

クライオ電子顕微鏡で電荷・化学結合を可視化



眞木さおり*^{1,2}
Maki Saori



川上 恵典*¹
Kawakami Keisuke



米倉 功治*^{1,2}
Yonekura Koji

1 はじめに

クライオ電子顕微鏡(EM)を用いた単粒子解析は、分子量の比較的大きなタンパク質の立体構造解析法として大きく発展した。試料の結晶化を必要とせず、生理的なイオン環境下における詳細な構造が得られるため、タンパク質の構造研究は一新されたと言われる。この進展は、電子線直接検出型の検出器の導入により、高い空間分解能の信号が記録されるようになったのが契機になった。その後もハード、ソフト、測定技術、解析理論についての研究と開発は続き、得られる構造の分解能の更なる改善につながっていった。

筆者らは、日本電子 CRYO ARM 300 を導入し、その利用・運用技術の開発を進めた^{1,2)}。同機は、干渉性の良い電子ビームを発生する冷陰極電界放射型(コールドフィールドエミッション)の電子銃を搭載した初めてのクライオ EM である。この電子銃で得られる時間的な干渉性が向上した電子ビームで撮像すると、高分解能領域の信号の減衰を抑えられる。しかし、その時点において単粒子解析への効果は分かっていなかった。その有効性を示した筆者らの解析を発端とし¹⁾、2020年にはアポフェリチンの1.25 Åと1.22 Å分解能の構造解析が報告された^{3,4)}。アポフェリチンは生体内で鉄を貯蔵する機能を持つ、24個の同一サブユニットから成る球状のタンパク質複合体で、単粒子解析のベンチマークとして頻繁に用いられる。これらの研究では、実験

データから水素原子の信号さえ得られることが示された^{4,5)}。

タンパク質中の水素原子、電荷、化学結合の極性は、構造の形成、安定化に加え、酵素触媒作用、エネルギー伝達、基質や薬剤との結合等、様々な機能と性質を担う。電子線は、電荷に対する高い感度を持ち、これらの性質の測定に適する可能性がある。それは、透過経路にある試料のクーロンポテンシャルに影響を受けるからで、原子核の周りの電子に散乱されるX線とは、作用を及ぼされる実体が本質的に異なる。筆者らは、この特性を利用してより詳細な化学情報を抽出することが、単粒子解析の次の課題と考えた。そこで、前記のCRYO ARM 300を用いて測定したアポフェリチンの画像データの解析から、1.19 Å分解能の構造を得た。得られた構造からタンパク質中のほとんどの水素原子が可視化できたことに加え、電荷、化学結合に係る情報が取得できることを実証した^{6,7)}。

2 画像データ撮影時の収差の低減

タンパク質溶液を、直径1 μm程度の円形の穴が並んだ炭素の支持膜中で、薄いアモルファスな氷の状態に凍結しクライオEM撮影の試料とする(図1)。今回の解析では、約10万倍の高倍率の像を8000枚弱集めた。このような多数の画像の収集には自動撮影とその高速化が必要である。実際の撮影では、中倍率の像に写った個々の膜穴(図1c)の中央に試

