

化学 别刷

C H E M I S T R Y

電子顕微鏡で見る巨大分子複合体の構造

Uchiyama Susumu Fukui Kiichi
内山 進・福井 希一

Keyword

クライオ電子顕微鏡法(cryo-electron microscopy), 生体高分子(biopolymer), 構造解析(structural analysis), 可視化(visualization)

タンパク質分子は、生体内で他のタンパク質や核酸、糖などの分子と動的に相互作用し、複合体を形成することによって、さまざまな機能を発揮する。したがって、タンパク質の機能を理解するためには分子レベルでの構造解析が必須であり、とくに複合体の構造解析が不可欠である。近年、生体高分子の立体構造がX線結晶解析や核磁気共鳴(NMR)法によって次々と明らかにされており、従来では困難と考えられていたリボソームやカルシウムポンプなどの巨大分子複合体の構造も解明されるに至った。X線結晶解析は1~2Åという高い分解能で構造が決定でき、NMR法は溶液中での分子の運動性や相互作用部位の特定に有力な方法である。しかしながら、NMR法の場合は30kDaより分子量が大きい分子の解析が難しく、X線結晶解析の場合には試料の結晶化が前提となる。また、生体高分子複合体では、反応中間体など、いくつかの異なった相互作用状態の複合体が同時に存在することもあるので、複合体のまま結晶化するには、さまざまな条件検討が必要になる。

ここで最近注目を集めているのが、電子顕微鏡を用いた構造解析法である。電子顕微鏡は、生物試料を光学顕微鏡より高い分解能で観察するために古くから用いられてきたものであり、透過型電子顕微鏡(TEM)と走査型電子顕微鏡(SEM)がある。TEMの原理は光学顕微鏡と同じで、試料を透過する電子を結像させて明視野像を得るものであり、おもに分子の内部構造を観察するために用いられる。一方、SEMは試料表面に電子ビームを照射して、その結果発生した二次電子などを検出することで表面構造の像を得る。いずれの分野においても同様であるが、近年、電子顕微鏡を用いた研究も、装置や解析ソフトウェアの進歩、さらには試料作成方法の急激な進展により大きく発展している。とくに極低温で測定を行う“クライオ電子顕微鏡法(低温電子顕微鏡法)”は、生体高分子の構造解析にきわめて有効な手段であり、この手法を用いることにより生体高分子複合体の構造や機能発現にかかわる構造的メカニズムを分子レベルで迅速に明らかにすることも可能となってきた¹⁾。

クライオ電子顕微鏡法

クライオ電子顕微鏡法の長所は、(1)極低温(4~40K付近)で試料観察を行うため試料に与えるダメージが少ない、(2)試料溶液中の水分子のガラス化(vitrification)により水和水をまとったままの状態で作成でき、通常の乾燥あるいは蒸着した試料と比べて、生体高分子が溶液中に存在する状態をより反映した構造情報を得ることができる、という2点である^{1,2)}。試料のガラス化は、グリッドにのせた試料を液体エタン中に浸して行うが、試料準備条件によっては反応中間体の構造を得ることもできる²⁾。また、クライオ電子顕微鏡法により得られた像の解析方法は近年著しく発達してきており、対称性のある複合体や非対称の構造をもつ複合体の解析が行われている。とくにアクチンなど、らせん構造をもつ試料の電顕像における周期構造の解析^{3,4)}や、単粒子解析(single particle analysis)による複合体の構造解析が進められている^{5,6)}。また、二次元結晶を用いた電子線回折による構造解析も、おもに膜タンパク質について行われてきている。酵母の80Sリボソームの構造も最近解明されている^{7,8)}。

鞭毛タンパク質複合体の構造解析

クライオ電子顕微鏡法と単粒子解析により、バクテリア鞭毛タンパク質複合体の構造およびバクテリア鞭毛の伸張反応のメカニズムが同様にして解明された⁹⁾。図1には、バクテリア鞭毛先端部とキャップ構造の実際の電顕像と解明された三次元構造を示す。細菌の鞭毛フィラメントの成長は、フィラメント内部の狭い内部チューブを通して細菌の菌体から運ばれたフラジュリンが、鞭毛末端部で自己集合化して起こることが知られている。成長している鞭毛末端部にはキャップ構造があり、鞭毛の正常な成長に不可欠である。このキャップ構造は鞭毛末端に安定に位置すると同時に、鞭毛が成長するためのフラジュリンの挿入が可能になっていなければならない。この、一見相反する機構を構造的に解明するために、クライオ電子顕微鏡法を用い

