結晶を用いない電子顕微鏡 画像からの3次元構造決定： 単粒子解析法

三尾和弘^{*1, 2}, 小椋俊彦^{*1, 3}, 丸山雄介^{*1},
三尾宗代^{*1}, 間中幸絵^{*1}, 佐藤主税^{*1, 2}

^{*1}産業技術総合研究所脳神経情報研究部門, ^{*2}同研究所バイオメディシナル情報研究センター,
^{*3}科学技術振興機構さきがけ

精製タンパク質が微量しか得られなかったり、結晶化が難しいなどの理由により、X線解析やNMRなどの高分解能構造解析手法が適用できないタンパク質も少なくない。そのような場合には単粒子構造解析法が有効である。本技術はタンパク質の電子顕微鏡像だけを用いて、情報処理技術を頼りに3次元構造まで進んでいく手法である。電子顕微鏡で撮影した2次元の画像から3次元構造を再構築できることをDe Rosierらが示して以降⁽¹⁾、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、らせん対称分子を題材に単粒子解析法の技術開発が進められてきた^(2~4)。近年では、結晶を必要としない利点を生かして膜タンパク質や超分子複合体の構造解析、薬剤によるタンパク質構造変化の解析などにも広く用いられるようになってきている。

従来は、タンパク質画像の拾い上げ、画像の選別など膨大な作業時間を必要としていたが、これまで筆者らが導入・改良を加えてきたニューラルネット (NN: neural net) 法や焼きなまし (SA: simulated annealing) 法、グリッド技術などによって単粒子解析の分解能の向上と解析期間の大幅な短縮が望めるようになってきた^(5~8)。特に顕著なのは分解能の向上で、ソフトウェアの改良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^(9,10)。

筆者らの研究室では、膜タンパク質をはじ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。この解析技術の概要を、近年筆者らが解析に成功した膜タンパク質の事例も交えながら紹介したい。

単粒子構造解析法の原理

単粒子解析法は、タンパク質の電子顕微鏡像だけを用いて、情報処理技術を頼りに3次元構造まで進んでいく手法であり、結晶化を必要としない。De RosierとKlugは、透過型電子顕微鏡で撮影したらせん対称性をもつフェージ尾部の2次元画像から、元の3次元構造が再構築可能であることを示した⁽¹⁾。この技術はその後、対称性の低い分子を相手とする単粒子解析法へと発展し、結晶化の難しい膜タンパク質や高分子複合体、タンパク質の動的構造変化の解析などに広く用いられるようになった^(2~4)。

単粒子解析法は大きく3つのステップに分けられる。第一ステップは解析用のタンパク質粒子像の取得である。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1-A)。フィルムに記録された電子顕微鏡写真は十分なダイナミックレンジと空間分解能をもっているため、高解像度フィルムスキャナーを用いて16 bit 整数のデジタ

図1 ■ 単粒子構造解析法の概要

ル化を行なう。また最近の電子顕微鏡には高性能 CCD カメラを搭載している機種も多く、作業の効率化が期待できる⁽¹¹⁾。それらからタンパク質粒子画像の拾い上げを行なうが、信頼性の高い 3 次元構造を得るためには、後述する負染色粒子画像では一般的に 5,000~10,000 程度、クライオ電子顕微鏡画像では 10,000~100,000 程度の粒子数が必要である。効率的な粒子拾い上げのために、様々なプログラムが開発されているが^(12,13)、筆者らは粒子選択に学習機能を取り入れたニューラルネットワーク理論に基づく粒子拾い上げプログラムを開発し、自動化を図っている^(5,7)。また、アルゴリズムで除けなかった不良画像は目視による粒子判定を行ない、厳しい選別を行っている。

