

## クライオ電子顕微鏡による生体試料の構造解析



技術解説

岸川 淳一\*, 加藤 貴之\*\*

Structural analysis of biomolecules by Cryo-EM

Key Words : single particle analysis, Cryo-EM, biomolecules

### はじめに

タンパク質に代表される生体高分子は生命機能の維持において最も重要な役割を果たす。それらの生体試料の機能はその立体構造に大きく依存しており、立体構造を解析することは機能を知る上で非常に有益な情報を与える。構造解析を行う最もわかりやすい目的は治療薬のデザインである。病気の原因タンパク質となる分子の立体構造がわかるとそれを阻害あるいは活性化させる低分子のデザインがコンピューター上で可能となるため、最近では原因タンパク質の立体構造を解析し、その情報を元に新規の薬のデザインをする Structure based drug design が主流となっている。

これら生体試料の立体構造を解析する技術として、近年飛躍的に進歩したクライオ電子顕微鏡がある。クライオ電子顕微鏡とは、対象を凍結した状態で観察する電子顕微鏡で、低温電子顕微鏡とも呼ばれる。

クライオ電子顕微鏡による構造解析法は40年近い歴史を持っているが、本当の意味でメジャーになったのは2013年以降のことである。それまではクライオ電子顕微鏡、特に単粒子解析法で得られる構造の分解能は16Å程度と低く、巨大な分子の外観とそのドメインの構造を可視化するに留まっていた。そのため、通常は複合体の溶液構造を、クライオ電子顕微鏡を使って低分解能で解析し、そこにX線結晶構造解析法やNMR法で解析されたサブユニットを当てはめて擬原子分解能の溶液構造を解析するためのいわばサポート用の技術として用いられていた。その頃のクライオ電子顕微鏡の構造解析はblobology (blob (ぼんやりとした) + biology (生物学) の造語) と呼ばれており、限られた一部のマニアックな研究室が細々とその技術開発を行っていた。しかし、2013年頃に開発された電子直接検出型カメラ (ダイレクトディテクター) とそれを有効に利用でき、ユーザービリティに優れたソフトウェアの開発によって時代が大きく変わった。ダイレクトディテクター利用以降クライオ電子顕微鏡による構造解析の分解能は一気に6Å程度まで改善し、多くは4Åを超える分解能を達成しており、もはやX線結晶構造解析法やNMR法のヘルプなしに原子モデルを構築できるまでに成長した。そのような時代の流れから2017年ノーベル化学賞が、クライオ電子顕微鏡開発に貢献した3氏 (J. Dobochoet, J. Frank, R. Henderson) に贈られたのは記憶に新しい<sup>1)</sup>。

クライオ電子顕微鏡による解析数は、まだまだX線結晶構造解析に遠く及ばないものの、大きな分子に関しては既に第一選択的に使われており、将来的には構造解析の主役になると予想されている。本稿では現在構造解析の主流となっているクライオ電子顕微鏡法のうち特に単粒子解析法の現状と最新の応用例について紹介する。



#### \* Jun-ichi KISHIKAWA

1981年7月生まれ  
九州工業大学大学院 情報工学部 情報工学研究科 (2010年)  
現在、大阪大学 蛋白質研究所  
助教 博士 (情報工学)  
専門/エネルギー代謝・膜蛋白質  
TEL : 06-6105-6079  
FAX : 06-6105-6079  
E-mail : kishi.jun@protein.osaka-u.ac.jp



#### \*\* Takayuki KATO

1973年8月生まれ  
大阪大学 薬学研究所 分子薬化学専攻 (単位取得退学) (2004年)  
現在、大阪大学 蛋白質研究所  
教授 博士 (理学)  
専門/構造生物学  
TEL : 06-6105-6079  
FAX : 06-6105-6079  
E-mail : tkato@protein.osaka-u.ac.jp

