

## 蛋白質の薄い三次元結晶の電子線結晶構造解析と荷電情報の取得

### Electron 3D Crystallography of Thin Protein Crystals: Atomic Model with Charges

米倉 功治<sup>a</sup>, 加藤 一幸<sup>b</sup>, 小笠原光雄<sup>c</sup>,  
富田 正弘<sup>d</sup>, 豊島 近<sup>c</sup>

Koji Yonekura, Kazuyuki Kato, Mitsuo Ogasawara,  
Masahiro Tomita and Chikashi Toyoshima

<sup>a</sup> 国立研究開発法人理化学研究所  
放射光科学総合研究センター米倉生体機構研究室

<sup>b</sup> (株) 日立ハイテクフィールドディング

<sup>c</sup> 東京大学分子細胞生物学研究所

<sup>d</sup> (株) 日立ハイテクノロジーズ

**要旨** 膜蛋白質や生体超分子複合体では、小さく薄すぎてX線回折に利用できない結晶が得られることがよく経験される。私たちは、このような微小で薄い三次元の結晶から構造決定を行う電子線結晶構造解析の技術を開発した。電子線では、同じ原子でも電荷を持ったものと中性のもので散乱のされ方が大きく異なる。この特徴を活かし、蛋白質の活性部位にある金属原子の酸化状態や、アミノ酸側鎖のプロトン化状態を明らかにできた。

**キーワード**：電子線結晶構造解析，三次元結晶，荷電情報，低温電子顕微鏡，蛋白質構造解析

#### 1. はじめに

電子顕微鏡による蛋白質の原子配置の決定は、1990年のHendersonらによる好塩性古細菌のプロトンポンプ、バクテリオロドプシンの二次元結晶の構造解析の成功に始まる<sup>1)</sup>。この解析で、電子線回折由来の振幅情報と実像由来の位相情報を組み合わせて得られた3.5 Å分解能の構造から原子モデルが構築された<sup>1)</sup>。現在では、膜蛋白質の理想的な二次元結晶から、2 Åより良い分解能の構造解析が達成されている<sup>2)</sup>。しかし、これまでいろいろな試料で二次元結晶を作製する努力が続けられてきたが、ある種の膜蛋白質を除いて、二次元結晶を作ることは容易ではないことが分かってきた。一方、数百nm以下の厚さの非常に薄い三次元結晶が得られることはよく経験される<sup>3~6)</sup>。重要な生命機能を担う膜蛋白質や生体超分子複合体の結晶作成は難しく、微小な結晶やごく薄い

三次元結晶しか得られないことも多い。特に、膜蛋白質結晶は二次元的には大きく成長するが、数層の重なりしかできない場合もある。これらの結晶はX線回折には小さすぎたり薄すぎたりして、構造解析の対象にならなかった<sup>5,6)</sup>。最新のシンクロトン放射光やX線自由電子レーザーの強いX線を用いても、大型蛋白質などの巨大分子の回折測定には、数 $\mu\text{m}$ ~100 $\mu\text{m}$ 程度の大きさの良質の結晶が必要である<sup>7,8)</sup>。

最近、著者らのグループ<sup>9)</sup>とアメリカのグループ<sup>10)</sup>により、薄い三次元の結晶の電子線結晶構造解析法が独立に開発された。筆者らの解析では、荷電状態に関する情報を得ることに成功している<sup>9)</sup>。本稿では、この開発と最初の解析結果について紹介する。

#### 2. 原理

電子線はX線と比べて十万倍も強く物質と相互作用する<sup>11)</sup>。そのためX線回折で利用できない微小で薄い結晶からでも、3 Å分解能を超えて回折点が観測されることもある(図1)。また、電子線は負電荷を持つため同じ原子でも電荷を持ったものと中性のもので、散乱のされ方は特に低分解能側で大きく異なる(図2)<sup>12,13)</sup>。図2に電子線の原子散乱因子を示すが、X線で両者の違いが殆ど無い(文献9) Fig. S2参照)のに比べて、電子線での違いは顕著である。電子線回折では、この電荷分布の情報を含む、分子の三次元クーロンポテンシャルマップが得られる。これにより、生体分子の機能部位の荷電状態に関する情報を、実験的に取得することが可能になる<sup>9,14)</sup>。アミノ酸や金属イオンの荷電状態は、生体分子が機能を発揮する上で大きな影響を及ぼすため、非常に