画像処理の次のステップとして、投影方向が似た画像どうしを相互に回転と平行移動させて重ね合わせ、鮮明な 2 次元平均画像の取得を行なう。これらに用いる電顕画像は、電子線による試料の損傷を最小限に抑えるため低線量条件で撮影するが、その結果得られる粒子像はノイズに埋もれており、バックグラウンドとの識別すら難しいものが多い。ノイズを除去し、タンパク質粒子の構造情報を導き出す唯一の方法は、回転と移動により粒子像を同じ向きへの重ね合わせ（アラインメント）を行ない、同じ方向から撮影された粒子だけを選び出す（クラスタリング）ことである。さらに重ね合わせ像を参照画

像として使い、元画像の位置合わせを行なうサイクルを繰り返して徐々に平均画像の収束を図ることにより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。

最終ステップは、得られた 2 次元平均像に対するそれぞれの 3 次元角度（オイラー角）の決定と、立体構造の構築である。しかし、高次の対称軸をもつウイルス外壁や 2 次元結晶試料、らせん状配列分子に比べ、単分子分散したタンパク質粒子の角度決定は非常に難しい。これまでの 3 次元角度決定法には大きく分けて 2 つあり、1 つは顕微鏡の試料ステージを傾斜させて単一粒子の画像を多方向から撮影し、角度情報を得る配向傾斜法（random conical tilt）⁽¹⁴⁾、もう 1 つはコモンライン定理⁽¹⁵⁾に基づき 2 次元平均画像間の相互関係を導き出す角度復元再構築法（angular reconstruction）^(16,17) である。筆者らは、新たに SA アルゴリズムを用いた角度推定方法を開発した⁽⁸⁾。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なうことにより、解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なわないため 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。

こうして得られた初期 3 次元構造を様々な角度に投影して、2 次元の投影像群をリファレンスとする。これらを基準として平均画像の再アラインメントとクラスタリングを行ない、新しい平均像から再び 3 次元再構成を行なうことにより、より精密化した 3 次元構造を得ることができる（projection matching 法）。このような画像重ね合わせ、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 1-D）。

実際の電圧感受性 Na チャネルの解析結果を図 2 に示す⁽¹⁸⁾。この実験では、チャネル分子は薄いバッファ層に凍った状態で閉じ込められており、電子線損傷を極限まで抑える He ステージ電子顕微鏡を用いて無染色で撮影されている⁽¹⁹⁾（図 2-A）。電顕写真ではノイズに比べてタンパク質粒子のシグナルが非常に低いが、同じ方向の投影画像どうしを 100 枚強ずつ重ねると背景のランダムなノイズは平均化されて見えなくなり、タンパク質のシグナルのみが增強されてはっきりと見えてくる（B）。これらの画像をもとに再構築された 3 次元構造は、高さ 135 Å、横幅 100 Å の鐘状の形をしており、頂上は半球

図2 ■ 画像の重ね合わせと三次元再構成

電圧感受性 Na チャネルの電子顕微鏡像 (A) からの 3 次元再構成 (C). a は下から (細胞内から) の構造, d は横から (細胞膜側から), b と c はそれぞれ中間の傾いた角度での構造. スケールバーは 50 Å (C. Sato *et al.*: *Nature*, 409, 1047 (2001) より改変)

に似たすばまった形であることが示された (C). そこから 2 次元に再投影した像からは, 内部にあるいくつかの空洞が細胞外の 4 つの小さな孔と細胞内の 8 つの大きな孔につながっていることがわかる (D). これらのうちの 8 個の孔は, チャネル分子表面において膜層と水溶液層の境界に存在した. これらの位置は, 細胞膜表面のリン脂質のマイナスチャージを用いてチャネルがイオン選択を行なっている可能性を示唆する. さらに, アセチルコリン受容体で提案されているように, イオンを細胞質側の膜直下に放出してリン脂質表面近くに漂わせ, ポンプによる Na イオンの再度のくみ出しを容易にする機構が想像される.

単粒子解析法は, 結晶が得られなくても 3 次元構造を保ったまま精製できれば, ほぼすべてのタンパク質試料に適用可能である. EMAN⁽²⁰⁾, IMAGIC⁽²¹⁾, SPIDER⁽²²⁾, Xmipp⁽²³⁾, FREALIGN⁽²⁴⁾ など, 様々な特徴をもったソフトウェアパッケージが開発されている.

