X線結晶学者のためのクライオ電子顕微鏡解析の手引き(1)

クライオ電子顕微鏡で 生体分子の構造解析をはじめよう

自然科学研究機構 生命創成探究センター 宋 致弘, 村田和義

Chihong SONG and Kazuyoshi MURATA: Let's Start Structural Analysis of Biomolecules with Cryo-Electron Microscopy

About 40 years ago, the basic concept of cryo-electron microscopy was introduced, where biological specimens were kept close to nature state by being embedded in vitreous ice and observed directly with electron microscope. Since then, technology and equipment have improved significantly, making it now possible to determine the atomic coordinates of many biomolecules. Here, we will introduce the latest structural study of biomolecules using single particle cryo-electron microscopy.

1. はじめに

クライオ電子顕微鏡法(以降, クライオ電顕)は, 1980年代にJ. Dubochetらにより開発された氷包埋法の導入から始まった.^{1),2)} 氷包埋法は, 生体試料をその溶液ごと急速凍結して非晶質の氷の中に埋め込む技術である。このことにより, タンパク質などの生体試料を電子顕微鏡内の高真空から守り, より自然に近い状態で観察できるようになった。しかし, 電子線による試料損傷は続く大きな問題であった。R. Hendersonらは, 紫膜(バクテリオロドプシンの二次元結晶)を用いて試料に対する照射電子線量を最小化することにより, 電子顕微鏡でもタンパク質の原子座標を決定することが可能であることを示した。³⁾そしてさらに, J. Frankらは, 同種のタンパク質の多数の投影像から立体構造を再構築する単粒子解析法を開発し,⁴⁾現在の「クライオ電子顕微鏡単粒子解析法」の基礎を確立した。2017年のノーベル化学賞は, これらクライオ電子顕微鏡法のパイオニアとなった3人の研究者に贈られた。しかし, この技術も約10年前は, 生体分子の構造解析においてX線結晶学やNMR分光法と比べて分解能が低く, 「クライオ電顕マップは, いつもでこぼこした表面の塊である」という意味から, ブログロジー(blobology = blob + biology)と喩やされた。

ところが, 最近の目覚ましいクライオ電顕の進歩は, 2つの主要なイノベーションによりもたらされた。1つは, 電子直接検出カメラの開発である。電子直接検出カメラは, 毎秒数百から数千コマに及ぶ高いフレームレートを実現し, 試料からの散乱電子を1つ1つピクセルごとに直接読み取ることができる。このことにより, 試料ス

テージのドリフトや電子ビーム照射による試料の動きに起因する画像のボケを, 撮影後に補正することが可能となった。この「モーション補正」の機能は, 今日, 単粒子解析では必要不可欠なプロセスとなっている。^{5),6)}もう1つは, 最尤推定(maximum likelihood estimation)を用いた画像解析手法の進歩とグラフィックカードによる演算速度の飛躍的な向上である。⁷⁾これらはフーリエ変換などの計算コストの高いアルゴリズムを用いて, 数百万の画像を正確に処理することを可能にした。上記2つの技術革新は, X線結晶解析とNMR分光法が独占的であった構造生物学の世界においてクライオ電子顕微鏡による革命をもたらした, そしてさらに, 動的な生体分子の構造変化も原子レベルで分類して解析できる技術になっている。本稿では, このクライオ電顕の原理, 基本的な操作手順, 最新の応用例などを紹介する。

2. クライオ電子顕微鏡法による試料観察範囲

試料の結晶化を必要としないクライオ電顕は, 溶液中のタンパク質粒子などをより自然に近い状態で構造解析することができる。このことにより, 生体試料が示すダイナミックな構造変化に対する豊富な情報が得られる。さらに, クライオ電顕は, 数十キロダルトンから数メガダルトンのタンパク質複合体に至るまで, 幅広い分子量範囲の構造解析が可能である(図1)。また, クライオ電顕は, X線結晶解析やNMR分光法と比較してサンプルの形態にも制限が少ないため, 多彩な生体関連試料の観察に応用できる。例えば, 化合物の微結晶, さまざまな形状のウイルス粒子, 繊維状のタンパク質複合体, さらに細菌, 細胞, 組織切片に至るまで, 氷包埋さえでき

図1 クライオ電子顕微鏡により構造解析された代表的な大小さまざまな生体分子。(Represented various-sized biomolecules determined the atomic structures by cryo-electron microscopy.) (a) から (d) は同じ倍率で表示している。(a) アフリカ豚熱ウイルス.⁹⁾ (b) *Polytomella* のF-ATP合成酵素.¹²⁾ (c) ヒトアポフェリチン.¹³⁾ (d) SAM-IVリボスイッチ.¹⁴⁾

