最近の研究から

電子線結晶学による光合成集光性アンテナ 蛋白質複合体の構造

松下電器産業 (株) 国際研究所 藤吉好則

Yoshinori FUJIYOSHI: Structure of Plant Light-harvesting Complex by Electron Crystallography

Fundamental principles and recent developments in electron crystallography are explained by way of structure analysis of plant light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex associated with photosystem II (LHC-II). Atomic model of LHC-II had been determined at 3.4 Å resolution by electron cryo-microscopy, which included newly developed hardware (an electron cryo-microscope, a cryo-transfer device) as well as specimen preparation techniques.

1. はじめに

最近の蛋白質の構造解析をめぐる進歩はめざましく、蛋白質の新しい構造が毎日発表されるような状況になっている。¹⁾ これらはほとんどが可溶性蛋白質で、膜蛋白質の構造解析は、1985年に光合成反応中心の構造解析というノーベル賞が与えられるほど画期的な研究成果が発表された²⁾にもかかわらず、その後ほとんど成功していない。その理由は、X線結晶構造解析に適した膜蛋白質の3次元結晶化が困難だからである。それに比べると、膜蛋白質の2次元結晶化の方が易しいようである。現に、W. Kühlbrandt等は、集光性アンテナ蛋白質 (LHC) の3次元結晶化を試みた結果、3次元結晶は得られたが、高分解能の構造解析は不可能なものであった。彼らは、LHCの2次元結晶化をも試みて、2.3 Å分解能の電子線回折像が得られる2次元結晶の作製に成功した。³⁾ そして、6 Å分解能の構造解析を電子顕微鏡を用いて行った。⁴⁾ この解析の分解能は、結晶性によってではなく電子線による試料損傷のために制限されている。電子線損傷を軽減するために開発した極低温高分解能電子顕微鏡⁵⁾を用いて、我々は同じ試料で、3.4 Å分解能の構造解析を行った。この結果は1994年の*Nature*誌2月17日号⁶⁾に掲載されているが、このLHCの構造と併せて、この解析に用いた手法・電子線結晶学についても簡単に解説する。

2. 電子線結晶学

電子線結晶学とは基本的にX線結晶学とほとんど同じ原理を用いた構造解析の手法で、最終的に得られる構造

も同様のものであるが、原子散乱因子の違いによって多少の差がある。電子線結晶学で求められるのは、ポテンシャル分布である。電子線結晶学では、ほとんどの場合2次元結晶を用いて、色々な傾きで電子線回折像と電子顕微鏡像を撮影する。電子線回折像から、X線結晶構造解析と同じように振幅を求める。位相は、電子顕微鏡像の解析に基づいて計算する。電子顕微鏡像からは、もちろん位相だけでなく振幅の情報も得られるのであるが、振幅のデータについては電子線回折像からも得られる。電子線損傷などの原因のために、より多くの単位格子から平均した情報を収集する電子線回折の方が精度がよい。低分解能の構造解析の場合をのぞいて、良質の電子線回折像を撮影することも像の撮影と同じように重要である。なぜなら、解析の最終段階での構造の精密化はX線結晶学同様振幅に基づいて行われるからである。

まず結晶性が良く面積の大きい2次元結晶を作製する。これを、マイカ表面に注意深く真空蒸着して作製した薄いカーボン膜に吸着させて、余分の結晶溶液を濾紙で吸い取り、薄い水の膜とする。その直後に、液体エタン中に落下させて、急速に凍結する。これを140 K以下に保ちながら、小さい氷などによる汚染物質が付着しないように（このように工夫された装置を用いて）電子顕微鏡の低温ステージに挿入する。

解析の手順を図1に示したが、これにしたがって簡単に説明する。できる限り大きい傾斜角度（通常60度）までの色々な傾斜角度で実像（電子顕微鏡像）と電子線回折像を撮影する。解析に必要な像の枚数は、目指す分解能が高く、結晶の対称性が低いほど多くなる。LHCのように比較的対称性が高い結晶 (P321) の場合、3.4 Å分解

