

電顕画像からの自動3次元再構成法の開発とTRPチャネルの構造

小椋 俊彦^{a, b}, 三尾 和弘^a, 佐藤 主税^{a*}^a産業技術総合研究所脳神経情報研究部門, ^b科学技術振興機構さきがけ研究員

キーワード: 単粒子構造解析, TRPチャネル, 画像分類, 画像認識, オイラー角推定

1. はじめに

電子顕微鏡画像から蛋白質の3次元構造を決定する単粒子構造解析法は、結晶サンプルを必要としない極めて汎用性の高い方法である。しかし、多くの処理が手作業であるため解析期間が2年以上必要であり、その分解能もX線結晶解析やNMRと比較すると低い。そのため、解析速度と分解能の向上が極めて重要な課題となっている。これまで我々の研究室では、Neural NetworkやSimulated Annealing (SA)等の柔軟な情報処理の方法論を単粒子構造解析に取り入れ、様々な処理の自動化と分解能の向上を達成してきた。本稿では、粒子像の3次元角度推定法の歴史を述べ、さらに我々が最近開発した自動決定法を概説する。さらに、この手法を用いて、神経可塑性や細胞死に関与するTRPC3チャネルの構造解析を行い、その3次元構造を10Åの分解能で解析した。こうして解析された結果は、生理学や薬理学など多くの生物学分野で活用されるものと予想される。

2. 単粒子構造解析の概要

生物の多種多様な機能の多くは、重要な基本コンポーネントである蛋白質の働きによって実現されている。個々の蛋白質は、精緻で特異的な3次元構造を形成することで極めて複雑な機能を実現している。そのため、生体内の生理機能や生化学反応、さらに病理の解明や薬理特性の解析において、個々の蛋白質の3次元構造を解明することが極めて重要となる。こうした理由から、現在多くの蛋白質の3次元構造解析がX線結晶構造解析により進行中である。しかし、蛋白質の結晶化が必要であるため、結晶化が困難な膜蛋白質は解析が難しい。細胞膜に存在する膜蛋白質は、細胞間の情報伝達や外部環境に対する細胞応答を担っており、生理学的にも薬理的にも極めて重要である。しかし先の理由より、そのほとんどが手付かずのままである。

こうしたことから、電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析法と呼ばれる解析方法が脚光を集めつつある。この方法では、薄い氷の層に閉じ込めた蛋白質粒子を極低温電子顕微鏡で撮影し、この画像だけから3次元構造を求めていく。具体的には、まず電顕画像内に点在する蛋白質粒子部分の画像を選択的に拾い上げる。こうして拾い上げた数千から数万の粒子画像の位置や回転角度を推定し、それぞれに適合した角度や位置で加算平均を計算し、バックグラウンドノイズを減少させてS/N比を向上させる。この平均画像を基にそれぞれの3次元角度を推定し3次元構造を再構築する¹⁾。そのため結晶サンプルが必要なく、伝達物質や薬物などによる構造変化も、サンプル作成時に付加するだけで解析が可能である。また、蛋白質が細胞内で機能する時には、様々な種類の蛋白質と結合し複合体を形成することが必要であるが、こうした蛋白質複合体に関しても、解析が可能になる。

3. 粒子平均画像の角度推定法の概要

単粒子構造解析では、分類された後のクラスごとの平均画像から3次元構造を構築する。こうした平均画像は、蛋白質をさまざまな角度から投射したプロジェクションと捉えることができるが、そのオイラー角や回転角は未知である(図1)。そのため、各平均画像のオイラー角と回転角を画像情報のみから推定する必要がある。こうした画像情報のみから角度を推定する方法として、中央断面定理に基づくシノグラム法が用いられてきた²⁾。しかし、この方法では、2次元画像を回転させながら投射して1次元データへと変換するため情報が大幅に減少し極めて精度が悪かった。そのため、この方法では、対称性が高く角度推定範囲を大幅に絞り込める粒子に対しては有効であるが、対称性の極めて低い粒子では角度推定が困難であった。一度、初期の3次元モデル構造ができてしまえば、そこから様々な角度へのプロジェクションを作成し、これとのマッチングにより角度を推定する方法も提案されている³⁾。しかしこの方法では、高精度な初期の3次元モデルをいかに作るかが重要な問題となる。もし初期3次元モデルが実際の構造と大きく異なる場合は、その推定された角度も真値からかけ離れたものとなり、形成される3次元構造も実際の構造とは大きく異なる。当然のことながら、対称性を持たない一般的な蛋白質の場合には、その複雑さから人間が手

