

生体超分子の高分解能構造解析のための電子線イメージングの条件

Electron Imaging towards High-Resolution Structure Analysis of Biological Macromolecules

米 倉 功 治

Koji Yonekura

理化学研究所放射光科学総合研究センター

要 旨 電子顕微鏡像からの生体高分子の構造解析は結晶化の困難な試料に対して有効な手法であるが、得られる構造の分解能はあまり高くないという認識が一般的であった。近年、4～3 Å 台の分解能に到達し、アミノ酸側鎖を可視化したという報告がなされてきており、得られた密度マップに基づいて新規構造の原子モデルを直接構築できた例もある。低温電子顕微鏡法では、結晶格子に縛られないより生理的な構造が解析できるだけでなく、今後、分解能の面でも X 線結晶回折法に匹敵する手法となっていくものと期待される。本稿では、低温電子顕微鏡法で高分解能構造解析を行うための必要な撮影条件等を解説し、細菌のべん毛繊維や球状ウィルス蛋白質等の解析の実例を紹介する。

キーワード：低温電子顕微鏡，生体超分子，高分解能構造解析

1. はじめに

電子顕微鏡像からの生体高分子構造の解析は、結晶化困難な試料に対して広く行われるようになってきている。しかし、得られる構造の分解能は、20～30 Å 程度で、分子の概形がわかる程度という認識が一般的であった。近年、4～3 Å 台の分解能に到達し、アミノ酸側鎖を可視化したという報告がなされてきている。得られた密度マップに基づいて、新規構造の原子モデルを直接構築できた例もある（文献 1-2 等）。生体分子の電子顕微鏡を使った高分解能構造解析は、Henderson らが好塩性古細菌のバクテリオロドプシンの二次元結晶から原子モデルの構築に成功した 1990 年の論文が最初の例である³⁾。この過程で開発された電子線回折の振幅情報と実像由来の位相情報を組み合わせる手法により、現在では、2 Å より良い分解能の構造解析が膜蛋白質の理想的な二次元結晶から達成されている⁴⁾。一方で、二次元結晶の作製はある種の膜蛋白質を除いて容易ではなく、また、そのような試料でも X 線結晶構造解析に適した三次元結晶が同時にできることが多いということもわかってきた。さて、結晶を作製することなく試料の実像からの構造解析、らせん再構成、単粒子解析等も 1960 年代から行われてきておりその歴史は古く、数十年にわたる分解能改善に向けた努力が続けられた結果、対称性の高い超分子複合体で上述の分解能に達することが可能となった。現状では原子レベルでの構造解析は X 線結晶回折法の独壇場といった感があるが、今後、低温電子顕微鏡法は分解能においても匹敵する手法となっていくもの

と期待される。結晶格子に縛られないより生理的な構造の解析ができる可能性も有り、その有用性は高い。現在、新しい検出装置の登場、電子分光装置の利用等に伴い、撮像条件の再検討も迫られている。本稿では、高分解能構造解析を行うための必要な撮影条件等を解説し、細菌のべん毛繊維や球状ウィルス蛋白質等の解析の実例を紹介する。

2. 撮像条件

電子線は、軽い原子との相互作用が X 線に比べて約十万倍も強く⁵⁾、電磁レンズを作ることにより、蛋白質一分子の実像を得ることができる。一方、相互作用が強いことは、扱える試料の厚さを制限し、加速電圧 100～300 kV の汎用的な電子顕微鏡では、数千 Å を超える厚さの試料の透過像を正確に解釈することはできない。X 線による構造解析が原子の電子雲からの散乱を反映するのに対して、電子線では電荷のポテンシャル分布を反映する。後述する弱位相弱振幅物体近似、弾性・非弾性散乱電子の比、像のコントラスト等の関係から生体高分子の高分解能の構造解析には、加速電圧 200～300 kV が適していると考えられている。

2.1 氷包埋

蛋白質分子は、主として炭素、窒素、酸素、水素等の軽い元素から構成される。そこでコントラストを上げるため、試料をウランやタングステン等の重金属塩で染色し乾燥させる、負染色が広く行われてきた。しかし、この方法では、染色むらや試料の変形は避けられない（図 1b）。一方、低温電子顕微鏡法では、試料溶液を電子顕微鏡用グリッドに載せ余分な溶液を吸いとった後、液体エタン中に落下させ急速に凍結、厚さ数十～150 nm 程度のアモルファスな氷に包埋することにより、生理的な環境下で無染色の試料を観察すること

〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

E-mail: yone@spring8.or.jp

2010 年 9 月 2 日受付

ができる (図 1c). 冷却することで電子線による試料損傷を大幅に低減でき、室温での観察に比べ液体窒素による冷却 (~90 K) で約 1/10 に、液体ヘリウム温度 (4 K) では、約 1/20 にすることができると考えられている⁶⁾. しかし、それでも試料損傷は深刻な問題であり、構造解析の分解能を制限する主因となる。電子線照射は試料に質量欠損を生じさせたり、共有結合を切断しラジカルを発生させたりする。生成したラジカルは周囲の構造を次々に破壊して、最終的に試料は蒸発してしまう。従って照射電子線量を非常に少なく抑える必要がある。高分解能の構造解析への目安として 10 ~ 20 電子/Å² 程度にしなければならず、結果として像の信号対雑音比は低くなる。

2.2 コントラスト

像のコントラストは、主に、試料中で弾性散乱によって位相が変えられた波と散乱されずに透過した波の干渉の結果生じる位相コントラストに起因する。電子線の試料への吸収や対物絞りの外への散乱から生じる振幅コントラストの寄与は小さい。試料と氷との電子散乱断面積の差は小さく、像のコントラストは低い。以上の条件下において、構造解析を信頼性高く行うには、多くの像の平均が必要となる。