能の解析には像と回折像をそれぞれ約80枚用いている。バクテリオロドプシンの場合のP3の対称性ではその倍の数の像と回折像を必要とする。

まず電子線回折像をデンシトメータで濃度測定し、フォーマット変換を行い解析システムに送る。我々は最近、電子線回折像の撮影にはスロースキャン CCD カメラ (SSCCD) ⁷⁾ を用いて直接デジタルデータを得る方法を採用している。この方法は、解析のスピードを早くするのみならずデータの精度も向上させることが明らかになってきたので、将来はこの方法が一般にも用いられることになるだろう。SSCCD から送られたデータを用いて格子定数の精密決定を行い、回折点の積分強度を求める。フィルムを用いる場合には特にダイナミックレンジが小さいので、電子線量とフィルムの黒化度との直線性などに留意した定量的な解析が必要である。またレンズと画像記録装置 (フィルム) の歪みによる回折点の位置の補正も行う。電子線の場合、エバルド球の直径が大きいのでフリーデル対が同時に観察される。観測データの誤差はこの対などから補正する事ができる。電子線回折像を構造解析に必要な枚数だけマージすることによって3次元の振幅情報が得られる。

電子顕微鏡像は、良い像を撮影できる割合が少ない上に、一般にコントラストが極めて低くデジタル化に要する時間が長いので、フィルムの濃度測定をする前に、撮影された多くのフィルムの中から良い像を選び出す必要がある。さらに、1枚のフィルムの中でも結晶性の良い部分を中心に濃度測定できるように位置決めをしなければならない。この目的のためにレーザー光を用いた回折装置で、光変換を行う。こうして選び出されたフィルムの中でも選ばれた (6000 × 6000 ピクセルの場合、4.2 cm × 4.2 cm) の領域だけをおよそ7 μm 間隔で濃度測定する。高分解能の解析のためには、この操作に長い時間をかけなければならないのが現状である。デジタル化されたデータを適当なフォーマット変換の後、フーリエ変換して格子定数の精密決定を行う。像の歪み補正、コントラスト伝達関数の補正、傾斜角の補正を行うことによって、より高分解能の位相と振幅が得られる。必要な枚数の像をマージすることで立体構造の位相情報が求められる。電子線回折像のマージを行って得られた振幅と、電子顕微鏡像の解析から得られた位相情報を用いて、逆フーリエ変換を行えば、立体構造モデルを作る出発点となる密度図が得られる。あとはX線結晶構造解析と同じように、振幅のデータに合うように構造の精密化を行う。

電子線結晶学の分解能を制限しているのは、基本的には、(2次元) 結晶の質 (結晶性) であるが、この他に、電子線による試料の損傷という深刻な問題が存在する。これを解決するために、我々は、1.5K まで冷却できて、2.0 Å の分解能を有する極低温電子顕微鏡を開発した。⁵⁾

図1 電子線結晶学による構造解析の流れ図。

同時に、我々が特別に開発したクライオトランスファー装置を備えているので、急速凍結法で水に包埋した試料を短時間で電子顕微鏡に挿入して観察できる。上に述べた、構造解析のためのコンピュータプログラムと、極低温電子顕微鏡を含むハードウェアの整備には長い年月を要したが、電子顕微鏡用試料作成法を含むほとんどすべての点で、経験が蓄積されてきたので、高分解能の解析に適した2次元結晶が得られれば、1年間以内に構造解析ができるようになりつつある。

3. 2次元結晶化

膜蛋白質の2次元結晶化の方法には、1) 生体中での結晶化、2) 膜中での結晶化、3) 可溶化して精製した後の結晶化に大別できる。1) はバクテリオロドプシンの例が良く知られている。その結晶性膜断片を取り出し、膜融合をすることで大きい2次元結晶が得られている。⁸⁾ 2) の例としては、我々が成功しているNa, K-ATPaseをあげることができる。犬の腎臓髄質外帯から単離した膜断

片を pH 4.8 のクエン酸緩衝液で透析する事で、結晶化できている。⁹⁾ 3) が最も一般性の高い方法で、高分解能の解析に適した結晶が得られる方法であるが、膜蛋白質を、界面活性剤に長時間接触させることになり、変性が大きな問題となる。今回報告するアンテナ蛋白質 (LHC-II) の場合はこの方法を用いている。そら豆の葉のチラコイド膜から、0.4 % の Triton X-100 で LHC を可溶化して、密度勾配遠心分離で精製する。これを 0.11 % Triton X-100, 0.24 % の n-nonyl- β -D-glucopyranoside と 40 % のグリセロールを 10 mM のグリシン緩衝液 (pH 7.0) にくわえて、蛋白質の最終濃度がクロロフィルの濃度で、0.78 mg/ml になるように調製する。最初に 25 °C で 48 時間、ついで 40 °C で 2 時間インキュベートする事で 5 から 10 μ m 程度の結晶が成長する。このようにして作製した 2 次元結晶は、2.5 Å 以上の分解能の回折点が観察できる。³⁾