Toshihiko Ogura, Kazuhiro Mio and Chikara Sato: Development of accurate automatic 3D reconstruction method and the structure of TPRC3 channel

^a〒305-8568 つくば市梅園1-1-4

FAX: 029-861-6478

* E-mail: ti-sato@aist.go.jp

2007年11月6日受付

作業で3次元モデルを作ることは不可能に近い。

こうした、2次元画像から3次元構造を求める問題は、2次元画像の3次元オイラー角への最適配置問題と捉えることができる。通常こうした問題には、多くのローカルミニマムが存在する。そのため最急勾配法やニュートン法などのように最適な方向にのみ移動するだけではすぐにローカルミニマムにはまり、極めて悪い結果しか得られない。こうした問題を解くためには、ローカルミニマムから抜け出す方法を備えることが本質的に必要となる。

4. 新規角度推定法

最近我々は、SAを用いた3次元角度推定法を開発した⁴⁾。一般的に3次元角度推定問題では、極めて多くのローカルミニマムが存在しており、それらの多くは真の構造からかけ離れたものと想定される。SA法は、極めてローカルミニマムの多い最適配置問題や最短経路問題を現実的な精度で解くことが可能な最適化法の一つである。本方法を応用して、3次元角度推定問題においてもローカルミニマムから抜け出して、真の構造に近い形状まで近づけることが期待される。我々は、スコア関数として、各画像と再プロジェクションの相関関数を計算し、これが高くなるようなアルゴリズムを開発した。この理由としては、もし全ての平均画像の推定角度が最適ならば、再構成される3次元構造も極めて真の形状に近く、これから再投射される画像も元の平均画像と極めて類似するため、相関値が高くなる。これに対して、推定角度が実際の角度と異なる場合は、形成される3次元構造も真実からかけ離れるため、その再投射画像も異なり相関値は低くな

る。すなわち全ての画像の推定角度が実際の角度と一致した場合には、相関値の総和が最高となる。

SA法を用いた3次元モデルの再構成方法の概要を図2に示す。単粒子構造解析の初期に得られるプロジェクションのクラス平均画像中の粒子は、それぞれ様々な回転角を有し、さらに中心位置からのずれがあり、それらの値は未知である。こうした各画像の回転角度や位置、オイラー角を推定し、3次元モデルを再構成する必要がある。本論文で提案する方法では、まず各平均画像のオイラー角をランダムに設定しBack-projection (BP)により3次元モデルを作成する(図2左中)。各構成画像のオイラー角は真値とまったく異なっているため、実際の構造から大きくかけ離れている。次に、画像を一枚ランダムに選択し、オイラー角と画像の回転角、中心位置をランダムに変化させる(図2右上)。そして、この位置で再度BPを行い3次元モデルの再構成を行う。この再構成画像から全ての平均画像の対応するオイラー角へと再プロジェクションを行い、それぞれの平均画像との相関スコアを計算する(図2右下)。この全体のスコアが、画像の移動によって向上する場合は「移動」が確定する。もし、低下する場合は、遷移確率 $P(\Delta L)$ を計算し、これが0から1の乱数値より大きい場合に「移動」を確定させ、これ以下では移動を取り消して以前の位置に戻す。こうした一連のサイクルを繰り返しながら、徐々に温度係数を指数関数的に低下させることで、平均画像と再プロジェクションが徐々に類似するよう、回転角と位置が変化していき、それと同時に3次元構造も最適な形へと成長する(図2左下)。

