

単粒子像解析法によって明らかにされた最小の生体分子構造体

Smallest Structure of Biological Macromolecular Complex Revealed by Single Particle Image Analysis

加藤 貴之^a, Russell P. Goodman^b, Christoph M. Erben^b, Andrew P. Turberfield^b, 難波 啓一^a
Takayuki Kato, Russell P. Goodman, Christoph M. Erben, Andrew P. Turberfield and Keiichi Namba

^a大阪大学大学院・生命機能研究科

^bオックスフォード大学物理学研究室

要旨 凍結氷包埋試料の低温電子顕微鏡を用いた単粒子像解析法は、生体超分子複合体など巨大な分子集合体の構造解析にその真価を発揮する。その反面、分子量 100 kDa 以下の小さな分子では、S/N の悪い写真に粒子像が埋もれてしまうため、解析は不可能であると言われてきた。我々は、分子量約 78 kDa の正四面体 DNA ナノ構造体の立体構造を単粒子像解析法を用いて解析した。さまざまな画像処理法を組み合わせて活用することで、DNA の二重らせん構造を解像し、設計上予想された 2 種類の立体異性体を区別するのに十分な、12 Å 分解能の構造解析に成功した。

キーワード：単粒子像解析法、正四面体 DNA ナノ構造、極低温電子顕微鏡、ナノテクノロジー

1. はじめに

低温電子顕微鏡を用いた単粒子像解析法は、構造生物学分野において極めて重要な構造解析手法の一つである。この方法は以下のような特徴と優位性を持つ。1) 分子を溶液ごと急速凍結し、非晶質の水の中に凍結包埋された分子を対象として解析を行うため、機能状態に近い立体構造を解析することができる。2) 結晶化など特殊な試料調製の必要がないため、試料に課せられる制限が緩い。3) 電子顕微鏡観察に必要な試料溶液はわずか数マイクロリットルで十分である。そのため極めて汎用性が高く、特に結晶化が困難な巨大な超分子複合体の解析にその真価を発揮する。欠点は、得られる構造の分解能が X 線結晶構造解析法や NMR 分光法に比べて低いことだが、その欠点も電子顕微鏡の様々な装置技術の進歩やコンピュータの大容量と高速化によって解消されつつある。最近では、正 20 面体対称性を持つウィルス粒子で約 4 Å^{1,2)}、対称性のないリボソームでも約 7 Å^{3,4)} で構造が解析されており、X 線結晶構造解析の分解能に迫ってきている。

このように非常に多くの利点を持つ単粒子像解析法であるが、分子量が 100 kDa 以下の小分子にはあまり適していない⁵⁾。その理由の一つは、電子顕微鏡写真の S/N の悪さに起因する。生体分子の構造は電子線照射に対して非常に弱く、わずかな電子線量でもその構造は破壊されてしまう。液体室

素や液体ヘリウムで試料を冷却し、試料の損傷反応を遅らせても、実際に照射できる電子線量は少なく、結果として写真の S/N は極めて低い。そのため小さな分子の像はノイズに埋もれ、粒子像の選択と抽出、粒子像間の正確な整列や分類が困難となる。もう一つの理由は、小さな分子では結晶化できる可能性が高く、結晶化スクリーニングに十分な量の試料があれば、あえて困難な単粒子像解析法による構造解析を行う必要性がないことである。これらの理由から小さな分子に対して単粒子像解析法の積極的な利用はあまり行われてこなかった。本稿では、一辺約 7 nm、分子量約 78 kDa という極めて小さな正四面体 DNA ナノ構造体を、さまざまな画像解析の工夫により 12 Å 分解能で構造解析に成功したので報告する。

2. 材料としての DNA

われわれの身の回りにあるすべての人工物は、大きくて純粋な材料を小さく加工していく“トップダウン”式の技術によって作製されている。この方法の微細加工精度には加工するための道具に依存した限界があり、機能を持った機械としては小さくてもマイクロメートルサイズが限界である。一方、生物は原子や分子を最小単位の機能部品として組み上げる“ボトムアップ”方式の技術によってできており、それらの持つ自己組織化能や自己集合能により高次の生命機能を実現する超分子複合体（ナノマシン）を作り出す。この“ボトムアップ”式では、部品を集めて混合するだけで同じナノマシンを大量生産できるため、時間コストもエネルギーコストも極めて低い。ボトムアップ式技術を用いて人工的にナノマシン

