

クライオ電子トモグラフィーによる *in situ* 構造生物学

小田賢幸

山梨大学医学部解剖学講座構造生物学教室

1. 電子顕微鏡を用いた構造生物学の歴史

構造生物学とは、X線や電子線、核磁気共鳴などを用いてタンパク質の三次元構造を解析する学問である。その歴史は1958年のKendrewらによるミオグロビンのX線結晶構造¹より始まり、Klugらによる電子顕微鏡によるヒトパピローマウイルスの構造解析²、Wüthrichらによるタンパク質分解酵素阻害剤IIAのNMR構造³と続いた。しかし原子分解能に達するX線結晶解析やNMRと異なり、電子顕微鏡によって解かれた構造は辛うじてalpha-helixなどの二次構造がわかるか、あるいは丸いか伸びているか平たいかという大まかな形状しかわからないことが多く、しばしば“blob-ology”と揶揄された。この不名誉な状況を変えたのが、Direct electron detectorの開発である。従来のCCD/CMOSカメラでは、電子線をシンチレータに当て発生した光子を検出していたが、これでは光子の散乱が大きく分解能が大きく損なわれていた。そこで開発されたのがActive Pixel Sensor技術⁴で、電子線を直接CMOSセンサーで検出することにより1つの電子を1ピクセル以下の分解能で検出できるようになった。このDirect electron detectorの開発は驚異的なdetective quantum efficiencyの向上をもたらし、電子線によるタンパク質構造解析を飛躍的に発展させた。特に、電子線の照射によるタンパク質分子の位置のブレをframe毎にトラックすることで補正できるようになったことで分解能はさらに向上した⁵。このような“Resolution Revolution”と呼ばれる技術革新⁶は、2017年のノーベル化学賞にクライオ電子顕微鏡技術を開発した3名の研究者が選ばれることで世界的に注目されることとなり、構造生物学はトップジャーナルの常連となるほど生物学において大きな存在感を獲得した。

構造生物学者は未だ興奮冷めやらぬといった雰囲気であるが、同じように構造解析に電子線を用いる材料工学の研究者と話すとき「現行のCMOSになんの問題があるのか」と議論が噛み合わないことが多い。これはタンパク質が電子線損傷に極めて弱いことに起因する。タンパク質の電子顕微鏡観察は液体窒素温度下で行っているにも関わらず、僅か5 electron/Å²の照射でカルボキシル基が脱落しジスルフィド結合の解離が生じる⁷。従って構造生物学においては材料工学で用

¹ Kendrew JC et al A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis Nature 181: 662-6. 1958.

² Crowther RA et al Three Dimensional Reconstructions of Spherical Viruses by Fourier Synthesis from Electron Micrographs Nature 226: 421-425. 1970.

³ Williamson MP et al Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by 1H nuclear magnetic resonance and distance geometry. J. Mol. Biol. 182: 295-315. 1985.

⁴ Milazzo AC et al Active pixel sensor array as a detector for electron microscopy. Ultramicroscopy 104: 152-9. 2005.

⁵ Lin X et al Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. Nature Methods 10: 584-590. 2013

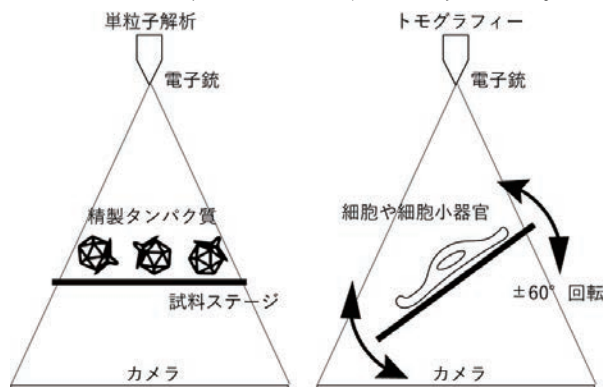
⁶ Kühlbrandt W. The resolution revolution. Science 343: 1443-1444. 2014.

⁷ Hatte J et al Analysis of Global and Site-Specific Radiation Damage in Cryo-EM. Structure 26: 759-66. 2018.

