

# 単粒子解析による生体高分子複合体の構造解析とその最近の進展

## Single Particle Analysis of Biological Macromolecules and Its Recent Advances

光 岡 薫

Kaoru Mitsuoka

大阪大学超高压電子顕微鏡センター

**要 旨** 単粒子解析は、低温電子顕微鏡を用いて撮影した粒子像から生体高分子複合体の立体構造を計算する手法である。最近この分解能が向上し、原子モデルが得られるようになった。本解説では、それを可能とした技術的要因である、電子直接検出カメラと自動撮影、解析ソフトウェアなどについて紹介する。その中では電子直接検出カメラの登場が最も重要と考えられるが、それとともに動画補正技術や低温電子顕微鏡法の自動化、ベイズ統計を利用した画像解析ソフトなどの進展により、高分解能が得られるようになった。そして、その単粒子解析法の詳細を我々の例などを用いて述べ、電子顕微鏡試料調製法についても紹介する。それにより、最近の単粒子解析の状況について理解を深め、興味を持っていただければと考える。

**キーワード**：単粒子解析、低温電子顕微鏡法、生体高分子複合体、画像解析

### 1. はじめに

単粒子解析は、電子顕微鏡（電顕）を用いて撮影した生体高分子やその複合体粒子の投影像から、その三次元構造を計算する構造解析法である。簡単な流れとしては、生体試料を真空である電顕中に入れるため、試料を含む水溶液を液体エタンで急速凍結し、観察したい粒子を非晶質の薄い氷の中に閉じ込める。低温ステージを持つ電顕でそれを観察する。その画像から粒子像を抽出し、計算機で位置や向きを合わせ、それを分類することで同じ画像を積算して、S/Nの良い平均像を得る。その平均像から三次元構造での方位を決定し、逆投影法により立体構造を計算する。

最近、この単粒子解析による構造解析の分解能が向上し、生体高分子やその複合体の原子モデルが得られる解析が多く行われるようになってきた。単粒子解析の対象となる分子量の大きな生体高分子や複合体の高分解能構造解析は、今までは、X線結晶解析の独断場であった。しかし、X線結晶構造解析では結晶化のための試行錯誤が必要とされる。さらに、同じ対象のいくつかの状態に対応する構造を得るためには、その度に結晶化を行う必要がある場合が多い。一方、単粒子解析を用いれば、結晶化する必要がないので、ある程度自由に溶液条件を選択することができる。さらに、画像分類により、いくつかの異なる構造が共存する場合にも、それらを同時に解析できる可能性があり、より複合体の機能と関係づけやすい構造解析を行う事ができる。

それらの特徴を活かした研究により、現在、毎週のように一流紙に低温電顕を用いた単粒子解析結果が掲載されてい

る。そこで、本解説では、そのような高分解能解析が可能となった技術的な進展を紹介するとともに、我々の研究室で取り組んでいる単粒子解析を用いた研究を例として用いて、単粒子解析の実際について、その試料作製法を含めて述べる。それにより、単粒子解析の詳細を知っていただき、自分の研究に取り入れるか考える際の参考となればと考える。

### 2. 電子直接検出カメラと動画補正

まず、現状の高分解能構造解析に最も重要だった技術は、電子直接検出カメラと考えられる。電子直接検出カメラについては、既に本誌において宮崎らに紹介されているので<sup>1)</sup>、詳しくはそちらを参照して欲しいが、これにより、はじめて電顕フィルムを超える画像が得られるようになった。ここでは、その電子直接検出カメラを単粒子解析に応用する際に、考えるべき点についてのみ述べてみたい。

まず、撮影に利用する電子線量であるが、我々が利用しているFEI社のFalcon IIの場合には、300 kVではピクセル辺り1秒間に55から60電子を照射すると最も性能を発揮できるとされている（200 kVでは40から45電子）。そこで、この値を基準に、欲しい分解能から倍率を考えて、その後、カメラへの電子線量が上記のようになるように試料への照射量を決定している。例えば膜タンパク質複合体で、とりあえず二次構造を可視化し、良い場合には原子モデルが得られれば良いと思われる試料であれば、直接倍率を59 Kとすると、ピクセル辺り1.4 Å程度となり、その条件で28 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>/sで撮影している。高分解能を得る際に、試料へ照射できる電子線量は1 Å<sup>2</sup>あたり20電子程度と考えられるので、その条件で、1秒以内の露光時間で撮影を行えば、高分解能解析に適した像を撮影できる。β-ガラクトシダーゼの例では、14 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>

〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘7-1

2015年10月2日受付

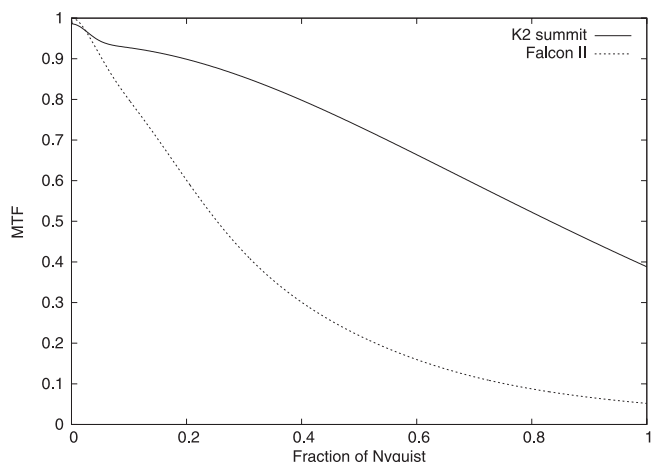


図1 電子直接検出カメラにおけるMTFの比較  
横軸にナイキスト周波数との比、縦軸にMTFの値を示した。

までのデータを用いることで、 $2.2 \text{ \AA}$ の構造解析を実現している<sup>2)</sup>。一方、Gatan社のK2 summitカメラの場合には、電子を1個ずつ検出するモードがあり、それにより、ピクセルより細かい位置情報を読み出すこともできる。その場合には、電子の重なりを避けるため、例えば1秒間に1ピクセル辺り2.4電子程度で利用することとなるので、より長い照射時間で利用することとなる。しかし、どちらの場合にも、適当なMTF (Modulation Transfer Function)の補正を行えば、高分解能では同程度のDQE (Detective Quantum Efficiency)を実現できると考えられており<sup>3)</sup>、実際に両方のカメラを用いて原子モデルが決定されている。図1に異なる電子直接検出カメラのMTFの比較を示した。これらカメラのMTF補正については、後に述べるRelionという単粒子解析ソフトウェアに組み込まれている。DQEは、理想的な検出器と比較して、ある周波数でどの程度、S/Nが減衰するかを表しており、これが同じであれば、同じ分解能を達成できると考えられる。

現在、我々は単粒子解析法により好熱菌からのV-ATPアーゼの高分解能構造を得るため、データ収集を行っている。そのFalcon IIによる電顕画像を図2に示す。V-ATPアーゼとは、ATPのエネルギーを用いて水素イオン、つまりプロトンを送るプロトンポンプである。細胞内にある小胞などに存在し、その内部を酸性にしている。その構造は、プロトンを送る生体膜貫通部分と、ATPのエネルギーを用いて軸を回転する、回転モーターである水溶性部分の、二つのドメインに分けることができる。膜貫通部分は脂質二重層中にあり疎水的なため、界面活性剤を用いて複合体を水溶液中に可溶化した試料を用いて単粒子解析を行う。図2に黒色の丸で示したように、カーボン膜上に吸着した複合体の顕微鏡像としては、その二つのドメインが明瞭に分離して、ダンベル状の形状で観察されている。

次に、このようにして得られた画像の動画補正について述べる。電顕像は、試料への電子線照射により、試料を保持し

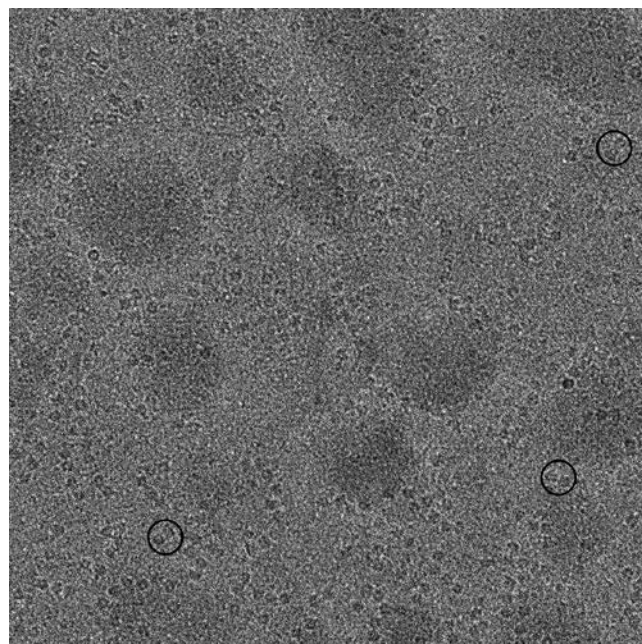


図2 V-ATPアーゼの電子直接検出カメラ像  
Falcon IIで5ミクロン程度のunder focusで撮影した。四角の1辺の長さが約570 nmである。薄いカーボン膜に吸着させたQuantifoil (市販の膜穴グリッド)を用いて、そこに試料を吸着させて作製した。典型的なV-ATPアーゼの粒子像を緑の丸印で示した。