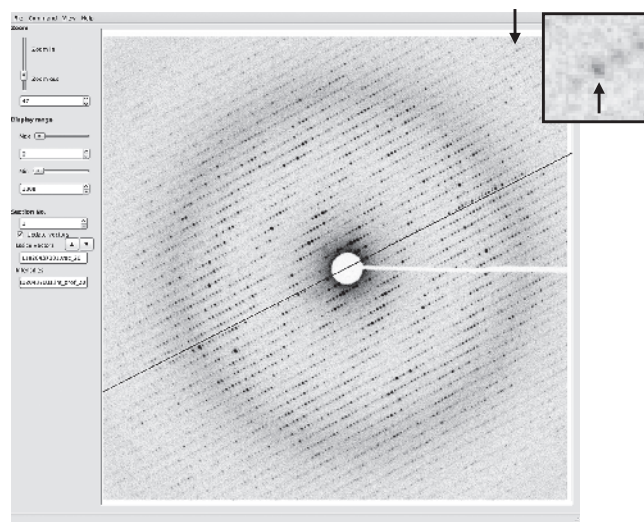


図1 カタラーゼの薄い結晶<sup>4)</sup>の電子線回折パターン。回転シリーズの一つのフレーム。試料ステージを傾斜角25.0°から25.5°で連続的に傾斜させながら総計0.03 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>の電子線を照射して記録した回折パターンを、開発した処理プログラム(XQED)<sup>9)</sup>で表示した。右上の挿入図は、矢印で示した2.4 Å分解能の回折点、また、回折パターン上の斜めの直線は傾斜軸の方向を示す。

<sup>a</sup> 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
2015年8月21日受付

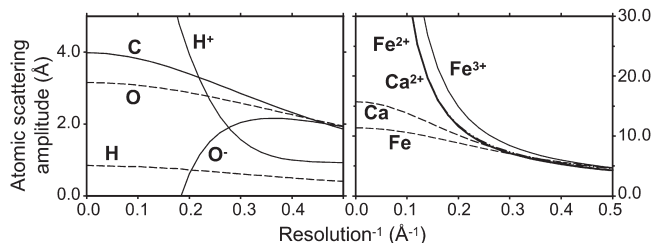


図2 加速電圧 300 kV の電子線に対する原子散乱因子. 文献 12) より計算.  $H^+$  は文献 13) の値を用いた. 表示の範囲で,  $Ca^{2+}$  と  $Fe^{2+}$  の散乱因子はほぼ重なっている.

重要な情報である. X 線結晶構造解析による電子密度マップからは, 荷電に関する情報は取得できない.

### 3. 開 発

二次元結晶の回折パターンは繰り返しのない方向に連続的な回折線から構成されるのに対して, 三次元結晶の回折パターンはすべての方向で離散的な回折点となる. 三次元空間に分布する回折点をもらすことなく, その正確な強度情報を取得することは難しかった. 試料を回転させながら回折パターンを記録し回折強度を機械的に積分することにより, すべての回折点の強度情報を抽出できる. これは, 蛋白質結晶の X 線回折で実践されている測定手法であるが, 電子線回折では実現されていなかった.

私たちは, 日立ハイテクノロジー社製の電子顕微鏡を基に, 電子線回折測定に適した新しい電子回折計を開発した (図 3). このシステムは, 回転角度を高精度に制御できる試料ステージを備えており, 結晶を回転させながら電子線を照射することで回折点の正確な積分強度を取得することができる. また, 試料のクーロンポテンシャルを正確に反映する弾性散乱された電子のみを選択して<sup>15,16)</sup> 結像に用いるために, 電子分光装置を搭載している<sup>9)</sup>. 氷包埋した試料からは多くの非弾性散乱電子が生じ, 回折パターンに高いバックグラウンドを与える<sup>16)</sup>. 非弾性散乱電子の平均自由行路は弾性散乱電子の 1/4 程度であり<sup>17)</sup>, 薄い結晶を大きく傾けた際には電子線の透過距離が長くなるので, 非弾性散乱の影響は非常に深刻となる. 従って, 電子分光は高品質のデータ取得に絶大な効果を発揮する<sup>9,16)</sup>.