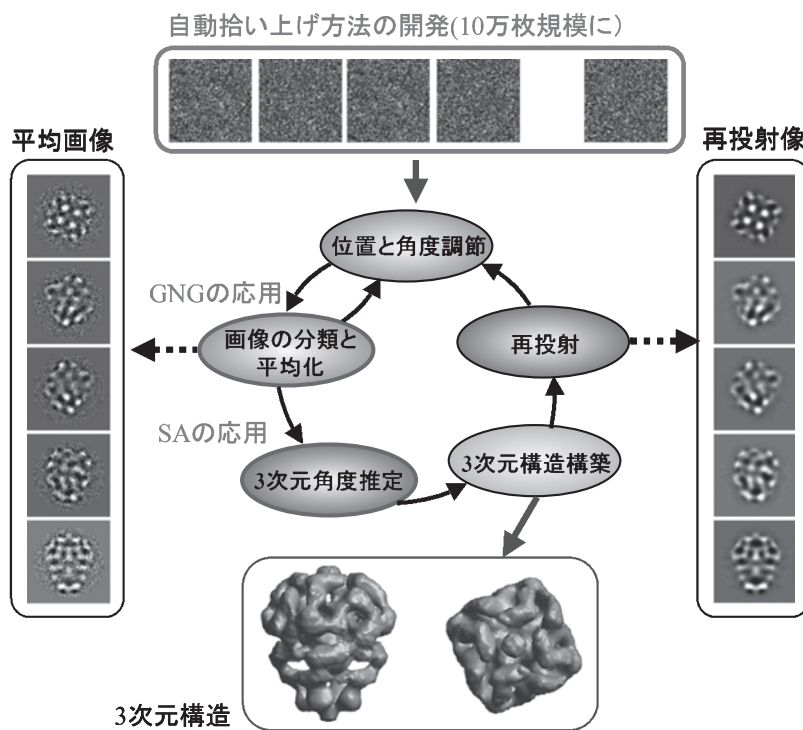


図1 単粒子構造解析法の概要。

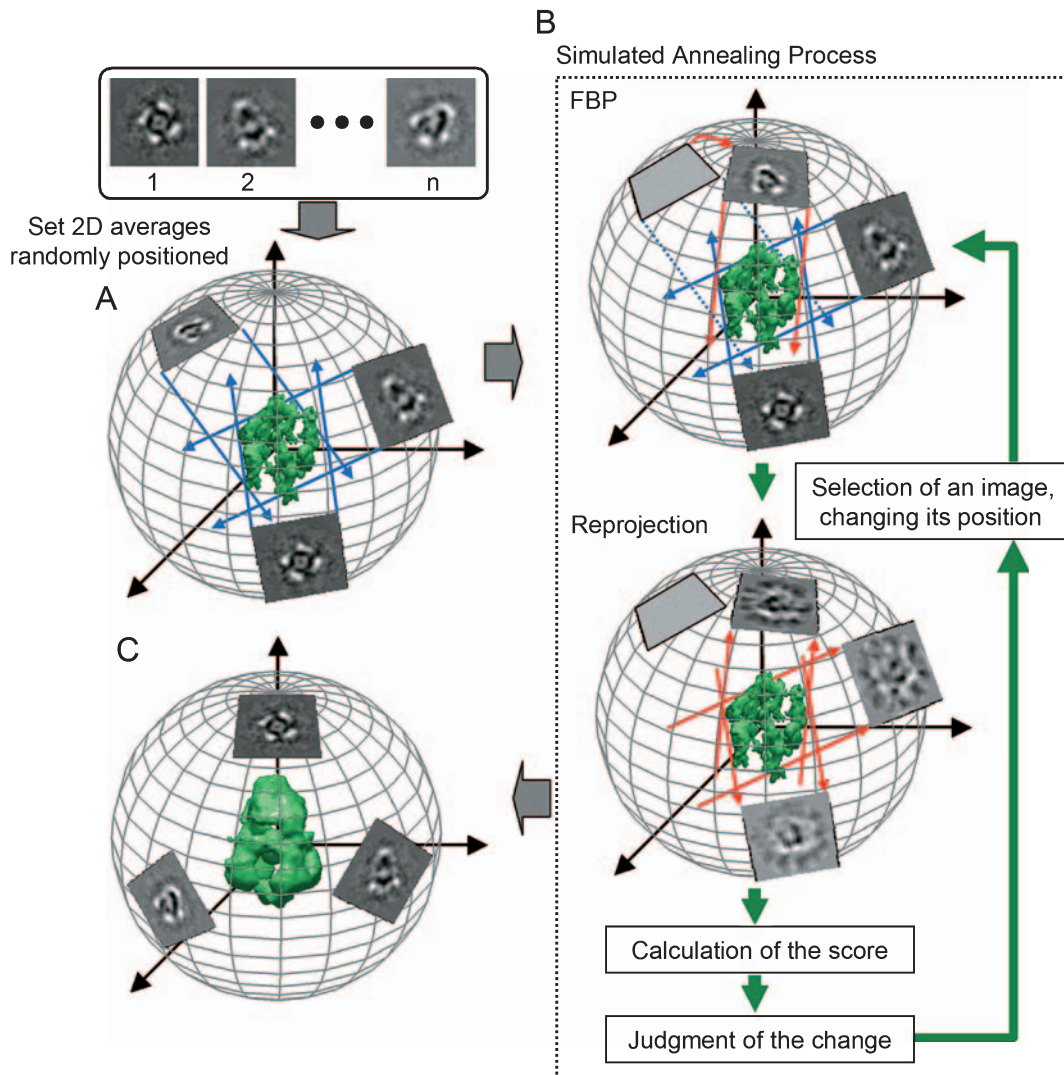


図2 Simulated-Annealing法を用いた新規角度推定方法の概要⁴⁾。

5. IP3受容体のクライオ電顕画像を用いた3次元再構築

本方法の妥当性を検証するため、IP3受容体のクライオ電顕画像のクラス平均画像を用いて確認を行った。IP3受容体は、細胞内の小胞膜に存在するレセプターで、IP3やCaイオンを受容することでチャンネルが開きカルシウムイオンを放出する⁵⁾。我々は、クライオ電顕を用いてIP3受容体の粒子画像を撮影し、15Åの分解能で単粒子構造解析を行っている⁶⁾。ここでは、テストデータとしてIP3受容体のクライオ電顕による粒子のクラス平均画像を用いて3次元再構築を行った。使用した平均画像は任意に選択した40枚であり、その角度や回転角・位置は図3aのようにバラバラの状態である。この画像をオイラーマップ上にランダムに配置し、本方法による再構築を行った。IP3受容体は4回対称性があるため、 γ の角度は0~90°に限定される。そして3次元再構築のFBP (Filtered-BP) では、各画像の α とさらに $\alpha+90^\circ$ 、 -90° 、 -180° の4角度からも同じ画像を投射させた。SA processを所定回数繰り返した後は、各画像のオイラー

角、回転角、位置が最適化され極めて妥当な位置に全ての画像が配置される。この時の3次元構造の変化とスコア変化を示したものが図3Cである。温度の低下と共にスコアが上昇し、3次元構造が徐々に形成されていく(図3B, C)。最終的に形成される3次元構造はモデルデータに極めて近く、IP3結合部位のL形状の部分も再現されている(図3D)。

この方法では数十枚のクラス平均画像に、いくつかのパラメータを設定するだけで、自動的に高精度な3次元モデルを作り出すことができる。計算の初期には温度パラメータが高いため、画像はほぼランダムにオイラー角や位置を変化させる。温度が徐々に減少するに従い、スコアが高くなる方向に移動が制限される。これは自然の分子が結晶化する状態を模倣したものであり、低エネルギー状態(本方法ではHigh Score)を達成するための必須条件である⁴⁾。自然における分子の結晶化では、温度低下がゆっくりであればあるほど良質な結晶が得られる。このことは、本方法にもあてはまり、急激に温度が低下した場合はノイズの多い不完全な3次元構造が構築される。一方、温度低下をスローにした場合は、極め