ている非晶質の水自体の変形や、また試料のチャージアップによる顕微鏡像の移動や変形の影響により、撮影中に試料が動くように見えることが、この電子直接検出カメラによる動画撮影により確認されている。そこで、電顕像を動画として撮影し、各フレームの動きを補正後、積算することで、より高分解能の電顕像を得ることができる。例えば、この動画補正をTRPV1チャンネルの単粒子解析に応用することで、 $3.4 \text{ \AA}$ 分解能での構造解析が行われている<sup>4)</sup>。この場合には、GPUを用いる補正プログラムを開発し、動画補正を各画像にまず適用し、その後、単粒子解析を行うことで高分解能の構造を得た<sup>5)</sup>。このプログラムは、K2 summitからの画像の補正のために開発されたが、図3のようにFalcon IIからの画像に対しても適用できた。しかし、Falcon IIでは1秒間に18フレームの撮影となり、公式には、そのうち積算した7フレーム分しか取り出すことができないという制約があり、動画撮影に関してはK2 summitの方が優れている。また現在は、以下に述べるRelionという単粒子解析ソフトウェアに、粒子像ごとの動画補正が組み込まれており、画像解析後に補正を行うこともできる。また、さらに高度な動画補正を行うプログラム開発も試みられている<sup>6)</sup>。

### 3. 自動撮影

次に、電子直接検出カメラ以外の、現在の単粒子解析に必要な周辺技術開発について見てみる。単粒子解析では、氷を張るのに用いるグリッドは、カーボン膜に規則正しく丸い穴

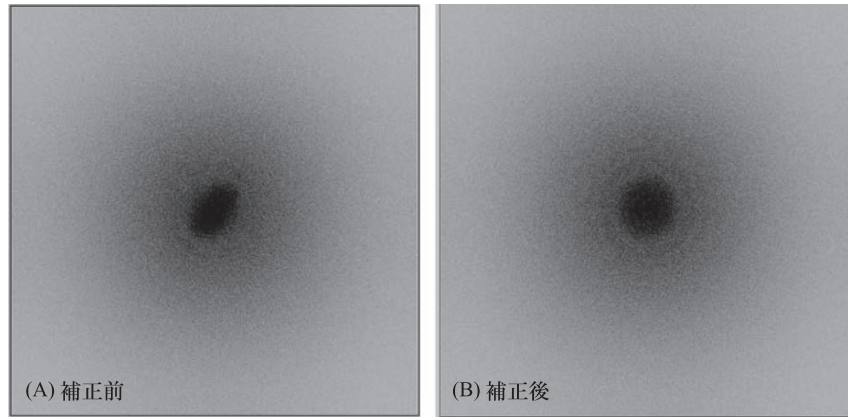


図3 動画補正の効果

Falcon II を用いて撮影した複合体画像からのフーリエ変換図形を示す。動画補正前 (A) と動画補正後 (B) で Thon リングが異方的な状況から等方的になっていることがわかる。

が空いた Quantifoil や C-flat という商用グリッドを用いる場合が多い。そのような規則正しく穴が空いたグリッドを用いることで、その穴の自動撮影が可能となる。この自動撮影により、単粒子解析に必須な多くの電顕画像を収集することが可能となった。例えば、リボゾームで  $3 \text{ \AA}$  より高い分解能で構造解析を行った例では、24,684 枚の画像を撮影した<sup>7)</sup>。この場合には、穴の大きさが  $3.5 \mu\text{m}$  と大きな Quantifoil (R3.5/1) を用いて、その中を  $4 \times 4$  で撮影しているため、実質 1/16 とも考えられるが、それでも、この数の画像を収集することは、自動撮影なしでは考えにくい。