^a 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3
TEL: 06-6879-4625; FAX: 06-6879-4652
2009年2月24日受付

ンを作製するには、自己組織化能や自己集合能をどのようにコントロールするかが大きな問題となる。その材料として期待されているのが DNA である。

DNA は 4 種類の塩基配列の組み合わせによって相補鎖間の結合を厳密に制御することができ、しかも形成される二重らせんの直径は 2 nm と非常に小さい。このため、ボトムアップ方式で人工ナノマシンを作るのに適した材料である^{6,7)}。これまでに、DNA の自己集合能を使った 2 次元^{8,9)} あるいは 3 次元^{10~15)} のさまざまな構造体が作製され、ドラッグデリバリーのための DNA ケージ¹⁵⁾ や、蛋白質結晶作製のための鋳型¹⁶⁾、病気の診断¹⁷⁾、DNA コンピューター^{18,19)} など、幅広い応用が考え出された。ただし、DNA からなる構造体を実際に利用するためには、その DNA 構造体が設計図どおりに作製されていることを確認する必要があり、その評価の方法は極めて重要である。本研究では DNA ナノ構造体が設計どおりの構造を形成しているかどうかを評価するため、極低温電子顕微鏡を用いた単粒子像解析法によって構造解析を行った。

3. 正四面体 DNA ナノ構造体

図 1 に本研究で用いた正四面体 DNA ナノ構造体の設計図²⁰⁾を示す。この構造体は 4 種類の本鎖 DNA 各 1 本で構成されており、一本の DNA 鎖中に異なった 3 つの相補的塩基配列領域（両末端の 2 領域は一つと数える）を持つように作製されている。図中の同じアルファベットの大・小文字の組み合わせは相補鎖を表している。この 4 本の DNA を混ぜてアニーリングするだけで、互いに相補な部分が結合して正四面体構造が形成される。その後、構造安定化のためにライ

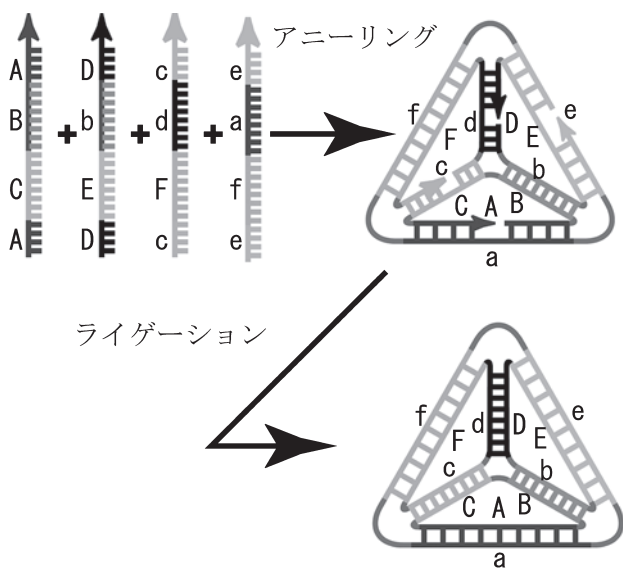


図 1 正四面体 DNA ナノ構造体の設計図。

正四面体 DNA ナノ構造体は 4 本の異なる一本鎖 DNA からなり、一本の DNA は 3 つの異なる相補配列領域を持っている。4 本の DNA を混合し、アニーリング、ライゲーションすることで正四面体 DNA ナノ構造体を作製することができる。

ゲーション処理を行ったが、正四面体 DNA ナノ構造体を作るためには、この工程は本来必要ではないため、省くこともできる。これまで使われた他の方法では、多くの精製過程を経て合成された長い一本鎖 DNA を用い、それを短い DNA でつなぐことによって構造形成させるため、収率が極めて悪い^{10~12)}。それに対してこの方法は、60 塩基程度の短い DNA を組み合わせることによって構造体を形成させるため、核酸合成をする会社に塩基配列を指定して注文するだけで材料を手に入れることができる。DNA は届いたときすでに高純度であるため、チューブから出して、混ぜてアニーリングするだけで構造体を作製できる。この方法は、過去に使われた DNA ナノ構造体作製技術の中で最も簡単で安価で、構造体自身も最も小さい。

