



# 結晶化はしなくて良いの？ ～クライオ電子顕微鏡の構造生物学への貢献～

藤吉 好則

## 構造解析分野の激変

タンパク質やその複合体の構造解析は、困難で長い期間を要すると考えられてきたし、実際に構造解析には何年もの歳月を要した例が多く知られている。たとえば、浸透圧に応答した血圧調節と電解質の恒常性維持などに関わるエンドセリン受容体の構造解析は、18年程度もの長い期間をかけて遂げられた<sup>1)</sup>。この構造解析は、X線結晶学を用いてなされており、結晶を作製する必要があった。膜タンパク質の良質な結晶を作製することは、一般的には容易ではなく、膜タンパク質の構造解析には長い年月が必要であった。構造学者にとって苦しいのは、いつ成功できるかわからないまま結晶化の努力を続けなければならないことである。

このような状況を大きく変える論文が2013年の12月に発表された<sup>2)</sup>。この論文では、筆者の研究室のポストドクでもあったChengのグループが、クライオ電子顕微鏡と新たに開発された高性能のカメラを用いて、辛さや温度のセンサーとして重要なtransient receptor potential (TRP) と名付けられた受容体の構造を、単粒子解析法によって高い分解能で解析した結果が発表された(図1)。

このTRPチャネルは、その構造を解析するために結晶化の努力がなされてきたが、だれも構造解析できな

かった膜タンパク質である。それが、比較的短期間に、しかも原子モデルを作製できる高い分解能で、結晶化することなく構造解析されたのである。この報告の後、X線結晶学者を含む多くの構造分野の研究者が、このクライオ電子顕微鏡と単粒子解析法を用いてさまざまなタンパク質の構造解析に挑戦するようになった。すなわち、構造解析分野が激変したきっかけとなった。

## クライオ電子顕微鏡と電子線結晶学

クライオ電子顕微鏡は、日本でも独自の開発が進められてきた。タンパク質の構造を解析するためには、高い分解能で電子顕微鏡像を撮影する必要がある。そのためには、電子線による試料損傷を低減することが重要である。そこで、電子線損傷の温度依存性が定量的に測定され、試料を8K(ケルビン)以下に冷却すると室温と比較して、およそ1/20に電子線損傷を軽減できるという結果が得られた。それゆえ、このような低い試料温度で高分解能像が撮影できるクライオ電子顕微鏡が開発された<sup>3)</sup>。このタイプのクライオ電子顕微鏡を活用した電子線結晶学により、光合成のアンテナタンパク質であるLHC-IIの構造<sup>4)</sup>やバクテリオロドプシンの構造<sup>5)</sup>が、高い分解能で解析された。このような電子線結晶学による構造解析手法は、膜タンパク質が本来存在する脂質膜内にある状態で構造解析できるという重要な特徴を有している。液体ヘリウム温度にまで試料を冷却できる安定で高性能なクライオ電子顕微鏡が用いられているので、高い分解能の構造解析が可能になった。特に、水チャネルの構造と機能解析では、このタイプのクライオ電子顕微鏡が大きな力を発揮した。

ヒトの身体は70%近くの割合で水を含んでおり、13種類の水チャネルがさまざまな生理機能に関わっていることがわかっている<sup>6)</sup>。たとえば、アクアポリン-1(AQP1)は、多くの組織での発現がみられ、1つのチャネルで1秒間に30億分子もの水を透過しながら、いかなるイオンもプロトンも透過しない機能を有する。水チャネルが水分子とともにイオンを透過させるとイオンチャネルが機能できなくなる。さらに、pHは細胞分裂

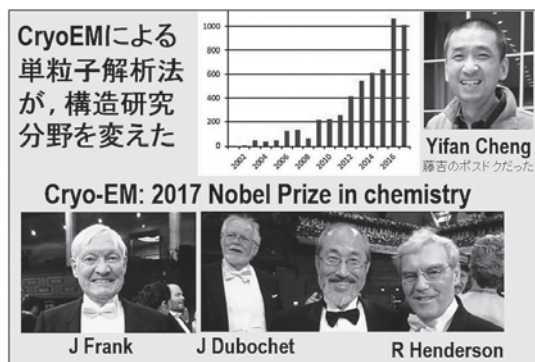


図1. クライオ電子顕微鏡と単粒子解析法により構造生物学分野が大きく変わり、構造解析数が飛躍的に増加した。その嚆矢となったのが、Chengらの構造解析であった。その結果、この分野の3人のパイオニアにノーベル賞が授与された。

