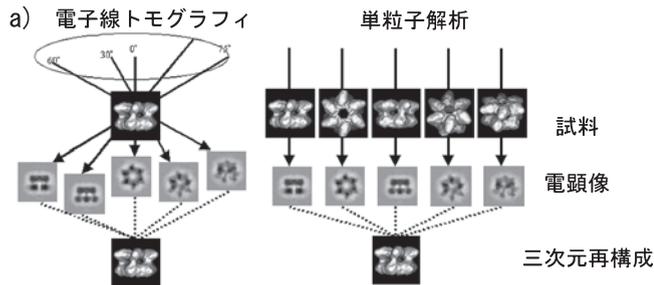
無染色試料を傾斜連続撮像して立体構造を計算するというクライオ電子線トモグラフィ法のアイデア自体は1960年代にまで遡ることができる³⁾。しかし、現実には液体窒素温度で傾斜のできる安定したステージ、電子線損傷を最小限に抑えるためのレンズ・コイルの外部制御、極低電子線量照射でもコントラストを得るための電子銃や対物レンズ、CCDカメラなどが完成してようやく現実的な技術となった。マックス・プランク研究所のBaumeisterの研究室で多くの技術が開発され、遂に無染色・氷包埋の細胞性粘菌内部の分子の三次元構造、配置が発表されたのが2002年のことである^{4,5)}。

図1に電子線トモグラフィ法と単粒子解析法の比較を示した。どちらも結晶化なしに溶液中の構造を撮像するという点は共通しているが、試料の三次元密度を二次元に投影したものである電顕像を三次元構造に再構成する戦略が異なっている。単粒子解析では、精製した多数の粒子を（通常は1回だけ）撮像し、それらの粒子が同一の三次元構造をランダムな方向に投影したものである、という仮定に基づいて、三次元構造と各粒子の方向のつじつまが合うように解析する。一方電子線トモグラフィは1つの対象を鏡筒の中で傾斜しながら撮像を続け、異なる角度からの投影像を統合することで三次元構造を得る。

1.2 クライオ電子線トモグラフィ法の実際

クライオ電子線トモグラフィ法を行う際には通常のクライオ電顕に必要な設備（アンチコンタミネーター、クライオホルダー）に加えて高傾斜できるステージ、CCDカメラ（後述）、電子線損傷を最小限に抑えるための外部制御ソフトが必要となる。目指す分解能によっては電界放射型電子銃が必須だろ

Schafmattstrasse 20, CH8093 Zurich, Switzerland
TEL: +41 44 633 2463
E-mail: takashi.ishikawa@mol.biol.ethz.ch
2009年11月17日受付



b)	電子線トモグラフィ	単粒子解析
三次元再構成の原理	1つの対象をさまざまな角度に傾斜し、複数回撮像して合成する	多数の粒子像を1度撮像し、同一の三次元構造の異なる方向からの投影という仮定の下に合成
結晶化	不要	不要
構造の不均一性があった場合	多様性が可視化される	平均化されて見えなくなる
分解能	~35 Å	~8 Å (対称性がない場合)
構造情報の欠損	Missing wedge (1軸ホルダー) または Missing pyramid (2軸ホルダー)	なし (粒子がランダムな向きを取る場合)

図1 単粒子解析法と電子線トモグラフィ法の比較

うし、傾斜時に試料が厚くなることを考えれば 200 kV (細胞をそのまま見る場合のようにもともと厚い試料に対しては 300 kV) の加速電圧が必要であろう。1つの試料に対して少なくとも数十回の電子線照射を行う関係上、毎回の撮像は極低電子線量 (筆者らの研究では $0.5 \text{ e}^-/\text{Å}^2$ 程度の電子線照射を行っている) で行われなければならない。一方、電頭像の位置あわせをするには少なくともマーカーとして加える金粒子が確認できる程度のコントラストが必須である。極低電子線量とコントラストの両条件を満たすには、高感度の CCD カメラ (厚いシンチレーターを持ったカメラの方が1個の電子線から多数の光子が生成されるので高感度となる。一方二次電子のために分解能は落ちる) が好ましい⁶⁾。単粒子解析や二次元結晶、チューブ状結晶を用いて高分解能を目指す研究にはむしろ薄いシンチレーターを備えた高分解能仕様の CCD カメラが向いているので、1台の顕微鏡で両方のプロジェクトを進める場合、ハードウェアの選定は悩ましいこととなる。