電子顕微鏡像は、対物レンズにより特殊な点広がり関数 (point spread function; PSF) による変調を受ける。試料が薄い場合、その空間周波数 (k) 分布であるコントラスト伝達関数 (contrast transfer function; CTF) と試料の投影ポテンシャルのフーリエ変換との積を逆フーリエ変換したものが電子顕微鏡で得られる像となる (弱位相弱振幅物体近似)。CTF は式 (1) のように表せる。この導出に関しては、例えば文献 7) 等を参照のこと。

$$CTF(k) = \sin \left\{ 2\pi \left(\frac{1}{4} C_s \cdot \lambda^3 \cdot k^4 - \frac{1}{2} \Delta f \cdot \lambda \cdot k^2 \right) - \arcsin Q(k) \right\} \quad (1)$$

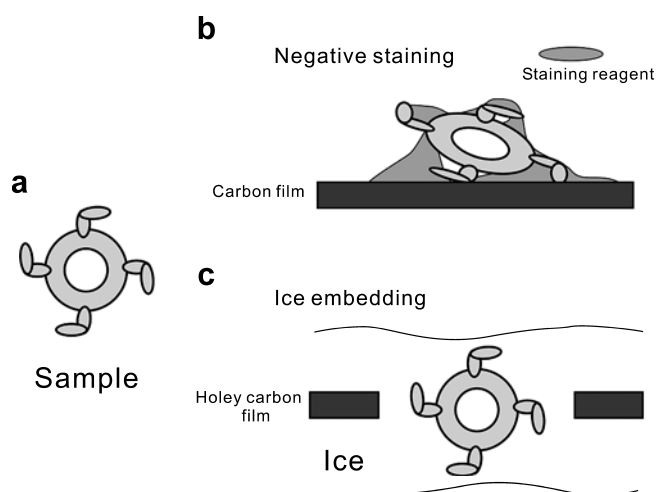


図 1 負染色と氷包埋における試料状態の比較。(a) 生理的環境下での蛋白質試料。(b) 負染色。(c) 氷包埋。負染色では、試料を重金属塩で染色し乾燥させるので、染色むらや変形が起こる。一方、氷包埋では水溶液中の生理的な環境下で試料を観察することができる。

ここで、 Δf は焦点のずれ (デフォーカス)、 C_s は対物レンズの球面収差係数、 λ は電子線の波長を示す。 $Q(k)$ は全コントラストに対する振幅コントラストの割合で、氷中の蛋白試料では数%程度しかなく、また、定数として扱って大きな問題はないことが知られている⁸⁾. ちなみに重金属による染色では、 Q の値は 35%程度になる。CTF はデフォーカスの関数で、絶対値の大ききなところでは対応する周波数成分が強調され、ゼロ点付近では失われる。CTF の符号が変わる周波数帯では、位相が反転し像のコントラストが反転してしまう。従って、正しい構造を得るためには画像解析による CTF の補正が必須となる (後述)。焦点が合っていると低周波数領域での CTF の値がゼロに近くなるため、コントラストは非常に悪く、何も写っていないように見える。そのため、通常、1 千 ~ 数千 nm 程度の不足焦点にして、低周波数成分のコントラストを増加させて像を撮影する必要がある。図 2a に $\Delta f = 1,500$ nm と $\Delta f = 100$ nm における理論カーブを示す。

CTF は電子線の可干渉性、色収差、加速電圧の揺らぎ等の影響から、周波数が高くなるに従い減衰する。(2) 式に、その減衰関数 (envelope function; ENV) を示す。

$$ENV(k) = \exp[-\{\pi\beta k(C_s \cdot \lambda^2 \cdot k^2 - \Delta f)\}^2] \cdot \exp\{-\{\pi\lambda k^2 \Delta\}^2 / 2\} \quad (2)$$

ここで、 β は照射の開き角で、 Δ は加速電圧 V の下で (3) 式のように定義される。

$$\Delta = C_c \sqrt{\left(2 \frac{\delta I}{I}\right)^2 + \left(\frac{\delta E}{V}\right)^2 + \left(\frac{\delta V}{V}\right)^2} \quad (3)$$

C_c は色収差係数、 $\delta I/I$ は対物電流の揺らぎ、 δE は電子銃からの放出電子のエネルギー幅、 $\delta V/V$ は加速電圧の揺らぎを表す。減衰関数も (2) 式のようにデフォーカスの関数で、デフォーカス量が大きくなるに従って減衰は速くなる (図 2a)。(1) 式と (2) 式が実際に対象のフーリエ変換像に掛かってくる。電界放射型の電子銃では電子線の干渉性が高く CTF の減衰が熱電子銃に比べて小さいため、生体分子の氷包埋像から高分解能の構造解析を行う上で、必須となっている (後述)。

2.3 エネルギーフィルター

入射電子と蛋白質を構成する軽原子との相互作用では、エネルギーを失う非弾性散乱が多いが、それらは試料を破壊すると共に結像の際、ノイズになる。電子線の分光装置 (エネルギーフィルター) を用いることで非弾性散乱された電子を除き、弾性散乱された電子のみによる像を得ることができる (ゼロロス像)。詳細は省くが、筆者らは非弾性散乱電子を除くことで見かけの吸収が起こり、振幅コントラストが二倍程度増加すること、また、信号対雑音比が大幅に改善されることを示した⁸⁾. 図 3b と c に電子分光のありなしで撮影したべん毛繊維の氷包埋像を示す。位相コントラストの CTF は周波数空間の原点でゼロとなり、低周波数領域では振幅コントラストが大きく影響する。従って、振幅コントラストが増すことで、像の“見え方”が改善されているのがわかる

(図 3b). エネルギーフィルターの製品化は進んできており、生体試料の構造解析へのさらなる利用が期待される。

2.4 Cs, Cc 補正

近年、透過電子顕微鏡 (TEM, STEM) の多極子レンズによる Cs 補正の実用化が大きな関心を集めている。先日、ある会合で Cs 補正は生物分野で役に立つのかという趣旨の質問を受けた。先刻承知の方も多と思われるが、ここでは式 (1), (2) に基づいて簡単な考察をしてみたい。ただし、STEM 観察に対する利点には触れない。プローブを移動させて対象の