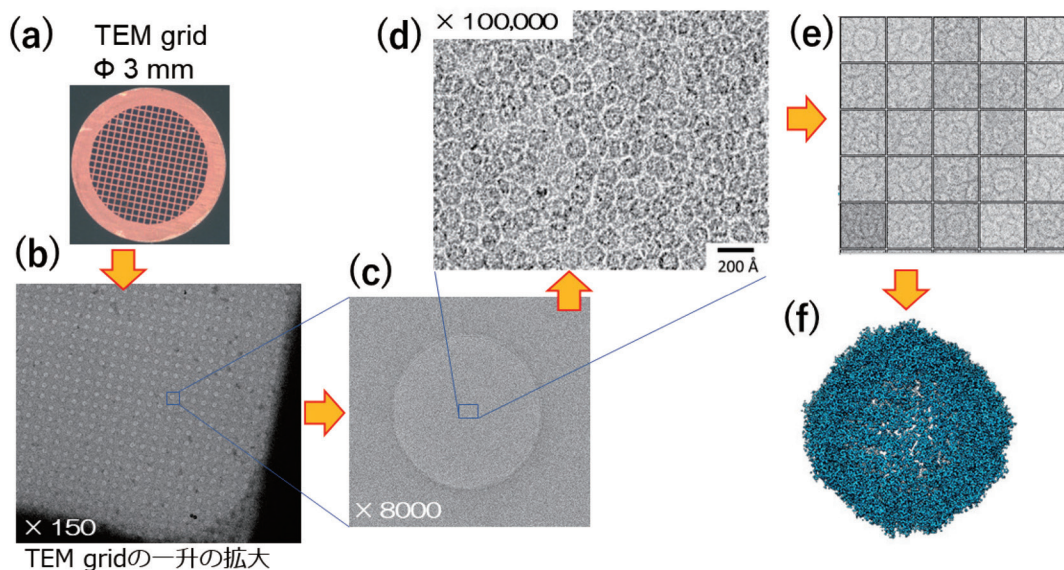


図1 クライオ EM の単粒子解析の流れ

(a) 透過電子顕微鏡用の直径 3 mm の銅製試料グリッドを用いる。(b) 凍結試料の約 150 倍の像の一部で、炭素薄膜に規則的に並んだ円形の穴の中にタンパク質溶液のアモルファスな薄い氷の層が張っている。(c) 視野の位置合わせに用いる約 8000 倍の像。(d) 画像解析に用いる約 10 万倍のクライオ EM 画像。視野内に非常に多数の球状のアポフェリチンが写っている。(e) 個々の分子像を切り出し並べて表示。(f) 3次元再構成

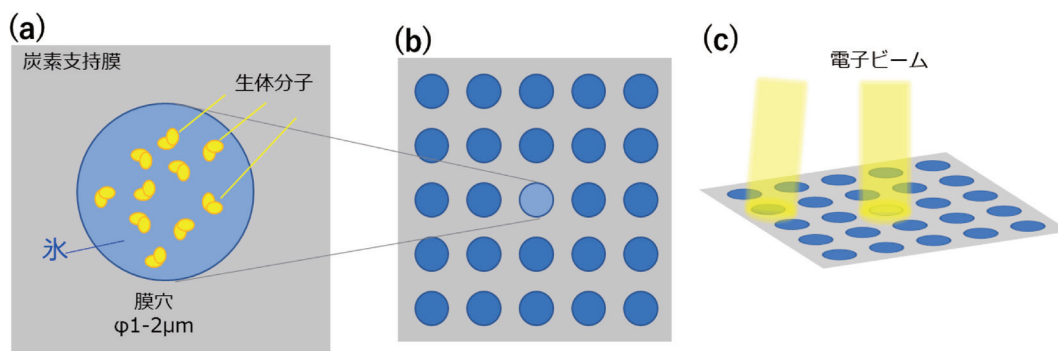


図2 クライオ EM による氷包埋試料の像撮影の模式図

(a) タンパク質等の生体高分子を炭素支持膜穴中の薄いアモルファスな氷に包埋する。(b) 膜穴の並び。(c) 中央の膜穴の位置に試料ステージを機械的に移動した後、偏向コイルでビームを振り、周囲の穴を含め複数（この例では5×5）の像を撮影する

料ステージを機械的に合わせた後、投影系の偏向コイルでビームを電氣的に振り、周囲を含め5×5個の膜穴から高倍率の像を取得した(図2)。この一連の動作はスクリプトプログラムを用いて繰り返し実行できる。また、偏向コイルを使うことで機械的な移動を大幅に減らせるため、撮影中の試料ステージの微動の低減と撮影の高速化が両立する。一方、ビームの偏向動作は軸上コマ収差の導入を招き、位相のずれが著しく大きくなる⁸⁾。この位相のずれは測定後の画像処理で見積もり補正できるが⁹⁾、到達分解能は1.49 Åに留まった⁶⁾。より高い分解能を目指すためには、測定中にコマ収差を減らすよう照射