トモグラフィのためのデータ収集では、試料を傾斜しながら焦点を合わせ、また傾斜時に機械的ヒステリシスによって生じる水平方向の移動を評価し、電子ビームを移動させて常に対象が視野の中にあるようにしなければならない。クライオ電子線トモグラフィの場合は、電子線損傷を最小にするためにそれらのプロセスを対象より数ミクロン離れた場所 (Focus mode) で行う。また、三次元再構成では、傾斜角の異なる低コントラストの電頭像を、傾斜前後の像の相関と金コロイドの位置を用いて合わせる。これらのアルゴリズムは既によく確立されていて、SerialEM/IMOD 等のフリーウェアとして配布されている^{7,8)}。また FEI、日本電子各社も自社製の制御ソフト・再構成ソフトを販売している。

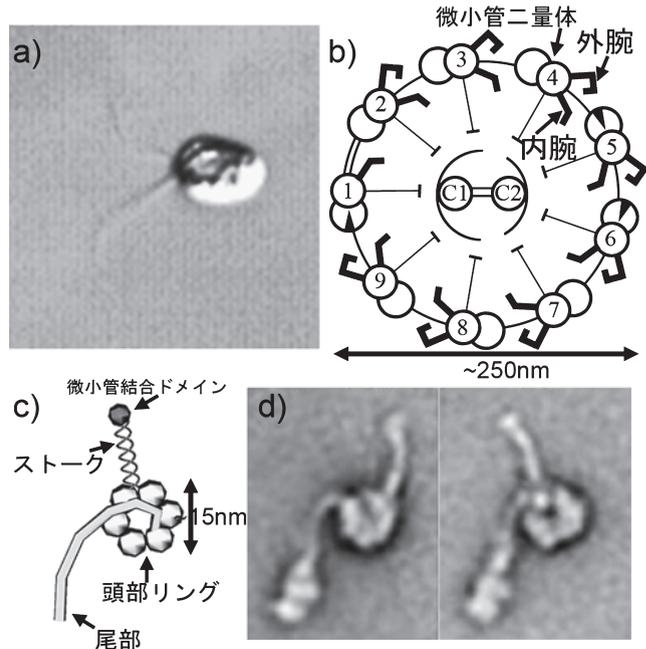


図2 鞭毛ダイニン a) 緑藻クラミドモナスの微分干渉頭微鏡像。左側に2本の鞭毛が見える。大岩和弘・榎原斉博士 (NICT) のご好意による。b) 鞭毛断面の模式図。c) ダイニン分子の模式図。d) Burgess 等によるダイニン分子の電頭像の平均。左: スクレオチド存在下。右: 非存在下。d) は文献 11 より転載。

2. 真核生物鞭毛の構造解析

2.1 真核細胞の鞭毛

この章では筆者らが実際にクライオ電子線トモグラフィ法を用いて行った真核生物鞭毛の構造解析について解説する。真核生物の鞭毛は長さ 5 ~ 10 ミクロン、径 0.3 ミクロンで屈曲運動を行う (図 2a)。種や器官、運動の条件によって屈曲の波形が異なる (例えば緑藻クラミドモナスの鞭毛運動は平泳ぎのような非対称型だが、精子の鞭毛は対称型である) が、「9+2 構造」と呼ばれる、9本の微小管二量体が2本の微小管を車輪状に取り囲む構造は共通である (図 2b)。屈曲運動の原動力はダイニンという ATP 加水分解性タンパク質による微小管二量体上の滑り運動によることがわかっている。ダイニンは1分子につき 4,500 以上のアミノ酸からなる巨大タンパク質で、鞭毛の中では外腕・内腕と呼ばれる複合体を構成している。8分子のダイニンによって構成される内腕が波形の決定や屈曲の制御に重要なものに対し、3分子のダイニンからなる外腕は力発生・速度・屈曲の増幅に必要らしい⁹⁾。それぞれのダイニン分子は ATP 加水分解を行う頭部リングから尾部とストークが突き出した構造をとっている (図 2c)。尾部は1本の微小管二量体上に固定され、ストークが隣の微小管二量体と動的に相互作用して、2本の微小管の滑り運動を引き起こすことが知られているが、ダイニン自体の滑り運動のメカニズムも、ダイニン1分子の滑り運動が統合されて鞭毛全体の屈曲運動を生じるメカニズムも未だわかっていない。

