

結合の直接測定はルーチン化され、得られる水素結合の情報、分子認識に基づく構造生物学研究に貢献するであろう。

文 献

- 1) Niimura, N.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 602 (1999).
- 2) Longhi, S. *et al*: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 730 (1998).
- 3) Dingley, A. J. and Grzesiek, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8293 (1998).
- 4) Cavanagh, J. *et al*: *Protein NMR Spectroscopy*, Academic Press, San Diego (1996).
- 5) Pervushin, K. *et al*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14147 (1998).
- 6) Cordier, F. and Grzesiek, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1601 (1999).
- 7) Cornilescu, G. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2949 (1999).
- 8) Cordier, F. *et al*: *J. Magn. Reson.*, **140**, 510 (1999).
- 9) Meissner, A. and Sørensen, O.: *J. Magn. Reson.*, **143**, 431 (2000).
- 10) Cornilescu, G. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6275 (1999).
- 11) Mishima, M. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5883 (2000).
- 12) Tong, L. *et al*: *J. Mol. Biol.*, **217**, 503 (1991).
- 13) Milburn, M. V. *et al*: *Science*, **247**, 939 (1990).
- 14) Pervushin, K. *et al*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366 (1997).
- 15) Lohr, F. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9289 (2000).
- 16) Czernek, J. and Brusweiler, R.: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11079 (2001).
- 17) Del Bene, J.E. *et al*: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6393 (2002).
- 18) Medek, A. *et al*: *J. Biomol. NMR*, **18**, 229 (2000).
- 19) Wang, Y. *et al*: *J. Biomol. NMR*, **14**, 181 (1999).
- 20) Grzesiek, G. *et al*: *Methods in Enzymology*, **338**, 111 (2001).

低温電子顕微鏡法によるタンパク質の構造解析

米倉 功治

タンパク質の立体構造の解析にはX線結晶回折法や核磁気共鳴 (NMR) 法が広く用いられている。前者は小さくともサブミリメートル以上の大きさの良質な結晶が必要であり、後者は解析できるタンパク質の分子量が通常数万以下に限られる。一方、電子顕微鏡法ではタンパク質一分子の解像をすることができ、試料の形態、分子量による制限は緩い。生体には非常に大きなタンパク質複合体を形成し機能しているものや、膜タンパク質のように良質な結晶作成の困難なものが多い。細菌の遊泳のための回転モーターであるべん毛は、約25種類のタンパク質からなる超分子複合体である。それは、細胞の外膜と内膜を貫く基部体、トルク生成に関わるイオンチャネルや、細胞外には10 μm 以上に達するべん毛繊維、べん毛繊維先端のキャップタンパク質などから構成される。^{1,2)} このような超分子複合体の構造の解明には電子顕微鏡法が適しており、また必須でもある。本稿ではバクテリアべん毛を例として、低温電子顕微鏡法によるタンパク質の構造解析について概説する。

特 徴

電子顕微鏡によるタンパク質の観察に従来から行われてきた負染色法では、試料をウランやタングステンなどの重金属塩で染色し乾燥させるので、染色むらや試料の変性は避けられなかった (図 1b)。一方、低温電子顕微鏡法では、試料溶液を試料グリッドに乗せ余分な溶液を

吸いとり、液体エタンや液体プロパン中で急速凍結した後 (氷包埋法)、そのまま低温に保ち電子顕微鏡内に移すことで、非染色の水和した状態という生理的な環境で試料を観察することができる (図 1c)。^{3,4)} 低温にすることによって電子線による試料損傷を大幅に低減できるが (室温での観察に比べ液体窒素温度で 1/10, 液体ヘリウム温度で 1/20)、それでもまだ試料損傷は深刻な問題で、分解能を制限する主因である。電子線照射により試料は質量欠損を起こすと共に、ラジカルを生成する。生成し