系ビームのシフトと傾斜の補正が必要である。そこで、高倍の画像撮影データ測定と全く同じ条件で補正量の校正を、撮影前に行った。その結果、撮影画像の軸上コマ収差は小さく抑えられ、最終的に約220万個の分子像から前記の分解能の3次元構造が得られた⁶⁾。

3 水素原子の可視化

得られた構造は、水素以外の個々の原子が分離してみえる高い品質を示した(図3a)⁶⁾。水素原子の電子線を散乱する相対的強度はX線と比較して大

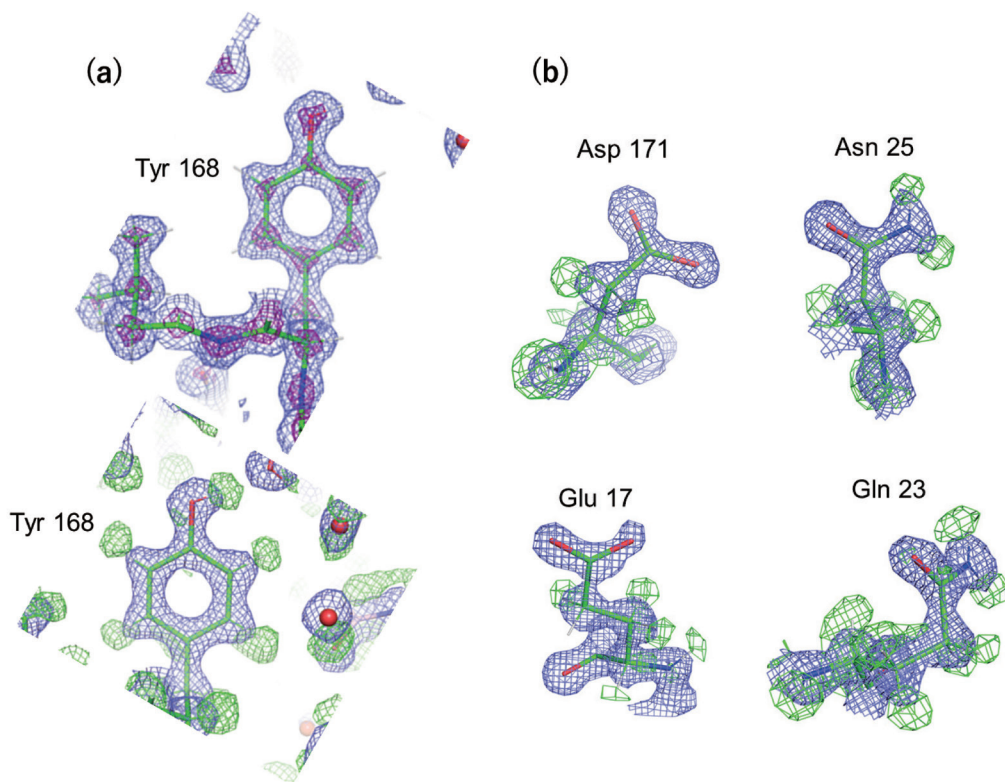


図3 単粒子解析構造の詳細

(a) アポフェリチンの168番のチロシン (Tyr 168) 近傍の実験構造 (青と紫の網目)。構造モデルを重ねて表示。表示レベルを上げると個々の元素が分離する (紫の網目)。(b) 171番のアスパラギン酸 (Asp 171)、25番のアスパラギン (Asn 25)、17番のグルタミン酸 (Glu 17)、23番目のグルタミン (Gln 23) の構造。緑の網目は重み付け差マップで水素原子に対応する。青と紫の網目は密度表示のレベルで 2σ と 7σ にそれぞれ相当する。緑は 3σ に相当する

きい¹⁰⁾が、実測データから直接、水素由来の信号を得ることは難しい。このような場合、X線結晶構造解析等では実測データと原子配置のモデルとの差 (差フーリエマップ) から、モデルに含まれない微弱な信号を検出することができる。そこで、今回の実験構造データから実験構造に基づいて構築した原子配置モデルの構造因子を引いた重み付け差マップを計算した。水素原子はモデルに加えていないため、正の差は実験データに由来し、その多くはアミノ酸や水分子中の水素原子の結合位置に現れた。これにより、タンパク質の安定部位におけるほとんどの水素原子が観測できることが確認された (図3)。