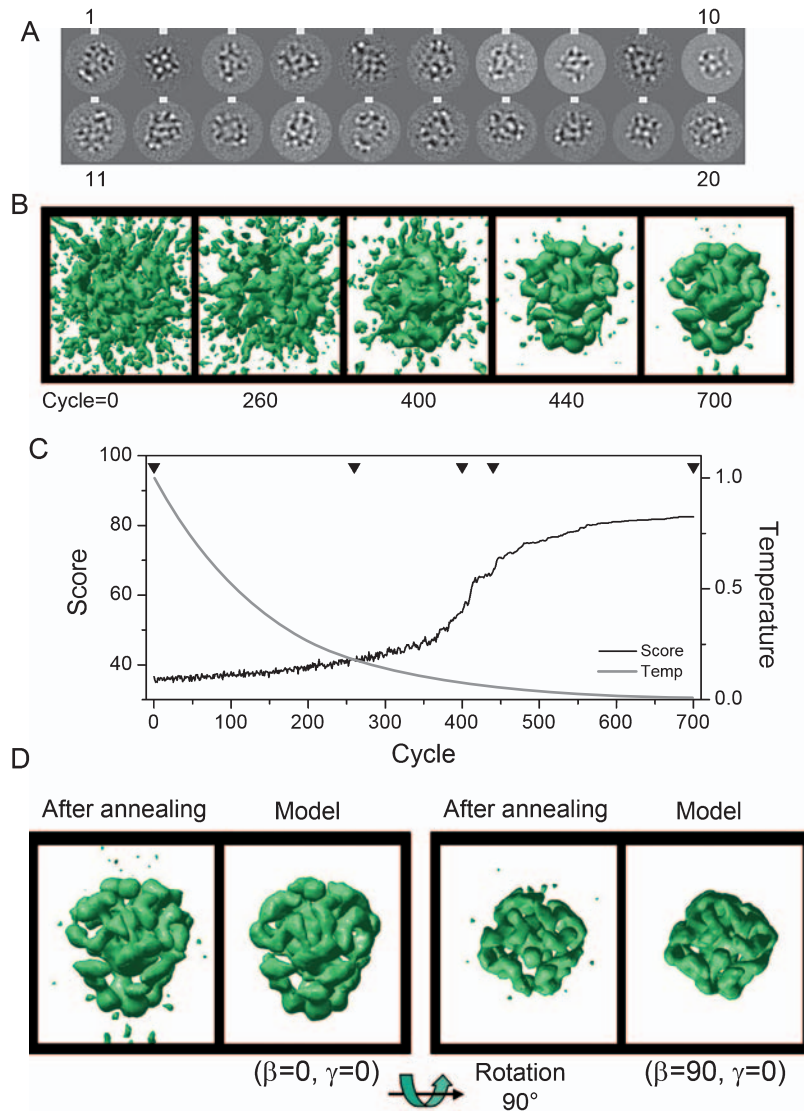


図3 IP3受容体の平均画像による本方法の精度検証。

て真の構造に近い形状となる⁴⁾。こうした結果からも、3次元角度推定問題には極めて多くのローカルミニマムが存在しており、急激な温度低下では真の形状とかけ離れたローカルミニマムにトラップされることが確認できる。そのため、温度をゆっくりと低下させ、その間に計算回数を増やせば増やすほど、より最適な角度を推定することが可能となる。

さらに本方法では、非対称粒子であるリボゾーム RF (Release factor) 2 のオイラー角・回転角・位置がバラバラなプロジェクション群から、オリジナルの構造を自動的にほぼ形成することができた⁴⁾ (図4)。従来の方法では非対称粒子に対する角度決定は極めて困難であり、いくつかの方法を試行錯誤的に組合せながら角度を決定していた。そのため角度の精度は悪く、不完全な構造しか形成できなかった。これに比べて本方法では、2次元平均画像と再構成された3次元構造からの再プロジェクションとの相関をスコアとすることで、数学的な最適化問題として定義し、これをSAアルゴリズムで解決している。これまでにも、こうした2次元画像の

マッチングを用いた方法がいくつか提案されているが、これらはあらかじめ基となる3次元構造が必要で、さらにスコアを最適な方向のみに変更させるため、容易にローカルミニマムにトラップされる。そのため妥当な構造を得ることが極めて困難であった。こうした方法は、イメージ的には結晶化における急速冷凍的な方法のため、そこで形成される構造はアモルファス構造となり良質の結晶を得ることは困難であることと似ている。我々の方法では、初期構造も不用で、ローカルミニマムをエスケープし妥当な構造を自動的に形成することが可能である。ここでの2次元画像のBPと再プロジェクションは、比較的負荷の高い計算であるため、現実的な計算回数は限定される。今回のRF2やIP3受容体の計算では、700cycleで通常のパソコンで3日ほど費やした。しかしながら、画像処理の計算は繰り返し部分が多く、数十台のコンピュータによる並列化が容易である。これにより、計算速度を10倍以上高めることが可能であると思われる。今後は、本アルゴリズムの並列・分散化により計算速度を向上させ、