ソフトウェアに関しては, 電子線回折パターンを処理する一連のプログラムを開発した (図 1). 電子線照射による試料損傷は大きく, 照射量を少なく抑えても, 通常, 一つの結晶からは広い傾斜角度にわたって回折点を集められない. 既存の X 線結晶構造解析用のプログラムを用いて, 狭い角度範囲しかない電子線回折パターンのデータセットは処理できていない<sup>10)</sup>. 我々の解析プログラムでは, 一フレーム内で二次元格子として回折点を指数付けしてから, 回転シリーズ内で三次元目の指数付けを行う. この二段階を経ることで, 5° から 10° の狭い角度範囲のデータセットの処理も可能になっている. 例として, ある回転シリーズ中 (H, K) 指数が同じ

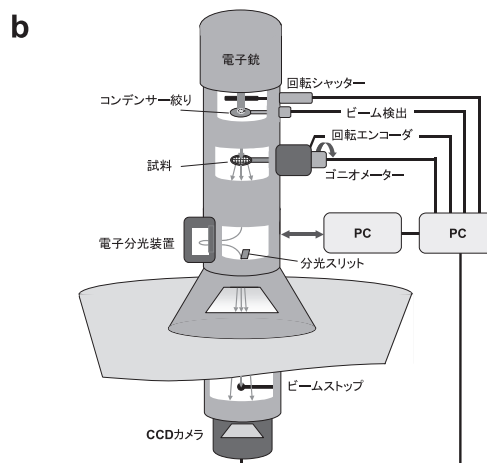
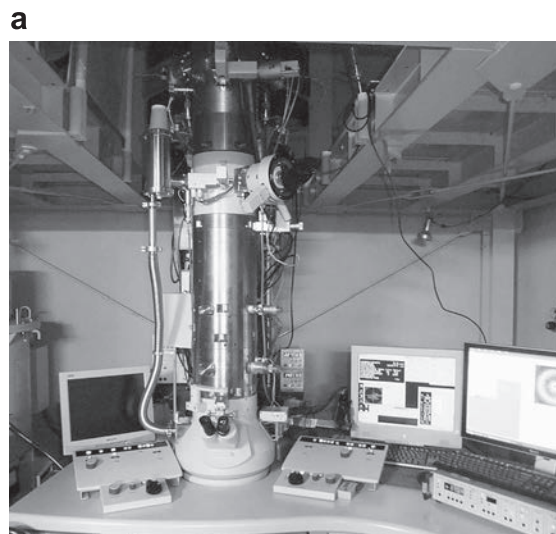


図3 電子線回折計の写真 (a) とその模式図 (b).

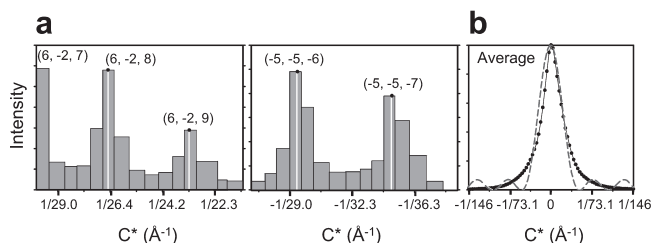


図4 回折パターンの回転シリーズ中 (H, K) 指数が同じ回折点の強度分布. 図 1 はこの回転シリーズの最初のフレームに相当する. (a) (H, K) = (6, -2), (-5, -5) の回折点のフレームごとの強度分布. 図中の括弧内は (H, K, L) 指数を表す. 棒グラフの一つのバーは, 対応するフレームに相当する. バー中の白い縦線は, 隣り合う 3 つのフレームの強度の二次補完から求めたピーク的位置. 三次元目の逆格子の長さ  $C^*$  は  $1/206 \text{ \AA}^{-1}$ . (b) この回転シリーズの回折点の平均強度分布. 結晶のモザイク幅を補正したもの. 点線は  $N = 4$  のラウエ関数.