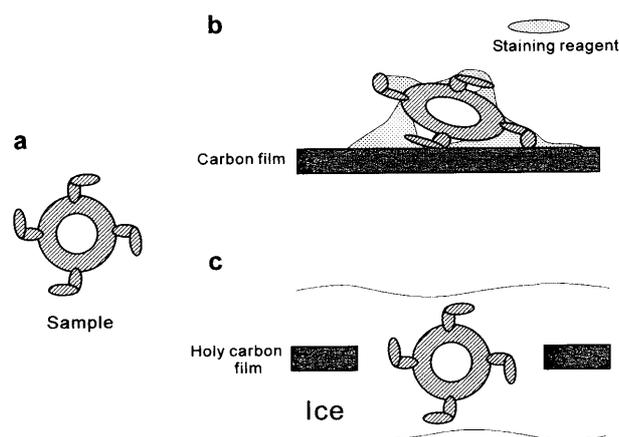


図1. 負染色法と氷包埋法での試料の状態の比較. a: 生理的環境下でのタンパク質試料. b: 負染色法. c: 氷包埋法. 負染色法では、試料を重金属塩で染色し乾燥させるので、染色むらや変性が起こる。一方、氷包埋法では水溶液中の生理的な環境下で試料を観察することができる。

著者紹介 大阪大学大学院生命機能研究科 (助手), 科学技術振興事業団 ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト
〒619-0237 京都府相楽郡精華町光台3-4 松下電器産業㈱先端技術研究所内
TEL. 0774-98-2543 FAX. 0774-98-2575 E-mail: yone@fbs.osaka-u.ac.jp

たラジカルは周囲の原子の結合を次々に破壊して、最後には蒸発してしまう。したがって許される照射電子線量はごく限られ、二次構造の解像の目安である 10 \AA より高い分解能での構造解析のためには、 $10\text{-}20 \text{ electrons / \AA}^2$ 以下にしなければならない。電子線照射量の制限に加え、像のコントラストは試料と氷（糖やタンニン酸に包埋する場合もある）との電子散乱断面積の差によるので小さく、非常に S/N が悪い。そのため、多くの像を平均することにより三次元構造の解析が行われている。

現在までに二次元結晶で原子モデルの構築が可能な 3 \AA 分解能、らせん対称性を利用できる試料で二次構造の解像可能な $4.6\text{-}10 \text{ \AA}$ 分解能で構造解析がなされている。また、結晶性のない試料からの単粒子解析法では正二十面体対称性を利用した球状ウイルスの解析で $7\text{-}9 \text{ \AA}$ 分解能が達成されている他、対称性のない試料でも 20 \AA よりよい分解能での構造解析は普通に行われるようになってきている。得られた構造は分解能に応じた利用がなされる。分解能が $20\text{-}30 \text{ \AA}$ 程度の場合、タンパク質のドメインやサブユニットの形状、位置を知ることができる。電子顕微鏡法で解析した分子複合体と X 線結晶回折法などで得られた構成タンパク質の原子モデルとを相補的に利用した解析も行われている。 $10\text{-}7 \text{ \AA}$ 分解能では α -ヘリックスが棒状に解像でき、膜タンパク質の膜貫通ヘリックスの配置などが明らかにされてきた。

結像原理

タンパク質の構造解析に通常用いられる加速電圧 $100\text{-}300 \text{ kV}$ の電子線に対する軽い原子の散乱断面積は、波長 1 \AA 程度の X 線に対するものに比較し十数万倍も大きい⁵⁾ため、電子線は試料と強く相互作用する。また荷電粒子であるため、電磁レンズを用いることで試料の実像を得ることができる。以上の特性が、電子顕微鏡ではタンパク質一分子の解像をすることができる理由である。反対に、大きな散乱断面積は使用できる試料の厚みを制限する。通常、 1000 \AA を超える厚さの試料を扱うことはできない。X 線による構造解析が原子の電子密度を反映するのに対して、電子線では原子のクーロンポテンシャルが反映される。したがって原子の核構造の影響が顕著に現れ、X 線のような明瞭な原子番号依存性は観察されない。また、透過型電子顕微鏡では、電子線の透過力が強くほとんど軸上の電子線のみを使うため、焦点深度が深く焦点を変えても三次元構造の異なった断面を解像することはできない。対象が十分に薄い場合、電子顕微鏡像は対象の投影像となる。