れば基本的に観察可能である。唯一制限されるのが、試料の厚さである。これは電子ビームが試料を多重散乱せずに十分に透過できるかどうかの問題で、測定可能な試料の厚さは電子顕微鏡の加速電圧にほぼ比例する。単純に電子線の透過能で言えば、200 kV透過型電子顕微鏡(TEM)の場合は200 nm、300 kV TEMでは300 nmぐらいまでは観察できると考えてよい。よって、細胞などの大きな試料の場合は、観察できる範囲が比較的薄い細胞の周辺部に限定されてしまう。この解決策として、凍結切片の作製や、集束イオンビーム(FIB)で凍結試料を薄く加工する技術も開発されている。⁸⁾ また、単粒子解析では、直径約260 nmにもなる巨大ウイルスで、300 kVのクライオ電顕を用いて4.1 Åの分解能で構造解析が行われている(図1a)。⁹⁾ この場合、電子線の透過能だけでなく、同一粒子中のフォーカスのズレが問題となる。粒子全体を再構築した後、粒子を空間的に分けてイメージを再整列することで、このようにソフト的に分解能を上げることに成功した。

一方、分子量の小さい試料の解析は、現在、クライオ電子顕微鏡がもつ課題の1つである。クライオ電顕で解析可能な生体分子の最小サイズは、試料の許容電子線量(Critical electron dose)に対する画像のSN比(シグナル/ノイズ比)で決まる。例えば、原子レベルの分解能を得るためには200kVの加速電圧において許容可能な電子線量は、 $20 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ 以下であると報告されている。¹⁰⁾ SN比は電子線量に比例するので、小さな分子の場合は必然的にSN比が下がってしまう。電子線照射量の制限を考慮した画像のSN比から計算すると、約38 kDaまでが解析可能とされている。¹¹⁾ 現在、近原子分解能で単粒子解析がされている一番小さい生体分子は、40 kDaの核酸のアポSAM-IVリボスイッチ(図1d)である。¹⁴⁾ 1つの解決策

として、電子顕微鏡の加速電圧を下げることが考えられる。例えば加速電圧を200 kVから100 kVへと下げると、電子線の散乱断面積が約1.5倍上がるため、得られる画像のSN比も改善される。ところが、同時に試料の許容電子線量が下がることに加えて、電子の平均自由行程が約1/2となるため多重散乱効果も上がってしまう。¹⁰⁾ より小さな分子をクライオ電顕で解析するためには、試料はできる限り薄くし、少ない電子線量でSN比だけを上げられるような新たな光学系の開発が必要である。

3. さまざまなクライオ電子顕微鏡法

今日、クライオ電顕単粒子解析が脚光を浴びているが、クライオ電顕法による生体分子の構造解析には、単粒子解析に加えて、電子線結晶解析、電子線トモグラフィー、微結晶電子線回折なども用いられる。このような点で、クライオ電顕はマルチモダリティーであると言える。

クライオ電顕で最初に原子モデル構築を達成したのは、電子線結晶解析である。³⁾ タンパク質の二次元結晶を傾斜させて、高分解能電顕画像と電子線回折像を独立に収集し、電顕画像からの位相情報と電子線回折像からの振幅を使って、逆空間でマージされた構造情報の逆フーリエ変換を可能にした。しかし、良質のタンパク質二次元結晶を作製することは難しく、そこが現在ボトルネックとなっている。

電子線トモグラフィーは、1990年代に電顕用CCDカメラの普及に伴って、実用化が急速に進んだ。試料の連続傾斜像を試料ステージを連続して傾斜させることによって収集し、これを逆投影することでもとの立体構造を再構築する。単粒子解析が苦手とする構造変化を伴うタンパク質粒子の解析などに有効な方法である。個々の粒子を独立に三次元再構築し、三次元で粒子をクラス

分け(サブモグラム平均化)することで、タンパク質の構造変化を分離して解析する。しかし、同一試料から60枚以上の画像を収集する必要があるため、この間に試料は大きくダメージを受け、高分解能の解析は難しい。また、この手法はX線CTなどとは異なり、試料ステージが±70度程度までしか傾斜できないため、ミッシングウェッジと呼ばれる情報欠損角度領域が生まれる。しかし、個々の粒子をサブモグラム平均化することで、ミッシングウェッジの問題を最小にすることができる。

最後に、微結晶電子線回折(Micro Electron Diffraction (MicroED))は、微小な三次元結晶を電子線回折を用いて解析する方法である。この手法により、X線ではデータ収集が困難であった微結晶から構造決定が可能になった。¹⁵⁾これは、タンパク質の結晶のみならず化合物の微結晶にも応用できる。ただし、これには精度の高い試料傾斜ステージが必要となる。