2.2 鞭毛ダイニンの電頭による構造解析の現状

ミオシンやキネシンなど他のモータータンパク質の滑り運動に比べてダイニンの滑り運動のメカニズムの解明が遅れているのは、ダイニンの分子量（ミオシン・キネシンの力発生部分がそれぞれ約 900 残基、350 残基なのに対して、ダイニンは 4,500 残基）と尾部、ストークなど柔軟な領域が多いことが結晶化を困難にしているからである（現在のところ 125 残基の微小管結合ドメインだけが結晶化されている¹⁰⁾）。しかし巨大さはむしろ三次元電子顕微鏡法を行う際には利点となる。実際今までダイニンの構造解析はこれまで主に電子顕微鏡法、特に単粒子解析で行われてきた。図 2d は Burgess らが精製し負染色したダイニン分子の電頭像を分類・平均した結果である¹¹⁾。ヌクレオチド非存在下ではストークと尾部が頭部リング上のほぼ同じ位置から伸びているのに対し、ヌクレオチド存在下では両者が 90 度以上の角度を持って頭部から出ているのがわかる。また上野らは精製したダイニンを微小管に再結合させ電頭像の二次元平均からダイニンの微小管上でのヌクレオチドによる構造変化を観察した¹²⁾。水野らはダイニンの微小管結合ドメインを微小管に結合させ、らせん対称性を用いた三次元再構成を行うことで微小管上のダイニン結合部位を特定した¹³⁾。

2.3 鞭毛のクライオ電子線トモグラフィで明らかになったこと

我々は氷包埋の鞭毛の電子線トモグラフィを行い、精製など生化学的なプロセスを経ない、生理的条件下にある鞭毛の

三次元構造を解析した^{14,15)}。得られた鞭毛の三次元構造（トモグラムと呼ぶ）からは「9+2 構造」がはっきりと見て取れる（図 3b にトモグラムの垂直断面を示す）。また、水平断面からは既に超薄切片の電頭観察から明らかになっているようなダイニン外腕・内腕の繰り返し構造が観察できた（図 3c）。このような構造は二次元投影である電頭像（図 3a）ではなく三次元再構成されたトモグラムにしてはじめて観察できる。S/N 比を高め高分解能での議論を行うために、この繰り返し構造と 9 本の微小管二量体の車輪上構造は大きな助けになる。我々は繰り返しのユニットを計算機上で切り出し（サブトモグラム）平均化を行った。鞭毛内の微小管は緩やかに曲がっている。このためサブトモグラムは必ずしも同じ方向を向いているわけではない。2 つのサブトモグラムの三次元相関に基づき相対的な方向を計算する（アラインメント）のだが、この時間問題になるのが Missing wedge である。トモグラフィのデータ収集では試料を一定角度以上（我々の装置では 60 度）傾斜できないので収集できない領域が生じる（図 1b）。1 軸で傾斜する場合この領域は三次元フーリエ空間の中で楔形になるので Missing Wedge という（2 軸で傾斜できる電頭では失われる領域はピラミッド型になる）。図 3b の微小管が円形でないのは Missing Wedge による歪みである。2 つのサブトモグラムの中の微小管二量体は異なる方向を向いているので、Missing Wedge の方向も異なることになる。アラインメントのためには、異なる方向に歪みを受けている三次元像の相関を計算するので、Missing Wedge の方向