タンパク質の氷包埋像は、試料との相互作用で位相を変えられた電子とそのまま透過した電子が干渉してできる位相コントラストにより、主に形成される。電子線のみかけの吸収に起因する振幅コントラストの寄与は非常に少なく、全コントラストの数%に過ぎない。電子顕微鏡像の周波数特性（コントラスト伝達関数、CTF）は一律でない。得られる像は CTF により歪められ、対象のエッジ部分が強調され周囲にコントラストの反転した縁取りが現れる（図 2a）。図 3 に CTF の理論上の概形を示す。CTF は焦点のずれの関数で基本的に \sin 型をしており、絶対値の大きなところでは対応する周波数成分が強調され、ゼロ点付近では失われる。焦点が合っていると低周波数（低分解能）領域の CTF の値がゼロに近くなるため、コントラストは非常に悪く何も写っていないように見える。そのため、通常大きく焦点をずらして（1

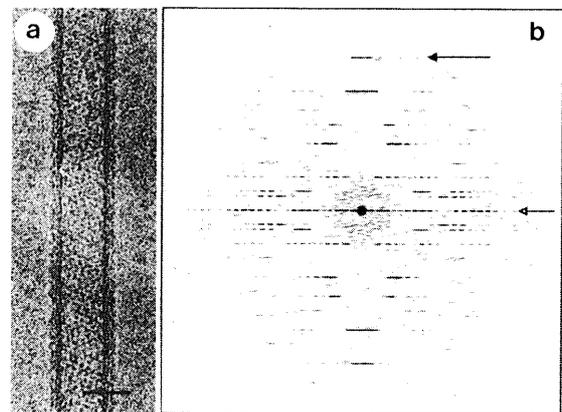


図 2. 筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase のチューブ状結晶の氷包埋像 (a) とフーリエ変換像 (b)。²⁾ 黒い部位のほうが、密度が高い。チューブのエッジに沿って白い縁取りが現れていることに注意。a のスケールバーは 500 \AA 。b の下の矢印は赤道線、上の矢印は子午線上で 26.4 \AA 分解能に相当する層線を示す。

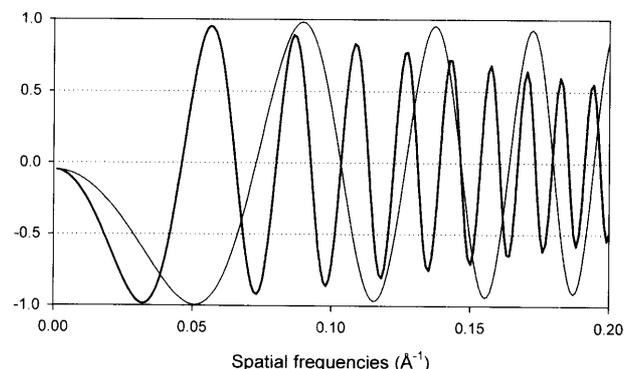


図 3. 電子顕微鏡のコントラスト伝達関数 (CTF) の概形。細い線： $10,000 \text{ \AA}$ 不足焦点。太い線： $25,000 \text{ \AA}$ 不足焦点。焦点のずれの大きいほど低分解能側で絶対値が大きくなるが、高分解能側で振動と減衰が激しくなる。

万~2万 Å程度)像を撮影する必要がある。また、CTFが正の値を持つ周波数帯では、位相が反転してしまう(写真の白黒が反転してしまう)ため、画像解析による補正が必須になる。焦点のずれを大きくすると高周波数(高分解能)領域での振動が激しくなるだけでなく振幅の減衰が顕著になる。この減衰は電子線の可干渉性に大きく依存する。電界放射型の電子銃では電子線の干渉性が良くCTFの減衰が小さいため、高分解能の構造解析に威力を発揮する。