試料の調製と電子顕微鏡撮影

単粒子解析に用いる試料を精製する際に最も大切なことは, 精製の最終段階において試料が正しいコンフォメーションを保っていることと, 粒子の均一性が確保できていることである. したがって, 複数のサブユニットから構成される複合体では構成単位が揃っていることが重要である. また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ため, 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 (図 3-A). 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. 筆者らは通常, 抗体を使ったアフィニティー精製と分子量で分画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, 良い結果を得ている. 最終ステップのゲルろ過精製は持ち越したノイズ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タンパク質粒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ない, 粒子の均一性や分子パッキング状態の確認を行なっている⁽²⁵⁾. 他のタンパク質の混入があったとしても, 目視あるいははじき出しプログラムなどにより除外することも場合によっては可能である.

精製したタンパク質の粒子像は, 負染色電子顕微鏡あるいはクライオ電子顕微鏡によって撮影する (図 3-B). 古くから用いられている負染色法は, タンパク質溶液をカーボンコートしたグリッド上に吸着させ, ウラン塩などの重金属系の染色液を用いてタンパク質密度の低い場所への沈着を観察する方法で⁽²⁶⁾, 特別な装置を必要としないため広く用いられている. 非特異的な染色剤の沈着や粒子の乾燥により解像度も 20 Å 程度に限られるが⁽²⁷⁾, 高コントラストな画像はタンパク質粒子の大まかな外形や特徴を理解するのに適しており, また親水性が高く染色液が入り込む部分に関しては, 内部構造情報を得ることも可能である^(28, 29).

一方, クライオ電子顕微鏡法は, 試料の温度を極低温

図3 ■ 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 は糖鎖除去酵素 PNGase F のバンド), グルタルアルデヒド架橋で生じた四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。

にすることで電子線損傷を最小限に抑えた優れた観測方法である。グリッドに滴下した試料溶液は液体窒素や液体エタンを用いて急速凍結され、結晶性の氷が形成されない条件でタンパク質粒子の非晶質氷包埋が行なわれる。顕微鏡内の試料ホルダーも液体窒素温度あるいは液体ヘリウム温度に冷却されており、氷の昇華を抑えて低温のまま撮影する^(19,30~32)。極低温で観察することにより試料への電子線照射量をダメージなしで増やすことが可能であるため、通常は無染色で撮影する^(19,33)。負染色撮影と比べてきわめてコントラストが低いため、解析には多数の粒子画像と時間を要するが、生体内に近い状態のタンパク質構造を高解像度で解析可能である。またリガンド投与時のイオンチャネルの構造変化解析にも用いられている⁽³⁴⁾。

構造解析の実例

単粒子構造解析は結晶化の難しい高分子タンパク質、

たとえばせん状分子、リボソーム、多面体ウイルス、巨大分子複合体などに広く用いられている^(35~38)。筆者らは特に、イオンチャネルなどの膜タンパク質を中心に本技術の開発を進めてきた^(18,28,29,39~41)。ここでは筆者らが近年解析に成功した事例を中心に、解析例を紹介する。

1. CFTR 陰イオンチャネル

嚢胞性線維症 (CF: cystic fibrosis) は体中のあらゆる組織で粘膜分泌障害が引き起こされる重篤な遺伝病であり、特に白人幼児の死亡原因の上位に位置する。これは ABC トランスポーターに属する陰イオンチャネル、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) の遺伝子変化に基づく機能失調で発症する。筆者らは、正常ヒト CFTR タンパク質を HEK293 細胞に発現させ、界面活性剤で可溶化した後、抗体カラム・レクチンカラム・ゲルろ過カラムを組み合わせることで精製した。負染色電子顕微鏡画像を用いて単粒子構造解析を行