このような単粒子解析用の自動撮影を行うソフトウェアは、アカデミックなものや商用のものなど、既に多くの選択肢があり、最近の電顕であれば利用できる場合が多い。例えば、アカデミックな選択肢としては、Leginon<sup>8)</sup> が多く利用されていると思う。我々は、Titan Krios (FEI) を利用しているので、FEI が提供している EPU を利用している。Leginon のようなソフトウェアと比べると自由度は低いと思うが、通常の単粒子解析のためのデータ収集に限って言えば、問題なく自動撮影が行える。我々が通常利用している撮影法では、1 画像を得るのに 3 分程度必要なので、人が撮影すると時間的には変わらないが、一晩自動で撮影させれば、200 枚程度の画像を収集できるので、その後の画像解析の時間を考えると十分と考えている。また、完全な自動撮影でなく、氷が薄いところをある程度選んで撮影しているため、200 箇所程度の穴を選択するのに、数時間をかけている。この選択を効率化するため、200mesh のような、大きめのメッシュサイズのグリッドを用いている。また、Titan は O リングと C リングでグリッドを挟むが、この際にグリッドが曲がっていると氷が割れて利用できる部分が少なくなる。O リングと C リングで先に挟んだグリッドを凍結に用いれば、この問題は防げるが、グリッドからの液体エタンの除去などが難しくなると考えられる。そのため、グリッドの変形を防ぐため、曲がりにくい Mo グリッドを我々は用いている。また、長時

間自動撮影を行うためには、低温電顕への液体窒素の自動供給も必須で、専用の低温電顕を用いるのが望ましい。

#### 4. 単粒子解析ソフトウェア

単粒子解析の分解能が向上したのは、電子直接検出カメラの登場が大きいが、動画補正のように、そのカメラを利用した関連技術の開発も寄与している。そのような技術の一つが、ベイズ統計を利用した単粒子解析ソフトウェア Relion である<sup>9)</sup>。このソフトウェアを利用することで、S/N の良い電顕画像を利用した高分解能構造解析が可能となった。ベイズ統計とは条件付き確率を利用した統計で、Relion では所属するクラスと角度パラメータを求めると最大事後確率 (MAP) 推定を利用している。MAP 推定は、数学的には最尤法を正規化したものと考えられるので、より良い結果を得ることができる。そして、その確率モデルの事前分布を得るため、期待値最大化法 (EM 法) を利用している。この EM 法は、音声認識などにも利用されており、最近応用が広がっている。

このように、Relion は最近の統計手法を取り入れており、今までの単粒子解析ソフトウェアより計算コストは高いが、より良い結果が得られる可能性が高い。しかし、これは画像の S/N にも関係しており、電子直接検出カメラを用いない画像を利用した場合には、今までのソフトウェアの方が良い結果が得られることも経験している。Relion の具体的な解析手順は、まず、1000 個程度の粒子をピックアップしながら、それと平行して Defocus を推定する。そしてピックアップした粒子像を用いて 2 次元クラス分けを行い、クラス平均像を得る。そのクラス平均像をテンプレートとして用いて、半自動ピックアップを行い、十分な数の粒子像を得る。それを用いて、もう一度 2 次元クラス分けを行い、同じクラスに入る粒子数が多い粒子像、つまり似た像が多いものを正しい粒子像と考え、そのクラスに入らないものを取り除く。これにより粒子以外のノイズを取り除くことができる。次に適当な立体構造を用いて 3 次元クラス分けを行い、いくつかの 3 次元