## 各種構造解析法の特徴とクライオ電子顕微鏡法の位置付け

現在生体試料の構造解析を行う方法は、X線結晶構造解析法、NMR法、電子顕微鏡法の3種類が挙げられる。表1にその違いと特徴を示す。

表1 構造解析手法とその特徴

方法	試料条件			分解能	
	濃度	純度	状態		
結晶構造解析	高い	極めて高い	結晶	1-3 Å	
NMR	高い	極めて高い	溶液	-	
電子顕微鏡	結晶構造解析	高い	極めて高い	結晶	1-5 Å
	単粒子像解析	低い	高い	溶液	1-20 Å
	トモグラフィ	非常に低い	低い	細胞ごと	70-Å

X線結晶構造解析法はタンパク質の構造解析として最も古くから使われる方法であり、いまでも最も多く使われている構造解析の王道である。この方法は高純度、高濃度の試料を元に結晶化を行い、得られた結晶にX線を照射した時に得られる回折像から構造解析する手法で、得られる分解能は平均2Åと極めて高く、創薬にとって最も重要な低分子との複合体、特に水素結合の方向といった非常に微小な情報を得ることができる。その反面、結晶化には大きな労力と時間が払われることがあり、場合によっては数年といった長時間を結晶化に費やすことも珍しくない。

NMR法は、X線結晶構造解析法と同様、高濃度、高純度の試料が要求される。その一方で、X線結晶構造解析法と違って、溶液中での構造解析が可能な方法であり、結晶化は必要でなく、溶液中での運動性を評価することができるという利点があるものの、分子量が50kDaを超える大きな分子では解析ができない。特に生体中ではタンパク質は複合体を形成していることが多く、この分子量の制限は、より自然に近い状態での生体分子の構造解析にとって大きな足かせになっていることは否めない。事実NMR法によって構造解析され、データベースに登録された構造数は2007年をピークに減少している(図1)。

電子顕微鏡を使った構造解析の方法は、さらに結晶構造解析、電子線トモグラフィ、単粒子解析に分類することができる。結晶構造解析は用いる光がX線か電子線かという違いがあるものの、X線結晶構造解析法と基本同様である。ただ電子線はX線と比べて圧倒的に分子との相互作用が強く、小さな

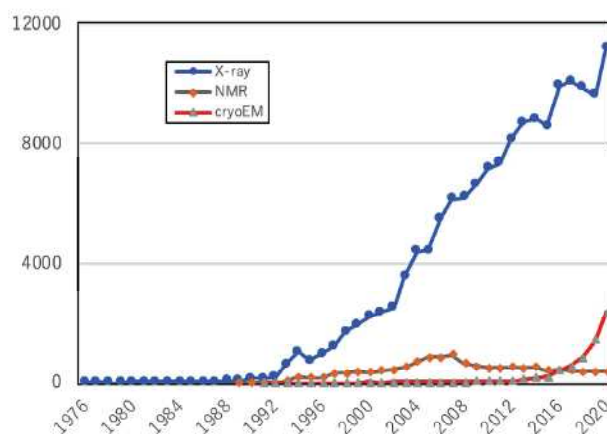


図1 手法別構造登録数推移

結晶でも構造解析することができる。通常X線の場合、数 $\mu\text{m}$ から数十 $\mu\text{m}$ オーダーの結晶を必要とするが、電子線の場合100 nm程度からでも十分にデータを取得することができる。そのため、近年では微小な3次元結晶から構造解析を行うmicroEDと呼ばれる方法が注目を集めている。大きな結晶を作りにくい試料でもその粉末の中に微小な結晶が含まれている場合があり、特に低分子やペプチドに対してこの方法が使われ始めている。電子線トモグラフィは試料を傾斜させて電子顕微鏡画像を撮影し、その角度情報を使って立体構造を解析する手法で、医療用のCTスキャン(CTはcomputed tomographyの略)と全く同じ原理で解析される。この方法は試料に対する要求が極めて低く、細胞丸ごとでもその構造解析が可能である。つまり、細胞中で機能している状態のタンパク質の構造を解析できるだけでなく、標的としている分子とその周辺の分子の構造解析も同時にされることで、分子同士のネットワークや細胞内での局在など、生体内での分子挙動の重要な情報を得ることができる。しかし、1つのトモグラフィで得られる分解能は70Å程度と他の手法に比べて著しく悪く、それ単体での原子モデルの構築は不可能である。そのため、複数のトモグラフィから同じ分子を三次元的に切り出して平均化するsub-tomogram averageによって分解能を上げる工夫がされており、近年では4Åよりも高い分解能での構造解析に成功した例<sup>2)</sup>もあり、後述の単粒子解析法の次に続く構造解析手法として技術革新が期待されている。