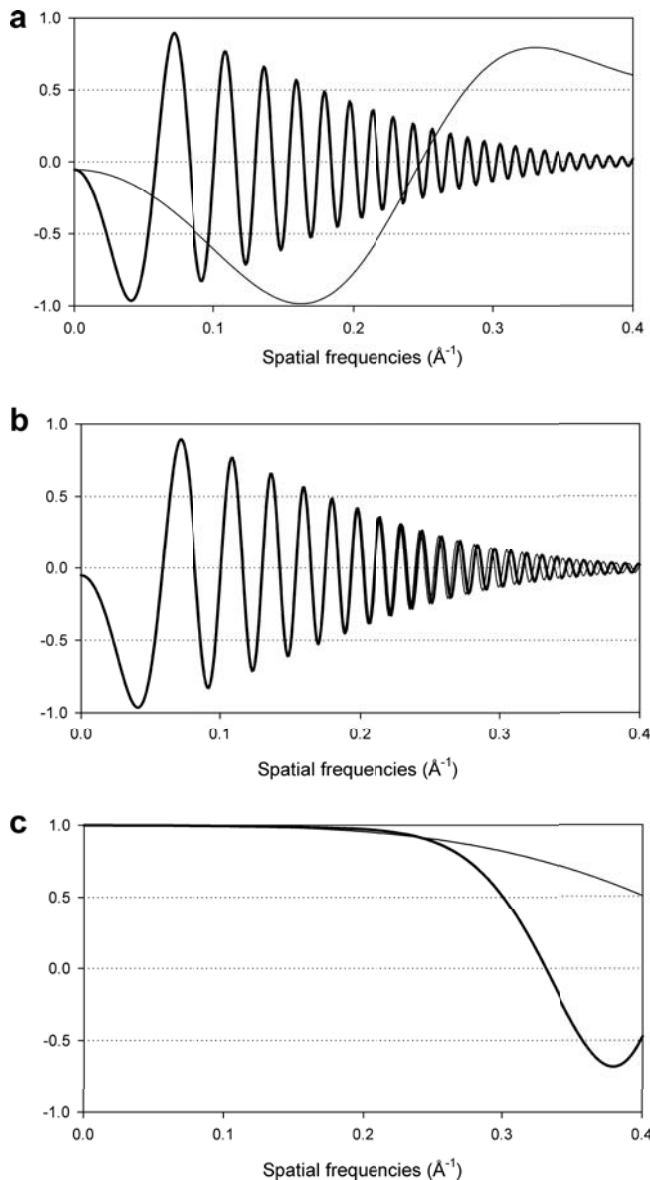


図 2 CTF の理論曲線の比較。(a) $C_s = 1.6 \text{ mm}$, $C_c = 2.2 \text{ mm}$ での理論曲線。太線: $\Delta f = 1,500 \text{ nm}$ 。細線: $\Delta f = 100 \text{ nm}$ 。高周波数成分の伸びはデフォーカス量が小さい方が良いが、低周波数成分の絶対値が低くコントラストはつかない。(b) $\Delta f = 1,500 \text{ nm}$ での C_s, C_c 補正の比較。太線: $C_s = 1.6 \text{ mm}$, $C_c = 2.2 \text{ mm}$ 。細線: $C_s = C_c = 0$ 。(c) (1) 式の \sin を \cos にした $\Delta f = 10 \text{ nm}$ の理論曲線。太線: $C_s = 1.6 \text{ mm}$, $C_c = 2.2 \text{ mm}$ 。細線: $C_s = C_c = 0$ 。いずれの曲線も、 $V = 300 \text{ kV}$, $\beta = 0.1 \text{ mrad}$, $\delta I/I = 0.000001$, $\delta V/V = 0.000002$, $\delta E = 1.0 \text{ eV}$, $Q = 5.3\%$ ⁸⁾ として計算した。

像を得る場合、電子線を当てる領域が極めて小さくとも、試料の帯電、周辺の温度の上昇、散乱した電子や破壊された試料からのラジカルが周囲に広がること等による影響で、ダメージが大きくなってしまふことは避けられない。従って、生体試料の水包埋像の観察には適していないと考えるからである。

さて、TEM 観察で Cs 補正は、(1), (2) 式の C_s の値をゼロにすることにより、球面収差のない像を得ることである。図 2b に、生物試料の撮影に用いられる $1,500 \text{ nm}$ 程度のデフォーカスの理論曲線を示す。ここで、 $V = 300 \text{ kV}$, $\beta = 0.1 \text{ mrad}$, $\delta I/I = 0.000001$, $\delta V/V = 0.000002$, $\delta E = 1.0 \text{ eV}$, $Q = 5.3\%$ ⁸⁾ として計算した。 $C_s = 1.6 \text{ mm}$, $C_c = 2.2 \text{ mm}$ の曲線は、 C_s, C_c が共にゼロのときと比べてほとんど違いみられない。(2) 式の減衰関数もデフォーカス量に依存するため、色収差 C_c をゼロにすることもできて利点は少ない。図 2c では位相板を導入して、CTF を \sin から \cos に変換した際の理論曲線を示す。 \cos 関数の性質からデフォーカス量がゼロでも低分解能領域の CTF の絶対値を大きくできることが位相板の最大の利点であるが、ここでもデフォーカス量が 10 nm 程度で 3.3 \AA 程度の分解能までならば、 C_s, C_c 共に補正の効果をみるのは難しい。デフォーカス、 C_s, C_c がみなゼロであ