4. LHC の構造

原子モデルを構築できるような高分解能の密度図を得るためには、高い分解能の電子顕微鏡像を解析する必要がある。大きい傾斜角度で、高分解能の像を撮影するのは一般に困難で、このことが、c 軸 (膜表面に垂直な軸) 方向に分解能を悪くする原因となっている。例えば、Henderson 等が解析したバクテリオロドプシンでは、この方向の分解能が 10 Å 程度より悪いので、3.5 Å 分解能の構造解析であっても、側鎖を分離して観察することができていない。¹⁰⁾ 我々の解析では、図 2 (b) に示す像のフーリエ変換から明らかなように、60 度傾斜の像でも 3.4 Å 分解能の像が得られている。このように大きい傾斜角度でも高い分解能の像が得られていることから、最終的な密度図は c 軸方向でも 4.9 Å より充分高い分解能であることが確認できている。例えば、図 2 (a) の Phe194 と Pro205 はほぼ c 軸と平行に 4.9 Å 離れた構造をとっているが、図 2 (c) に示すその部分のプロファイルからわかるように、我々の解析では 2 つの側鎖を完全に分離して観察できる。また、6 Å 分解能の解析では観察できなかった、D と名付けられた、ヘリックスがはっきり見えてきた。図 2 (a) のマップから明らかなように、D のヘリックスの 209 と 213 の 2 つのロイシンともきれいに分離して観察できている。

膜を貫通しているヘリックスは 3 本あり、A, B2 本のヘリックスは、c 軸に対してそれぞれ 31 度と 34 度の傾で、長さも 48 Å, 53 Å と極めて近い。このヘリックスは互いに疑似の 2 回軸の関係にあり、図 3 (a), (b) に見られるようにストロマ側へのびたアルギニンと反対側のヘリックス上のグルタミン酸とが 2 対のイオン対を形成している。しかも、グルタミン酸 180 と 65 は、それぞれ、クロロフィル a1 と a4 の中心にあるマグネシウム原子と結合している。またアスパラギン 183 とヒスチジン 68 は、

図2 LHC の密度マップ (a), 60 度傾斜の電子顕微鏡像のフーリエ変換 (b) とフェニルアラニン 194 とプロリン 205 の中心を結ぶ密度プロファイル (c) (Nature 367, 1994, pp.615, 616, Fig.1, Fig.2e より転載.)

それぞれ、クロロフィル a2 と a5 のマグネシウムと結合している。C のヘリックスは長さ 33 Å で、ほぼ c 軸に平行である。図 3 (c) に示すように、このヘリックス上のグルタミン 131 はクロロフィル b6 のマグネシウムと結合している。A, B2 本のヘリックスがコイルドコイルを形成している付近の c 軸に平行方向から見た構造は図 3 (d) にあるようで、143 のアルギニンとイオン対を形成する 139 のグルタミン酸はクロロフィル b5 と結合している。図 3 (e), (f) に示されているように、補助色素のルテイン分子は、オールトランス構造を取って A, B のヘリックスを挟むような配置をしている。

全体の構造を示すと図 4 のようになる。蛋白質の構造はリボンモデルで示してあり、ヘリックスには A, B, C, D の記号が付けてある。クロロフィル a は、b よりやや濃い色で区別してある。上下 2 本の直線は脂質 2 重膜を示す。

ルテイン分子は 2 つの重要な役割を担っていると考えられる。第一に、2 つのルテイン分子は、その両端の 4 か

[illegible]