いられる線量とは桁違いに少ない電子線しか当てられない。タンパク質の原子構造は弱い電子線照射でぼんやりと見える数十万から数百万の画像を平均化することでようやく得ることができるもので、日常的にその場観察で原子を見ている材料工学とは全く世界観が異なるのである。

2. クライオ電子顕微鏡による構造解析法

上記のように、タンパク質は極めて電子線に弱く構造解析には手間がかかる。一般に用いられている電子顕微鏡用の生体試料調製は、真空下での観察と電子線損傷からの保護を目的として化学架橋剤や重金属染色、脱水と樹脂包埋といった harsh な処理が行われる。これではタンパク質の native な構造を得ることができないので、無固定・無染色・水和状態のタンパク質を電子顕微鏡で観察する方法がクライオ電子顕微鏡法である⁸。この技術は、直径約 1 μm の孔が空いたカーボン膜にタンパク質水溶液を載せ、ろ紙で液体を吸い取った後に孔に張った厚さ数十～数百 nm の水の膜を液体エタンで急速凍結することで、タンパク質分子を非晶質の氷の膜に包埋するものである。この凍結試料からタンパク質の構造を解析する方法は、単粒子解析とトモグラフィーの2つが主である(第1図)。単粒子解析は、タンパク質が氷の中で様々な方向を向いて包埋されていることを利用して、画像から各分子の投影像を切り出し、中心断面定理を用いて逆空間で三次元情報を再構築し、それを逆フーリエ変換することでタンパク質の三次元構造を得る方法である。またトモグラフィーは、一つの試料を回転し連続傾斜像を撮影することで様々な角度からの投影像を得て、それを逆投影で三次元再構築する方法である。トモグラフィーは一つの試料から三次元構造を得ることができるという利点があるが、一つの試料に 40～60 回電子線照射をする必要があるため、一つの試料に 1 回だけ照射すればよい単粒子解析と比較すると各傾斜画像の S/N 比は非常に小さくなる。また、電子線照射により試料が次第に変形すること、傾斜した氷表面の電荷により電子線が曲がること、高傾斜において試料が厚くなり非弾性散乱によるノイズが大きくなること、傾斜角度に限界があるので情報欠落が不可避であることなど不利な点が多く、単粒子解析と比べるとトモグラフィーは普及していない。しかし細胞小器官あるいは細胞そのものなどの *in situ* 構造は、大きく不均一な試料は単粒子解析を用いることができないので、トモグラフィーが必須となる。



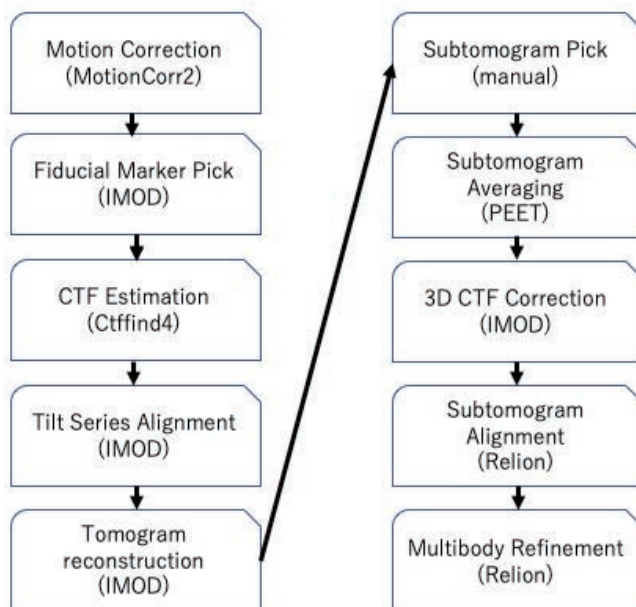
第1図: 単粒子解析とトモグラフィーの比較。Murata and Wolf より改変⁹。

⁸ Dubochet J. et al Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. J. Mol. Biol. 128: 219-237. 1982.