図4■膜タンパク質分子の解析

(A) 変異により嚢胞性線維症が引き起こされる CFTR 陰イオンチャネルの構造⁽²⁸⁾。様々な角度からの表面構造を示した。推定される細胞膜の位置 (M) を水色の帯で示す。左下はアミノ酸配列から予想される CFTR 分子の膜トポロジーで、この単位が二量体になって CFTR チャネルを形成する。右下：C 末結合タグ (FLAG 配列) および制御領域 (R-domain) を、それぞれ抗体ならびに金粒子標識 Fab 抗体で検出した。いずれも細胞質側が標識された。(B) 陽イオンチャネルの構造解析。上：クライオ電子顕微鏡画像から 3 次元構造が決定された TRPC3 チャネル⁽⁴⁰⁾ と IP₃ 受容体 (IP₃R)⁽³⁹⁾ の結合モデル図。頂点どうして結合する場合には、広い膜間スペースが確保される。下：Orai1 チャネル (負染色電顕画像から解析)⁽²⁹⁾ は、小胞体膜上に存在する STIM1 と共役して CRAC チャネルを形成する。(C) アルツハイマー病発症に関連する γ セクレターゼの構造解析⁽⁴⁰⁾。本酵素はプレセニリン、ニカストリン、Aph-1、Pen-2 の少なくとも 4 種の膜タンパク質から構成される巨大膜型プロテアーゼである。右上：精製タンパク質の電子顕微鏡写真ではくさび形 (白矢印) や心臓形 (黒矢印) をした粒子像が見られ、全体的に細長い形状であることが予想された。右下：3 次元再構築された γ セクレターゼを様々な角度から示す。スケールバーは 200 Å を示す。

ない、その3次元構造を明らかにした(図4-A)⁽²⁸⁾。その結果、CFTRは幅120 Å、高さ162 Åの楕円形の構造をもち、細胞膜直下に分子内外をつなぐ開口部をもつことが示された。この研究で明らかにされたCFTRの3次元詳細構造は、CFの疾病原因解明のみならず、正常な組織におけるCFTRの機能解明にも役立つことが期待される。

2. 細胞内カルシウム濃度の制御：TRPC3/IP₃受容体系とOrai1/STIM1系

TRP (transient receptor potential) チャネルは細胞膜に存在し、情報伝達物質と結合することにより、分子内のイオン通路を開いてカルシウムイオン流入と細胞内部への情報伝達を行なう。TRPC3は以前クライオ画像の単粒子解析から構造を報告したイノシトール三リン酸(IP₃)受容体⁽³⁹⁾と協調して細胞内Ca²⁺制御を行なっている。約13万枚のクライオ画像を用いて分解能15 Åで決定された構造から、TRPC3はIP₃受容体の約1/3程度の分子量であるにもかかわらず、ほぼ同じ大きさの膨れた構造をもつことがわかった⁽⁴⁰⁾。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を同時に結合すること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チャネルとしてはきわめて理にかなった構造であるといえる。これらの構造情報をもとにIP₃受容体との結合を考察してみると、1:1の比率で結合する可能性が示唆された(図4-B, 上)。

一方、小胞体内Ca²⁺枯渇に応答し、細胞外からのCa²⁺流入を担うCa²⁺放出活性化Ca²⁺(CRAC)チャネルの構成サブユニットとして、細胞膜上のチャネルポアとなるOrai1と小胞体膜上でCa²⁺枯渇を感受するSTIM1が同定された。そこで筆者らは、Orai1タンパク質を発現・精製し、その生理機能単位が四量体であることを突き止め、その電顕画像から3次元構造を21 Å分解能で再構成した(図4-B, 下)。Orai1分子は高さ150 Å、幅95 Åの水滴形である。抗体やレクチンを用いてラベルしたOrai1分子を電顕観察したところ、水滴の先細りに相当する側が細胞質に、丸い側が細胞外にあった。さらに、その間の幅広い部分は膜貫通領域と推定された。この先細りの細胞質領域は100 Å程度であり、STIM1との直接結合が可能であることがうかがわれた。