4. 一辺 7 nm の正四面体 DNA ナノ構造体の電子顕微鏡観察

低温電子顕微鏡を用いた単粒子像解析による生体分子の構造解析が小分子には向かず、一般にその分子量の下限が 100 kDa 程度であることはすでに述べた。実際に、これまでに分解能 10 Å 程度で構造解析された最小分子は p53 tumor suppressor protein²¹⁾ で、その分子量は 180 kDa で分解能は 13.4 Å である。一方、本研究の標的分子である正四面体 DNA ナノ構造体はその半分以下の 78 kDa で、一般的な限界よりもさらに 20 kDa ほど小さい。構造解析に単粒子像解析法をよく用いられる分子と、塩基配列から予想された正四面体 DNA ナノ構造体との大きさの比較を図 2 に示す。中央が今回作製された DNA ナノ構造体（分子量 78 kDa）の予想立体構造で、左が GroEL-GroES 複合体（分子量 880 kDa）、右がリボソーム（分子量 2.5 MDa）である。この DNA ナノ構造体が極めて小さいだけでなく、低密度であることが解る。そのため、S/N が極めて低い氷包埋試料の電子顕微鏡観察では可視化が困難であることが予想された。試料温度 4 K、加速

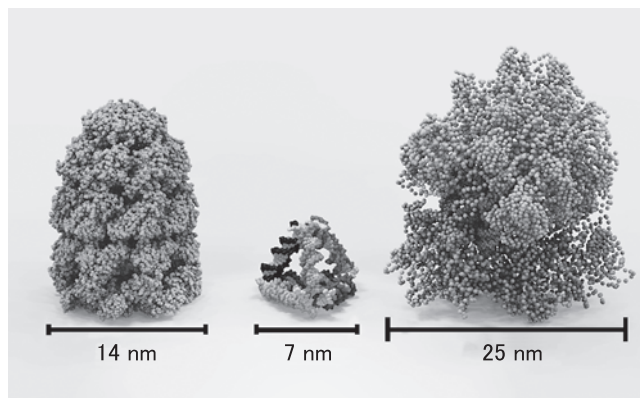


図 2 単粒子像解析法によって構造解析された代表的な分子と正四面体 DNA ナノ構造体との大きさの比較。

中央が正四面体 DNA ナノ構造体（分子量約 78 kDa、長さ約 7 nm）。左が GroEL-ES 複合体（分子量約 880 kDa、長さ約 14 nm）。右が 70S リボソーム（分子量約 2.5 MDa、長さ約 25 nm）。リボソームは主鎖の原子のみ。

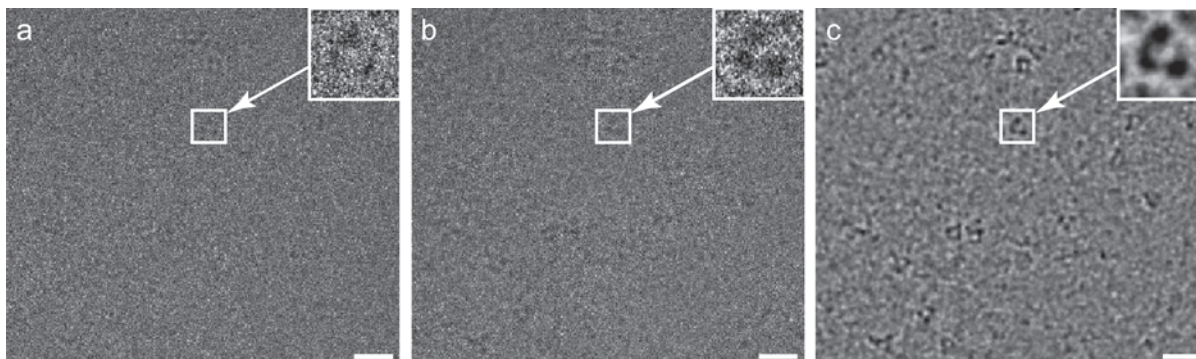


図3 急速凍結氷包埋された正四面体 DNA ナノ構造体の電子顕微鏡写真。

a) 電子線量約 $40 \text{ e}^-/\text{Å}^2$, デフォーカス $2 \mu\text{m}$ での撮影. b) a) と同じ視野を電子線量約 $100 \text{ e}^-/\text{Å}^2$, デフォーカス $5 \mu\text{m}$ で撮影. c) Focal pair merging を用いて, コントラストを改善した像. 試料温度は 4 K .