⁹ Murata K and Wolf M. Cryo-electron microscopy for structural analysis of dynamic

3. クライオ電子トモグラフィーの画像処理

凍結試料の連続傾斜像を1データ撮影するのに約20分ほどかかるので、電子顕微鏡の補正作業や試料位置合わせを含め1日に50データセット程度撮影することができる。これらのデータからタンパク質の三次元構造を得る工程は以下ようになる(第2図)。



第2図:クライオ電子トモグラフィーのデータ解析工程。括弧内はプログラム名。

1 データセットは通常 -60° から $+60^{\circ}$ の傾斜角を 3° 間隔で撮影された40枚の投影像(4,092 \times 5,760 pixels each)から構成され、それぞれの投影像はさらに20 framesに分割されているので1日の撮影で出力される総データ量は2.6 \times 50 GB程度になる。データ解析の最初の工程はframe間のブレ修正である(Motion Correction)⁵。連続する2つのframe間の相関を取ることでブレの方向と大きさを求め、平均することでブレ補正をするわけであるが、実際は試料の位置によってブレのベクトルは異なるため、1 frameを12箇所程度に分割し各場所におけるブレを相関から求め、spatiotemporally-smooth 2D polynomial functionとして算出する¹⁰。GPUにより高速化が可能で、1つの連続傾斜データセットを処理するのに10分程度であるから次の試料を撮影中に処理が終わる計算である。なお解像度を原子分解能まで向上させるためには12箇所程度の分割では不足しており分子単位でmotion correctionを行う必要があるが¹¹、S/N比が小さいトモグラフィーにおいては困難であり、一部のS/N比が高い試料でのみ行われているが応用範囲は狭くない¹²。次の工程は、傾斜像間の位置関係

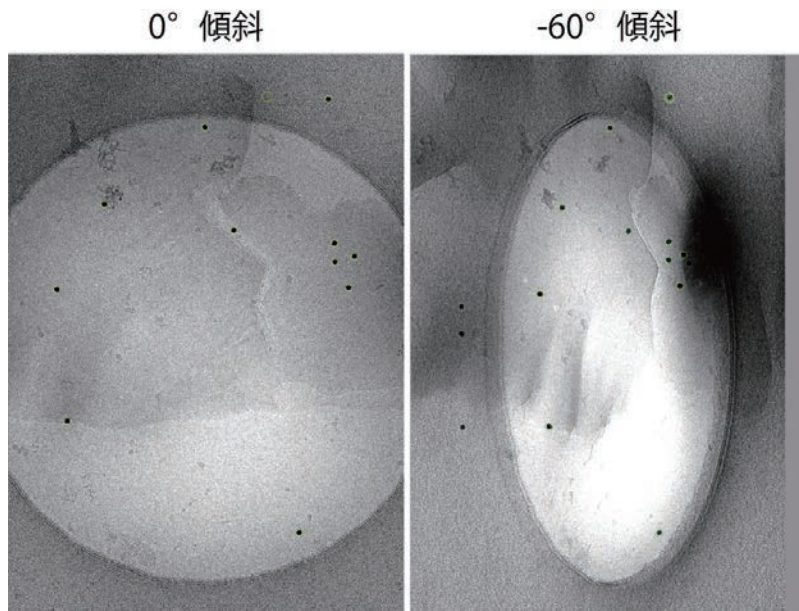
biological macromolecules. Biochem. Biophys. Acta 1862: 324-334. 2018.

¹⁰ Zheng et al MotionCor2 - anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. Nat. Methods. 14: 331-332. 2017.

¹¹ Zivanov et al A Bayesian approach to beam-induced motion correction in cryo-EM single-particle analysis. IUCrJ 6: 5-17. 2019.

