単粒子解析法による膜タンパク質の電子顕微鏡構造解析 —酸化ストレス感受や聴覚増幅などに働くセンサー分子を例として—

三尾和弘^{1,2}, 小椋俊彦^{1,3}, 丸山雄介¹, 佐藤主税^{1,2}

¹産総研・脳神経情報研究部門

²産総研・バイオメディカル情報研究センター

³科学技術振興機構・さきがけ研究員

1. はじめに

タンパク質構造解析を取り巻く環境は、ここ 10 年で大きく変わりつつある。わずかに数マイクロリットルの試料で結晶化スクリーニングが可能なロボットの登場や解析ソフトウェアの整備、世界各国でのナショナルプロジェクトなどにより、タンパク質データベース (PDB) の登録数もすでに 5 万件を超えている (2009 年 1 月現在)。近年では構造変化のスナップショットや機能制御タンパク質との共結晶など、より難解な構造の解明に向けたチャレンジも果敢に進められている。一方その陰で膜タンパク質や巨大複合体など、重篤な疾病の原因解明や生理機能の理解に不可欠であるにもかかわらず、結晶化の難しさゆえに解析から取り残されているタンパク質も少なからず存在する。

De Rosier と Klug は、電子顕微鏡で撮影した 2 次元の画像を元にそこから 3 次元構造を再構築できることを示した¹⁾。この技術はその後単粒子解析法へと発展し、核酸とタンパク質の複合体で高コントラスト画像が得られるリボソーム分子や、対称性が高く計算上メリットのある球状ウイルス分子、らせん対称分子への応用がさかんに行われるようになった²⁾。現在ではソフトウェアの開発やコンピュータ処理能力の向上に伴い、正 20 面体構造をもつ球状ウイルスのキャプシドでは原子分解能に迫る 3 Å 台後半の分解能が得られつつある^{3), 4)}。

われわれの研究室では特に膜タンパク質を始めとする難結晶性タンパク質の構造解析に向けて、単粒子解析法の技術開発を推進している⁵⁾⁻⁹⁾。単粒子解析技術

について、酸化ストレスを感受する TRPM2 チャンネルや、内耳で聴覚増幅を司るプレスティンの解析結果を交えながら紹介する。

2. 膜タンパク質の電子顕微鏡撮影

膜タンパク質は細胞膜から取り出された状態では不安定で、容易に変性してしまう。安定に抽出するためには臨界ミセル濃度 (CMC) 以上の界面活性剤を用いて、疎水領域を包み込むような形で可溶化する。

構造解析に用いるためには変性をなるべく抑えた状態で純度を高めていかなければならない。われわれは通常、抗体を使ったアフィニティー精製と分子量で分離するゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせた 2～3 段階のマイルドな精製系を構築し、よい結果を得ている。最終ステップのゲルろ過精製はもち越した混入物を除くためだけではなく、多量体構造から解離したサブユニットや部分変性により異なる移動度を示す分子を除くためにも有効である。また各精製ステップで負染色電子顕微鏡観察を行い、粒子の均一性や粒子パッキング状態の確認を行っている¹⁰⁾。

精製したタンパク質溶液は、タンパク密度の低い場所へのウラン染色液の沈着を観察する負染色電子顕微鏡法、あるいは緩衝液に浮遊したまま瞬間凍結させて直接観察するクライオ電子顕微鏡法で撮影して解析用粒子像を得る (図 1)。前者は高コントラストな粒子像が得られるためデータとして扱いやすいが、染色液の不均一な沈着によるアーティファクトや乾燥によるタンパク粒子の変形などにより分解能が限られる。後者のクライオ電子顕微鏡法では自然な状態のまま観察できるメリットがあるが、得られる画像はきわめて低

Single Particle Analysis of Membrane Proteins

Kazuhiro MIO^{1,2}, Toshihiko OGURA^{1,3}, Yuusuke MARUYAMA¹ and Chikara SATO^{1,2}

¹Neuroscience Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

²Biomedical Information Research Center (BIRC), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

³PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST)

図 1

膜タンパク質試料の調製. TRPC3 チャンネルの精製例を示す. 挿入した電気泳動ゲルは, 左から SDS-PAGE, 糖鎖除去による分子量低下 (36 kDa のバンドは PNGaseF), グルタルアルデヒド架橋で生じた 4 量体構造を示すバンド. 電子顕微鏡写真では粒子の位置を丸で示した. (本図は, 冊子体ではモノクロ, 電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> ではカラーで掲載)

コントラストであるため粒子画像の拾い上げ・解析に多くの時間を要する.