タンパク質を構成する軽原子と電子線の相互作用では、試料と相互作用しエネルギーを多少失った非弾性散乱電子の方が弾性散乱されるものより多い。高分解能の構造情報を持つのは後者のみであり、前者は試料を破壊し結像時にノイズとなる。電子線プリズムであるエネルギーフィルターを用いることで非弾性散乱電子を効率よく除き、像のS/Nを大幅に改善できる。低温電子顕微鏡法と組み合わせた構造解析例はまだ少なく、今後の進展が期待される。

解 析

電子顕微鏡像を投影像とみなせる薄い試料では、コンピュータトモグラフィと同様にいろいろな方向からの投影像の組から、三次元構造を再構成することができる。対象が結晶性を持つ場合、フーリエ空間では対象を表現する波が限定され、規則的な点や線などの離散的な信号になるので、それ以外の大部分をノイズとして除くことができる(フーリエフィルタリング)。この場合、対象のある方向への投影像をフーリエ変換したものは、対象の三次元フーリエ変換像の原点を通る一断面になるという中央断面定理を用いて、フーリエ空間を埋めるように試料の電子線に対する傾斜を変えた像を集める。

分子が平面的に一層に並んでいる二次元結晶の場合、像のフーリエ変換像は結晶面に垂直な格子線になる。試料を傾斜させて格子線上各点のデータを集め、三次元構造を得ることができる。⁴⁾ 高度好塩菌の紫膜,⁶⁾ 高等植物のクロフィルタンパク質複合体,⁷⁾ 赤血球の水チャネル⁸⁾などの膜タンパク質はその理想的な例である。これらの二次元結晶は1 μm以上の大きさになるものもあり、電子線回折を行うことができる。この場合、少ない電子線量で広範囲の領域を照射することにより、高分解能の回折点を抽出することができる。回折像はCTFの影響を受けない散乱強度、すなわち構造振幅を与えるので、電子線回折から得た強度と実像から得た位相を組み合わせることにより、原子モデルの構築の可能な3-3.8 Å

の分解能の構造解析が上記タンパク質でなされている。一番の問題は、電子顕微鏡内での傾斜角の制限のため、高傾斜のデータを集めることができないことである。一般的に±60°傾斜までのデータが使われるが、データを集められない領域が円錐状に残ってしまう(missing cone)。結果として結晶面に垂直な方向の分解能は悪くなる。

筋肉のアクチン繊維,⁹⁾ バクテリアのべん毛繊維,¹⁰⁾ タバコモザイクウィルス¹¹⁾などの繊維状の分子集合体や、アセチルコリンレセプター,¹²⁾ Ca²⁺-ATPase¹³⁾などの膜タンパク質のチューブ状結晶では、分子がらせん状に配置している(図2a)。繰り返して、らせん軸に沿った方向のみで一次元結晶と考えることができ、そのフーリエ変換像は赤道線に平行にX字型に並んだ線(層線)の集合になる(図2b)。一枚の画像にいろいろな方向を向いた分子が写っているため、理論上は一枚の電子顕微鏡像からでも三次元構造を得ることができる。¹⁴⁾ 実際には、特に試料の歪みの影響を受けやすい、赤道線に平行な方向で高分解能領域のフーリエ成分は、急激に減衰してしまう。したがって構造解析の分解能と信頼性を上げるためには、多くの像の平均が必須になる。最近筆者らは、バクテリアべん毛繊維をこの手法により約4 Å分解能で構造解析し、得られた構造から原子モデルの構築を行うことができた(未発表)。