¹² Tegunov et al Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-

を補正するための fiducial marker を拾う作業である。理想的には撮影している試料内の任意の構造が各傾斜像においてどこに存在するか assign すれば良いが、クライオ像はコントラストが低いので直径 5~15 nm の金コロイド粒子を試料に混ぜることで marker とする(第 3 図)。コントラストの高い金コロイド粒子の位置を傾斜像毎に assign することで連続傾斜像の中で観察対象の構造をトラックすることができる。



第 3 図:金コロイド粒子を用いた fiducial marker pick(緑丸)。

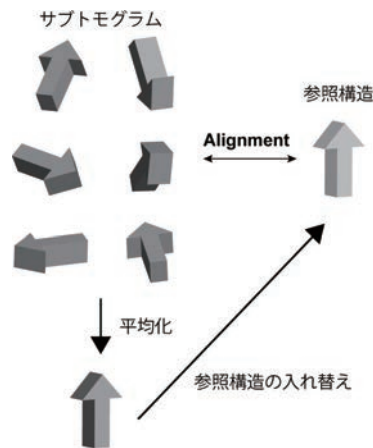
次の工程は contrast transfer function (CTF) 補正である。クライオ電子顕微鏡撮影ではぼんやりとしか見えない生体試料のコントラストを上げるために、単粒子解析においては 1~2 μm 程度、トモグラフィーにおいては 3~6 μm 程度の underfocus で撮影する。この“defocusing”により画像は逆空間においてコントラストが oscillate する位相コントラスト伝達関数 CTF によって modulate されることになる。空間周波数によってはコントラストが 0 になったり、非常に小さくなったりするので、underfocus の値を画像毎に変化させることで情報の欠落を補完することになる。またコントラストが反転している周波数領域については、正しいコントラストに反転させる必要があるので、各画像の underfocus 値を正確に求め、CTF 補正をしなくてはならない¹³。クライオ電子トモグラフィー、特に高傾斜像においてコントラストの低い画像の CTF 測定は困難であるため、単粒子解析と比較してトモグラフィーの underfocus 値は大きくせざるを得ない。最近 Volta phase plate の使用により小さな underfocus 値でも高いコントラストを得ることができるようになったが¹⁴、照射電子線量が限られるトモグラフィーでは小さな underfocus の画像から正確な推定を行うことが困難であり、高解像度情報の解析には適していない。以上の工程で連続傾斜像から三次元トモ

antibiotic complex at 3.5 Å in cells. Nat. Methods. 18: 186-193. 2021.

¹³ Zanetti G et al Contrast transfer function correction applied to cryo-electron tomography and sub-tomogram averaging. J. Struct. Biol. 168: 305-312. 2009.

¹⁴ Danev R et al Using the Volta phase plate with defocus for cryo-EM single particle analysis. eLife 6:e23006. 2017.

グラムを再構成するに必要な情報が揃ったので、逆投影による再構成を行う¹⁵。中心断面定理により、3D object の二次元投影像の 2D フーリエ変換は元の 3D object の 3D フーリエ変換の中心断面に対応するので、各傾斜像を傾斜角に合わせて逆空間に配置すればトモグラムを再構成することができる。しかし、等間隔の角度で撮影された連続傾斜像のフーリエ変換を逆空間に配置すると、空間周波数が小さい部分では情報が密になり空間周波数が大きい部分では情報が疎になるので、単純な逆投影で得られるトモグラムは低解像度情報が強調されたものになる。これを補正するため、radially weighted 逆投影を行い高解像度成分の底上げを行う。このような weighted-backprojection(WBP)が基本的なトモグラム再構成の方法であるが、再構成したトモグラムから連続投影像を作成し、元データとの差分が小さくなるように iteration を行う Simultaneous Iterative Reconstruction Technique (SIRT) という方法も存在する¹⁶。SIRT で得られるトモグラムは確かにコントラストが高くなるが、あくまで低解像度成分が補正されているだけで、高解像度情報が改善しているわけではない。時間がかかる SIRT を行うよりは、シンプルに WBP で済ませるのが実用的である。再構成されたトモグラムは高傾斜情報が欠け、S/N 比も小さいので目的の分子構造情報を得ることはできない。そこでトモグラムの一部を切り出し、そのサブトモグラムを平均化することで高解像度情報の獲得と情報欠損の埋め合わせを行う¹⁷。平均化には、サブトモグラムをオイラー角回転、XYZ 軸移動変換を行い、参照三次元構造と最も相関する変換を求め平均化、それを新たな参照構造とする、という操作を繰り返し構造を収束させる(第 4 図)。