3. 単粒子構造解析法

精製したタンパク質を電子顕微鏡で観察すると, それぞれの粒子はランダムな位置と方向をもっている (図 2, 上段). 最初にそこからタンパク質粒子画像を拾い上げ, 次に分子の 3 次元投影方向が似た画像同士を相互の回転と平行移動により重ね合わせる. これを平均化することで背景のノイズを低下させ, **S/N 比** が高い 2 次元平均化像を得ることができる (図 2, 2 ~ 3 段). それらを参照画像として再び元画像の位置合わせに用い, さらに新たな平均化画像を生み出す. これらのサイクルを繰り返して平均画像の収束を確認した後, それぞれの 3 次元角度 (オイラー角) を決定して立体構造の構築を行う. 得られた初期 3 次元構造から再投影像を作成して, それを参照画像として元画像の重ねあわせによる平均化を行い, その結果から新たな 3 次元構造の構築を行う. このような画像重ねあわせ, 3 次元再構成を構造が安定化するまで繰り返し, 構造モデルを完成させる (図 2, 下段).

われわれはこれまで, 単粒子解析法的高速化と精度向上をめざして粒子自動拾い上げプログラムや粒子分類プログラムの開発を行ってきた. また平均画像から粒子の撮影角度を推定するためには, 従来は 2 次元画像情報を 1 次元データへと変換する, 中央断面定理に基づくシノグラム法が用いられてきた. 最近われわれは, **simulated annealing** (SA) アルゴリズムを用いた角度推定方法を開発した¹¹⁾. この方法では, 最初球の表面にランダムに配置した平均画像から 3 次元構造

を計算し, 平均画像の位置を修正することで徐々に構造をよくしてゆく. その際, 再投影像と平均画像との類似性を示す相関係数を指標とする. 具体的には平均画像の移動にランダム性をもたせて, 新たに作られた構造からの再投影像と平均画像との相関係数が, 前の構造で得られた値よりも高くなる移動は可とする. 一方, 低くなる移動は, 擬似的な温度係数に従い確率的

図 2

単粒子構造解析法の概要. (本図は, 冊子体ではモノクロ, 電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> ではカラーで掲載)

に移動の可否を決定し、温度係数を低下させながら移動を繰り返すことにより最適解を求めてゆく。SAを導入することで、解析途中では解が改悪方向にも移動する可能性を残しながら解析を行うことにより、解析がローカルミニマムに捕まらずにグローバルミニマムに到達させることが可能となった。本方法では1次元データへの変換を行わないため2次元情報の損失が起こらず、対称性の低い分子の3次元構造構築への障壁も大幅に下げることができた。

4. 構造解析の実例

TRP (transient receptor potential) チャンネル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発見され、ヒトでは30種類近くもの遺伝子群を形成する。それらは温度感受や酸化ストレス、浸透圧、味覚等々、さまざまなセンサー的役割を担う。それぞれの特異的刺激に応じて開口し、細胞内へ Ca^{2+} などのイオンを流入する。

われわれは最近、TRP superfamily の中でも酸化ストレスセンサーとして働く TRPM2 チャンネルの3次元構造を、負染色電子顕微鏡画像を用いて解析した¹²⁾。TRPM2 は双極性障害 (躁うつ病) やアルツハイマー病の発症とも関係が深いことが報告されている。このタンパク質は分子内に ADPRase 酵素活性ドメイン (NUDT9-H ドメイン) を有し、そこにリガンドが結合することによってチャンネルが開閉する。構築された

TRPM2 は細長いベル形構造をしており、大きく膨れた細胞内ドメインが特徴的であった (図 3a)。

本構造をクライオ電子顕微鏡画像から構築された TRPC3⁹⁾ と比較すると、TRPM2 分子には細胞質端に飛び出した突起が認められ、NUDT9-H ドメインと推測された。この場所は膜貫通領域のイオンゲートとは離れているため、チャンネルの開閉には大掛りな立体構造変化が必要と思われた。また全体的に膨らんだ構造は TRPC3 チャンネルにも見られる。一般的に TRP チャンネルは複数の刺激を同時に感受するセンサーとして働くが、この膨らんだ構造がさまざまなリガンドと結合するための3次元スペースを作り出しているのかもしれない。本解析で得られた TRPM2 の分解能は 2.8 nm 程度であるが、クライオ電子顕微鏡画像を用いた単粒子構造解析により、より詳細な構造解明が期待される。

単粒子構造解析で得られる情報は低分解能の分子内密度であり、残念ながらそれぞれがアミノ酸配列上のどこにあてはまるかの高分解能な情報は得られない。そこで抗体を用いて立体構造上の各ドメインを特定する技術について、われわれが最近報告したプレスチンの構造解析¹³⁾ を例に解説する。