著者紹介 東京医科歯科大学高等研究院(特別荣誉教授) E-mail: yoshi.cesp@tmd.ac.jp

やシグナル伝達，細胞の生死にも関わるので，水が透過するときプロトンを透過させないことは，水チャンネルに課せられた必須の機能である。しかし，プロトンはヒドロニウムイオンが物理的に移動しなくても，水分子が形成している水素結合を通して容易に伝搬してしまう(図2)。しかし，プロトンの伝搬を止めるために水分子の水素結合のネットワークを断ち切ろうとすると，エネルギー障壁が高くなって，1秒間に30億もの水分子を透過できなくなってしまう。

クライオ電子顕微鏡と電子線結晶学を用いて，ヒト由来の水チャンネルAQP1の構造が解析されたことによって，この水チャンネルの速い水透過と高い水選択性の機能を理解するモデルとして，図3のようにHydrogen-Bond Isolation Mechanismが提案された<sup>7)</sup>。

すべての水チャンネルで保存されている2本の短いヘリックスが強い静電場を形成してチャンネル内で水分子を配向させるとともに，高度に保存されているNPA（アスパラギン，プロリン，アラニン）の位置において，アスパラギンのアミド基とその場所に来た水分子が水素結合を形成することによってエネルギー障壁を低くしてい

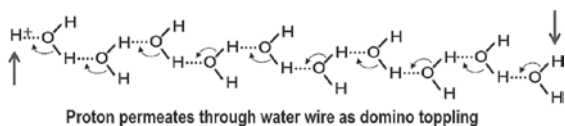


図2. プロトン： $H^+$ はヒドロニウムイオンが一方の側から他方に動かなくても，水素結合のネットワークを通して容易に伝搬してしまう。

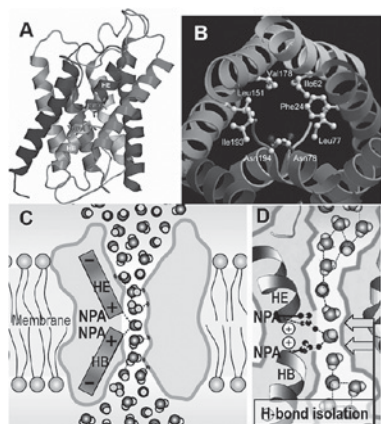


図3. AQP1の構造解析の結果，複雑な構造(A)を形成しており，中央部に3 Å径の狭いチャンネル部分を形成して(B)，水和したイオンなどを透過させない機構が明らかになった。さらに，短いヘリックスが形成するヘリックス双極子(C)の静電場で配向した水分子が，高度に保存されているNPA配列のアスパラギンのアミド基とスムーズに結合して，その水分子の2つの水素をチャンネル軸に垂直に配向させ，隣り合う水分子とは水素結合を断ち切る(Dの矢印)ことで，プロトンを透過させないというモデルが提案された。

る。その位置の水分子は上下の水分子と水素結合を形成できないように水分子が配置されるため，プロトンが水分子間の水素結合を伝搬してしまうのを防いでいるのである(図3)。