回折点のフレームごとの強度分布を図 4 (a) に示すが, 隣り合うピークの分離はよい. 図 4 (b) の回折点の平均強度分布の広がり  $N = 4$  のラウエ関数とよく一致することから, この結晶は 4 から 5 層の厚みしかないこと, このような薄い結

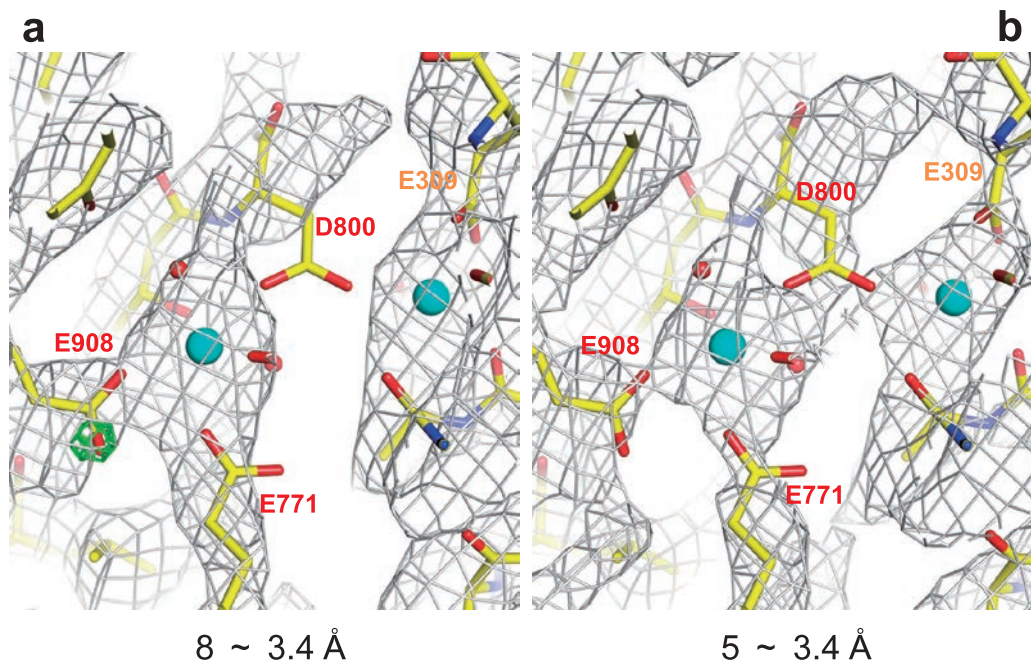


図5  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位のクローンポテンシャルマップ<sup>9)</sup>。モデルからの構造因子の計算には、全ての荷電アミノ酸側鎖に部分電荷を与えている。(a)8~3.4 Å分解能の反射点のみを用いて得られたマップ。800番目のアスパラギン酸(D800)側鎖に相当する部分(図中のネット)が欠失している。また、部分電荷を仮定したモデルからのずれを示すマップでは、908の番目のグルタミン酸(E908)側鎖にプロトン化を示す差(緑のネット)が現れる。(b)5~3.4 Å分解能の反射点のみを用いて得られたマップ。D800の側鎖に相当する部分が現れる。部分電荷を仮定したモデルからの有意なずれはみられない。D: アスパラギン酸, E: グルタミン酸。2つの水色の球は $\text{Ca}^{2+}$ を表す。分子全体のネットの表示レベルは $1\sigma$ 、(a)の緑のネットは $3.5\sigma$ の有意水準に相当する。

品でも構造解析に利用できることが分かった<sup>9)</sup>。解析プログラムでは、複数のフレームにわたる回折点の積算を図4(b)の平均強度分布で重み付けすることで、より正確な強度情報を取得できる<sup>9)</sup>。

#### 4. 荷電状態の情報を付加した原子モデル

開発したシステムを、ウサギ筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase<sup>3)</sup>と牛肝臓カタラーゼ<sup>4)</sup>のごく薄い(150 nm以下)三次元結晶の構造解析に適用した。X線結晶構造解析の原子モデル<sup>3,18)</sup>を用いた分子置換法により構造決定した結果、これらの蛋白質のクローンポテンシャルマップから、機能部位にあるアミノ酸や金属イオンの荷電状態の可視化に成功した(図5, 6)。

筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseは筋小胞体にある膜蛋白質で、筋収縮の際に放出される $\text{Ca}^{2+}$ を筋小胞体中に回収するポンプとして働く。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの膜内領域にある $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位は、主に、アスパラギン酸とグルタミン酸の酸性アミノ酸で構成される。負電荷を持つ原子の電子線の散乱因子が低分解能側で負の値をとることを反映し(図2)、低分解能領域を含めた理論的なクローンポテンシャルマップでは負電荷を持つ原子に相当する部分が欠失する。実際、8~3.4 Å分解能の反射点のみを用いて得たマップでは、2つの $\text{Ca}^{2+}$ に挟まれた800番目の残基であるアスパラギン酸側鎖に相当する部分は解像されない(図5aで有意水準 $1\sigma$ の表示レベルにおいて該当するネットはない)<sup>9)</sup>。一方、低い分解能領域を除いた

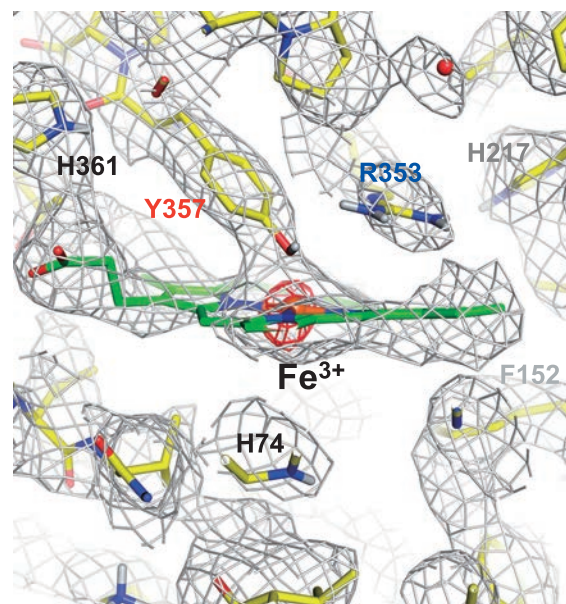


図6 カタラーゼの活性部位のクローンポテンシャルマップ<sup>9)</sup>。8~3.2 Å分解能の反射点のみを用いて得られたマップ。活性部位の中央にあるヘムの鉄に三価の鉄の原子散乱因子(図2)を用いたモデルとのずれ(赤いネット)は大きく、今回の測定ではこの鉄が二価であることが示唆された。Y: チロシン, R: アルギニン, F: フェニルアラニン, H: ヒスチジン。分子全体のネットの表示レベルは $1.3\sigma$ 、赤いネットは $3.5\sigma$ の有意水準に相当する。

5 ~ 3.4 Å 分解能の反射点のみから得たマップでは、このアスパラギン酸側鎖に相当する部分が現れる (図 5b)。これらの特徴は、電子線の原子散乱因子と原子モデルを用いて計算した理論クーロンポテンシャルマップ中の特徴と一致する<sup>9)</sup>。また、このアスパラギン酸が、Ca<sup>2+</sup>の結合に関わる残基の中で最も酸性が強いという計算結果<sup>19)</sup>とも一致する。以上から、このアミノ酸側鎖が負電荷を持っていることを実験的に明らかにできた。

一方、負電荷を仮定したモデルからのずれを示すマップでは、908番目のグルタミン酸の側鎖に大きな差が現れ、この部位にプロトンが結合していることが示された (図 5a の緑のネット)<sup>9)</sup>。このプロトン化により、近傍の771番目のグルタミン酸との水素結合が形成され、Ca<sup>2+</sup>結合部位の安定化に寄与すると考えられる<sup>19)</sup>。

さらに、水溶性の超分子複合体であり、有害な過酸化水素を分解する酵素であるカタラーゼでも、8 ~ 3.2 Å 分解能の反射点のみを用いたクーロンポテンシャルマップから、その活性部位にあるヘムの鉄の荷電状態に関する情報を得ることができた (図 6)<sup>9)</sup>。