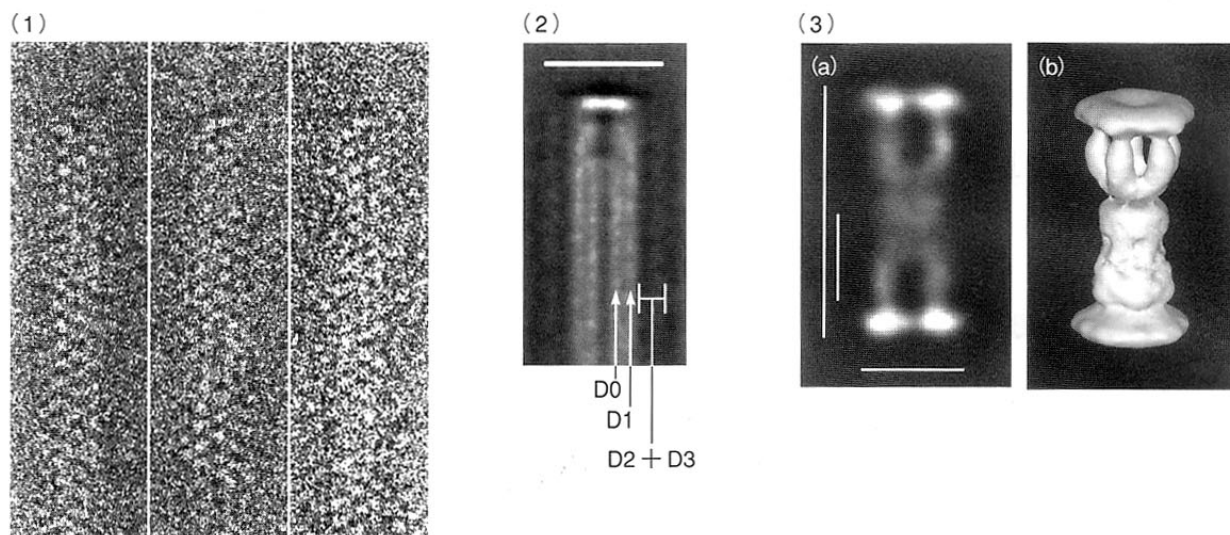


図1 (1) 鞭毛先端部のキャップ・フィラメント構造の電顕写真

(この状態では、構造はほとんどわからない)

(2) 589枚の画像から得られた平均画像

D0, D1, D2+D3はそれぞれ内部チューブ, 外部チューブ, 外部ドメイン. スケールバーは230 Å

(3) キャップ構造(5量体×2)のネガティブ染色による平均画像(a)と三次元復元像(b).

スケールバーは120 Å [K. Yonekura et al., *Science*, **290**, 2148 (2000) より引用]

てキャップとフィラメントの複合体および単離したキャップ構造が解析された。その結果、五角形のキャップの五つの足のようアンカードメインが、柔軟に構造を変化させてフラジュリンの結合部位をちょうど一つ開けており、キャップの回転がフラジュリンの自己集合化を促進していることがわかった。すなわち、589個の単粒子解析により得られた電子密度像から、キャップは五角形であるが厳密な5回対称軸をもっていないこと、キャップ下の空洞は 40×70 Åの大きさであること、さらには鞭毛の先端を五つの角度から見たとき、一つの角度から見た場合のみ 50×25 Åの逆L字型の大きな空隙があることなどが明らかになったのである。これらの結果から、フラジュリンは変性状態で鞭毛内部の輸送管を通り抜け、キャップの下部分にある空洞(シャペロン)で天然状態の構造になり、キャップが反時計回りに72度回転して4.7 Å上昇する際に、鞭毛末端の空隙で

ある結合部位にはめ込まれると考えられた。

クライオ電子顕微鏡法による構造解析は溶液状態を反映した方法であり、細胞内は溶液状態であることを考慮すると、生体高分子複合体の構造解析に非常に適した方法であるといえる。分子間の相互作用条件がわかっていれば、さまざまな条件下で試料を調整し観察することで、複合中間体をも捉えることができるであろう。さらに高分解能での分子の構造情報が必要であれば、X線結晶解析やNMR法により解明し、電子顕微鏡の電子密度図に当てはめれば得られる。ただし、クライオ電子顕微鏡法による構造決定は、構成タンパク質の物性や複合体の形成条件についての詳細なデータを得たうえで組み立てられるものだということを記憶しておく必要があるだろう。

【大阪大学大学院 工学研究科】

1) H. R. Saibil, *Acta crystallogr. D*, **56**, 1215 (2000). 2) J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Home, J. Lepault, A. W. McDowell, P. Schultz, *Quart. Rev. Biophys.*, **21**, 129 (1988). 3) A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, M. Stowell, N. Unwin, *J. Mol. Biol.*, **288**, 765 (1999). 4) L. C. Serpell, J. M. Smith, *ibid.*, **296**, 813 (2000). 5) J. Frank, "Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies," Academic Press, San Diego (1996). 6) J. Ruprecht, J. Nield, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **75**, 121 (2001). 7) R. Beckmann, C. M. Spahn, N. Eswar, J. Helmers, P. A. Penczek, A. Sali, J. Frank, G. Blobel, *Cell*, **107**, 361 (2001). 8) C. M. Spahn, R. Beckmann, N. Eswar, P. A. Penczek, A. Sali, G. Blobel, J. Frank, *ibid.*, **107**, 373 (2001). 9) K. Yonekura, S. Maki, D. G. Morgan, D. J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada, K. Namba, *Science*, **290**, 2148 (2000).