## ノーベル化学賞

2013年以前のクライオ電子顕微鏡を用いた膜タンパク質の高分解能の構造解析は，電子線結晶学で行われていたが，ChengらのTRPの構造解析以降，単粒子解析法による構造解析が飛躍的に増加したので，2017年のノーベル化学賞は，クライオ電子顕微鏡法分野における3人のパイオニアであるDubochet, Frank, Hendersonに授与された(図1)。Dubochetはウイルスをはじめとする生体試料を非晶質の水に包埋する技術開発を1984年に確立して<sup>8)</sup>，その後の単粒子解析法による高分解能の構造解析の基本的な試料作製法を確立した。この技術開発において鍵となった技術は，液体エタンを用いた急速凍結法である。数 $\mu m$ 程度の小さな穴が密に開いたカンチフォイルと呼ばれる電子顕微鏡用グリッド，あるいはマイクログリッド上に置いた試料液をろ紙で吸い取ることで薄い水の膜を形成させて，液体窒素で冷却した液体エタン中にグリッドを落下させて急速に水の膜を凍結する。このようにして，非晶質の水の薄膜を形成させて，その中に分散している生物試料を高い分解能で電子顕微鏡観察できるようにした。この急速凍結法は，生物試料を高い分解能で電子顕微鏡観察しようとするときに問題となる，試料の乾燥を防ぐ技術である。電子顕微鏡の内部は高真空中に排気されており，生物試料では水が飛んで干からびてしまう。この問題を解決するために酢酸ウラニルなどで染色して観察していたが，この染色法では20 Åより高い分解能の構造を観ることはできなかった。そこでUnwinとHendersonは，グルコース(糖)に包埋(水と糖を置換)して7 Å分解能でバクテリオロドプシンの構造を解析した<sup>9)</sup>。なお，氷包埋法を最初に開発したのはTaylorとGlaeserで，カタラーゼの結晶を氷に包埋して4 Å程度の回折点を観察した<sup>10)</sup>。しかし，この方法では，水が結晶性の氷になり，生物試料を破壊する恐れがあった。それゆえ，急速凍結法を開発して広く用いられている方法を確立したDubochetがノーベル賞を受賞した。

Frankは2次元投影画像を平均化してS/Nを向上させた像から3次元立体構造を解析するコンピュータシステムとして計算機プログラムSPIDERを1981年に開発した<sup>11)</sup>。Frankらの単粒子解析法による構造解析は，ネガティブ染色法による電子顕微鏡像を用いて行われていた

が、Duchochetらの水包埋法が開発されたので、“生”の試料をクライオ電子顕微鏡で撮影した像を用いて行われるようになった。それゆえ、当初は原子モデルができるほどの高い分解能の解析はできなかったが、水包埋法を用いて7 Å前後にまで分解能を向上させることができた<sup>12)</sup>。余談であるが、Frankはタンパク質を合成する工場ともいえるリボゾームの構造解析を行っている。このリボゾームの構造解析は抗生物質の理解やその設計をはじめ、基礎生物学においてもきわめて重要であり、2009年のノーベル化学賞はこの構造研究に貢献した3名、Steitz, Ramakrishnan, Yonathに与えられた。リボゾームの構造解析におけるFrankの貢献は小さくないと評価されていたが、この時の受賞には至らなかったため、Frankが今回ノーベル賞を受賞したのは良いことであろう。

Hendersonはクライオ電子顕微鏡分野におけるオピニオンリーダーであり、Unwinとともに電子線結晶学の分野を切り開き、次いで高分解能の構造解析を行うための単粒子解析法の可能性を早くから予想して、分野の発展をリードしてきている。最近でもScheresを英国のMRC LMBという研究所に招聘してRELIONという単粒子解析でもっとも使われる解析プログラムの開発を援助した<sup>13)</sup>。

### 単粒子解析法

ここで、単粒子解析法を概観する。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法の流れを図4に示す。

(1) まず、構造解析を目指す標的分子を精製する必要がある。(2) 膜タンパク質の場合には、界面活性剤を用いて膜タンパク質を可溶化して精製しなければならないので、界面活性剤が試料に含まれている。一般には、それを何らかの方法で除く、あるいは少なくとも減らす必要がある。界面活性剤がミセル状になって試料に含まれると、バックグラウンドノイズが大きくなるのみならず、薄い最適な厚さの水の膜を形成することができず、厚い水になってしまう。それゆえ、膜タンパク質の場合には、可能な限り界面活性剤を除くような試料作製法が望まれる。(3) 高分解能の構造解析を行うには、試料を薄い最適な厚さの水に包埋する必要がある。厚すぎるとバックグラウンドノイズが大きくなるのみならず、試料位置が異なる粒子像を解析することになり、粒子ごとに焦点条件が異なるなどの問題が生じるため、高分解能での解析が困難となる。一方、水の膜が薄すぎると、標的分子が包埋できなくて標的粒子像が撮影されなくなってしまう。あるいは、標的分子が変性・変形してしまう。