3. 膜貫通型セリンプロテアーゼの構造解析

γセクレターゼは、アルツハイマー病発症機構において重要な役割を担っている、Aβペプチド産生の最終段階を担っているプロテアーゼである。したがって、γセクレターゼ阻害によるAβペプチド産生阻害はアルツハイマー病の根治療法としての可能性を秘めており、創薬の観点からも期待されている。このプロテアーゼは、プレセニリン・ニカストリン・Aph-1・Pen-2と呼ばれる4つの膜タンパク質を最小構成因子とする複合体である。生化学的にその大きさは数メガダルトンであることが明らかとなっており、ニカストリンを除き構成因子のアミノ酸配列はほとんどが膜貫通領域を構成している。

筆者らは、Sf9細胞を用いて発現させたγセクレターゼ複合体を可溶化剤を用いて精製し、その構造を単粒子解析法を用いて解析した(図4-C)⁽⁴²⁾。最も高い酵素活性が認められた精製画分に含まれるタンパク質粒子を負染色電子顕微鏡を用いて観察すると、長短が500 Åを超えるような大きさの舟型の像が観察された。2,341個の粒子像から48 Åの分解能で解明された構造は、560×320×240 Åの大きさをもつハート型であり、内側に認められる低密度領域のいくつかは酵素機能に関与することが考えられた。

1つのγセクレターゼ複合体分子を形成するために、4種類の構成タンパク質がそれぞれ何分子ずつ組み込まれているかについては明らかになっていない。解析の結果、本複合体が非常に大きなサイズをもつことが確認されたが、それぞれ複数のサブユニットが同時に組み込まれる可能性も示唆された。

まとめ

単粒子構造解析は、結晶化が困難であっても数μg程度のタンパク質が精製できれば構造解析が可能な、汎用性の高い手法である。筆者ら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・画像処理を組み合わせることで、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の添加がサンプル作製時に容易にできるため、ダイナミックな構造変化を解析することも可能である。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、様々な応用が期待される。

謝辞：CFTRチャネルに関しては慶應大学医学部の相馬義郎准教授とMissouri大学John M. Dalton Cardiovascular CenterのT.C. Hwang教授に、TRPチャネルとOrai1チャネルに関しては京都大学工学部、森泰生教授とグループの方々に、γセクレターゼに関しては東京大学薬学部、岩坪威教授、富田泰輔准教授とグループの方々に感謝いたします。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