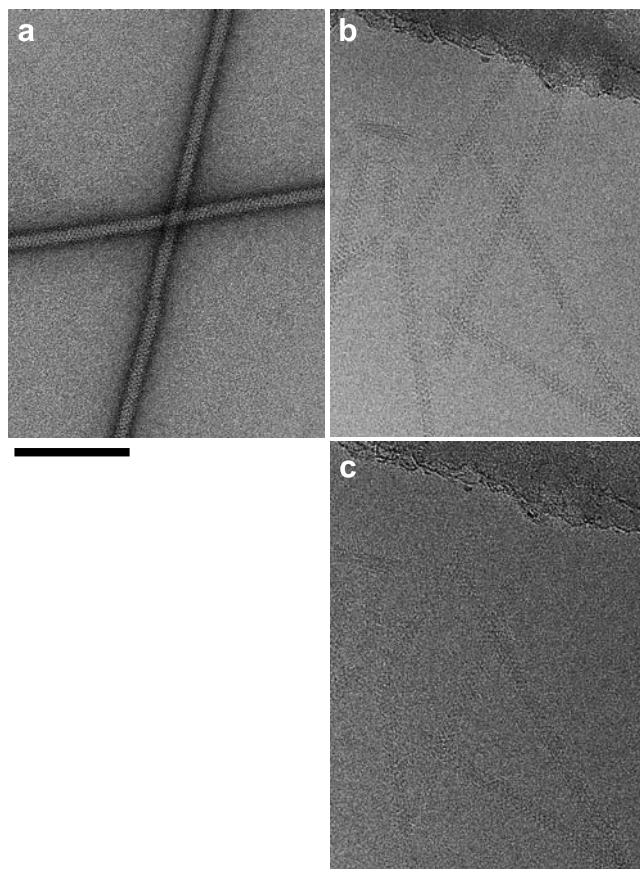


図 3 細菌べん毛繊維の負染色像と氷包埋像の比較。(a) 負染色像。(b) 電子分光により非弾性散乱電子を除き撮影した氷包埋像。(c) b と同一視野を電子分光しないで撮影。べん毛繊維と炭素支持膜 (上部) の端のコントラストが電子分光により改善されているのがわかる⁸⁾。スケールバーの大きさは $1,000 \text{ \AA}$ 。

れば、減衰はなくなる (2, 3 式). しかし, 低電子線量撮影モードで \cos 関数型の CTF からフォーカスを対象へ正確に合わせることは困難であり, また, 対象は通常 10 nm 以上の大きさがあるため (氷の厚さは数十~150 nm 程度), 実際に Cs, Cc 補正の恩恵を受けることは期待できないと思われる. 一方, カーボン膜を用いた位相板 (文献 9 等) では, 7~8 Å 程度で急激に構造因子が減衰することが知られており, 高分解能解析に適さないと思われる¹⁰⁾. また, 静電型の位相板では, 焦点面に挿入される電極及びその支持棒に遮られ情報が失われる周波数領域が大きくなってしまっているのが現状である.

以上から, デフォーカスが大きな条件下では, 照射の開き角 β を小さくすることが CTF の減衰に実質的に影響を与える唯一の因子であることがわかる (2, 3 式). 従って, 電界放射型電子銃からの空間干渉性の良い電子線を並行照射することが重要になる.

2.5 記録メディア

以前は写真フィルムに記録した電子顕微鏡写真をスキャナーで読み込み, デジタル画像に変換, 画像解析に用いるのが一般的であった. 近年, 操作の利便性とデータ確認の即時性のため, シンチレーターと結合したスロースキャン CCD または CMOS の利用が増えてきている. シンチレーターの厚さに依存するが全般に高感度で, 低分解能領域では信号対雑音比がフィルムより良いという報告もある (文献 11 等). しかし, 200~300 kV 程度の加速電圧では, 電子線の隣接ピクセルへの染み出しが大きくなってしまふ. 周辺への染み出しを point spread function (PSF) と呼び, そのフーリエ変換である modulation transfer function (MTF) で評価する. 評価には, 量子検出効率 (detective quantum efficiency;

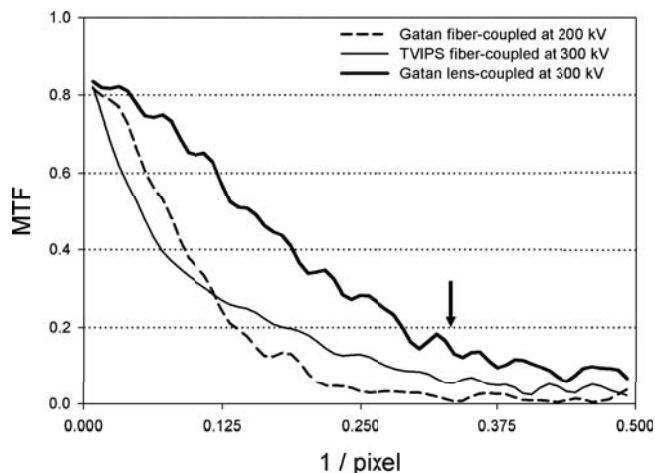


図4 スロースキャン CCD カメラの MTF の比較¹²⁾. 点線: GATAN 社のファイバー結合型のカメラ. 加速電圧 200 kV で測定. 細線: TVIPS 社のファイバー結合型のカメラ. 加速電圧 300 kV. 太線: GATAN 社のレンズ供役型のカメラ. 加速電圧 300 kV. ピクセルサイズはいずれも 15 μm で, 80 照射電子/ピクセルの条件で測定. 横軸の 0.5 がナイキスト周波数に相当. 矢印は 110,000 倍で撮影したときに, 4 Å に相当する周波数を示す. MTF はシンチレーターの厚さに依存するため, ここでは目安であることに注意.