単粒子解析法は、現在クライオ電子顕微鏡を使っ

た構造解析で最も一般的な方法で、NMR法と同様に結晶を必要とせず溶液構造を解析することができる上に、NMR法のような分子量の制限がほとんどない。小さな分子に対しては苦手で、良い試料が得られる場合には分子量 52 kDa のストレプトアビジンが分解能 1.70 Å で解析された例<sup>3)</sup>もあるが、一般に 100 kDa より小さな分子は困難な場合が多い。その一方で大きな分子とは極めて相性が良く、1 MDa を超えるような超分子複合体の構造解析であっても十分に構造解析することができる。分子量が大きくなると結晶化は飛躍的に困難になることから、結晶化というプロセスを経ずに構造解析できるという簡便さは多くの構造生物学者にとって大きな福音となった。また、以前は欠点だった分解能もダイレクトディテクターの利用以降は飛躍的に改善し、現在では世界最高分解能は 1.22 Å<sup>4)</sup>であり、もはや X 線結晶構造解析法に引けを取らない。現在までに自動高速撮影の実現と、簡便な操作環境の整備によって、利用者に対する専門知識や装置のオペレーションの要求はずいぶん下がってきた。日本においては創薬等先端技術支援基盤プラットーホーム (BINDS) による解析基盤の整備事業<sup>5)</sup>により、日本各所にクライオ電子顕微鏡が配備されており、比較的気軽に単粒子解析ができるようになっている。

### 分解能革命の立役者

クライオ電子顕微鏡での試料作成法は、溶液サンプルをクライオ電子顕微鏡用グリッドに載せ、余分な水分を濾紙で吸い取り、薄膜化した試料グリッドを液体エタンで急速に凍結することによって作成される (図 2)。こうすることで生体試料が非晶性の氷に閉じ込められた状態となり、これを液体窒素温度に冷やしたままクライオ電子顕微鏡に導入することで観察することが可能となる。生体分子は溶液中に浮遊しているわけではなく、氷に閉じ込められてい