ここに示した特定のアミノ酸だけでなく、すべてのアミノ酸のクーロンポテンシャルマップを統計的に処理したところ、8 Å までの低分解能側の回折点を含んだ場合、アスパラギン酸とグルタミン酸の側鎖に負電荷を仮定しないモデルとのずれが大きくなる傾向が明瞭になった<sup>9)</sup>。このように、開発したシステムが、アミノ酸やイオンの荷電状態を解析する汎用性の高いツールになることを示すことができた<sup>9)</sup>。

## 5. まとめ

蛋白質のX線結晶構造解析技術は、KendrewとPerutzらによる先駆的な研究から半世紀以上を経て大きな進歩を遂げた。しかし、生体超分子複合体や微量しか調製できない膜蛋白質などの重要な機能を持つ試料の結晶作成が難しい状況に変わりはない。電子線三次元結晶構造解析により、これまで利用できなかった微小で薄い三次元結晶からの構造決定や、荷電状態の可視化が実現すれば、その有用性は非常に大きいと考えられる。現状では、位相を実験的に求めることができておらず、また、データを測定できない領域が錐状に残るいわゆる“ミッシングコーン”の問題もある。克服すべき課題も多いが、この手法を新しい基礎技術として確立し、生命科学の発展や医療、創薬、工学などの広い分野への貢献を目指したい。

## 謝 辞

ここに紹介した電子線回折計の調整と稼働に関し、日立ハイテクフィールドングの野元昭吾さん、小川修一さん、松本敏博さん、杉野耕紀さん、日立ハイテクノロジーズの皆川勝之さんに感謝いたします。杖田淳子さんにはCa<sup>2+</sup>-ATPaseの結晶の調製に、眞木さおりさんには結晶凍結と回折パターン測定への補助をしていただきました。お礼申し上げます。研究開発は、JST 先端計測分析技術・機器開発プログラム、科研費挑戦的萌芽研究 (24657111)、特別推進研究 (23000014) の支援を得て行いました。

## 文 献

- 1) Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K.H.: *J. Mol. Biol.*, 213, 899–929 (1990)
- 2) Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Harrison, S.C. and Walz, T.: *Nature*, 438, 633–638 (2005)
- 3) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H.: *Nature*, 405, 647–655 (2000)
- 4) Dorset, D.L. and Parsons, D.F.: *Acta Cryst.*, A31, 210–215 (1975)
- 5) Jeng, T.W. and Chiu, W.: *J. Mol. Biol.*, 164, 329–346 (1983)
- 6) Stuart, M.C.A., Koning, R.I., Oostergetel, G.T. and Brisson, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1663, 108–116 (2004)
- 7) Chapman, H.N. et al.: *Nature*, 470, 73–77 (2011)
- 8) Pedrini, B. et al.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 369, 20130500 (2014)
- 9) Yonekura, K., Kato, K., Ogasawara, M., Tomita, M. and Toyoshima, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 3368–3373 (2015)
- 10) Nannenga, B.L., Shi, D., Leslie, A.G.W. and Gonen, T.: *Nat. Methods*, 11, 927–930 (2014)
- 11) Henderson, R.: *Q. Rev. Biophys.*, 28, 171–193 (1995)
- 12) Prince, E. (Ed.): *International Tables for Crystallography*, John Wiley & Sons Inc., Vol. C 263–281 (2006)
- 13) Hirai, T., Mitsuoka, K., Kidera, A. and Fujiyoshi, Y.: *J. Electr. Microsc.*, 56, 131–140 (2007)
- 14) Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., Miyazawa, A., Kidera, A., Kimura, Y. and Fujiyoshi, Y.: *J. Mol. Biol.*, 286, 861–882 (1999)
- 15) Taya, S., Taniguchi, Y., Nakazawa, E. and Usukura, J.: *J. Electron Microsc.*, 45, 307–313 (1996)
- 16) Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. and Namba, K.: *Biophys. J.*, 82, 2784–2797 (2002)
- 17) Angert, I., Burmester, C., Dinges, C., Rose, H. and Schröder, R.R.: *Ultramicroscopy*, 63, 181–192 (1996)
- 18) Foroughi, L.M., Kang, Y.-N. and Matzger, A.J.: *Cryst. Growth Des.*, 11, 1294–1298 (2011)
- 19) Sugita, Y., Miyashita, N., Ikeguchi, M., Kidera, A. and Toyoshima, C.: *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 6150–6151 (2005)