DQE) の周波数依存性もよく使われる. 図 4 (点線と細線) に示すように高加速電子線に対して MTF の減衰は非常に速く, ナイキスト (Nyquist) 周波数の半分 (横軸 0.25) で 0.1 以下になってしまう. 電子線回折では, 回折点の積分強度を集めればよく PSF はあまり問題にされないが, 実像からの解析では深刻である. このため高分解能構造解析を目指すのであれば, 依然として MTF の減衰が比較的小さい写真フィルムが用いられることが多い.

通常, シンチレーターと撮像素子の間は, ガラスファイバーで接続されるが, 筆者らはシンチレーターで発生した光だけをベリリウム鏡で反射して CCD に取り込むレンズ供役型のカメラを試しており, MTF の向上が見られることを示している (図 4 の太線)¹²⁾. 同カメラの DQE は, MTF と同様の周波数依存性を示しその絶対値も低くない.

写真フィルムではかぶり濃度 (fog level) が高く, 5 万倍で 10~20 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$ 程度の照射条件が適当であった. この場合, 3~4 Å の分解能を目指すのであれば, 5~7 μm 程度の間隔でスキャナーにより数値化する必要がある. 一方, 現在実用になるデジタル検出器は, 感度が高く電子線量を減らしても像を得ることはできる. 特に電子分光時には試料の厚さにより到達電子線量が 1/2~2/3 になる場合があり, デジタル検出器の使用は必須となる. 上述のように, 信号対雑音比はナイキスト周波数の 1/5 程度までならば勝っている (文献 11 等). ピクセルサイズは 15 μm 程度であること, 高分解能領域の MTF が良くないこと等を考慮して 10 万倍程度の倍率での撮影が実用的である. この場合, 電子線照射量を 15~20 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$ (電子分光後, 200~350 カウント/ピクセルに相当) で撮影するのが, 得られる情報との関係で良いようである^{8,12)}.

最近, シンチレーターを持たず, 直接電子線を受ける方式の検出器が商品化された. このカメラでは, MTF は高分解能領域まで顕著な伸びを示す. しかし, 電子線照射に対する素子の劣化は激しく, 頻りに交換することが必要であるとみられている. また, 一部のピクセルに電子線が大量に照射される電子線回折の記録には適さない.

2.6 撮影温度

電子線照射損傷を低く保つためには, 冷媒として液体ヘリウムを使用することが, 目的に適う. 一方, 試料を包埋しているアモルファスな氷は, 20 K 以下で 2~3 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$ 程度の照射で容易に低密度から高密度へと相変化してしまう¹³⁾. 低密度相の氷の密度は 0.94 g/cm^3 であるのに対して高密度相では 1.1 g/cm^3 となり, 試料蛋白質 (1.2~1.4 g/cm^3) との差は小さくなる. 実際, 液体ヘリウム冷却下ではコントラストが低下することが報告されている (文献 12 等). また, 高密度相の氷では粘性が下がり水中で試料が動き易くなること¹³⁾, 伝導性が悪くなり帯電し易くなることが指摘されており, いずれも像の劣化につながる. 筆者の経験では, 液体ヘリウムタンクを鏡筒に内蔵した日本電子の電子顕微鏡の冷却ステージ以外は, 液体ヘリウム冷却時の安定性が低くドリフトも大きいようである. さて, 30 K から 70 K では高密度相の氷は低

密度相に自発的に相変換するが、電子線を照射することで再度高密度相の水が生成する¹³⁾。氷相の状態からは、液体窒素冷却による 80 K から 100 K 程度の温度範囲が、試料を低密度のアモルファスな氷に安定に包埋しておくのに最適な範囲となる。それ以上に温度が上昇すると結晶状態の水に相変化してしまう。氷の相変化は、温度が高くなるほど速やかに進むことが知られる¹³⁾。上述のように液体ヘリウムによる冷却は、試料損傷軽減に有利であり、分解能に依存するが、約 2 倍の電子線量を照射できると考えられている⁶⁾。しかし、最近では、4 Å 分解能より良い構造解析も液体窒素温度で撮影した像から成されている(文献 2 等)。今後、新しい検出器に対応して、照射電子線量と試料損傷、得られる信号、撮影倍率等の関係を再検討する必要があるであろう。

3. 構造解析

3.1 CTF 補正

文献 14) 等に述べたので試料形態に基づく解析の特徴、手順については、ここでは記述しない。CTF の影響を受けない電子線回折の振幅情報が得られる二次元結晶と異なり、実像からの解析では位相に加え振幅も実像由来であるため、CTF をより正確に補正することが必要となる。上述のようにフォーカスを大きくずらして撮影するので、高分解能の解析には CTF のゼロ点を越えた領域の情報を活用することが鍵となる。そのためには、デフォーカス量と二次の非点収差をカーボン膜や試料それ自身から正確に決定することが求められる。補正は、電子顕微鏡像のフーリエ変換を CTF で割り算すればよいが、CTF のゼロ点のため一枚の像の完全な補正はできない。そこで焦点のずれの違う複数の像からのフーリエ変換を CTF で重み付けし平均するか(文献 15 等)、Wiener フィルターを用いる。高空間周波数領域で CTF の振動は激しく(図 2a, b)、CTF パラメーターの誤差は深刻となるので、そのためにも多くの像平均が必要となる。その上で、異なる方向からの像を集め、個々の像の電子線に対する投影角、位置等を正確に求め、三次元再構成を行うのが基本的な流れとなる。

3.2 分解能

(4) 式の Fourier shell correlation (FSC) が、分解能の標準的な評価基準となっている。実際の計算は、解析データを 2 つのグループに分けそれぞれ独立に三次元再構成した後、2 つの密度マップの構造因子 ($\mathbf{F}_1, \mathbf{F}_2$) の間で空間周波数 k に対する相関係数を求める。

$$FSC(k) = \frac{\sum \mathbf{F}_1(k) \mathbf{F}_2^*(k)}{\sqrt{\sum |\mathbf{F}_1(k)|^2 \sum |\mathbf{F}_2(k)|^2}} \quad (4)$$