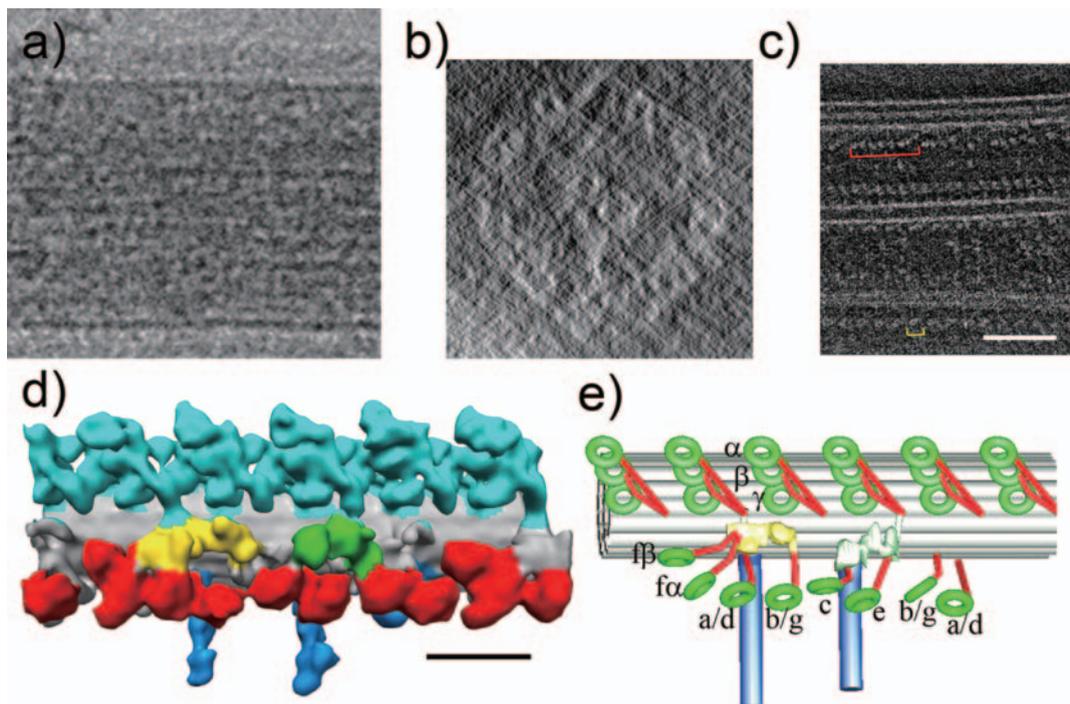


図 3 鞭毛のクライオ電子線トモグラフィ。 a) 氷包埋した鞭毛の電頭像。 b) トモグラムの垂直断面 (図 2b に対応)。 c) 水平断面。内腕の 96 nm 周期と外腕の 24 nm 周期を赤・黄で示した。バーは 100 nm。 d) サブトモグラムの平均像。バーは 25 nm。青：外腕。赤：内腕。灰色：微小管二量体。 e) d) を基にした鞭毛内のダイニン分子の構造・配置のモデル。内腕・外腕のダイニン 11 分子を示した。緑が頭部リング、赤が尾部。 c, d) は文献 15 より転載。

を考慮に入れつつフーリエ空間内で双方のサブトモグラムが情報を保持している部分だけで相関を取ることになる。20本の鞭毛のトモグラムから1000個以上のサブトモグラムを抽出し、三次元でのアラインメントと平均を行った結果が図3dである。この解析の場合、1本の鞭毛の中には9本の異なる方向を向いた微小管二量体があるため、最終的な平均像にはMissing wedgeによる歪みは存在しない。

平均化により外腕、内腕など、鞭毛を構成するタンパク質複合体が37Åの分解能で明らかになった(図3d)。我々は緑藻クラミドモナスの変異体の三次元構造を解析することで、これらダイニンの位置と形態を明らかにすることができた(図3e)。外腕を構成する3分子のダイニン(α, β, γ)は3つの頭部リングが縦に重なるのに対し、内腕の中にあるダイニンのうち2分子は微小管の表面近くで二量体を形成し(ダイニンf)、その他6分子(a-e, g)の頭部リングは横(水平)に並んでいる。頭部リングはほぼ微小管二量体の表面に平行だが、若干のぼらつきがあり、これら異なる方向の組み合わせが鞭毛波形に影響するのもかもしれない。尾部は外腕、内腕のダイニンとも鞭毛の先端方向に伸びている。ポート競技で数人の漕ぎ手が同じ方向にオールを漕いでいるかのようである。