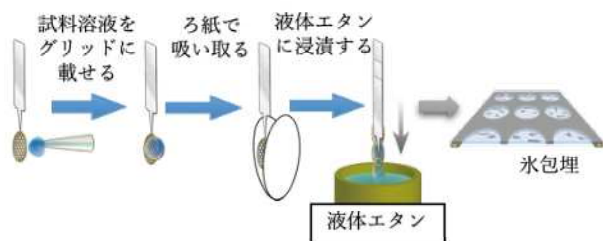


図2 氷包埋グリッド作成手順

るため撮影中は止まった状態の綺麗な写真を撮ることができそうだが、実はそんなに単純ではない。氷包埋試料に電子線を照射すると氷の中で試料が動き出す beam induced motion という現象が古くから知られており、それがクライオ電子顕微鏡の分解能を制限している主要要因と言われていた<sup>6)</sup>。過去に汎用的に使われていた銀塩フィルムは数秒の露光時間が必要で、撮影の間にこの beam induced motion によって動いている試料をずっと撮影し続けることになり、結果的にフィルムの中で被写体ブレを起こした画像しか得られなかった。近年のダイレクトディテクターは毎秒数百から千数百フレームという高いフレームレートを実現しており、今まで1枚で撮影していた静止画を、数十枚のフレームからなる動画として撮影することが可能となった。動画モードで撮影された1フレームの画像の S/N は1枚に比べると低いものの、beam induced motion による動きも小さくなっている。動画モードの各フレームを、粒子の動きが最小限になるように整列して足し合わせることで動きの少ない画像を合成することができる。これは motion correction と呼ばれており、単粒子解析法の分解能の上限を突破するための大きなブレークスルーとなった。この motion correction をいち早くサポートした RELION<sup>7)</sup> という構造解析プログラムは優れたユーザーインターフェースと、新しいアルゴリズムの採用によってクライオ電子顕微鏡による構造解析のスタンダードプログラムになり、その後、GPU の利用による高速化、より高度な収差の補正などの改良に伴って、より高速で高分解能な構造解析が実現されるようになった。また、2017年に発表された cryoSPARC<sup>8)</sup> はブラウザを使った斬新な操作画面と、高速になった RELION よりもさらに 10 倍以上高速で計算できることからそのシェアを伸ばし RELION に迫る勢いである。特に初期構造の算出方法として採用された確率的勾配効果法 (Stochastic gradient descent) は非常に強力で、これまで長年考えられてきた様々な初期構造構築のためのアルゴリズムを一夜にして無効化し、現在ではこれ以外の方法で初期構造を構築することはほとんどなくなった。

### コロナウイルスのスパイクタンパク質の構造解析

このようにハード面、ソフト面での改善が著しい

単粒子解析法で、どのようなことが明らかにできるのかということについて、最新の結果について紹介する。

2019年12月、中国武漢を発端とした新型コロナウイルス (SARS CoV-2) は、またたく間に世界に拡がり、パンデミックの様相を呈している。これまでに、全世界で約1億8千万人が感染し、約390万人の人命が失われた (2021年6月時点)。現在でも収束の目処は立っていない。コロナウイルスは、RNAウイルスの1種で、柔らかな脂質2重膜の殻 (エンベロープ) の中にその遺伝情報であるゲノムRNAが収まっている。ゲノムRNAには、ウイルスを構成する29種類のタンパク質がコードされている<sup>9)</sup>。前述のように、タンパク質の構造を知ることが薬を作ることに繋がるため、世界中多くの研究者が、コロナウイルスのタンパク質の構造解析に取り組んでおり、その結果、ほとんどのタンパク質の構造が明らかになっている<sup>9)</sup>。その中で、とりわけ注力されているのが、スパイクタンパク質の構造解析である。これまでに報告されている約1,200のコロナウイルスタンパク質のうち、実に400以上がスパイクタンパク質関連であることから注目度合いがよく分かる (2021年6月時点)。スパイクタンパク質はエンベロープの表面に突き出た1回膜貫通領域を持つタンパク質で、3つの同じタンパク質が集合した3量体で存在し、それぞれがN末ドメイン (NTD)、レセプター結合ドメイン (RBD)、S2ドメインを持つ。RBDが、宿主細胞 (ここではヒト細胞) のACE2受容体に結合することがウイルス感染の最初の重要なステップとなるため、RBDを含むスパイクタンパク質の構造解析が盛んに行われている。ニュースを賑わせている変異株 (アルファ型、デルタ型など) の多くは、RBDに変異が入ることでACE2受容体との結合性が変化したもので、変異の結果、感染力がより強くなっていると考えられている。

RBDに結合し、ACE2受容体との結合を阻害するような抗体は感染を抑制する中和抗体となる。中和抗体のように感染を抑制する抗体がある一方で、感染を増強する抗体が存在することがわかってきた。重篤な症状を示したコロナウイルス患者から単離した抗体を調べたところ、スパイクタンパク質とACE2受容体の結合を促進する抗体 (増強抗体)