電圧 200 kV , 電子線量 $40 \text{ e}^-/\text{Å}^2$, デフォーカス $2 \mu\text{m}$ の条件下で撮影した電子顕微鏡像を図 3a に示す. 今回用いた電子線量は一般に単粒子像解析に用いられる量よりも $2 \sim 3$ 倍多く, その分だけ S/N が高いはずであるにもかかわらず, その粒子像を見つけるのに十分なコントラストを得ることはできなかった. そこで, 電子線量を $100 \text{ e}^-/\text{Å}^2$, デフォーカスを $5 \mu\text{m}$ にし, ぎりぎりまでコントラストの改善を試みたが, それでも十分なコントラストを得ることはできなかった (図 3b). しかし, この同じ視野で撮影されたデフォーカスの異なる 2 枚の写真は互いに保持している情報が異なるため, お互いに足りない情報を補い合うような画像処理 (focal pair merging)²²⁾ を施すことでコントラストの改善を試みた (図 3c). その結果, 明らかに正四面体 DNA ナノ構造体と認識できる三角形の粒子像を数多く観察することができた. この画像から粒子の位置を決定し, その座標データをデフォーカスの浅い像に適用して, 粒子像を切り出した.

5. 3次元像再構成

3次元像再構成には, 278 枚の写真から切り出した約 3,000 の粒子像を用いた. 球体を初期構造として, 4° ごとに投影した 513 枚のリファレンス像を作製し, 個々のリファレンス像に対して, 撮影された粒子像の位置と向きを合わせてクラス分けをした. そして, クラスごとに平均像を作製した後, 逆投影法によって 3次元像再構成を行い, その構造を初期構造として再度リファレンス像を作製し, この工程を 20 回繰り返すことで精密化を行い, 正四面体 DNA ナノ構造体の立体構造を解析した. 得られた立体構造の分解能は 20 Å (図 4a) で, 一辺約 7 nm の辺で構成される中空の正四面体構造をしており, 大きさも形も設計された構造とよく似ていた. 今回用いた DNA ナノ構造の作製方法により, ほぼ設計どおりのナノ構造体が作製可能であることを証明することができた.

しかし, 再構成像の各辺は外側に少し湾曲しており, 初期構造を球にしたことによる影響で, 正しい構造が得られなかった可能性が考えられた. そこで, 球だけでなく, 正四面体, 立方体, 予想立体構造の原子モデルなどを初期構造とし

て解析してみたが, この湾曲は解消されなかった. 20 bp という短い二重らせんの DNA はかなり剛直で, これほど大きく曲がるとは考えにくい. そのためこの曲がりの原因は画像の S/N が低いため, 画像の整列と分類の精度が低いことによるアーティファクトと考えられた. そこで, 分子量から見積もった分子の体積を覆うマスクを作製し, それを構造解析の精密化サイクルの各初期構造に施した^{23,24)}. この処理は DNA 分子の領域を残したまま, それ以外 (主には溶媒) の領域の密度を平坦にすることによってノイズの影響を軽減でき, 結果として画像の整列と分類の精度を改善できる. この方法はアセチルコリンレセプターやウィルスのコア構造など中空の構造において効果的であることが知られている²⁵⁾. この方法を用いてさらに 20 回の精密化サイクルを実施したところ, 分解能が劇的に改善され, 12 Å 分解能の構造を得ることができた (図 4b). 各辺の湾曲りは完全には解消されなかったが, 20 Å 分解能では確認できなかった DNA 二重らせんの主溝を可視化することに成功した. 得られた構造とモデルとの重ね合わせ (図 4c) は非常によく一致しており, 今回用いた DNA ナノ構造体作製技術が, 大まかな構造だけでなく, 各辺を構成する DNA の向きまで制御できていることを証明することができた.

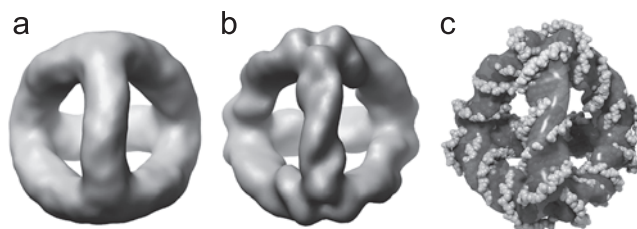


図4 単粒子像解析によって再構成された正四面体 DNA ナノ構造体の立体構造.

a) 分解能 20 Å での立体構造. b) 分子量依存の体積をもとに作製したマスクの適用によって分解能が改善した 12 Å 分解能の立体構造. a) では確認できなかった二重らせんの主溝まで確認できる. c) 12 Å 分解能の立体構造と, 予測立体構造の重ね合わせ. わずかにはみ出している部分もあるが, 全体としてよく一致している.