2.4 「9+2 構造」は対称ではない

図2bで示したように鞭毛には9本の微小管二量体が車輪のような配置で存在する。ところが鞭毛運動の波形は9回対称ではない。緑藻クラミドモナスの鞭毛も精子の鞭毛も平面内で運動する。9本の微小管の間でどのようにして対称性が破れるのであろうか?この疑問は9本の微小管上のダイニンの配置を比較することで解明された¹⁶⁾。緑藻クラミドモナスは2本の鞭毛を平泳ぎのような波形で動かして(非対称波形)前方に進むが、それぞれの鞭毛を構成する9本の微小管二量体のうち、もう1本の鞭毛にもっとも近い微小管を1番と名づけ、それ以外を順に2, 3...と呼ぶことにする(図4c)。それぞれの微小管二量体から切り出したサブトモグラムを別々に平均すると、明らかな違いが現れた。微小管2番から8番までは3分子の外腕ダイニンと8分子の内腕ダイニンを全て備えている。それに対して微小管9番は1つの内腕ダイニンを欠いている(図4a)。微小管二量体1番は更に大きな違いを持つ。外腕を完全に欠き、内腕ダイニンのうち3分子が2-8番で見られる位置に存在しない。このようなダイニン分子の配置の異常は、微小管二量体間の滑り運動が、9番と1番、それに1番と2番の間で他の組み合わせより弱いことを示唆している。9本の微小管二量体間の差異はダイニンの配置に留まらない。図4bで示したのは微小管二量体間をつなぐリンカーと呼ばれるタンパク質の三次元構造である。古くから知られていたネクシンと呼ばれるリンカーは9本全ての微小管二量体間に存在している。しかし、今回クライオ電子線トモグラフィ法によって、新たに2つのリンカーが発見された。これらのリンカーはそれぞれ微小管二量体の9番と1番、1番と2番、それに5番と6番の間にしか存在しない。リン