以上、紹介した手法は、単粒子解析を補う型で、クライオ電顕構造解析の適応範囲を大きく広げている。

4. 試料グリッドの作製

4.1 試料の氷包埋

クライオ電顕では、タンパク質溶液などを、膜穴グリッド上で急速凍結して作製される。その方法は、グロー放電などによって膜穴グリッドに親水化処理を施した後、1~3 μL の試料溶液をグリッドに載せ、余分な溶液をろ紙で除去した後、グリッドを液体エタン中に急速に落下して試料を凍結させる(プランジ凍結)(図2)。このことにより、タンパク質試料が非晶質の薄い氷の膜の中に閉じ込められた凍結グリッドができる。これを液体窒素中で保存し、必要に応じて取り出してクライオ電顕に装填してその画像データを収集する。

クライオ電顕に用いられる膜穴グリッドは、さまざまな導電性素材(銅、金、モリブデンなど)に規則的な穴の開いたカーボン支持膜が貼られている(Quantifoil

(Quantifoil Micro Tools), C-flat (Protochips Inc.))。支持膜には通常10~50 nmの薄い炭素膜が用いられるが、電子線照射による膜の帯電を防止するため、これに5~10 nm金薄膜をコートしたもの¹⁶⁾も用いられる。

氷包埋法では、膜穴に試料が均一に分散することが望ましいが、試料粒子の表面電荷によって、穴の中央に集まったり、穴以外に吸着したりすることがある。そのような場合には、陽電荷をもつ物質(アミルアミンなど)、もしくは陰電荷をもつ物質(吉草酸など)のガス雰囲気の中で膜穴グリッドの親水化処理を行うことで改善する場合がある。¹⁷⁾また、薄いカーボン支持膜をさらに膜穴グリッドに貼って、膜穴に粒子を固定することも行われる。Kellyらは機能性頭部基をもつ脂質一重膜を付けた「親和性グリッド」を開発し、濃度の低い粒子からでも氷包埋グリッドを作製できることを報告している。¹⁸⁾

氷包埋法で一般的に使われる冷媒は液体エタンである。一方、細胞などの比較的大きな試料を氷包埋する場合には、エタンとプロパンの混合液が用いられる。¹⁹⁾純粋なエタンよりもエタンとプロパンの混合物を使用することにより冷却剤の凍結温度を低下させ、細胞のより深部まで良好に凍結させることができる。

4.2 クライオ電顕単粒子解析に適した試料グリッド

クライオ電顕単粒子解析では、試料粒子がランダムな方向を向くのに加えて、できるだけ薄い氷に包埋することが重要である。Nobleらは、さまざまなタンパク質粒子を氷包埋した試料をトモグラフィ解析することで、水中でのタンパク質粒子の分布を報告した。²⁰⁾その結果、多くのタンパク質粒子が氷膜の界面に集積することを明らかにした。また、膜穴の氷は中心で薄く、端にいくに従って分厚くなっていることが示された。これらのことから、クライオ電顕単粒子解析では、膜穴の見え方、粒子の分布の仕方などから氷の厚さを判断し、適切な膜穴、さらには膜穴内の領域を選択して画像を収集することが重要であることがわかった。

図2 プランジ凍結による氷包埋グリッドの作製。(Preparation of ice-embedding sample grid by plunge-freezing.)

5. クライオ電顕によるデータの収集

氷包埋された試料グリッドは、液体窒素で冷却されたクライオワークステーションの中でクライオトランスファーホルダーもしくは専用のカートリッジに取り付けられ、霜を付けないようにしてクライオ電顕の中に挿入される。クライオオートローダーを備えたクライオ電顕 (Titan Krios (FEI), CryoARM (JEOL) など) では、鏡筒脇に取り付けられたチャンパー内に十数個のグリッドを同時に装着し、これらを自由に出し入れすることができる。また、観察するグリッドを選んで自由に鏡筒内に送り込むことができる。一般的なサイドエントリー型のクライオトランスファーホルダーでは、1つのグリッドしか電子顕微鏡にセットすることができず、また、液体窒素も約3時間ごとに継ぎ足さないといけない。さらには、グリッドをカラムに入れてからステージが安定する (ドリフトがおさまる) まで数十分必要である。これらのことから、現在一般的になりつつある数千枚からの電顕画像を取得するような目的には、あまり適さなくなっている。

クライオ電顕では、画像は低照射 (low dose) モードを使用して撮影される。モードの呼び名は装置メーカーによりさまざまであるが、その原理は共通で、低倍率または回折モードでターゲットとなるグリッド上の膜穴の位置をナビゲートし、その近傍の支持膜上で焦点外れ (デフォーカス) 量を合わせ、撮影したい領域をあらかじめ設定した必要最小限の電子線量で露光する。このことにより、試料に対する照射損傷を最小に抑えながら撮影することができる。近年の自動化されたクライオ電顕では、最初に試料グリッドのモニタージュ写真を作成して、その中の膜穴の座標を記録し、あとは電子顕微鏡のステージがその場所に移動して次々と像を撮影していく。これらはEPU (Thermo Fisher Scientific) や SerialEM²¹⁾ などのソフトウェアを用いて行われる。また、ハイスループットに対応するためビーム傾斜機構を用いて、一回のステージ移動で複数箇所 (4~9箇所) の画像を瞬時に撮影する²²⁾ ことも行われている。