このような問題のない、最適厚さの水に試料を包埋する必要がある。(4) このようにして、最適な厚さの水に包埋した試料をクライオ電子顕微鏡で撮影する。この時に3 mm径の電子顕微鏡用グリッドのすべての領域で最適厚さの水が形成されているわけではないので、低い倍率で良いグリッド領域を探して、高い倍率の高分解能の像を撮影する。ノーベル賞が与えられるほど大きな変化をもたらしたのは、電子線を直接検出するタイプのK2 summitと名付けられたGatan製の高性能カメラが開発されたからである<sup>14)</sup>。このカメラの開発によって、画像記録法の2つの大きな前進が可能になった。クライオ電子顕微鏡で高分解能像を撮影しようとするときに、電子顕微鏡の不安定性や試料のチャージアップなどの理由で、画像のドリフトが生じることが多い。1枚の写真を6秒露光で撮影しようとするときに、0.3秒露光の像を20枚撮影することで1枚の画像を形成させるようにすると、それぞれの画像間でずれが生じて互いに相関を計算してそのずれを補正することが可能となる。これは、モーションコレクションと呼ばれる方法で、このような補正ができるようになったことで、高分解能の像を撮影できる可能性が飛躍的に向上した。さらに好都合なことに、このような画像記録法がクライオ電子顕微鏡法の大きな発展をもたらした。生物試料は電子線による損傷が大きな問題であり、照射できる電子線量が制限される。それゆえ、図4に示すクライオ電子顕微鏡像は、一般的にはS/Nの悪い像となってしまふ。(5) 粒子拾い上げには多くの電子線を照射したS/Nの良い画像を用いて、正しく粒子を拾い上げることが望ましい。しかし、上記の例で、たとえば、最初の10枚の画像は比較的電子線損

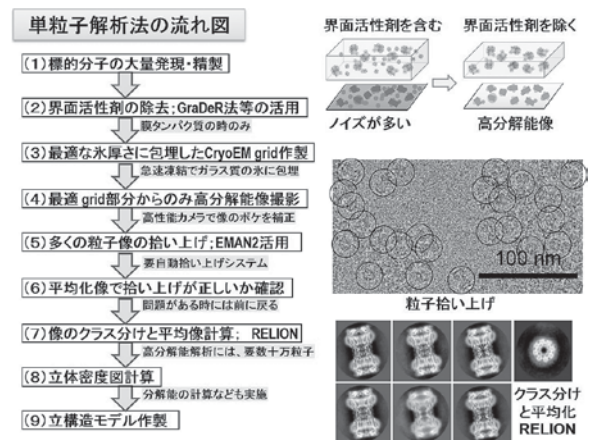


図4. 単粒子解析法の流れを示す図。右上に標的粒子の水包埋を模式的に示す。右の真ん中には実際の電子顕微鏡像から、標的粒子を拾い上げる様子を示す。その下に、平均化した像を示す。イネキシンの2次構造が観察される。

傷を受けてないとしても、後半の11枚目から20枚目までの画像は前半に撮影された画像より電子線損傷を受けており、特に高い分解能の構造情報が失われている。それゆえ、このような損傷を受けている画像を解析に含めると、高い分解能の構造を得ることができない。そこで、粒子を拾い上げるときには、20枚すべての像を重ね合わせた比較的S/Nの良い画像を用い、粒子の拾い上げを行った後で高い分解能での解析をするために、比較的損傷の少ない前半の10枚の像だけで構造解析を実施するというような方法を可能にした。(6) 拾い上げた像に問題がないことを確認した後、これらの像の解析に進むが、(7) 標的タンパク質の構造が完全に1つのコンフォメーションだけを取っているとは限らないし、変形している粒子が含まれている可能性もあるので、RELIONという解析プログラムでは、何種類かの構造が存在すると仮定してクラス分けを行い、同一の構造を有する粒子のクラス分けを行うことで、2次元平均像を計算することができる。(8) 均質なコンフォメーションを有すると思われる、良い2次元平均像が計算できると、3次元の密度図を計算することができる。(9) その密度図と、アミノ酸配列の情報を用いて、原子モデルを作製することで構造解析が行われる。

### 単粒子解析法を用いた膜タンパク質の構造解析例

クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析法である、単粒子解析法を用いた構造解析の具体例として、ギャップ結合チャネルの解析結果を図5に示す。