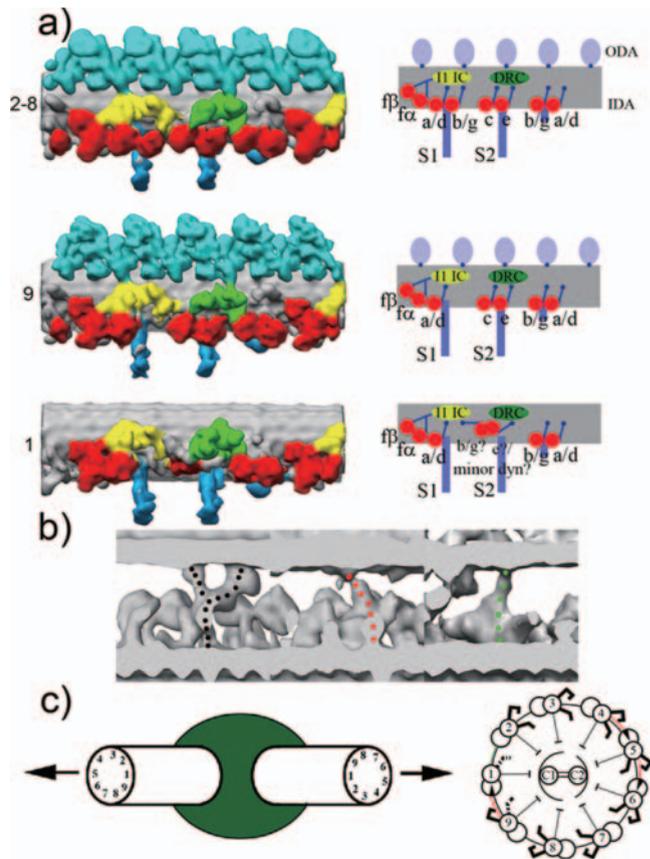


図4 9本の微小管二量体上のダイニン分子の配置の違い。a) 微小管二量体2番から8番、9番、1番をそれぞれ別々に平均したものの、トモグラムの平均を左、分子配置のモデル(内腕の8分子のダイニンはa-gで示している)を右に示す。b) 隣り合う微小管二量体をつなぐリンカー。黒点線:全ての二量体間に存在するネクシン。赤:9番と1番, 4番と5番, 5番と6番の間にのみ存在するリンカー。青:1番と2番の間にのみ存在するリンカー。c) それぞれの二量体の番号付けと非対称な分子配置。リンカーはb)と同じ色で、内腕の欠損は点線で示した。a-cは文献16より転載。

カーが存在する場所をプロットすると、鞭毛運動の起きる平面上にこれら新たに見つかったリンカーが存在し、従って運動を水平方向に限定していることがわかる(図4c)。一方、ダイニンが欠損している9番と1番の微小管二量体は反対側(5番)に比べて滑り運動が弱いいため、クラミドモナスの鞭毛運動は非対称な波形をとるのであろう。

3. 展 望

本稿で示したようにクライオ電子線トモグラフィ法は、生体高分子の立体構造を精製なしに細胞内で観察できる手法である。三次元構造を分子間相互作用やネットワークと共に議論できる点で画期的であり、いわば分子生物学と細胞生物学を橋渡しする技術である。しかし残念ながら、現在のクライオ電子線トモグラフィの技術では原子レベルはおろか二次構造レベル(7-8Å)の分解能すら得ることができない。数十回にわたる電子線照射による損傷とMissing Wedgeによる情

報欠損が大きなネックになっている。これらの問題を解決し高分解能を得るには、高感度・高分解能のカメラや、コントラストを増幅できる光学系など、電顕ハードウェア技術の飛躍的發展が望まれる。

文 献

- 1) J. Frank: Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies: visualization of biological molecules in their native state, Oxford University Press, Oxford (2006)
- 2) Pazour, G.J., Agrin, N., Leszyk, J. and Witman, G.B.: *J. Cell Biol.*, 170, 103–113 (2006)
- 3) Hart, R.G.: *Science*, 159, 1464–1467 (1968)
- 4) Baumeister, W., Grimm, R. and Walz, J.: *Trends Cell Biol.*, 9, 81–85 (1999)
- 5) Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G. and Baumeister, W.: *Science*, 298, 1209–1213 (2002)
- 6) Mooney, P.: *Methods Cell Biol.*, 79, 661–719 (2007)
- 7) Mastronarde, D.N.: *J. Struct. Biol.*, 152, 36–51 (2005)
- 8) Kremer, J.R., Mastronarde, D.N. and McIntosh, J.R.: *J. Struct. Biol.*, 116, 71–76 (1996)
- 9) Kamiya, R.: *Int. Rev. Cytology*, 219, 115–155.
- 10) Carter, A.P., Garbarino, J.E., Wilson-Kubalek, E.M., Shipley, W.E., Cho, C., Milligan, R.A., Vale, R.D. and Gibbons, I.R.: *Science*, 322, 1691–1695 (2009)
- 11) Burgess, S.A., Walker, M.L., Sakakibara, H., Knight, P.J. and Oiwa, K.: *Nature*, 421, 715–718 (2003)
- 12) Ueno, H., Yasunaga, T., Shingyoji, C. and Hirose, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 19702–19707 (2008)
- 13) Mizuno, N., Toba, S., Edamatsu, M., Watai-Nishii, J., Hirokawa, N., Toyoshima, Y. and Kikkawa, M.: *EMBO J.*, 23, 2459–2467 (2004)
- 14) Ishikawa, T., Sakakibara, H. and Oiwa, K.: *J. Mol. Biol.*, 368, 1249–1258.
- 15) Bui, K.H., Sakakibara, H., Movassagh, T., Oiwa, K. and Ishikawa, T.: *J. Cell Biol.*, 183, 923–932 (2008)
- 16) Bui, K.H., Sakakibara, H., Movassagh, T., Oiwa, K. and Ishikawa, T.: *J. Cell Biol.*, 186, 437–446 (2009)