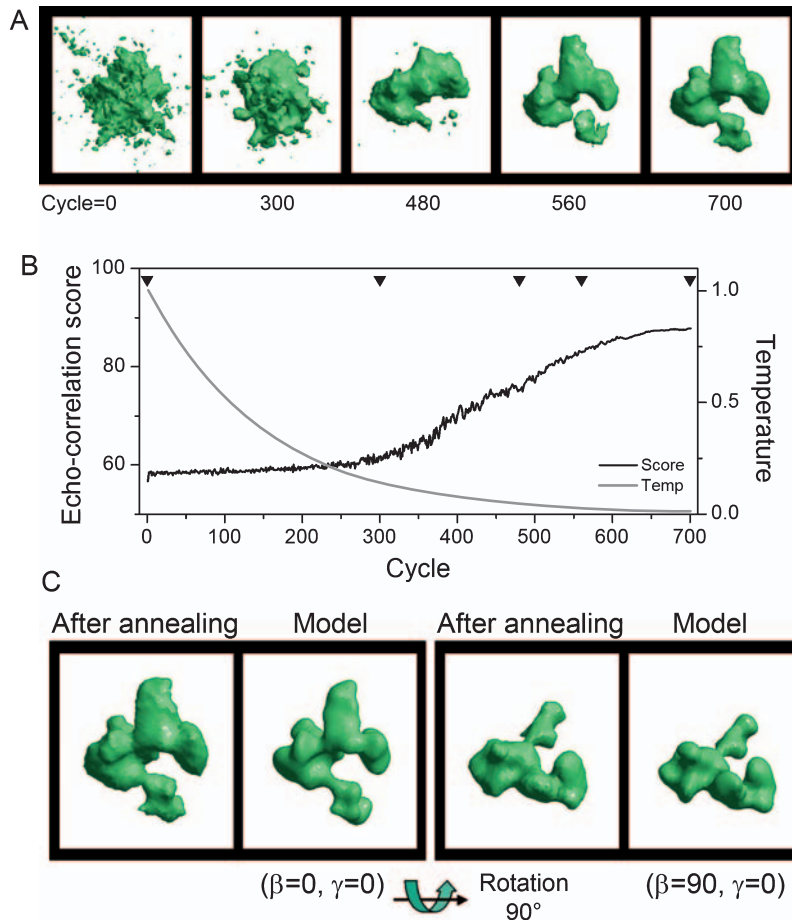


図4 非対称粒子 RF2 のモデル画像による本方法の精度検証。

計算回数を増やすことで精度を向上させると共に、1日で計算を終了させるシステムの開発を行う予定である。

6. TRPC3 チャンネルの構造解析

TRP (transient receptor potential) channel はショウジョウバエの光受容体異常を引き起こす *trp* 遺伝子のホモログとして見つかった遺伝子群で、ヒトでは30近くの異なるチャンネル種からなる Superfamily として報告されている。細胞膜に存在し、温度感受や酸化ストレス、浸透圧、味覚等々、様々なセンサー的役割を担っている。それぞれの刺激特異的にイオン通路チャンネルが開閉し、分子内への Ca^{2+} 等のイオン流入が行われる。しかし、その構造は全くの未知であった。

我々は単粒子解析法を用い、このファミリーの中で最も生理学的な研究の積み重ねの多い TRPC3 の構造解析を、クライオ電子顕微鏡で撮影した画像を用いて行った⁷⁾。TRPC3 はホスホリパーゼ C γ の直接的結合、および産生される Diacylglycerol により活性化する。また Ca^{2+} 放出に働く小胞膜 IP3 受容体チャンネルも TRPC3 と直接結合して活性を制御するため、TRPC3 は長年想定されてきた SOC (Store Operated Channel: 細胞内小胞での Ca イオン枯渇を感知して開閉するチャンネル) そのものと考えられている。