プレスチンは内耳コルティ器に存在する外有毛細胞の細胞膜に密に発現している12回膜貫通型分子で、膜電位変化で生じる自身の構造変化により 20 kHz にも及ぶ速さで細胞長振動を起こさせる。その振動を通じて、入ってきた音信号を 100 倍にも増幅させる

図 3 センサー膜タンパク質分子の解析。(a) 酸化ストレスを感受する TRPM2 チャンネル。上から、予想される分子の膜貫通・ドメイン構造 (実際のチャンネルは本配列の4量体)、解明された3次元構造、解析データ。スケールバーは 200 Å (b) 外有毛細胞の細胞膜に高密度で存在し、音増幅に働くプレスチン。抗体を用いた分子標識で細胞内領域を特定した。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> ではカラーで掲載)

ことができる。実際、本遺伝子の変異による難聴患者や、ノックアウトマウスにおける聴覚障害が確認されている。アミノ酸配列のC末端に付けたFLAGタグに対する抗体を用いて細胞内領域を特定した(図3b)。さらにそのFabのみに金粒子ラベルしたプローブを用い、抗体結合位置をより明確に示した。本実験では未反応の抗体が観察の邪魔にならないように、ゲルろ過カラムで複合体のみ分離、観察している。いずれもプレスティン分子の広いほうの端を認識した。さらにこれらの結合粒子を多数集めて平均化することにより、抗体結合部位を統計的に示すことも可能である。

5. まとめ

単粒子構造解析は、結晶化が困難であっても数 μg の精製タンパク質をもとに構造解析が可能な、汎用性の高い手法である。われわれは本プロセスの全自動化を推し進めており、自動的な染色・撮影・画像処理を組合せることで、タンパク質構造自動解析システムを構築することが可能と思われる。また薬物やリガンド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。今後は結晶化が困難な超分子複合体や構造活性相関の解析など、さまざまな応用が期待される。

謝 辞

TRPM2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、プレスティン精製を生理学研究所、久保義弘教授と山本友美氏に感謝いたします。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・さきがけ研究の支援による。

文 献

- De Rosier, D. J. and Klug, A. (1968) *Nature* **217**, 130-134.
- Frank, J. (2006) *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State*, Oxford University Press, New York.
- Yu, X., Jin, L. and Zhou, Z. H. (2008) *Nature* **453**, 415-419.
- Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., Dormitzer, P. R., Bellamy, R., Harrison, S. C. and Grigorieff, N. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 1867-1872.
- 小椋俊彦, 三尾和弘, 佐藤主税 (2005) 蛋白質 核酸 酵素 **50**, 1284-1291.
- 三尾和弘, 小椋俊彦, 佐藤主税 (2006) 細胞工学 **25**, 236-241.
- Sato, C., Hamada, K., Ogura, T., Miyazawa, A., Iwasaki, K., Hiroaki, Y., Tani, K., Terauchi, A., Fujiyoshi, Y. and Mikoshiba, K. (2004) *J. Mol. Biol.* **336**, 155-164.
- Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A. and Fujiyoshi, Y. (2001) *Nature* **409**, 1047-1051.
- Mio, K., Ogura, T., Kiyonaka, S., Hiroaki, Y., Tanimura, Y., Fujiyoshi, Y., Mori, Y. and Sato, C. (2007) *J. Mol. Biol.* **367**, 373-383.
- Mio, K., Ogura, T., Kiyonaka, S., Mori, Y. and Sato, C. (2007) *J. Electron Microsc.* **56**, 111-117.
- Ogura, T. and Sato, C. (2006) *J. Struct. Biol.* **156**, 371-386.
- Maruyama, Y., Ogura, T., Mio, K., Kiyonaka, S., Kato, K., Mori, Y. and Sato, C. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 36961-36970.
- Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T., Arisaka, F. and Sato, C. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 1137-1145.

三尾和弘

三尾和弘 (みお かずひろ)

産業技術総合研究所脳神経情報研究部門, バイオメディシナル情報研究センター

研究内容: 膜タンパク質の生化学, 構造解析

連絡先: 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1

E-mail: kazu.mio@aist.go.jp

小椋俊彦 (おぐら としひこ)

産業技術総合研究所脳神経情報研究部門主任研究員

研究内容: 情報工学, 画像情報処理

連絡先: 同上

E-mail: t-ogura@aist.go.jp

丸山雄介 (まるやま ゆうすけ)

産業技術総合研究所脳神経情報研究部門研究員

研究内容: イオンチャンネル・ポンプを中心とした生化学・構造生物学的解析

連絡先: 同上

E-mail: yuusuke-maruyama@aist.go.jp

佐藤主税 (さとう ちから)

産業技術総合研究所脳神経情報研究部門, バイオメディシナル情報研究センター, グループリーダー

研究内容: イオンチャンネルを中心としたタンパク質の構造解析

連絡先: 同上

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