168番のチロシンでは、側鎖のベンゼン環の先端のヒドロキシ基 (-OH) の水素原子が近くに存在する酸素原子の方に引き付けられ、水素結合を形成していることが分かった (図3a)。アスパラギンとアスパラギン酸、グルタミンとグルタミン酸は、側鎖末端のアミノ基 (-NH₂) とヒドロキシ基 (-OH) で区別される。カルボキシ基 (-COOH)

の一部であるこのヒドロキシ基から、中性pHで水素が脱離する。試料溶液のpHが7.5であったことを反映して、得られた構造のアスパラギン酸とグルタミン酸のカルボキシ基には水素原子は存在せず、アスパラギンとグルタミンのアミノ基には水素原子が2つ付いているのが確認できた (図3b)。X線結晶構造解析では、アスパラギンとグルタミンのアミノ末端 (-NH₂) とオキソ末端 (=O) の同定は特に難しいことが知られているが、今回の構造では、水素原子の有無によりアミノ末端とオキソ末端が明確に区別できる (図3b)。

4 電荷の計測

X線は波長の短い光で電氣的に中性であるのに対して、電子線は負の電荷を持つ。電子線では、同じ原子でも電荷を持つものと中性のものでは、散乱のされ方が顕著に異なる¹⁰⁻¹²⁾。これに対して、X線では両者の違いは原点で総電子数の違いとして現れ

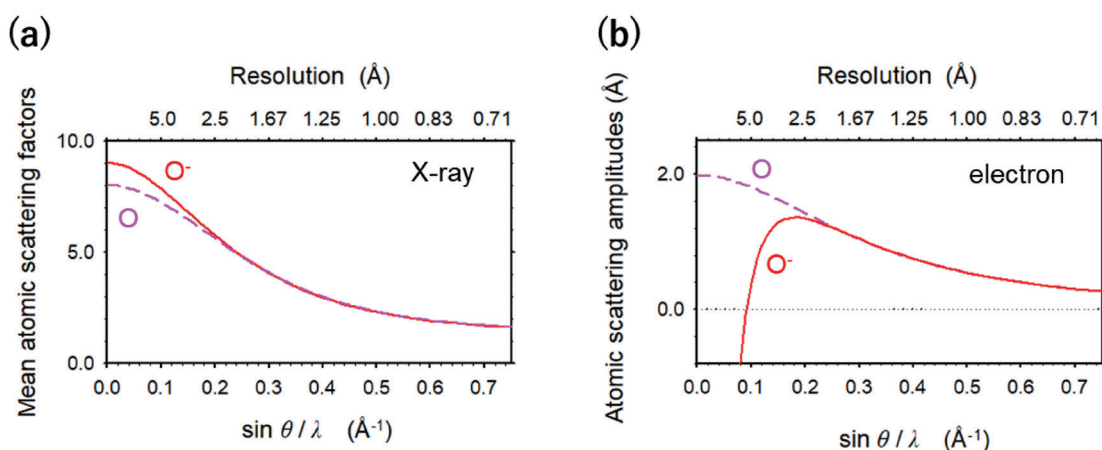


図4 X線と電子線に対する酸素原子の散乱曲線の比較

(a) X線。(b) 電子線。電子線では低分解能領域において、中性の酸素原子(O)と酸素イオン(O⁻)の散乱の差は大きく異なり、負電荷を持つと減少する。一方、高分解能領域では両者はほぼ等しい