負染色電子顕微鏡を用いた検討から、「軟らかい」構造を

持つタンパク質と推定されたため⁸⁾、13万6千枚ものクライオ粒子画像を用いて3次元構造の構築を行った。今回分解能 10\AA (6σ ノイズカーブとの交点、Fourier shell correlation: FSC > 0.5 の定義では 15.3\AA) で決定された構造から、TRPC3 は高さ 240\AA 幅 200\AA の隙間だらけの膨れあがった構造を持つことが分かった。外側はワイヤー状の構造で中心にはイオンが入り込むと思われる小部屋状になっていた。外側のワイヤーが3次元的な結合スペースをつくり出し、そのアンテナのような張り出しが様々な制御タンパク質との同時結合を可能にしていると思われる。これはマルチセンサーである TRP チャンネルとしては極めて理にかなった構造であると言える。本報告は TRP superfamily の中で初めての構造解明であると共に、そこから得られた表面構造からは、IP3 受容体と 1:1 の比率で結合する可能性が示唆された (図5)。

このように単粒子構造解析法は、結晶化の難しいタンパク質の構造解析に利点がある。我々は最近、TRP superfamily の中でも酸化センサーとして働くと考えられている TRPM2 チャンネルの3次元構造も、負染色電子顕微鏡画像を用いて解析した⁹⁾。また、TRP ファミリー以外のイオンチャンネルでは、細胞内膜からの Ca^{2+} 放出を助ける TRIC channel が近年、京大の竹島浩教授等によって発見された。そのサイズはわずか 90kDa と小さい。本システム開発によって、このようなサ

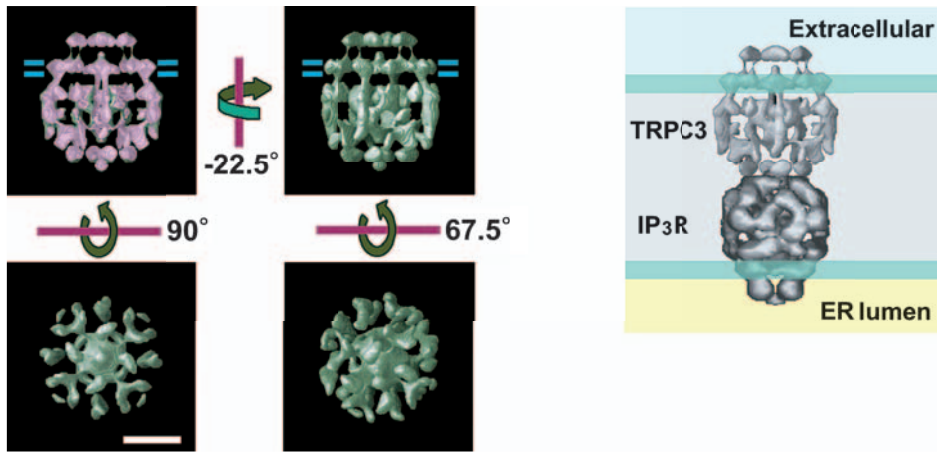


図5 TRPC3 チャンネルの3次元構造。
左：13万6千枚のクライオ電子顕微鏡画像から再構築されたTRPC3チャンネルの3次元構造。赤で示した図は分子量388kDa、緑は分子量610kDaで構築されたイメージである。細胞膜の位置を青の二重線で示した。バーは100オングストロームを示す。右：2004年に3次元構造が決定されたIP3受容体との結合イメージ。構築されたTRPC3の立体構造はIP3受容体と似た大きさであることがわかり、それぞれが1:1の比率で結合する可能性が示された。