単粒子解析法は近年急速に発展している手法で、分散した分子のいろいろな向きの投影像を集めて、それらの向きを決定し三次元再構成を行うというものである。その実際は文献15)に詳しい。最大の長所は試料の結晶化の必要がないということである。また、結晶に縛られない、より自然な構造を解析できる可能性がある。いかに正確に投影像の向きを決めることができるかが、この方法の正否を左右する。分子が電子線に対して決まった方向を向けて分散する傾向がある場合はランダムコンカルティルト法、分子がいろいろな方向を向けて観察される場合はcommon line search法(angular reconstitution法ともいう)が、方向決定に用いられる。三次元再構成は、周波数ごとに重みをつけ投影空間から実空間に逆投影して行う(back projection法)。得られた初期構造をいろいろな方向に再投影し、個々の像との相関から方向を最適化し、構造を精密化する。氷法埋像の単粒子解析には解析できる分子の大きさに下限があり、通常数十万以上のものにしか適用できない。これは、低いコントラストのため小さな分子の解像が困難になるからで、逆に分子量が大きく分子内の対称性が高い試料では、解析が容易になる。

構造解析ソフトウェアはイギリスのMRCのグループによって開発されたパッケージが標準である.¹⁶⁾ 同パッケージには二次元結晶構造解析の他に、らせん対称性を利用した再構成、および単粒子解析を行うプログラムも含まれるが、完全なセットが含まれているとは言い難い。そのため、筆者も含め、いろいろな研究室で解析プログラムの開発がなされている。他に主に単粒子解析を行うものとして、SPIDER/WEB (http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/spider.html), IMAGIC (<http://www.imagescience.de/>)などがある。フリーのパッケージでGUIが整備されたEMAN (<http://ncmi.bcm.tmc.edu/homes/stevel/EMAN/doc/>)もよく使用されている(主なパッケージについては文献17), <http://3dem.sdsc.edu/>などを参照)。

解析の実例、バクテリアべん毛繊維とそのキャップの複合体の構造解析

実例として、バクテリアべん毛とその先端に結合したキャップタンパク質複合体の構造解析結果を示す(図4).¹⁸⁾ 細菌のべん毛繊維は、構成分子であるフラジェリンがべん毛中央の細いチャンネルを通して細胞内から先端へ運ばれ、先端部に次々に結合することで伸張する。そこにはキャップタンパク質、HAP2 (hook associated protein 2) が結合している。HAP2の欠損株では輸送されたフラジェリン分子は先端から溶液中に放出され、べん毛の成長は起こらない。このべん毛繊維とキャップの複合体は均一な試料を調整することが困難であり、結晶化の不可能な試料である。そのため、電子顕微鏡での単粒子解析法が三次元構造解析の唯一の手法であった。

二次元平面内での像平均操作の工夫と、電子線に対する像の投影方向の決定にべん毛繊維のらせん対称性を利用することにより、¹⁹⁾ 比較的少数の像から三次元構造を得ることができた。¹⁸⁾ べん毛繊維部の規則的な突起状構造などが、らせん再構成により得られたもの¹⁰⁾と等しいことから、この解析の信頼性を確認できる。分解能は高くないが(約27 Å), HAP2キャップの五角形プレート状構造と、運ばれてきたフラジェリン分子の結合部位と思われるギャップ(図4d1)などを解像することができた。また、キャップのプレート状構造の直下にある空間(図4c)が、ある程度ほどけた状態で直径約30 Åの細い中央チャンネルを通して運ばれてきたフラジェリン分子の巻き戻りを助ける、フォールディングチャンバーとして機能していることも示唆された。図4eは、溶液中で形成されるHAP2キャップの5量体が対になった10量体構造であ