ここで \mathbf{F}^* は \mathbf{F} の複素共役、和は対応する空間周波数に寄与する構造因子の間でとる(データの数に相当する)。経験的に $FSC = 0.5$ となる空間周波数が分解能の目安となってきたが、その定義上、半分のデータを用いた再構成の分解能しか評価できないため、全データからの三次元再構成の分解能

が過小評価されていると考える研究者もいた。Henderson らは、全データを用いたときの基準として、 $FSC = 0.145$ 、または下の式で表す $C_{ref} = 0.5$ という値を提唱し¹⁶⁾、現在受け入れられるようになってきている。本稿ではこの式の導入の説明は省略する。

$$C_{ref} = \sqrt{\frac{2 \cdot FSC}{1 + FSC}} \quad (5)$$

評価の妥当性は、2 つのデータセットが完全に独立に扱われていることが前提になる。しかし、個々の像の投影方向、位置を精密化する過程で 2 つのデータセットの相関を完全に排除することは通常難しく、また、種々の要因によりデータセット間で構造因子の相関がたまたま高くなる可能性も否定できない。従って、上の基準では必ずしも分解能の妥当性を示すとはいえない。

筆者らは、密度マップに基づいて原子モデルが構築できた場合、X 線結晶学で用いられている以下の Figure of merit (FOM) を改変し、分解能の基準として用いた^{11,17)}。

$$FOM = \sum \frac{|\mathbf{F}|}{|\mathbf{F}_{EM}|} / N \quad (6)$$

ただし、 N は像の数、 \mathbf{F}_{EM} は電子顕微鏡由来(実験データ)の構造因子で、

$$\mathbf{F} = \frac{\int_{\alpha} P_{EM}(\alpha) P_{calc}(\alpha) \mathbf{F}_{EM}(\alpha) d\alpha}{\int_{\alpha} P_{EM}(\alpha) P_{calc}(\alpha) d\alpha}, \quad (7)$$

P_{calc}, P_{EM} はそれぞれ原子モデルと実験データのある位相 α における確率分布を示し、以下の式のように表す。

$$P_{EM}(\alpha) P_{calc}(\alpha) = \exp\{X1 \cdot \cos(\alpha - \alpha_{EM})\} \cdot \exp\{X2 \cdot \cos(\alpha - \alpha_{calc})\} \quad (8)$$

ここで、 $\alpha_{EM}, \alpha_{calc}$ は、それぞれ実験データとモデルデータ由来の位相に対応し、 $X = X1 = X2$ として、以下のように定義した。

$$X = \frac{2w \cdot |\mathbf{F}_{EM}| \cdot |\mathbf{F}_{calc}|}{|w \cdot \mathbf{F}_{EM} - \mathbf{F}_{calc}|^2} \quad (9)$$

\mathbf{F}_{calc} はモデルデータ由来の構造因子、 w はモデルデータの実験データに対するの振幅の比で、空間周波数での平均を表す。

4. 解析の実例

4.1 らせん再構成法による細菌べん毛繊維の構造解析

細菌の運動器官であるべん毛は、細胞膜を透過するイオン流を使って 200 ~ 300 Hz で回転する生体分子機械であり、約 30 種類の異なった蛋白質からなる超分子複合体である。べん毛繊維は分子量約 5 万の一種の蛋白質フラジェリンから構築される。2 万 ~ 3 万ものフラジェリンがらせん状に重合し、その長さは菌体長の約 10 倍、10 ~ 15 μm にも達する。筆者らは、低温電子顕微鏡法とらせん再構成の技術開発^{15,18 ~ 20)}を進め、サルモネラ菌の直線型べん毛繊維の立体構造を約 4 Å 分解能で解析した¹⁾。電子顕微鏡像からの構造解析では、実像から信頼性の高い位相情報を直接得ることができる。こ

ここでは、 α -ヘリックスのねじれが非常に良く解像できた他、大きな側鎖に相当する密度も解像できたため、得られた密度図に基づき原子モデルを構築した¹⁾。図5にべん毛繊維の原子モデルを示すが、フラジェリンが繊維の最内側で α -ヘリックス束を形成し、繊維構造を安定化することが明らかになった。分子間で密な疎水性相互作用を形成するこの内側部位は、繊維形成能のないフラジェリン断片の結晶構造²¹⁾には含まれない。両者の間には、他の部位にも構造の違いが認められ、結晶中と実際の繊維の構造に大きな違いがあることが明らかになった。この結果、結晶格子に縛られない、生体超分子の生理的構造を解析できる低温電子顕微鏡法の利点が明確になった。べん毛は病原性細菌の病原因子分泌装置 (Type III 輸送装置) と遺伝的に高い相関関係にある。病原因子は、ニードルと呼ばれる繊維中央のチャンネルを通して宿主まで運ばれるが、この解析により、その輸送経路の構造に関する詳細な情報を初めて得ることができたということも付け加えたい¹⁾。

上に紹介したのは、図5の右に示したR型と呼ばれる繊維構造である。細菌の遊泳には、べん毛繊維が緩やかな曲率を持つ左巻き超らせん形態をとることが必要である。一方、餌となる化学物質に向かったり水温の低い場所から逃げたりする際、べん毛モーターの逆回転が起こり、べん毛繊維の超ら