第 4 図: サブトモグラム平均化

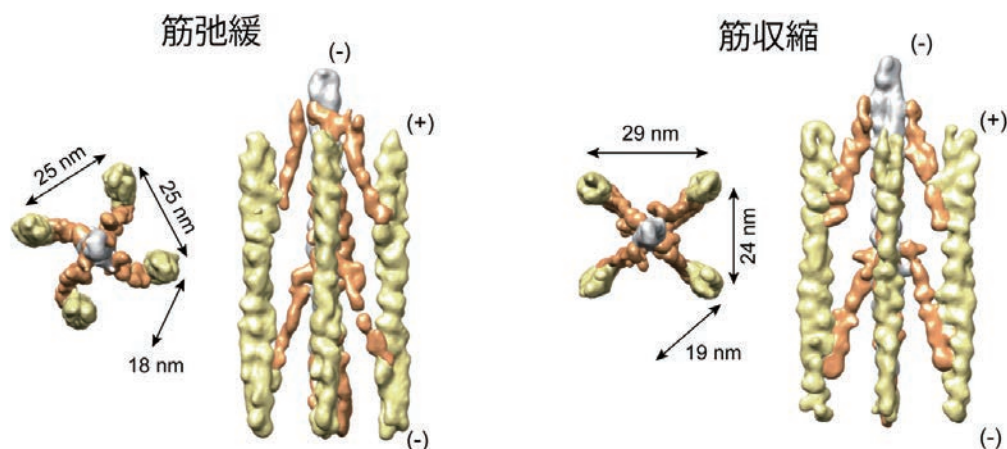
初期値の参照構造には任意のサブトモグラムを用いるか、あるいは 2^n 個 (512 か 1,024) のサブトモグラムを 2^{n-1} 対のペアに分け、各ペア間で相関を取り重ね合わせることを n 回繰り返す bias-free reference generation を行う。これで理論上構造解析は終わるはずであるが、primitive な averaging では高解像度に達することは難しい。そこで行う次の工程が 3D CTF 補正である。

¹⁵ Kremer JR et al Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. J. Struct. Biol. 116:71-76. 1996.

¹⁶ Gilbert P. Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections. J. Theor. Biol. 36: 105-117. 1972.

¹⁷ Nicastro D. et al The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. Science 313:944-948. 2006.

トモグラム再構成前に行った CTF 補正は二次元投影像に対して行った処理であるが、この方法では各サブトモグラムについて正確な CTF 補正は行われていない。なぜなら傾斜軸からの距離や試料の Z 位置によって各サブトモグラムの underfocus 値は異なるからである。さらに電子線損傷の蓄積値と傾斜角によって投影像の包絡関数も変わるので、それらを加味した三次元の CTF を用いてサブトモグラムの補正を行う必要がある¹⁸。3D CTF 補正をかけたサブトモグラムを単粒子解析と同じサブルーチンで align するのが次の工程である¹⁹。前述の primitive なサブトモグラム平均化とは異なり、Relion を用いた subtomogram alignment はオイラー角の sampling rate と translational search の範囲を iteration 毎の解像度推定に基づいて求めるため、overfitting を防ぎつつより高い解像度を得ることができる。しかしトモグラフィーで撮影するような構造は不均一性が高いものが多く、通常の alignment では解像度が伸びないことが多い(第 5 図)²⁰。



第 5 図:心筋 Z 帯の平均化サブトモグラム。筋弛緩状態と筋収縮状態で構造が変化している。アクチン繊維 (黄色、灰色) と α アクチニン (橙色) が判別できるが、解像度は低い。

トモグラフィーで解析される多数のタンパク質分子の複合体は、各サブユニット間の位置関係に揺れがあることが多く、これが構造の不均一性をもたらしている。このような揺れる複合体構造の解像度を向上させる方法が multi-body refinement である²¹。第 5 図の例では、アクチン繊維と α アクチニン分子の位置関係に揺れがある。そこでアクチン繊維と α アクチニン分子に対し別個にオイラー回転角と XYZ 軸移動値を与え、構造を収束させる。この際、 α アクチニン分子がアクチン繊維との結合部位を中心として回転しているという前提の元に回転角と軸移動値に縛りを与える。この工程により解像度が向上したアクチン繊維、 α アクチニン分子の構造が得られ、