クライオ電顕によるデータ取得で重要なことは、正確な光軸調整と、倍率、デフォーカス量、電子線照射量などの設定である。通常の電子顕微鏡の光軸調整に加えてクライオ電顕で特に重要なのは、試料に対して平行に電子線を照射することである。位相コントラストは試料からの透過光と散乱光の干渉により形成される。電子線が収束または発散するように試料に照射されると位相コントラストの低下につながる。また、並行な電子線が試料に対して傾いて照射されても、コマ収差などの収差を引き起こすため、分解能の低下につながる。これらは、クライオ電顕専用装置では自動で補正できるようになって

いるが、そうでない場合は自身で調整する必要がある。

撮影倍率は、目標とする分解能により決められる。カメラの性能 (DQE など) にも依存するが、通常、目標分解能の1/4 (1/2 Nyquist) ぐらいが、カメラの1画素に入るようにするのが目安である。例えば、2 Åが目標の分解能であれば、試料上で0.5 Åがカメラの1画素に十分入るように倍率を設定する。カメラの倍率はそれが取り付けられている場所で決まる値で、電子顕微鏡の表示倍率とは異なるので少し注意が必要である。デフォーカス量は小さいほうが高分解能のためには良いが、コントラストが低下するので、試料粒子が確認できるギリギリのところに設定する。また、最終的にコントラスト伝達関数 (CTF) (後述) の影響を最小にするためには、その前後で若干異なるデフォーカス量の像を撮影しておく必要がある。電子線量は、試料がダメージを受けない範囲で設定するものであるが、電子直接検出カメラが使われるようになってからは、電子カウンティングできる線量が優先され、露光時間によって最終的に調節されるのが一般的となった。

その他、エネルギーフィルターのスリット幅の設定など、高分解能の電顕像を収集するためには、装置に依存した調整が必要となる。

6. 単粒子解析

6.1 単粒子解析の原理

クライオ電顕単粒子解析は、前述の技術革新によりタンパク質試料を結晶化することなく構造決定ができるようになったため、近年急速に普及した。単粒子解析の原理は、計算機の中で個々のタンパク質粒子の画像を整列させて仮想的なタンパク質結晶を作ることと考えて良い。実際には、タンパク質粒子の向きの異なる投影像を多数収集して、これを計算機の中で整列化させ、個々の投影角度を推定して逆投影することで、元の三次元の粒子構造を再構築する (図3)。また、同じ角度投影像は平均化されてSN比を上げることができる。現在では、電子顕微鏡の自動化が進み、構造決定に用いられる単粒子解析のデータセットは、数千から数万の電顕像で構成され、個々の画像からは、数百に及ぶ異なる向きのタンパク質粒子像がピックアップされることが通常となっている。

一方で、単粒子解析には必要な仮定がある。その1つは、どの投影像も同型の粒子からのものであるということである。つまり、別のタンパク質粒子が混ざっていてもいけないし、タンパク質粒子が異なるコンフォメーションを取ってもいけない。そしてもう1つは、タンパク質粒子が包埋した氷の中でランダムな向きを取っているということである。これは、タンパク質粒子が非対称な構造の場合や、局所的にチャージをもつような場合には、ランダムな向きを取らないことがよくある。プリ

図3 クライオ電顕電子顕微鏡単粒子解析の原理.
(Principle of single particle analysis.)

ファードオリエンテーションと呼ばれ, うまく三次元再構成できない原因となる. 以上のような仮定を満たさない試料は, 基本的に単粒子解析により構造決定することができない. しかし, 後述するように, 解析アルゴリズムの進展により, わずかなコンフォメーションの変化であれば, これを分離して解析することが可能になってきている.

6.2 単粒子解析の基本手順

単粒子解析の基本手順を図4に示す. 以下, 各々のプロセスについて説明する.

6.2.1 モーション補正

クライオ電顕単粒子解析で一般的に用いられている電子直接検出カメラでは, 電顕像をムービーで記録し, 個々のムービーフレーム間での粒子像のズレ(ドリフト)を補正して, 一枚の電顕画像を作り直す. そして, 必要に応じて電子線損傷量に対する重み付けも行われる. このことにより, 高分解能の電顕画像を得ることができる. モーション補正は, MotoinCor2,²³⁾ Unblur,²⁴⁾ Direct detector utilities²⁵⁾などのソフトウェアを用いて行うことができる.

6.2.2 CTF補正

クライオ電子顕微鏡の画像は, 電磁レンズの収差のために周波数空間上で大きく変調を受けている. これはコントラスト伝達関数(Contrast Transfer Function, CTF)として定式化されており, 特にクライオ電顕ではサイン関数で表される位相コントラスト伝達関数に従って, コントラストの反転が起こる. CTFは収差とデフォーカス量によって決まる関数なので, デフォーカス量の異なる画像を平均化もしくはマージするためには, その前に画像ごとにCTFを推定し, これを補正する必要がある. 現在では, これらを自動化したソフトウェア(ctffind,²⁶⁾ gctf,²⁷⁾ e2ctf.py²⁸⁾)が利用できるようになっており, 数千枚の画像データでもバッチ処理で行えるようになっている.