があることがわかった<sup>10)</sup>。増強抗体がスパイクタンパク質のどの部分に結合するかを生化学的に調べたところ、RBDとは直接関係しないNTDに結合することが示唆された。そこで著者らは、感染を増強する抗体がNTDのどこに結合するかを調べるために、単粒子解析によるスパイクタンパク質と抗体複合体の構造解析に取り組んだ。

精製したコロナウイルスのスパイクタンパク質そのもの、スパイクタンパク質と感染増強を起こす2種類の抗体 (8D2抗体、2940抗体) をそれぞれ混ぜ合わせた溶液を使い、クライオ電子顕微鏡の観察用グリッドを調製した。調製したグリッドは、ハイエンドクライオ電子顕微鏡 Titan Krios を用いて撮影を行った。撮影したそれぞれ約6,000枚程度の電顕画像から解析を行い、スパイクタンパク質-増強抗体複合体の構造解析を行った。その結果、スパイクタンパク質単体は3.6Å、8D2抗体との複合体は3.5~3.7Å、2940抗体との複合体は3.2~4.0Åの分解能で構造を得ることができた<sup>10)</sup>。得られた構造からどちらの抗体もNTDの下側に結合していることがわかった (図3)。

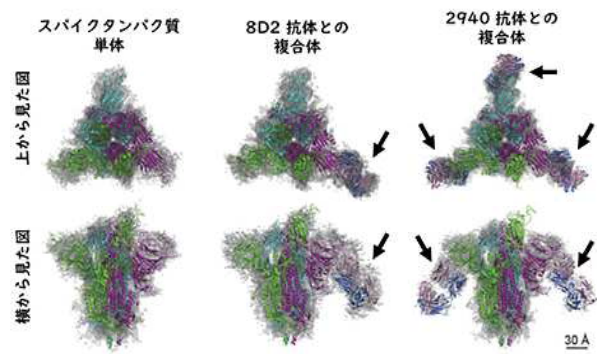


図3 単粒子解析で得られたコロナウイルスのスパイクタンパク質と増強抗体との複合体構造。矢印で抗体を示す。8D2抗体は1ヶ所、2940抗体は3ヶ所のNTDに結合しているのが分かる。論文図より引用改変<sup>10)</sup>。

これは、抗体の抗原 (エピトープ) 解析やそれを元にした結合シミュレーションの結果とよく一致していた。また、8D2抗体は3つのNTDのうちいずれか1つに結合しているのに対し、2940抗体は2つ、または3つのNTDに結合しており、それぞれの抗体のNTDに対する親和性を反映していることがわかった。このように複数の状態 (結合している抗体の数など) を含むタンパク質の構造解析を行えることは、単粒子解析の強みの1つである。一方で、

NTD への増強抗体の結合が RBD の構造に影響を与えることが期待されたが、抗体結合による明確な違いは見いだされなかった。別の実験から抗体の感染増強効果は、Y 字型の抗体の形が重要であるという結果が得られた。増強抗体は、エンベロープ上に存在する隣り合った 2 つのスパイクタンパク質の NTD を繋げ、下側に引き下げることで、RBD の構造変化を誘起するのではないかと考えられる (図 4)。今後、このモデルが正しいか、構造学・生化学の両面からさらに検証していく必要がある。