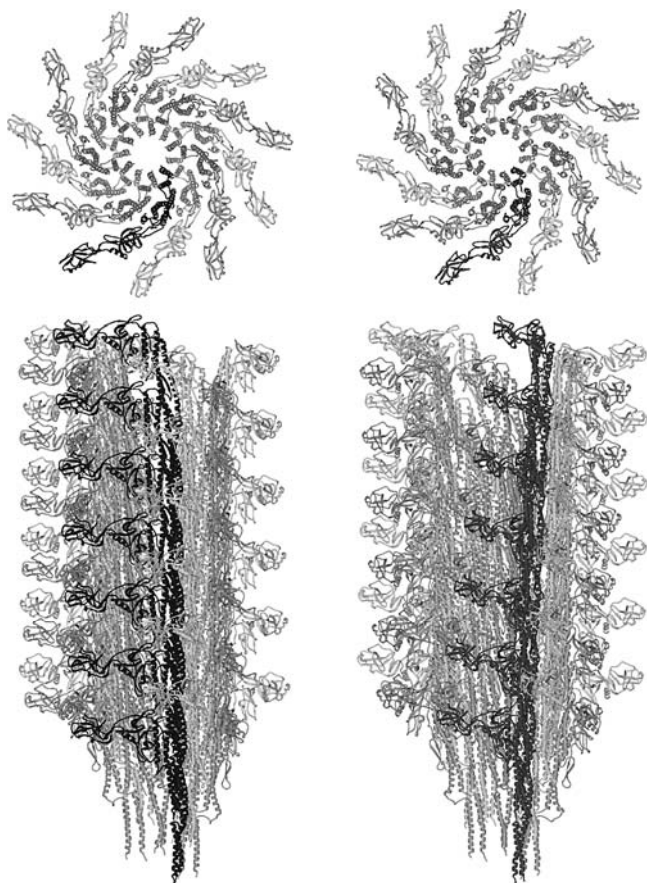


図5 細菌べん毛繊維の原子モデル^{1,17)}。上：べん毛繊維軸方向から見たもの。下：横から見たもの。左：L型繊維。右：R型繊維。見やすいよう一本の素繊維の色を濃くして表示。べん毛繊維の直径は240 Å。

せん構造が左巻きから右巻きに変換する。超らせん構造はコンフォメーションの異なる二種類の素繊維、L型とR型との混合から形成される²²⁾。最近、筆者らはL型のべん毛繊維を同程度の分解能で構造解析し (図5左)、両者の繊維構造を詳細に比較した結果、繊維中でフラジェリンの立体構造が柔軟に変化することを明らかにした¹⁷⁾。一方、モーターの高速回転、反転にも安定な繊維構造を保つため、繊維最内側の α -ヘリックスの束が密な相互作用が重要であることが分かった¹⁷⁾。

4.2 単粒子解析による高分解能の構造解析

最近、らせん対称性を持つタバコモザイクウイルス²³⁾、正二十面对称性を持つ球状ウイルスの構成蛋白質²⁾等で、単粒子解析により大きなアミノ酸側鎖の解像ができる分解能と品質の構造解析が成されている。後者では3.3 Å分解能が達成されている (図6b)。一般に、対象の大きさ (D)、分解能 (d)、及びその分解能において必要とされる投影像の数 (N) の関係を表す下の式が知られている。

$$N = \pi \cdot D/d \quad (10)$$

タバコモザイクウイルスの直径は約180 Å、上記の球状ウイルス構成蛋白質粒子の直径は、約800 Åであるため、4 Å分解能で解析するためには、計算上は、それぞれ約140枚と630枚の異なる方向からの投影像があればよいということになる。ただし、ここでは投影方向は等角度で分布していると仮定している。実際には、電子線照射損傷や試料の微動による像の劣化、信号対雑音比の低い像の整列の誤差、CTFや倍率等各種パラメーターの誤差から、はるかに多くの電子顕微鏡像が必要となる。上のウイルス試料は分子内に高い対称性を有するため、十分細かい間隔で構造因子を集めることができるが、三次元構造の計算には、それぞれ約二十万個と百万個強の非対称単位の平均が必要であった。一方、分子内の対称性の低い試料、分子量の小さい試料の単粒子解析では、依然として高い分解能を得ることは難しいのが現状である。

R型のべん毛繊維 (直径約240 Å) の解析では、使用した繊維像の数は102本で、この数は約42,000個の分子像に相当する¹⁾。らせん対称性という一次元の結晶性からは、フーリエフィルタリングにより抽出した信号部を、像の整列、倍率の補正等に用いることで、単粒子解析と比べて、桁違いに良い精度で解を得ることが可能になる。この解析では、さらに、液体ヘリウム温度で電子線による試料損傷を最小限に抑えたこと⁶⁾や、らせん対称性が高分解能領域までよく保たれている像のみを選択したこと¹⁹⁾、加えて、繊維像の三次元的な歪み補正¹⁵⁾、溶媒領域より畳み込まれるノイズの除去¹⁸⁾等の画像解析が、分解能の改善に非常に有効であった。その結果、上の単粒子解析の例より少ない数の分子像から、二次構造の特徴、ループ、大きなアミノ酸側鎖等を解像できる構造解析を行うことができたと考えられる (図6a)¹⁾。実際、コンフォメーションの異なるL型べん毛繊維では、多くの繊維像から厳選し約37,000個の分子像から、同様の解析により同程度の分解能と品質の密度図を得ている¹⁷⁾。