イズの膜蛋白質の単粒子解析も可能になった¹⁰⁾。

7. まとめ

2次元画像から3次元構造を推定する問題は、単粒子構造解析のみならず画像処理全般に関わる極めて重要な問題である。医学・生物学関連の分野においても、実験により得られるデータは顕微鏡画像のように2次元画像であることが多く、ここから3次元構造を推定できれば、より生物機能に対する理解を深めることができる。こうした視点は、蛋白質の機能解析において特に顕著であり、蛋白質の機能を探るためには、それぞれの蛋白質の3次元構造を高精度に調べることが重要となる。単粒子構造解析は、結晶化が困難で質量の大きな膜蛋白質の構造を決定することが可能な方法であり、最近では幾つかのチャンネルやレセプターの構造が解析されている¹⁾。

単粒子構造解析は、コンピュータ上における2次元画像を用いた結晶化と捉えることができる。そのため、自然の結晶化のメカニズムを模倣したSA法と極めて相性が良い。我々は、SA法を用いた粒子の拾い上げ法も報告しており、いくつかのパラメータを設定するだけで自動的に粒子を拾い上げることができる¹¹⁾。こうした戦略は、単粒子解析のアライメントを含めた数々の処理にも応用が可能と考えられる。さらに、この拾い上げ法と今回提案した3次元角度推定法、さらに高精度なGNGによる画像分類法¹²⁾を組合せることで、ほぼ完全な自動蛋白質構造解析システムを構築することが可能と思われる。さらに本方法は、単粒子構造解析だけでなく、2次元画像から3次元構造を構築するための極めて汎用的な方法である。その適用範囲は画像処理全般に及ぶため、さまざまな応用分野に用いられる可能性がある。

8. おわりに

単粒子解析は、タンパク質の結晶サンプルを必要としない。そのため、結晶化の困難なタンパク質の構造解析に必須の手法となりつつある。本手法では必要とされるタンパク質量は数 μg であり、これまで開発されてきた画像処理法や分

類法を用いればタンパク精製も完全である必要はない。今後は、結晶化が困難な超分子複合体や構造変化の解析に用いられることが期待される。

謝 辞

クライオ電子顕微鏡像を京大生物物理、藤吉好則教授とグループの方々に感謝いたします。また、TRPC3チャンネルに関して京大工、森泰生教授とグループの方々に感謝いたします。さらに、IP3受容体精製を東大医科研、御子柴克彦教授とそのグループの方々に感謝いたします。本研究の画像処理の一部は阿部幸絵、柳原真佐子が、生化学の一部は三尾宗代が行った。本成果は、NEDO、科研費、科学技術振興機構・さががけ研究の支援による。

文 献

- 1) Frank, J.: Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies, Academic Press, 2006
- 2) van Heel, M.: *Ultramicroscopy*, 21, 111-123 (1987)
- 3) Penczek, P.A., Grassucci, R.A. and Frank, J.: *Ultramicroscopy*, 53, 251-270 (1994)
- 4) Ogura, T. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, 156, 371-386 (2006)
- 5) Furuichi, T. et al.: *Nature*, 342, 32-38 (1989)
- 6) Sato, C., Hamada, K., Ogura, T., Miyazawa, A., Iwasaki, K., Hiroaki, Y., Tani, K., Terauchi, A., Fujiyoshi, Y. and Mikoshiba, K.: *J. Mol. Biol.*, 336, 155-164 (2004)
- 7) Mio, K., Ogura, T., Kiyonaka, S., Hiroaki, Y., Tanimura, Y., Fujiyoshi, Y., Mori, Y. and Sato, C.: *J. Mol. Biol.*, 367, 373-383 (2007)
- 8) Mio, K., Ogura, T., Hara, Y., Mori, Y. and Sato, C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333, 768-777 (2005)
- 9) Maruyama, Y., Ogura, T., Mio, K., Kiyonaka, S., Kato, K., Mori, Y. and Sato, C.: *J. Biol. Chem.*, 282(51), 36961-36970 (2007)
- 10) Yazawa, M., Ferrante, C., Feng, J., Mio, K., Ogura, T., Zhang, M., Lin, P.H., Pan, Z., Komazaki, S., Kato, K., Nishi, M., Zhao, X., Weisleder, N., Sato, C., Ma, J. and Takeshima, H.: *Nature*, 448, 78-82 (2007)
- 11) Ogura, T. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, 146, 344-358 (2004)
- 12) Ogura, T., Iwasaki, K. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, 143, 185-200 (2003)