6.2.3 電顕画像からの粒子像の抽出

現在の単粒子解析では, 多くの場合数万をはるかに超

図4 単粒子解析の手順. (Image processing work flow of single particle analysis.)

える粒子像が三次元再構成に用いられる. これらを人の手で抽出するのは不可能である. そこで, ガウシアン-ラプラシアンフィルタ(LoG)を用いて粒子を検出するものや, 教師画像を用いるものなど, さまざまなタイプの自動抽出ソフトウェアが開発されている(Gautomatch(<https://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/kzhang/Gautomatch/>), e2boxer.py,²⁹⁾ Relion-autopick,⁷⁾ FindEM,³⁰⁾ Signature³¹⁾). Relion-autopickでは, 最初にLoGを用いて数枚の電顕像から粒子像を抽出し, この二次元クラス分けを行って主要な平均化像を作製して, これを教師像として残りの電顕像から粒子を自動で抽出することが行われる. これらのソフトウェアはいずれもバッチ処理に対応しており, 数千枚の画像からの粒子の抽出も自動で行ってくれる.

6.2.4 画像の二次元クラス分け

個々の粒子像はダメージを避けるため低い電子線で記録されているため, SN比が非常に低い画像になっている. そこで, これらを分類して平均化することでSN比を上げる必要がある. この操作は, 三次元再構成のために必要な投影像が含まれているかどうかを確認するとともに, 間違って抽出された目的粒子以外のものを除くためにも用いられる. この操作ステップから計算時間を短くするため, 画像を縮小(ビンニング)して行われることが多い.

6.2.5 粒子像の再構築と三次元クラス分け

単粒子解析では未知の粒子像を立体再構築する場合, 先の二次元クラス分けした平均像の中からより鮮明なものをいくつか選んで粒子の初期三次元モデルを構築し, これを基に粒子像を再構築していく. しかし, 中には粒子中の突出した構造に引きずられて, 目標とは異なる

る構造に収束してしまうことがある。再構成像の三次元クラス分けは、いくつかの可能な三次元像を生成することで、誤った構造の収束を防ぐ。また、この機能は後述するように粒子中のわずかな構造変化を分類することにも使われる。

6.2.6 マップの精密化

上述の操作で確からしい三次元粒子像を選択することでできたなら、粒子画像の縮小率をもとに戻して、大元のムービーフレームを用いてマップの精密化が行われる。ここでは、再構築像の逆投影と元々の粒子像とを比較することで、電顕マップの分解能を上げていく。これはその操作からプロジェクションマッチングと呼ばれる。プロジェクションマッチングは徐々に逆投影角度を細かくして進められ、最終的に分解能がそれ以上向上しなくなるまで繰り返される。

6.2.7 マスクを用いたマップの後処理

マップの精密化が完了したら、適当な B-Factor を適応してマップのシャープニングを行う。B-Factor はソフトウェアが推定した値を使うこともできるし、マニュアルでセットすることもできる。さらに、分解能を見積もるために、粒子よりも少し大きめのマスクをかけた上で再度三次元再構築を行う。このことで、粒子と周辺の溶液とをはっきりと区別して三次元再構成することができ、分解能をより正確に推定することが可能となる。

6.2.8 CTF とビーム傾斜の補正

ここでは、さらにマップの分解能を上げるため、三次元再構成に使われた個々の粒子の CTF 補正が行われる。先に行った CTF 補正は、電顕像単位で行ったもので、実際には1枚の電顕像の中でも粒子によってデフォーカスが変わるからである。これには、個々の粒子について CTF を推定し、これを補正する。また、試料に対して斜めに電子線が照射されて記録された電顕像は、1つの粒子像の中で左右で位相がわずかにズレてしまうので、これも個々の粒子像について補正される。

6.2.9 バイズポリッシング

さらに分解能を向上させる手段として、三次元再構成に用いられた個々の粒子像について、再度、バイズ推定を用いてもとの電顕画像ムービーフレーム内におけるモーション補正を行うことができる。まず訓練モードによりモーションについての事前情報が推定できたら、これをすべての粒子のムービーフレームに適応し、これにより高精細の粒子像が再構築される。

6.2.10 領域ごとの三次元再構成

柔軟な構造をもつタンパク質は、全体的には高い分解能のマップが得られても、部分的には分解能の低い領域が生じる。そのような場合は、その領域だけにフォーカスして三次元クラス分けや再精密化を行うことができる。このプロセスにより構造の一部分のダイナミックを