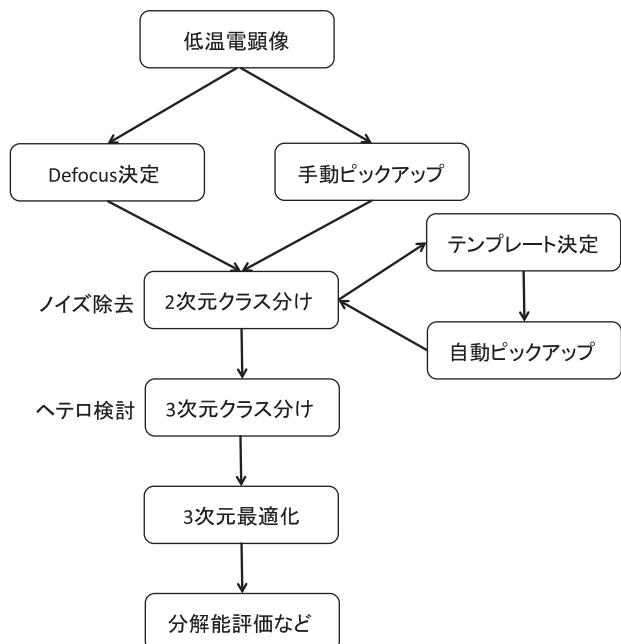


図4 Relionによる構造解析手順

Defocus 決定には CTFIND3<sup>15)</sup>、分解能の評価には ResMap<sup>16)</sup>を用いている。

クラスに分ける。これにより、立体構造の不均一を仮定し、いくつかの異なる立体構造が得られるか確認する。これにより、不均一と考えられた場合には、そのいくつかの異なる立体構造にクラス分けをして解析を進める。均一な立体構造に分類される粒子像を用いて、その立体構造を元に三次元最適化を行い、高分解能の構造を得る。このような手順により Relion は、均一でない粒子像の除去と不均一な立体構造の問題に対応している。以上の手順を図4に示す。アルゴリズムの詳細を理解していなくても、この手順に従って解析することができる。

実際の計算時間について、参考までに我々の例を示しておく。我々は、計算機クラスターとして、6コアのCPUを2つ持つノード10台を用いている。つまり、計120コアで計算しており、Relionを用いて現在単粒子解析に取り組んでいる研究室は、よりコア数の多いクラスを用いている場合が多いと考えている。しかし、上に画像を示したV-ATPアーゼ複合体に対して、1ピクセル2.8Å程度で、得られる分解能を検討している状況では、ピックアップが終われば次の日には立体構造が得られ、分解能などの評価を行うことができる。また、コア数を増やすと、それにかかなり比例して計算速度が向上するので、今後、より高い分解能を目指す場合にも、ノード数を増やすことで対応できると考えている。メモリ量はコア当たり4GBが推奨されており、現状Relionのみではファイルフォーマット変換など必要な機能がない場合もあるので、EMAN2のような歴史の古い解析ソフトウェアと併用している<sup>10)</sup>。

## 5. 電子顕微鏡用試料作製

最後に、単粒子解析に関係する周辺技術開発の一つとして、低温電顕法用の試料作製技術について述べる。まず、適した氷の厚さで適当な粒子密度のグリッドを安定して作製できるようになる凍結装置の開発が挙げられる。我々は、そのような凍結装置として、FEI社のVitrobotとLeica社のEM GPを利用している。前者は余分な水溶液を除くプロットを両面からろ紙を当てることで行うのに対し、後者は片面からのみろ紙で吸い取る。それぞれの方法に一長一短があり、どちらが良いとは言えないが、現状、Vitrobotの方が広く利用されており、情報が蓄積されていると思う。これらを利用することにより、同じ条件で凍結を行えば、同じ程度の厚さの氷が得られる可能性が向上し、再現性良くグリッド作製が行えるようになった。氷の厚さは、プロットしている時間やグリッドに載せる溶液量などにより調節できる。1枚の画像から、なるべく多くの粒子を重なりなく切り出せるように、濃度を調節するのが重要で、そのためには試料濃度を变化させた系列を効率的に観察できる自動ローダー付きの低温電顕を利用するのが望ましい。タンパク質の量や濃度は、X線結晶構造解析のための結晶化に比べるとかなり少ないが、それでも必要な溶液量は1グリッド辺り数μlで、用いる濃度は結晶化の1桁下程度が必要とされる場合がある。

また、複合体は安定性に問題があるものも多く、電顕用グリッドを作製する際に複合体の解離が見られることも多い。そこで、そのような解離を避けるため、GraFixという密度勾配遠心と化学架橋を組み合わせた複合体試料作製法なども開発されている<sup>11)</sup>。Relionでヘテロな構造がある程度は分類できるが、このような方法でなるべく均一な構造の試料を準備するのが望ましい。また、膜タンパク質やその複合体の場合には、界面活性剤により脂質二重膜から可溶化した試料を用いており、その安定性以外に、界面活性剤による作られるミセルが単粒子解析を困難にする場合がある。そのようなミセルの影響を最小に抑えるため、γ-セクレターゼの単粒子解析においては、界面活性剤 digitonin の代わりに amphipol が利用された。またγ-セクレターゼは分子量が小さいので、その低角度散乱の情報を得るために、そこでのDQEが最も良いK2 summitを用いて解析された<sup>12)</sup>。理論的には、低温電顕からの単粒子解析で原子モデルが得られる下限の分子量は100 kDaと言われており<sup>13)</sup>、現在、200 kDa程度の分子量の試料についても単粒子解析が試みられている。他の膜タンパク質複合体について、LMNGという界面活性剤の利用も検討され、最近、GraFixのように密度勾配遠心と組み合わせたGraDeR法が提案されている<sup>14)</sup>。LMNGやamphipolのような、膜タンパク質との相互作用が強い界面活性剤を用いることで、溶液中の界面活性剤濃度を低くすることができ、水溶性の複合体のような安定した電顕グリッド作製が可能となる。