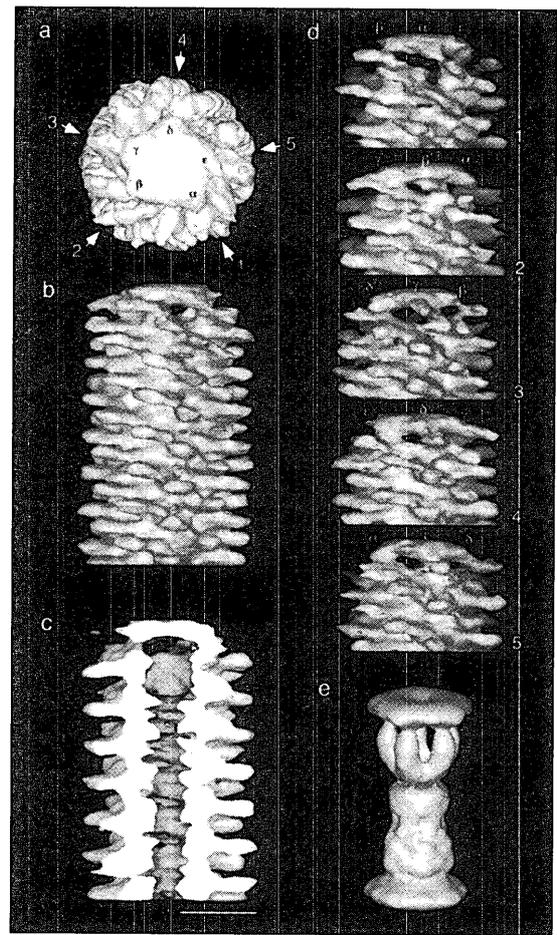


図4. バクテリアべん毛繊維とそのキャップ複合体の構造.¹⁸⁾ a: 繊維軸方向からの見た構造. b: 繊維軸に垂直な方向から見た構造. c: 軸に沿った断面図. d: aに示した5つの方向から見た構造. 1の方向にのみ見える大きなギャップが、次に輸送されてくるフラジェリン分子の結合部位と考えられる. e: 溶液中で形成されるHAP2キャップの5量体が対になった10量体構造。

る。べん毛繊維先端には、プレート状ドメインと5本の足状のドメインから構成される5量体が結合する。以上の解析結果に基づいて、キャップの足状ドメインが柔軟に動きべん毛繊維先端のらせん階段を上るように結合解離を繰り返す、結果としてキャップ全体が回転していくことで、フラジェリンの結合が促進されべん毛成長が効率よく進むという、自己構築機構のモデルを提出することができた(図5).¹⁸⁾

終わりに

低温電子顕微鏡法は、現在もまだ発展途上の部分も多く、得られる構造の分解能は通常高くない。国内では筆者らも含め数カ所の研究グループで行われているに過ぎない。一方、海外では多くの研究機関で行われており、その生命科学に対する重要性の認識は急速に高くなって

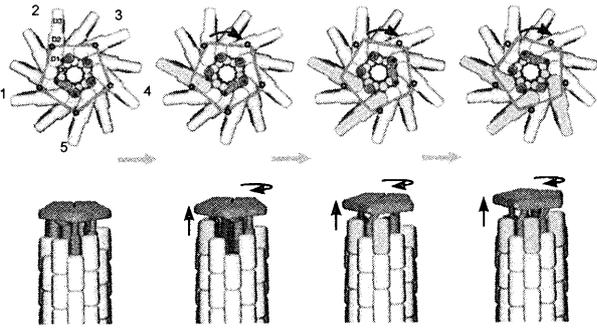


図5. キャップの回転によるべん毛繊維の伸張促進モデル¹⁸⁾ フラジェリンは繊維内側から D0,D1,D2,D3 の四つのドメインに分けられる¹⁰⁾ 下図では HAP2 の足状ドメインと繊維との結合が見やすいようフラジェリンの外側ドメイン (D2,D3) を省略してある。

いる。上述したように他の解析手法に比べ試料形態の制限が緩く、超分子複合体にとってその自然な動作環境での構造を解析することができる。生体内には、タンパク質間の複雑な相互作用により機能している例は多い。また、急速凍結により反応中間体を捕らえることも可能となる²⁰⁾ X線結晶回折法、NMR法と並ぶ構造解析手法として、今後さらに発展していくことが期待される。