- 1) D. J. De Rosier & A. Klug : *Nature*, **217**, 130 (1968).
- 2) M. van Heel *et al.* : *Q. Rev. Biophys.*, **33**, 307 (2000).
- 3) R. Henderson : *Q. Rev. Biophys.*, **37**, 3 (2004).
- 4) J. Frank : "Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State", Oxford University Press, New York, 2006.
- 5) T. Ogura & C. Sato : *J. Struct. Biol.*, **136**, 227 (2001).
- 6) T. Ogura & C. Sato : *J. Struct. Biol.*, **146**, 344 (2004).
- 7) T. Ogura & C. Sato : *J. Struct. Biol.*, **145**, 63 (2004).
- 8) T. Ogura & C. Sato : *J. Struct. Biol.*, **156**, 371 (2006).
- 9) X. Yu, L. Jin & Z. H. Zhou : *Nature*, **453**, 415 (2008).
- 10) X. Zhang, E. Settembre, C. Xu, P. R. Dormitzer, R. Bellamy, S. C. Harrison & N. Grigorieff : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1867 (2008).
- 11) D. H. Chen, J. Jakana, X. Liu, M. F. Schmid & W. Chiu : *J. Struct. Biol.*, **163**, 45 (2008).
- 12) W. V. Nicholson & R. M. Glaeser : *J. Struct. Biol.*, **133**, 90 (2001).
- 13) C. Potter, Y. Zhu & B. Carragher (ed.) : 'Automated Particle Selection for Cryo-Electron Microscopy', (Special issue in *J. Struct. Biol.*, Vol. 145 (2004)).
- 14) M. Radermacher, T. Wagenknecht, A. Verschoor & J. Frank : *J. Microsc.*, **141**, RP1 (1986).
- 15) R. Crowther, D. DeRosier & A. Klug : *Proc. Roy. Soc. Ser. A*, **317**, 319 (1970).
- 16) M. van Heel : *Ultramicroscopy*, **21**, 111 (1987).
- 17) I. I. Serysheva, E. V. Orlova, W. Chiu, M. B. Sherman, S. L. Hamilton & M. van Heel : *Nature Struct. Biol.*, **2**, 18 (1995).
- 18) C. Sato, Y. Ueno, K. Asai, K. Takahashi, M. Sato, A. Engel & Y. Fujiyoshi : *Nature*, **409**, 1047 (2001).
- 19) Y. Fujiyoshi, T. Mizusaki, K. Morikawa, H. Yamagishi, Y. Aoki, H. Kihara & Y. Harada : *Ultramicroscopy*, **38**, 241 (1991).
- 20) S. J. Ludtke, P. R. Baldwin & W. Chiu : *J. Struct. Biol.*, **128**, 82 (1999).
- 21) M. van Heel, G. Harauz, E. V. Orlova, R. Schmidt & M. Schatz : *J. Struct. Biol.*, **116**, 17 (1996).
- 22) J. Frank, M. Radermacher, P. Penczek, J. Zhu, Y. Li, M. Ladjadj & A. Leith : *J. Struct. Biol.*, **116**, 190 (1996).
- 23) R. Marabini, I. M. Masegosa, M. C. San Martin, S. Marco, J. J. Fernandez, L. G. de la Fraga, C. Vaquerizo & J. M. Carazo : *J. Struct. Biol.*, **116**, 237 (1996).
- 24) N. Grigorieff : *J. Struct. Biol.*, **157**, 117 (2007).
- 25) K. Mio, T. Ogura, S. Kiyonaka, Y. Mori & C. Sato : *J. Electron Microsc.*, **56**, 111 (2007).
- 26) S. Brenner & R. W. Horne : *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 103 (1959).
- 27) N. A. Kiselev, M. B. Sherman & V. L. Tsuprun : *Electron Microsc. Rev.*, **3**, 43 (1990).
- 28) K. Mio, T. Ogura, M. Mio, H. Shimizu, T. C. Hwang, C. Sato & Y. Sohma : *J. Biol. Chem.*, **283**, 30300 (2008).
- 29) Y. Maruyama, T. Ogura, K. Mio, K. Kato, T. Kaneko, S. Kiyonaka, Y. Mori & C. Sato : *J. Biol. Chem.*, **284**, 13676 (2009).
- 30) M. Adrian, J. Dubochet, J. Lepault & A. W. McDowell : *Nature*, **308**, 32 (1984).
- 31) K. A. Taylor & R. M. Glaeser : *Science*, **186**, 1036 (1974).
- 32) J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell & P. Schultz : *Q. Rev. Biophys.*, **21**, 129 (1988).
- 33) Y. Fujiyoshi : *Adv. Biophys.*, **35**, 25 (1998).
- 34) N. Unwin, A. Miyazawa, J. Li & Y. Fujiyoshi : *J. Mol. Biol.*, **319**, 1165 (2002).
- 35) W. Jiang & S. J. Ludtke : *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 571 (2005).
- 36) E. H. Egelman : *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 556 (2007).
- 37) Y. Cheng : *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 203 (2009).
- 38) K. Mitra & J. Frank : *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **35**, 299 (2006).
- 39) C. Sato, K. Hamada, T. Ogura, A. Miyazawa, K. Iwasaki, Y. Hiroaki, K. Tani, A. Terauchi, Y. Fujiyoshi & K. Mikoshiba : *J. Mol. Biol.*, **336**, 155 (2004).
- 40) K. Mio, T. Ogura, S. Kiyonaka, Y. Hiroaki, Y. Tanimura, Y. Fujiyoshi, Y. Mori & C. Sato : *J. Mol. Biol.*, **367**, 373 (2007).
- 41) K. Mio, T. Ogura, T. Yamamoto, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, Y. Kubo & C. Sato : *Structure*, **17**, 266 (2009).
- 42) T. Ogura *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 525 (2006).