調べる事が可能であるとともに、全体の分解能を高めることもできる。

以上、一連の単粒子解析の操作は Relion,⁷⁾ cryoSPARC,³²⁾ cisTEM,³³⁾ Spire,³⁴⁾ EMAN2²⁹⁾ などのソフトウェアを用いて行うことができる。これらソフトウェアの最大の特徴は、GUIにより各操作が画面上で順番に指示され、最終的な電顕マップの作製までたどり着けることである。

7. 分解能の測定、モデル構築、評価

電顕マップの分解能の1つの決定方法として、フーリエシェルの相関 (Fourier shell correlation (FSC)) がある。粒子像を無作為に半分に分けて独立に三次元再構成を行う。そして、2つの電顕マップの相互相関係数を空間周波数に対してプロットすることによって決定される。Rosenthal と Henderson は、最終的にすべての粒子を用いて構築されたマップの分解能が、FSC のために使用された半分の粒子数のマップよりも高いという事実に基づいて、FSC = 0.143 を導入した。³⁵⁾ そして、これが X 線結晶学において用いられる基準とおおむね一致することから、「Gold standard FSC」と定義した。³⁶⁾ しかし、この方法は実際取り得る構造とは関係なく決まる値であることから、一般には、構築した原子モデルから計算したマップとの FSC = 0.5 を合わせて評価することも行われる。これは先と区別して Map-to-Model FSC と呼ばれる。また、実際にはマップは局所的に分解能が異なることから、「局所」分解能 (Local resolution) を表示することもよく行われる。³⁷⁾

クライオ電顕による生体分子構造解析の最終的な目的は、生体分子の分子構造の決定である。分解能が 3 Å を超えるマップであれば、タンパク質の一次構造から *de novo* モデル構築も可能であるが、分解能が 3 ~ 4 Å のマップであれば、タンパク質であればポリアラニンなどを用いて主鎖のモデル推定し、 α ヘルックスや β シートなどの二次構造や芳香環などの大きな側鎖をもつアミノ酸を目印としてモデルを構築することになる。さらに低分解能 (4 Å 未満) では、二次構造の同定から初めて、分子動力学³⁸⁾ やノーマルモード解析³⁹⁾ のような物理化学的制約を組み込んだ手法を組み合わせる必要がある。精密化されたモデルは、X 線結晶解析による構造モデルで行われるのと同様に、さまざまな統計値を参考に原子座標の立体障害をチェックする検証ツールで評価される。⁴⁰⁾

8. クライオ電顕の応用例

8.1 動的分子の観察

多くのタンパク質およびタンパク質複合体は、溶液中で複数の立体構造をとり、また、構造を変化させてリガンドや金属を分子内に取り込んだりする。そこで、構造生物学では単一のタンパク質構造だけではなく溶液の中

での動的構造の解明も重要視されてきた。溶液中でのタンパク質のダイナミックスはNMR分光法を用いることで観察が可能であるが、解析できるタンパク質の分子量に制限 (25 kD 以下) がある。^{41), 42)} 最近, X線結晶解析でもX線自由電子レーザー (XFEL) を用いていることで時分割解析によるタンパク質のダイナミックスの研究が行われている。^{43), 44)} しかし, 結晶中でのタンパク質でのダイナミックスの分析に限られる。また, 高速原子間力顕微鏡 (高速AFM) を用いれば, 分子スケールの構造変化や分子間の相互作用などの観察をリアルタイムで行えるが,⁴⁵⁾ 空間分解能の制限で原子レベルの構造変化までを把握することはできない。このような中でクライオ電顕はタンパク質のダイナミックスを解析するための新たなツールになってきた。クライオ電顕では, 構造の「三次元クラス分け」という高度なアルゴリズム機能を用いて, タンパク質粒子中のわずかな構造変化を分離して解析することは可能である。その一例として, Murphyらは, F-ATP合成酵素において13個すべての回転状態の構造を三次元クラス分けして近原子分解能で報告した (図1b, 図5a)。¹²⁾ この構造解析は, ATP合成酵素の柔軟で可逆的な構造変化に依存したATP合成プロセスを詳細に説明した。また, 溶液状態の試料をそのまま観察できることは, 生体内での環境を仮定した条件で, タンパク質のコンフォメーションを確認することができる。その一例として, ノロウイルスが環境条件により構造変化をする様子が可視化された (図5b)。⁴⁶⁾ ノロウイルスは, 酸性条件下で金属イオンのリッチな状態に置くと, 外側の突起が内側の殻に密着する。一方で, アルカリ性条件下で金属イオンがない状態に置くと, 突起がシェルから