表 1 本解説で紹介した原子モデルが得られた生体高分子やその複合体

| 名称 (参照論文)         | 簡単な説明           | 分解能   | EMDB* |
|-------------------|-----------------|-------|-------|
| TRPV1 チャンネル       | 熱を検知するイオンチャンネル  | 3.3 Å | 5778  |
| $\gamma$ -セクレターゼ  | アルツハイマー病に関連する酵素 | 3.4 Å | 3061  |
| 大腸菌リボゾーム          | 翻訳を行う巨大生体高分子複合体 | 2.9 Å | 2847  |
| $\beta$ -ガラクトシダーゼ | ラクトースなどを単糖に分解する | 2.2 Å | 2984  |

\* <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/>

## 6. おわりに

以上のような技術発展により、低温電顕を用いた単粒子解析により原子モデルが得られる構造解析を行うことができるようになった。それにより単粒子解析は、電顕学者のみでなく生体高分子の X 線結晶構造解析を行っていた研究者にも注目されている。この解説で紹介した原子モデルが得られた単粒子解析結果を表 1 に示した。また、ここで少しデータを示したように、大阪大学超高压電子顕微鏡センターにある Titan-Krios と Falcon II は問題なく稼働しており、定常的に単粒子解析用のデータ収集を行っている。まだ、原子モデルが得られるような分解能の解析はできていないので、今後、そのような解析が実現できるように、さらにシステム改善・改良を行っていききたい。そして、それら設備の共同利用・共同研究を通して、日本での単粒子解析研究の発展に寄与したいと考えている。

## 文 献

- 宮崎直幸, 村田和義: 顕微鏡, 48, 57–60 (2013)
- Bartesaghi, A., Merk, A., Banerjee, S., Matthies, D., Wu, X., Milne, J.L. and Subramaniam, S.: *Science*, 348, 1147–1151 (2015)
- McMullan, G., Faruqi, A.R., Clare, D. and Henderson, R.: *Ultra-microscopy*, 147, 156–163 (2014)
- Liao, M., Cao, E., Julius, D. and Cheng, Y.: *Nature*, 504, 107–112 (2013)
- Li, X., Mooney, P., Zheng, S., Booth, C.R., Braunfeld, M.B., Gubbens, S., Agard, D.A. and Cheng, Y.: *Nat. Methods*, 10, 584–590 (2013)
- Abrishami, V., Vargas, J., Li, X., Cheng, Y., Marabini, R., Sorzano, C.Ó. and Carazo, J.M.: *J. Struct. Biol.*, 189, 163–176 (2015)
- Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A.L., Bock, L.V., Ficner, R., Rodnina, M.V. and Stark, H.: *Nature*, 520, 567–570 (2015)
- Carragher, B., Kisseberth, N., Kriegman, D., Milligan, R.A., Potter, C.S., Pulokas, J. and Reilein, A.: *J. Struct. Biol.*, 132, 33–45 (2000)
- Sheres, S.H.: *J. Struct. Biol.*, 180, 519–530 (2012)
- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P.R., Mann, D.S., Jiang, W., Rees, I. and Ludtke, S.J.: *J. Struct. Biol.*, 157, 38–46 (2007)
- Stark, H.: *Methods Enzymol.*, 481, 109–126 (2010)
- Lu, P., Bai, X.C., Ma, D., Xie, T., Yan, C., Sun, L., Yang, G., Zhao, Y., Zhou, R., Scheres, S.H. and Shi, Y.: *Nature*, 512, 166–170 (2014)
- Henderson, R.: *Q Rev Biophys.*, 28, 171–193 (1995)
- Hauer, F., Gerle, C., Fischer, N., Oshima, A., Shinzawa-Itoh, K., Shimada, S., Yokoyama, K., Fujiyoshi, Y. and Stark, H.: *Structure*, 23, 1769–1775 (2015)
- Mindell, J.A. and Grigorieff, N.: *J. Struct. Biol.*, 142, 334–347 (2003)
- Kucukelbir, A., Sigworth, F.J. and Tagare, H.D.: *Nat. Methods*, 11, 63–65 (2014)