れ、電子線に比べその差は小さい(図4)。したがって、試料の荷電状態をより高い感度で反映し、その影響を比較的 low resolution の構造からでも計測できる可能性がある¹⁰⁻¹³⁾。中性 pH で、アスパラギン酸とグルタミン酸は側鎖のカルボキシ基から水素原子が脱離することで負の部分電荷を持つ。高分解能の構造成分(分解能 3.0~1.19 Å もしくは 2.5~1.19 Å)を除き低分解能成分(分解能 100~3.0 Å)の構造因子だけを用いて計算した差マップには、アスパラギン酸とグルタミン酸の側鎖に負の差が現れることが分かった(図5の赤い網目)⁶⁾。実際、中性の原子と電荷を持った原子とでは、電子線の原子散乱因子が低分解能領域で大きく異なり、負電荷を持つと急激に減少する(図4b)。そのため、実験データから中性の原子を仮定したモデルの構造因子を差し引いた差マップでは負の差が現れると考えられる。

一方、電子線照射により試料が損傷を受け構造が消失した場合も負の差となる。特にアスパラギン酸とグルタミン酸の側鎖は、X線や電子線の照射に弱いことが知られる¹⁴⁾。そこで、実験データの低分解能域(分解能 100~3.0 Å)の構造因子を除いたところ、負の差はほぼ消失した(図5の分解能 2.5~1.19 Åの構造)。このことは、中性の原子と電荷を持った原子の散乱カーブが高分解能領域ではほぼ等しくなることと一致する(図4b)。詳細な構造(高分解能成分)は電子線照射損傷をより受けやすいため、負の差が試料の損傷によるものであれば高分解能成分から計算した差マップに負の差が現れるであろう。しかし、図5aのグルタミン酸の観察では、反

対に負の差が消失したことから、観測された負の差は負の電荷を表す可能性が高い。

クライオ EM 像は、1つの視野に対して非常に短い間隔で連続的に画像を取り込む。前記の電荷の観察結果を更に補強するため、電子線照射量が少ない撮影前半のデータのみを使って差マップを計算したところ、電子線照射損傷が増える後半のデータを含んだ場合と、負の差の現れ方にほとんど変化がないことが分かった⁶⁾。また、負の電荷を与えたモデルにおけるシミュレーション結果とも一致した⁶⁾。

以上から、アスパラギン酸とグルタミン酸の側鎖における負電荷の観測が補強された。

更に、今回の実験データが水素原子と共有結合相手の原子との距離が結合の極性によって異なることを計測できる精度を持つことも示した⁶⁾。その解説は専門性が高く、かつ誌面も限られているため、別の機会に譲りたい。

5 おわりに

紹介した研究は、他の計測手法を用いても測定が難しかった水素原子、電荷、化学結合の極性さえも、単粒子解析により取得できる可能性を示している。これにより、試料の化学的性質・機能の理解を深めることが期待できる。本論文の発表は2023年5月の終わりとなったが、主要な内容は2021年の暮れにはプレプリントサーバーに投稿していた。査読に長い時間がかかってしまったが、新しい主張が理解されるのに時間と労力がかかることはよく経験され