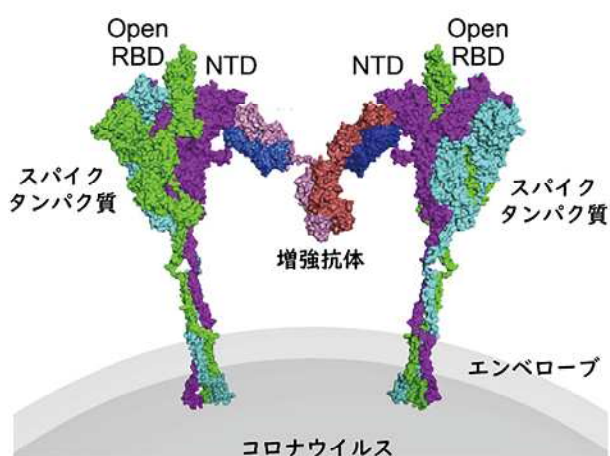


図 4 増強抗体の感染増強モデル。増強抗体がエンベロープ上に存在する 2 つのスパイクタンパク質の NTD に結合し、下に引き下げることで RBD の構造変化を誘起する。その結果、宿主細胞の ACE2 受容体との結合が促進され、感染が増強される。論文図より引用改変<sup>10)</sup>。

抗体に依存する感染増強自体は、以前から知られており、抗体依存性感染増強 (Antibody-Dependent Enhancement : ADE) と呼ばれる<sup>11)</sup>。この現象は、コロナウイルスやインフルエンザウイルス、HIV ウイルスなど様々なウイルスで観察される。そのメカニズムは、対象のウイルスに別のウイルスに対する抗体が結合することで、副次的に感染が増強されるものと考えられている。今回、我々が報告した増強抗体は、ADE とは全く異なる新たなメカニズムで感染増強を引き起こす。このメカニズムについて、さらに研究をすすめることで、コロナウイルスなどによる重篤化リスクの低減につながる可能性がある。

### 単粒子解析法の現在と今後の展望

電子顕微鏡の分解能は 20 年以上前から原子分解能に到達していたが、それを活かすカメラがなかつ

たため、クライオ電子顕微鏡の分解能は非常に低く、装置開発も材料系の電子顕微鏡ほど積極的には行われてこなかった。しかし、ダイレクトディテクターの登場によって、ようやく電子顕微鏡の本来あるべき性能を有効に使うことができるようになり、分解能は飛躍的に改善した。すると、今度は電子顕微鏡の性能をもっと上げるような試みが行われた。近年日本電子から発売された CRYO ARM 300<sup>12)</sup> は、これまで一般的に使われていた熱電界放出型電子銃よりもさらに干渉性が高い (波長が揃っている) 電子線を照射できる冷陰極電界放出型電子銃を搭載した新しいクライオ電子顕微鏡である。これまで冷陰極電界放出型電子銃は照射される電子線量が時間依存的に減少することが知られており、同じクオリティの画像を大量に撮影する必要のある単粒子解析には敬遠されてきた。近年の冷陰極電界放出型電子銃の周辺の真空度の改善によってその電子線量の減少が最小限に抑えられたことにより、単粒子解析法での実用化が実現した。その電子顕微鏡を使うことで著者らはアポフェリチンを用いて、2018 年当時世界最高分解能である 1.53Å を達成した<sup>13)</sup>。並行して照射電子線から一定の波長の電子線だけを取り出すことができるモノクロメーターについても研究が進んでおり<sup>14)</sup>、冷陰極電界放出型電子銃同様に高分解能構造解析の例が報告されている。表 2 に現在の単粒子解析法の構造解析手法の分解能ランキングを示した。

表 2 単粒子解析における分解能ランキング (2021 年)

試料	カメラ	分解能(Å)	著者
Apoferritin	Falcon3	★1.15	Yip KM et al.
Apoferritin	Falcon4	★1.22	Nakane T et al.
Apoferritin	Falcon3	★1.25	Yip KM et al.
Apoferritin	K3 BIOQUAN	1.31	Danev R
Apoferritin	Falcon3	★1.33	Yip KM et al.
Apoferritin	K2	★1.34	Tegunov D et al.
Apoferritin	K3 BIOQUAN	★1.34	Zhang K et al.
Apoferritin	K3 BIOQUAN	1.35	Danev R
Apoferritin	K3 BIOQUAN	1.35	Danev R et al.
Apoferritin	Falcon4	★1.36	Zhang K et al.
Apoferritin	Falcon4	1.43	Danev R
Apoferritin	K3 BIOQUAN	1.43	Danev R
Apoferritin	K2	★1.54	Kato T et al.
Apoferritin	Falcon3	★1.55	Yip KM et al.
Apoferritin	Falcon3	★1.56	Yip KM et al.