離れて伸びる。さらに中性の場合は, 1つの粒子が両方の状態をもつことを示され, 粒子の構造変化がどのように行われるのかがクライオ電顕を用いて確認された。

8.2 膜タンパク質の構造解析

結晶化が困難でX線結晶学では構造解析ができなかった膜タンパク質試料が, クライオ電顕単粒子解析によって解かれた事例は多くある。しかし, クライオ電顕でも分散よく安定に膜タンパク質を可溶化する必要があり, そのためには多様な工夫が必要である。膜タンパク質の可溶化にはさまざまな界面活性剤が用いられる。しかし, これらはミセルとして溶液中に残るために, クライオ電顕観察においてはバックグラウンドノイズを高める原因になる。これを改善する目的で, 膜タンパク質の三次元結晶化などでも用いられる Amphipol や LMNG が使われることがある。Amphipol は両親媒性ポリマーで, 膜タンパク質の疎水界面との親和性が高いことから, 精製で用いた界面活性剤を Amphipol に置換した後, 界面活性剤を含まない溶液に置き換えることができる。Shengらは Amphipol を用いてクラミドモナスの光化学系 II (PSII) の膜タンパク質超複合体を安定的に精製することに成功し, 近原子分解能の構造を明らかにした。⁴⁷⁾ ところが, Amphipol は, 膜にかなり強固に結合するため, 酵素活性が急激に失われるというデメリットも示された。⁴⁸⁾ これに対して, LMNG は, CMC (臨界ミセル濃度) が 0.001 % と非常に低いことから, クライオ電顕観察においてかなりバックグラウンドの影響を下げるができる。高熱菌 V-ATPase の構造解析では, 0.003 % の LMNG が用いられ構造決定につながった。⁴⁹⁾ 一方, できる限り自然の状態

図5 クライオ電顕による動的分子の構造研究。(Structural studies of dynamic molecules by cryo-EM.) (a) F-ATP合成酵素において三次元クラス分けされた13個の異なる構造の断面。¹²⁾ (b) pHと金属イオンによって構造変化するノロウイルスキャプシド。³⁸⁾

X-ray	human apoferritin, PDB: 2clu	human apoferritin, PDB: 2cn7	human apoferritin, PDB: 2chi
CryoEM	human apoferritin, PDB: 2clu	human apoferritin, PDB: 2cn7	human apoferritin, PDB: 2chi
particles	403	3,000	8,100
X-ray	frog apoferritin, PDB: 6iaf	frog apoferritin, PDB: 6i9p	human apoferritin, PDB: 6b8f
CryoEM	frog apoferritin, PDB: 6iaf	frog apoferritin, PDB: 6i9p	not possible with current cryo-EM technology
particles	163,000	1,000,000	Several billions

図6 X線結晶解析とクライオ電顕とのマップの比較.¹³⁾ (Comparing atomic resolution features obtained by X-ray crystallography and cryo-EM.)

ク (nanodisk) が用いられる。この方法を用いて、TRPV1 チャンネルがリガンドの結合によって開口するメカニズムが明らかにされた。⁵⁰⁾

8.3 クライオ電顕による原子分解能マップ

Yip らはモノクロメーターを備えたクライオ電子顕微鏡を用いて 1.25 Å 分解能のアポフェリチンの電顕マップを報告した。¹³⁾ そして、これを X 線結晶解析による電子密度マップと比較した。X 線では水素原子に起因する密度は 1.06 Å のマップでも見られないが、電顕マップでは 1.35 Å のマップでそれを確認することができた (図6)。また、X 線のマップでは個々の原子を 1.06 Å のマップで初めて分離して観察することができるが、電顕マップでは 1.35 Å のマップでそれを確認することができた。これらは X 線の電子密度マップと電顕のポテンシャルマップとの違いと考えられる。この結果は、構造生物学に新しい研究分野を開いたと言える。

9. 結論と展望

本稿は、クライオ電子顕微鏡法の概要を説明し、この分野への新規参入者への手助けとなるように書かれた。ここで紹介したように、クライオ電子顕微鏡による構造解析はようやく必要最低限の技術が出揃い、スタートラインに立ったと言える。ここですべてを紹介しきれなかったようにクライオ電顕にはまだまだ構造解析のためのポテンシャルが備わっており、これを武器に未開拓な分野へさらに進出していけるものと期待する。是非、本稿を参考にして、新しい構造生物学の分野をわれわれとともに発展させて頂ければ幸いである。

文 献

- 1) M. Adrian, *et al.*: *Nature* **308**, 32 (1984).
- 2) J. Dubochet, *et al.*: *Q. Rev. Biophys.* **21**, 129 (1988).
- 3) R. Henderson: *J. Mol. Biol.* **213**, 899 (1990).
- 4) J. Frank: *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native*