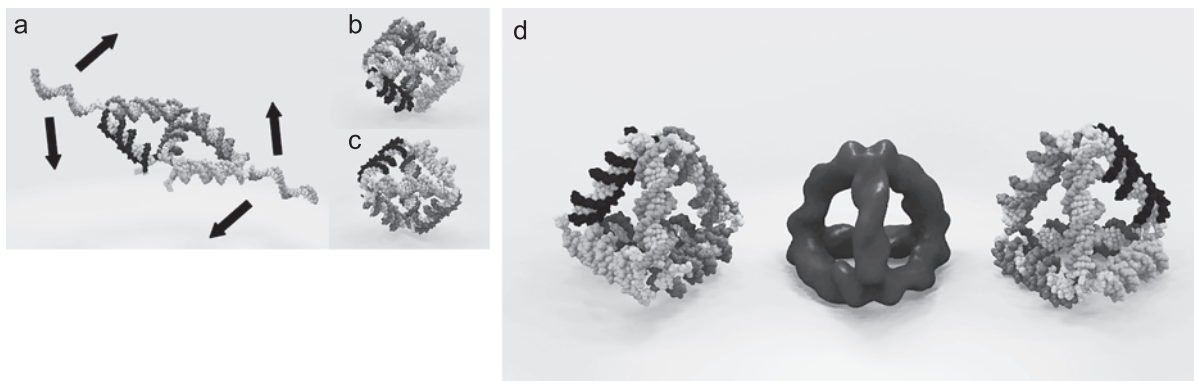


図5 2種類の立体異性体と解析結果の比較。

a) DNA ナノ構造体の形成過程の最終段階の模式図。最後の相補な一本鎖 DNA 同士が二重らせんを形成する際に、矢印の上側か下側かででき上がる構造が異なる。上側だと b) の構造を、下側だと c) の構造を形成する。d) 左側の構造は b) に、右側の構造は c) に対応しており、双方で DNA の主溝と副溝の位置が異なっている。解析結果の主溝の位置から、今回の DNA ナノ構造体が左側、すなわち b) の構造であることがわかる。

6. 立体異性体

今回用いた正四面体 DNA ナノ構造体だけではなく、これまで製作された DNA ナノ構造体の多くには、2つの立体異性体の可能性が考えられる。図 5a に示すように 6本の辺のうち 5本は互いに二重らせんを形成し、最後の一本のみが二重らせんを形成していないと仮定すると、最後の一本は他の辺が作り出す平面の上下どちらかで二重らせんを形成する。この両者の構造は、全体としてはよく似た正四面体を形成するが、各辺における DNA の向きが表と裏で完全に逆転する。この両者の構造の違いは、分解能が悪い構造ではほとんど見分けることはできないが、今回の解析によって得られた構造は DNA の主溝が解像できる程度に高い分解能であったため、どちらの立体異性体が形成されたのか容易に見分けることができた。本研究で用いた DNA ナノ構造体の作製方法では、95%以上の確率で片方の立体構造のみが形成されることがすでに間接的に証明されており²⁰⁾、今回得られた構造はその結果とよく一致している。

7. おわりに

この構造解析により、今回用いた正四面体 DNA ナノ構造体の作製方法が、4本の DNA を混ぜてアニーリングするだけの簡単な操作で設計どおりの構造を作製可能であること、さらに、高い立体異性体の選択性によって単一構造を形成することを直接証明することができた。また、これまで構造解析不可能とされてきた分子量 100 kDa 以下の分子に対しても、極低温電子顕微鏡を用いた単粒子像解析法が適用可能であることを立証することができた。今回、これほど小さな分子が 12 Å という高い分解能で解析された理由は、1) 同じ分子量でも、蛋白質と比べて密度が高いため像コントラストの高い核酸で構成された分子であったこと、2) 隙間のない分子ではなく、中空で外に広がった構造であったこと、3) 分子構造を支えている 20 bp の二重らせん構造が剛直で、分子