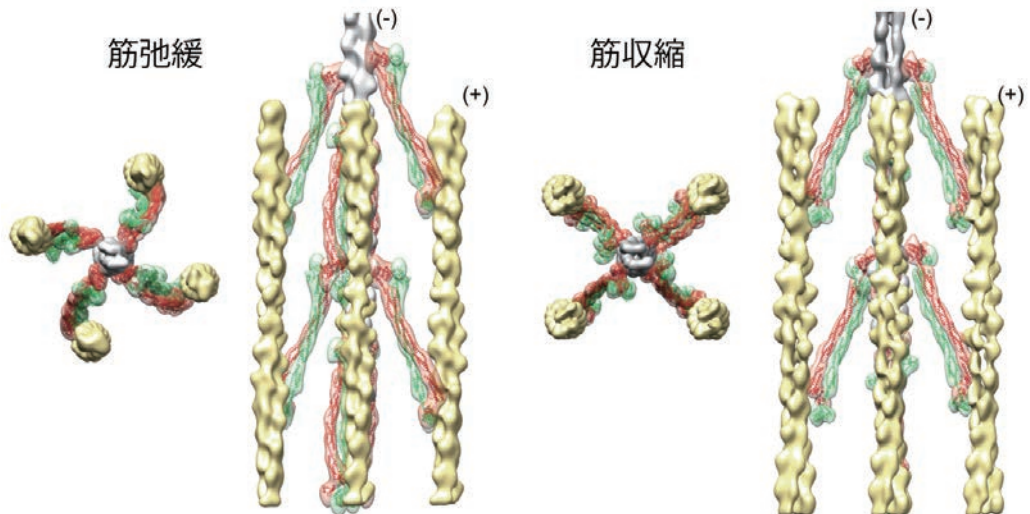
¹⁸ Turonova B et al Efficient 3D-CTF correction for cryo-electron tomography using NovaCTF improves subtomogram averaging resolution to 3.4 Å. *J. Struct. Biol.* 199: 187-195. 2017.

¹⁹ Bharat TAM and Scheres SHW Resolving macromolecular structures from electron cryo-tomography data using subtomogram averaging in RELION. *Nat. Prot.* 11: 2054-2065. 2016

²⁰ Oda T and Yanagisawa H. Cryo-electron tomography of cardiac myofibrils reveals a 3D lattice spring within the Z-discs. *Comm. Biol.* 3:585. 2020.

²¹ Nakane T et al Characterisation of molecular motions in cryo-EM single-particle data by multi-body refinement in RELION. *elife* 7:e36861. 2018.

さらにそれら二構造の相対的なオイラー角と軸移動値の範囲が判明する。最終的な結果にはそれらの値の中央値を取り、アクチン繊維と α アクチニン分子の構造を重ね合わせることで「揺れていない」複合体構造を示すことができる（第6図）²⁰。



第6図:Multi-body refinementで解像度が向上した心筋Z帯の平均化サブトモグラム。 α アクチニン二量体の各分子（赤色、緑色）を判別することができる。

4. おわりに

本研究において主に Relion プログラムを用いたサブトモグラム平均化と multi-body refinement に Reebush-L を利用した。サブトモグラムの構造解析、特に multi-body refinement は GPU 負荷が大きく Reebush-L のスペックでもかなり厳しい計算量であった。今回の multi-body refinement においては2つのアクチン繊維と2つの α アクチニン単量体の 4-body refinement が必要であり、一回の計算が200時間を超えるため Reebush-L の walltime を超過しプロセス管理が煩雑であった。最終的に16回の4-body refinement を筋弛緩、筋収縮の2状態に対して行った。今後、タンパク質の構造解析に求められるPCスペックは益々高くなり、GPUの品薄状況を考えても個々の研究室で整備できる計算環境には限界があり共通計算機センターの需要は高まっていくと考えられる。Reebush 退役後の GPU 計算機のスペックには期待と不安があるが、今後も共通計算資源の供給を継続して頂きたい。

参考文献

小田賢幸『クライオ電子トモグラフィーの実用技術』, 顕微鏡, 53(1):18-23. 2018