バクテリアべん毛繊維とそのキャップタンパク質の複合体の構造解析は、科学技術振興事業団 ERATO プロトニックナノマシンプロジェクトにおいて、主に眞木さおり研究員（現科学技術

振興事業団 ICORP 超分子ナノマシンプロジェクト研究員）、難波啓一プロジェクトディレクター（現大阪大学教授）らと共に行ったもので、本稿の校正にも力を貸していただきました。ここに感謝致します。

文 献

- 1) 難波啓一ら：細胞工学, **20**, 1371 (2001).
- 2) Yonekura, K. *et al.*: *Res. Microbiol.*, **153**, 191 (2002).
- 3) 豊島 近：実験医学, **8**, 433 (1990).
- 4) 藤吉好則, 光岡 薫：細胞工学, **16**, 1677 (1997).
- 5) Henderson, R.: *Q. Rev. Biophys.*, **28**, 171 (1995).
- 6) Henderson, R. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **213**, 899 (1990).
- 7) Kühlbrandt, W. *et al.*: *Nature*, **367**, 614 (1994).
- 8) Murata, K. *et al.*: *Nature*, **407**, 599 (2000).
- 9) 若林健之：蛋白質核酸酵素, **47**, 553 (2002).
- 10) Mimori, Y. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **249**, 69 (1995).
- 11) Jeng, T.-W. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **205**, 251 (1989).
- 12) Miyazawa, A. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **288**, 765 (1999).
- 13) Zhang, P. *et al.*: *Nature*, **392**, 835 (1998).
- 14) 米倉功治, 豊島 近：細胞工学, **16**, 1839 (1997).
- 15) Frank, J.: *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies*, Academic Press (1996).
- 16) Crowther, R. A. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **116**, 9 (1996).
- 17) Carragher, B. and Smith, P. R.: *J. Struct. Biol.*, **116**, 2 (1996).
- 18) Yonekura, K. *et al.*: *Science*, **290**, 2148 (2000).
- 19) Yonekura, K. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **133**, 246 (2001).
- 20) Unwin, N.: *Nature*, **373**, 37 (1995).
- 21) Yonekura, K. *et al.*: *Biophys. J.*, **72**, 997 (1997).

リボソーム再生因子 (RRF) の構造と機能

吉田 卓也

リボソームは遺伝情報をタンパク質へ変換するという生命の基本的な活動の中心である。原核生物の場合、リボソームは50S, 30Sの大小2つのサブユニットからなり、ペプチド結合形成の触媒は50Sサブユニットが担い、mRNAの遺伝情報の解読は主に30Sサブユニットが担っている。リボソーム上での一連のタンパク質合成過程(翻訳過程)は、開始、伸長、終止、そしてリボソーム再生の4つの段階から構成されている。近年、リボソームのX線結晶構造が相次いで報告され、原子レベルでのタンパク質翻訳系の研究が飛躍的に発展しつつある。また、各種の翻訳因子やtRNAとリボソームとの相互作用についても生化学的、および構造生物学的見地からの研究が盛んに行われている。本稿ではリボソーム再生過程において中心的な役割を果たすリボソーム再生因子 (ribosome recycling factor; RRF) の構造生物学について我々

の研究成果を交えながら最近の知見について紹介したい。

RRFとは

図1は原核生物のタンパク質合成過程を模式的に示したものである。タンパク質合成の終止段階 (termination step) では、終結因子 (RF1 or RF2) が終止コドンを認識してアミノアシル tRNA の代わりにリボソームのA部位に結合し、完成したポリペプチド鎖をペプチジル tRNA から切り離す。その後終結因子 RF3 によって RF1/RF2 が脱離するが、後には、リボソーム、mRNA、および脱アシル化 tRNA からなる複合体 (post termination complex; PTC) が残される。効率の良いタンパク質合成のためには、PTCを迅速にその構成要素に分解する必要がある。RRFは伸長因子 EF-G と共同して作用し、PTCを分