ギャップ結合チャネルは、発生制御や、炎症、細胞死、免疫応答、筋収縮などに関わっている細胞間をつなぐ興味深いチャネルで、脊椎動物にはコネクシンが、無脊椎生物にはイネキシンが発現して、ギャップ結合を形成している。これまでに、コネクシンの構造が電子線結晶学とX線結晶学を用いて構造解析されていた<sup>15,16)</sup>。そして結晶学的方法を用いることでイネキシンの構造も解析された<sup>17)</sup>。これらの結晶学的方法による構造解析の結果、コネクシンのギャップ結合は12量体で形成されている一方、イネキシンのギャップ結合は16量体を形成していることが明らかになった<sup>17)</sup>。しかし、質の良い結晶が作製されなかったために低い分解能での解析しかなされていなかった。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によって、イネキシンのギャップ結合チャネルの高い分解能での構造解析がわずか2か月でなされた(図5)<sup>18)</sup>。ギャップ結合は大きな可溶性分子を透過できるが、複雑なゲーティング機構で制御されるとともに、速いゲーティング制御も行っている。このような不思議な機

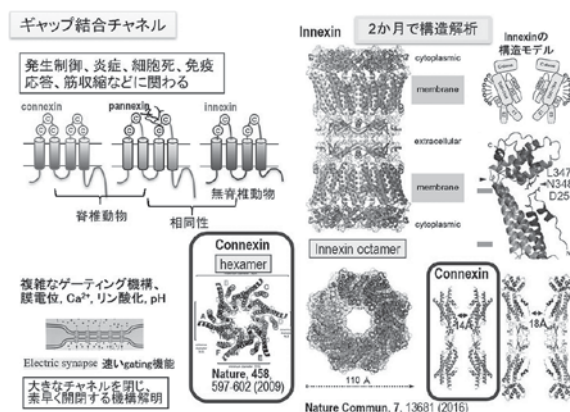


図5. 脊椎動物と無脊椎生物由来のギャップ結合チャネルの構造。電子線結晶学とX線結晶学を用いて、コネクシンの構造が解析された(黒い枠内の構造)。単粒子解析法を用いてイネキシンの高分解能の構造が解析された。結晶学では観察されなかった細胞内側のドメインの構造が単粒子解析法では解析された。速い構造解析のみならず、結晶化による人為的相互作用の影響が少ない構造解析が可能という大きな長所も確認された。

能を有するギャップ結合チャネルの高分解能の構造情報が、単粒子解析法を用いることで、短期に得られるようになったことにより、創薬標的として重要なさまざまな膜タンパク質やその複合体の構造解析が飛躍的に進むようになってきた。

このような構造解析技術の飛躍的前進によって、構造創薬という、これまでも期待されながら実現しなかった創薬戦略が実現できる可能性が出てきている。このような期待から、2017年のノーベル賞はクライオ電子顕微鏡法に与えられたと考えられる。

### 文 献

- 1) Shihoya, W. *et al.*: *Nature*, **537**, 363 (2016).
- 2) Liao, M. *et al.*: *Nature*, **504**, 107 (2013).
- 3) Fujyoshi, Y.: *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **91**, 447 (2015).
- 4) Kühlbrandt, W. *et al.*: *Nature*, **367**, 614 (1994).
- 5) Kimura, Y. *et al.*: *Nature*, **389**, 206 (1997).
- 6) Agre, P. *et al.*: *J. Physiol.*, **542**(1), 3 (2002).
- 7) Murata, K. *et al.*: *Nature*, **407**, 599 (2000).
- 8) Adrian, M. *et al.*: *Nature*, **308**, 32 (1984).
- 9) Henderson, R. and Unwin, N.: *Nature*, **257**, 28 (1975).
- 10) Taylor, K. and Glaeser, R.: *Science*, **186**, 1036 (1974).
- 11) Frank, J. *et al.*: *Science*, **214**, 1353 (1981).
- 12) Frank, J. *et al.*: *Nature*, **376**, 441 (1995).
- 13) Scheres, S. H.: *J. Struct. Biol.*, **180**, 519 (2012).
- 14) Booth, C. and Mooney, P.: *M&M*, **348**, 13 (2013).
- 15) Oshima, A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10034 (2007).
- 16) Maeda, S. *et al.*, *Nature*, **458**, 597 (2009).
- 17) Oshima, A. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **428**, 1227 (2016).
- 18) Oshima, A. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 13681 (2016).