- State, Oxford University Press (2006).
- 5) A. F. Brilot, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **177**, 630 (2012).
 - 6) X. Li, *et al.*: *Nat. Methods* **10**, 584 (2013).
 - 7) S. H. Scheres: *J. Struct. Biol.* **180**, 519 (2012).
 - 8) F. R. Wagner, *et al.*: *Nat. Protoc.* **15**, 2041 (2020).
 - 9) N. Wang, *et al.*: *Science* **366**, 640 (2019).
 - 10) L. A. Baker, *et al.*: *Methods Enzymol.* **481**, 371 (2010).
 - 11) R. Henderson: *Q. Rev. Biophys.* **28**, 171 (1995).
 - 12) B. J. Murphy, *et al.*: *Science* **364**, 6446 (2019).
 - 13) K. M. Yip, *et al.*: *Nature* **587**, 157 (2020).
 - 14) K. Zhang, *et al.*: *Nat Commun.* **10**, 5511 (2019).
 - 15) D. Shi, *et al.*: *Elife*, **2**, e01345 (2013).
 - 16) C. J. Russo, *et al.*: *Science* **346**, 1377 (2014).
 - 17) R. A. Grassucci, *et al.*: *Nat. Protoc.* **2**, 3239 (2007).
 - 18) D. F. Kelly, *et al.*: *J. Mol. Biol.* **400**, 675 (2010).
 - 19) W. F. Tivol, *et al.*: *Microsc. Microanal.* **14**, 375 (2008).
 - 20) A. J. Noble, *et al.*: *Elife*, **7**, e34257 (2018).
 - 21) D. N. Mastronarde: *J. Struct. Biol.* **152**, 36 (2005).
 - 22) C. Wu, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **208**, 107396 (2019).
 - 23) S. Q. Zheng, *et al.*: *Nat. Methods* **14**, 331 (2017).
 - 24) A. F. Brilot, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **177**, 630 (2012).
 - 25) Z. Ripstein, *et al.*: *Methods Enzymol.* **579**, 103 (2016).
 - 26) A. N. Rohou, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **192**, 216 (2015).
 - 27) K. Zhang, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **193**, 1 (2016).
 - 28) J. M. Bell, *et al.*: *Methods* **100**, 25 (2016).
 - 29) G. Tang, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **157**, 38 (2007).
 - 30) A. M. Roseman: *J. Struct. Biol.* **145**, 91 (2004).
 - 31) J. Z. Chen, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **157**, 168 (2007).
 - 32) A. Punjani, *et al.*: *Nat. Methods* **14**, 290 (2017).
 - 33) N. Grigorieff: *Methods Enzymol.* **579**, 191 (2016).
 - 34) T. Moriya, *et al.*: *J. Vis. Exp.* **123**, e55448 (2017).
 - 35) P. B. Rosenthal, *et al.*: *J. Mol. Biol.* **333**, 721 (2003).
 - 36) S. Chen, *et al.*: *Ultramicroscopy* **135**, 24 (2013).
 - 37) Y. Kayama, *et al.*: *Sci. Rep.* **11**, 1 (2021).
 - 38) B. Webb, *et al.*: *Curr. Protoc. Bioinforma* **54**, 5.6.1 (2016).
 - 39) Q. Jin, *et al.*: *Structure* **22**, 496 (2014).
 - 40) K. Murata, *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1862**, 324 (2018).
 - 41) T. Sugiki, *et al.*: *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **15**, 328 (2017).
 - 42) A. Dubey, *et al.*: *J. Biomol. NMR* **74**, 479 (2020).
 - 43) J. H. Park, *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1943 (2019).

- 44) J. C. H. Spence: *IUCrJ* **4**, 322 (2017).
- 45) T. Ando, *et al.*: *Prog. Surf. Sci.* **83**, 337 (2008).
- 46) C. Song, *et al.*: *PLoS Pathogens* **16**, e1008619 (2020).
- 47) X. Sheng, *et al.*: *Nat. Plants* **5**, 1320 (2019).
- 48) R. N. Burton-Smith, *et al.*: *J. Biol. Chem.* **294**, 15003 (2019).
- 49) A. Nakanishi, *et al.*: *Nat. Commun.* **9**, 1 (2018).
- 50) Y. Gao, *et al.*: *Nature* **534**, 347 (2016).

プロフィール

宋 致弘 Chihong SONG
 自然科学研究機構 生命創成探究センター
 The Exploratory Research Center on Life and Living
 Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural
 Sciences
 〒448-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38
 38 Nihsigonaka, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8585,
 Japan
 TEL : 0564-55-7894
 FAX : 0564-55-7895
 e-mail: chsong@nips.ac.jp
 最終学歴：博士 (理学)
 専門分野：構造生物学, 細胞生物学
 現在の研究テーマ：電子顕微鏡による構造解析
 趣味：トモグラフィー解析

村田和義 Kazuyoshi MURATA
 自然科学研究機構 生命創成探究センター
 The Exploratory Research Center on Life and Living
 Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural
 Sciences
 〒448-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38
 38 Nihsigonaka, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8585,
 Japan
 TEL : 0564-55-7893
 FAX : 0564-55-7895
 e-mail: kazum@nips.ac.jp
 最終学歴：博士 (理学)
 専門分野：構造生物学, 電子顕微鏡学
 現在の研究テーマ：クライオ電子顕微鏡による
 生体分子の構造解析
 趣味：ひみつ