構造にばらつきが少なかったこと、4) 対称性が高かったことなどが考えられるが、通常、生体高分子ではこのような幸運に恵まれることはまれである。しかし、今後さらに電子顕微鏡の装置技術の進歩が進み、凍結試料の調製法や画像解析法の工夫が進めば、より小さな生体分子の高分解能立体構造解析が夢でなくなる可能性もある。最近、材料分野で高分解能電子顕微鏡観察に使われるようになった球面収差補正装置を生体分子の観察に応用することもその一つの可能性を開く道であり、約2年後に利用可能になる予定の X 線自由電子レーザーによる回折顕微鏡もまた一つの可能性である。

文 献

- 1) Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., Dermitzer, P.R., Bellamy, R., Harrison, S.C. and Grigorieff, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1867–1872 (2008)
- 2) Yu, X., Jin, L. and Zhou, Z.H.: *Nature*, **453**, 415–419 (2008)
- 3) LeBarron, J., Grassucci, R.A., Shaikh, T.R., Baxter, W.T., Sengupta, J. and Frank, J.: *J. Struct. Biol.*, **164**, 24–32 (2008)
- 4) Connell, S.R., Takemoto, C., Wilson, D.N., Wang, H., Murayama, K., Terada, T., Shirouzu, M., Rost, M., Schuler, M. and Giesebrecht, J.: *Mol. Cell*, **25**, 751–764 (2007)
- 5) Henderson, R.: *Q. Rev. Biophys.*, **28**, 171–193 (1995)
- 6) Seeman, N.C.: *Nature*, **421**, 427–433 (2003)
- 7) Bath, J. and Turberfield, A.: *J. Nature Nanotech.*, **2**, 275–284 (2007)
- 8) Winfree, E., Liu, F., Wenzler, L.A. and Seeman, N.C.: *Nature*, **394**, 539–544 (1998)
- 9) Rothmund, P.W.: *Nature*, **440**, 297–302 (2006)
- 10) Chen, J.H. and Seeman, N.C.: *Nature*, **350**, 631 (1991)
- 11) Zhang, Y.W. and Seeman, N.C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1661 (1994)
- 12) Shih, W.M., Quispe, J.D. and Joyce, G.F.: *Nature*, **427**, 618–621 (2004)
- 13) Andersen, F.F., Knudsen, B., Oliveira, C.L.P., Fröhlich, R.F., Krüger, D., Bungert, J., Agbandje-McKenna, M., McKenna, R., Juul, S., Veigaard, C., Koch, J., Rubinstein, J.L., Guldbrandtsen, B., Hede, M.S., Karlsson, G., Andersen, A.H., Pedersen, J.S. and Knudsen, B.R.: *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1113–1119 (2008)

- 14) He, Y., Ye, T., Su, M., Zhang, C., Ribbe, A.E., Jiang W. and Mao, C.: *Nature*, **452**, 198–202 (2008)
- 15) Erben, C.M., Goodman, R.P. and Turberfield, A.: *J. Angew. Chem. Int. Edn.*, **45**, 7414–7417 (2006)
- 16) Seeman, N.C.: *J. Theor. Biol.*, **99**, 237–247 (1982)
- 17) Benenson, Y., Gil, B., Ben-Dor, U., Adar, R. and Shapiro, E.: *Nature*, **429**, 423–429 (2004)
- 18) Adleman, L.: *Science*, **266**, 1021–1024 (1994)
- 19) Rothmund, P.W.K.: *PLoS Biol.*, **2**, e424 (2004)
- 20) Goodman, R.P., Schaap, I.A., Tardin, C.F., Erben, C.M., Berry, R.M., Schmidt, C.F. and Turberfield, A.J.: *Science*, **310**, 1661–1665 (2005)
- 21) Okorokov, A.L.: *EMBO J.*, **25**, 5191–5200 (2006)
- 22) Ludtke, S.J. and Chiu, W.: *J. Struct. Biol.*, **144**, 73–78 (2003)
- 23) Ludtke, S.J., Jakana, J., Song, J.L., Chuang, D.T. and Chiu, W.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 253–262 (2001)
- 24) Ludtke, S.J., Baldwin, P.R. and Chiu, W.: *J. Struct. Biol.*, **128**, 82–97. (1999)
- 25) Yonekura, K. and Toyoshima, C.: *Ultramicroscopy*, **84**, 29–45 (2000)