星印で示すところは冷陰極電界放出型電子銃あるいはモノクロメータを使った構造解析を示しており、それらがランキング上位を占めるようになっている。これは、今後のクライオ電子顕微鏡がより干渉性が高い電子線照射できる装置が一般化していくことを示唆している。

ここで示したようにクライオ電子顕微鏡の改善はダイレクトディテクターの出現によって一気に進んだが、その一方で、クライオ電子顕微鏡のグリッド作製方法は前述した、溶液を濾紙で吸い取る方法のみが用いられており、その機械化による自動化が進んだものの、原理的には40年近く全く変わっていない。最近になってようやく濾紙を使わないインクジェット方式<sup>15)</sup>や極小サイズのペンでグリッドの上に試料溶液を載せる方法<sup>16)</sup>が開発されて、装置として市販されるようになった。これらの方法により、用いる試料溶液がこれまでより劇的に減り、また濾紙で吸っていた方法でしばしば問題になる、氷の厚さの再現性の低さを解決できる可能性が示唆されている。

このようにクライオ電子顕微鏡は本体、カメラの開発はもとより、試料作成方法、解析技術の開発など、まだまだ発展途上にあり、今後さらなる高分解能化や高速化、より広い範囲の試料に対する構造解析の適応、そして、自動化によって誰でも構造解析できるという一般化が進むことが期待される。我々の所属する蛋白質研究所にはハイエンドなクライオ電子顕微鏡に加え、ピンプリンティングによるグリッド作成装置も日本で最初に導入された。共同利用共同研究拠点事業、BINDS事業の中でそれら装置の技術提供を行っているので、もし興味があるようならば、連絡を頂きたい<sup>17)</sup>。

## 参考文献

- 1) <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2017/advanced-information/>
- 2) Tegunov D. *et al*, Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-antibiotic complex at 3.5 Å in cells., *Nat. Methods*, **18**, 186-193 (2021)
- 3) <https://www.pssj.jp/archives/files/articles/099.pdf>
- 4) Nakane T. *et al.*, Single-particle cryo-EM at atomic resolution., *Nature*, **587**, 152-156 (2020)
- 5) <https://www.binds.jp/>
- 6) Brilot AF. *et al*, Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film. *J. Struct. Biol.*, **177**(3), 630-637 (2012)
- 7) Scheres SH. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.*, **180**(3), 519-530 (2012)
- 8) Punjani A. *et al.*, cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods*, **14**(3), 290-296 (2017)
- 9) Lubin JH. *et al.*, Evolution of the SARS-CoV-2 proteome in three dimensions (3D) during the first six months of the COVID-19 pandemic. *bioRxiv* 406637 (2020)
- 10) Liu Y. *et al.*, An infectivity-enhancing site on the SARS-CoV-2 spike protein targeted by antibodies. *Cell*, **184**(13) 3442-3466 (2021)
- 11) Lee WS. *et al.*, Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat. Microbiol.* **5**, 1185-1191 (2020)
- 12) <https://www.jeol.co.jp/products/detail/JEM-Z300FSC.html>
- 13) Kato T. *et al*, CryoTEM with a Cold Field Emission Gun That Moves Structural Biology into a New Stage. *Microsc. Microanal.*, **25**, 998-999 (2019)
- 14) Yip KM. *et al.*, Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*, **587**(7832), 157-161 (2020)
- 15) Razinkov I. *et al.*, A new method for vitrifying samples for cryoEM. *J. Struct. Biol.*, **195**(2), 190-198 (2016)
- 16) Ravelli RBG. *et al.*, Cryo-EM structures from sub-nl volumes using pin-printing and jet vitrification. *Nat Commun*, **11**(1), 2563 (2020)
- 17) <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/cryoem/index.html>