所で水素結合を形成することによって、膜貫通ヘリックスが3本と少なくとも構造をしっかりと保たせる役割を担っている。この構造は、機能分子であるクロロフィルを有効に数多く膜内に配列する事を可能にしている。第二に、クロロフィルbは短い励起時間（約1 psec）で光エネルギーをクロロフィルaに伝搬するが、クロロフィルaは長い時間（1~3 msec）励起されている。そのためクロロフィルaは、光合成の反応中心からの発生期の酸素によって損傷を受ける虞がある。これを防ぐために、ルテイン分子は重要な役割を果たしていると思われる。実際、クロロフィルbはルテイン分子と6.5 Åから10.7 Å程度離れているが、クロロフィルaは4.9 Åより近接して配列されている。

A black and white photograph showing a dense, tangled mass of white, fibrous material. The fibers are thin and irregular, creating a complex, web-like structure. The mass is roughly circular but has an irregular, porous appearance with many small gaps and protrusions. It is set against a dark, textured background.

なったが、それ以外のクロロフィルがどのように固定されているかは不明である。おそらく水分子が寄与しているであろうが、この分解能の解析では見えていない。

電子顕微鏡を用いることで、膜蛋白質の分子モデルを構築できるような構造解析ができるようになった。しか

し、その分解能は3.4 Åと側鎖の構造を決定するには不十分である。しかも、我々の解析結果はcrystallographic R factor (20 Å to 3.4 Å) が33%で、free R factor (20 Å to 3.4 Å) が37.9%という不十分な値である。⁶⁾ すなわち、X線結晶学のレベルにはまだかなり距離があると言わざるを得ない。ただ、電子線結晶学は急速に発展しつつあり、3次元結晶を作りにくい膜蛋白質の構造解析には確かに有力な手法に成長しつつある。しかも、我々の新しいシステム、電界放射型電子銃を備えた極低温高分解能電子顕微鏡、そしてそれにスロースキャンCCDカメラを備えたシステムは、現在我々が解析を進めているバクテリオロドプシンのデータから見ると、少なくとも2.5 Å分解能の解析は可能である。もし、膜蛋白質の2次元結晶化を試みる研究者が今より増加して、さらに多くの膜蛋白質において、高い分解能の解析が可能になるならば、電子線結晶学が、蛋白質の構造研究に真に役立つ結晶学の仲間入りができることになる。これを夢見て、我々は膜蛋白質の構造解析を進めている。

なお、LHC-IIの研究はW. KühlbrandtとD. Wangとの共同研究によるものであり、図2、図3、図4はMacmillan Magazines社の許可を得て、*Nature* **367**, No.6464, pp.614-621, 17 February 1994から転載した。ここに感謝する。

文 献

- 1) N. Short: *Nature* **366**, 203 (1993) .
- 2) J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel: *Nature* **318**, 618 (1985) .
- 3) D. N. Wang and W. Kühlbrandt: *Biophys. J.* **61**, 287 (1992) .
- 4) W. Kühlbrandt and D. N. Wang: *Nature* **350**, 130 (1991) .

- 5) Y. Fujiyoshi, T. Mizusaki, K. Morikawa, H. Yamagishi, Y. Aoki, H. Kihara, Y. Harada: *Ultramicroscopy* **38**, 241 (1991) .
- 6) W. Kühlbrandt, D. N. Wang and Y. Fujiyoshi: *Nature* **367**, 614 (1994) .
- 7) O. L. Krivanek and P. E. Mooney: *Ultramicroscopy* **49**, 95 (1993) .
- 8) J. M. Baldwin and R. Henderson: *Ultramicroscopy* **14**, 319 (1984) .
- 9) Y. Tahara, S. Ohnishi, Y. Fujiyoshi, Y. Kimura, Y. Hayashi: *FEBS Lett.* **320**, 17 (1993) .
- 10) R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Bechmann and K. H. Downing: *J. Mol. Biol.* **213**, 899 (1990) .

プロフィール

藤吉好則 Yoshinori FUJIYOSHI
 松下電器産業(株)国際研究所電子顕微鏡グループ,
 〒619-02 京都府相楽郡精華町光台3番地の4
 International Institute for Advanced Research,
 Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.,
 3-4, Hikaridai, Seika, Kyoto, 619-02, Japan
 TEL. 0774-98-2543 FAX. 0774-98-2575
 e-mail: yoshi@crl.mei.co.jp
 最終学歴：京都大学大学院理学研究科博士課程
 1979年終了
 専門分野：電子線結晶学
 現在の研究テーマ：膜蛋白質の構造解析
 趣味：絵画、テニス