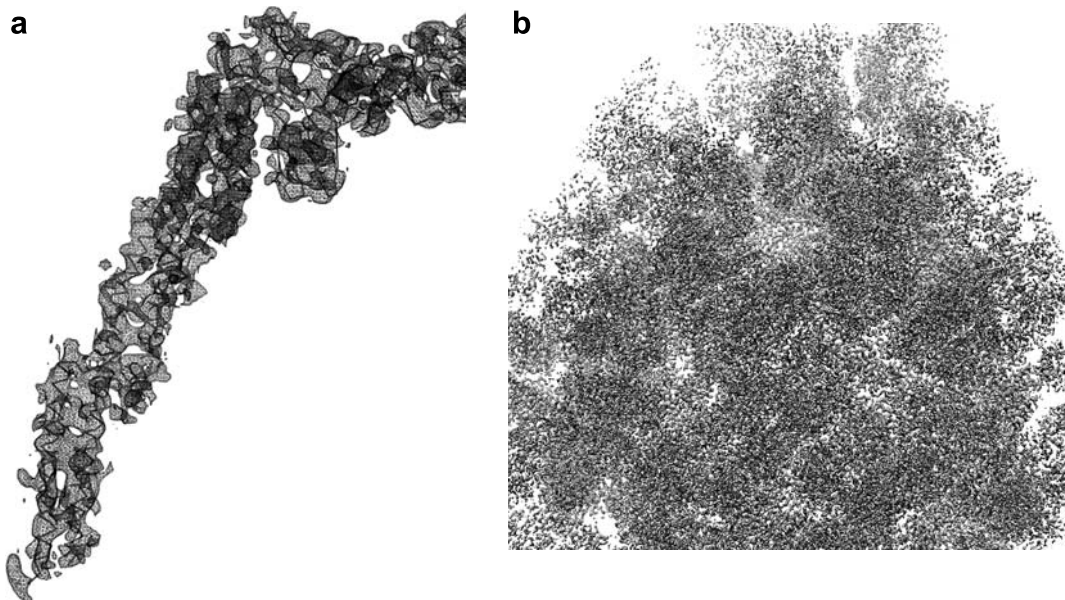


図6 低温電子顕微鏡法により得られた高分解能の密度図の例。(a) R型べん毛繊維中のフラジェリン分子の密度図とその原子モデルの α トレースを重ねて表示¹⁾。(b) aquareovirusの感染性ウィルス構成粒子²⁾。この密度図とモデルの一致度は、原著論文を参照のこと。(b)は、EM Data Bank (<http://emdatbank.org>)より、ダウンロードしたもの(ID codeはEMD-5160)。図は、UCSF Chimera²⁴⁾で作成。

5. 展望

低温電子顕微鏡法は現在もまだ発展途上の部分もあり、得られる構造の分解能は通常高くないが、近年、二次元結晶以外でも、対称性の高い試料からアミノ酸側鎖の解像が可能な分解能で構造解析できた例は増えつつある。上述したように他の解析手法に比べ試料形態の制限が緩く、超分子複合体の自然な動作環境下での構造を解析することができるということは、生命機能解明のための非常に大きな利点である。本稿では触れなかったが、低温電子線トモグラフィーでは、氷に包埋した無染色の試料の傾斜像を集めることで、細胞小器官、細胞、組織の一部等の非均一な試料の三次元構造の解析を行うことができ、その汎用性は際だっている。原子モデルの構築できる分解能に達するためには、現状では巨大で対称性の高い試料であることが必要である。ハード・ソフトの技術進歩により、低温電子顕微鏡法の重要性は今後ますます高まっていくことは間違いないと考えられる。

謝 辞

本稿の校正で助言をいただき、紹介した研究を共に行なった理化学研究所眞木さおり研究員に感謝いたします。また、草稿に詳細なコメントをいただいた名古屋大学山崎順さん、大阪大学荒河一渡さんにお礼申し上げます。

文 献

- 1) Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. and Namba, K.: *Nature*, **424**, 643–650 (2003)
- 2) Zhang, X., Jin, L., Fang, Q., Hui, W.H. and Zhou, Z.H.: *Cell*, **141**, 472–482 (2010)
- 3) Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E.

- and Downing, K.H.: *J. Mol. Biol.*, **213**, 899–929 (1990)
- 4) Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Harrison, S.C. and Walz, T.: *Nature*, **438**, 633–638 (2005)
- 5) Henderson, R.: *Q. Rev. Biophys.*, **28**, 171–193 (1995)
- 6) Fujiyoshi, Y.: *Adv. Biophys.*, **35**, 25–80 (1998)
- 7) 米倉功治, 眞木さおり: 顕微鏡, **42**, 29–34 (2007)
- 8) Yonekura, K., Braunfeld, M.B., Maki-Yonekura, S. and Agard, D.A.: *J. Struct. Biol.*, **156**, 524–536 (2006)
- 9) Danev, R., Glaeser, R.M. and Nagayama, K.: *Ultramicroscopy*, **109**, 312–325 (2009).
- 10) Murata, K., Liu, X., Danev, R., Jakana, J., Schmid, M.F., King, J., Nagayama, K. and Chiu, W.: *Structure*, **18**, 903–912 (2010)
- 11) Booth, C.R., Jiang, W., Baker, M.L., Zhou, Z.H., Ludtke, S.J. and Chiu, W.: *J. Struct. Biol.*, **147**, 116–127 (2004)
- 12) Maki-Yonekura, S. and Yonekura, K.: *Microsc. Microanal.*, **14**, 362–369 (2008)
- 13) Heide, H.G. and Zeitler, E.: *Ultramicroscopy*, **16**, 151–160 (1985)
- 14) 米倉功治: 日本結晶学会誌, **52**, 56–61 (2010)
- 15) Yonekura, K. and Toyoshima, C.: *Ultramicroscopy*, **107**, 1141–1158 (2007)
- 16) Rosenthal, P.B. and Henderson, R.: *J. Mol. Biol.*, **333**, 721–745 (2003)
- 17) Maki-Yonekura, S., Yonekura, K. and Namba, K.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 417–422 (2010)
- 18) Yonekura, K. and Toyoshima, C.: *Ultramicroscopy*, **84**, 29–45 (2000)
- 19) Yonekura, K., Toyoshima, C., Maki-Yonekura, S. and Namba, K.: *J. Struct. Biol.*, **144**, 184–194 (2003)
- 20) Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. and Namba, K.: *Structure*, **13**, 407–412 (2005)
- 21) Samatey, F.A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M. and Namba, K.: *Nature*, **410**, 331–337 (2001)
- 22) Asakura, S.: *Adv. Biophys.*, **1**, 99–155 (1970)
- 23) Sachse, C., Chen, J.Z., Coureux, P.D., Stroupe, M.E., Fändrich, M. and Grigorieff, N.: *J. Mol. Biol.*, **371**, 812–835 (2007)
- 24) Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E.: *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605–1612 (2004)