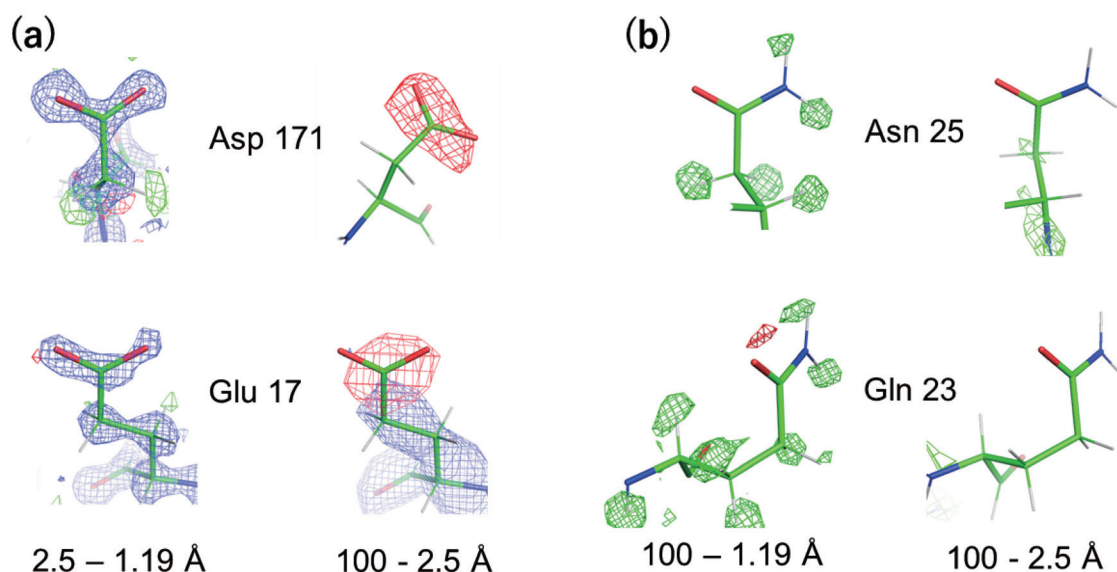


図5 タンパク質中の負電荷の観測と検証

(a) アスパラギン酸とグルタミン酸の高分解能領域 2.5~1.19 Å と低分解能領域 100~2.5 Å のデータを使用して計算した構造。2.5~1.19 Å とグルタミン酸の 100~2.5 Å の表示は、実験構造（青：密度表示レベルで 2σ ）と差マップ（緑と赤）を重ねた。(b) アスパラギン酸とグルタミンの 100~1.19 Å と 100~2.5 Å 分解能のデータを使用した重み付け差マップ。(a) と (b) の緑と赤は、 -4σ と 4σ にそれぞれ対応する。低分解能側の試料損傷は小さいにもかかわらず、Glu 17 の青い網目は消失し、負の差が現れるのが分かる。文献 6) より改変

ることでもある。

今回の測定は、自動撮影時に視野合わせの失敗が頻発する問題を解決する AI 技術開発にもつながった¹⁵⁾。解析では、電荷の同定や測定長の誤差の計算に、新しいアイデアを導入した⁶⁾。今後もより詳細な測定・分析の技術開発を進めていきたい。

謝辞

本研究に協力いただいた理研の生体機構研究グループの当時のメンバー、日本電子(株)のクライオ EM 開発メンバーの皆様に、この場を借りて感謝申し上げます。本研究は、科学技術振興機構 (JST) 未来社会創造事業探索加速型「微小結晶構造の自動・高精度電子線解析 (JPMJMI20G5)」, 日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (BINDS) 「高分解能単粒子解析, 電子線結晶構造解析及び AI 測定の高度化と支援 (JP22ama121006)」等の助成を受けて行われました。

参考文献

- 1) Hamaguchi, T., *et al.*, *J. Struct. Biol.*, **207**, 40-48 (2019)
- 2) Maki-Yonekura, S., *et al.*, *Microscopy*, **70**, 232-240 (2021)
- 3) Yip, K. M., *et al.*, *Nature*, **587**, 157-161 (2020)
- 4) Nakane, T., *et al.*, *Nature*, **587**, 152-156 (2020)
- 5) Yamashita, K., *et al.*, *Acta Cryst. D*, **77**, 1282-1291 (2021)
- 6) Maki-Yonekura, S., *et al.*, *Commun. Chem.*, **6**, 98 (2023)
- 7) 米倉功治, 他, *化学*, **78**, 39-43 (2023)
- 8) 米倉功治, *顕微鏡*, **54**, 91-97 (2019)
- 9) Zivanov, J., *et al.*, *eLife*, **7**, e42166 (2018)
- 10) Yonekura, K., *et al.*, *IUCrJ*, **5**, 348-353 (2018)
- 11) Yonekura, K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 3368-3373 (2015)
- 12) Yonekura, K., *et al.*, *J. Appl. Cryst.*, **49**, 1517-1523 (2016)
- 13) Takaba, K., *et al.*, *Nat. Chem.*, **15**, 491-497 (2023)
- 14) Fioravanti, E., *et al.*, *J. Synchrotron Radiat.*, **14**, 84-91 (2007)
- 15) Yonekura, K., *et al.*, *Commun. Biol.*, **4**, 1044 (2021)

(*¹ 理化学研究所 放射光科学研究センター, *² 東北大学 多元物質科学研究所)