

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：84502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06777

研究課題名(和文) X線による昆虫飛翔筋内の蛋白分子運動の実空間イメージング

研究課題名(英文) X-ray-based Real-space imaging of molecular motion of proteins in insect flight muscle

研究代表者

岩本 裕之 (Iwamoto, Hiroyuki)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・散乱・イメージング推進室・客員研究員

研究者番号：60176568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：X線回折法により昆虫飛翔筋内の分子配列の3次元構造を実空間でイメージングする方法として、2つの手段を開発した。一つは回転平均化パターン関数法で、これは研究代表者が開発した新規な方法である。これを用い、マルハナバチ飛翔筋のミオシン繊維の構造を明らかにした。二つ目の方法は、平面的な試料によく使われる繰り返し計算法(オーバーサンプリング法)の3次元拡張版で、回転平均化された回折像から試料の3次元構造を復元しようとするものである。こちらも、飛翔筋のアクチン・ミオシン繊維の格子構造から計算された回転平均化回折像から、元の格子の3次元構造をかなりよく復元することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

X線回折法は、用いるX線の波長が原子のサイズと同じレベルであることから、原子分解能の構造決定手段として優れた方法である。しかし、固有の問題として、構造復元に必要な振幅と位相のうち、位相情報が検出器で記録する際に失われてしまうという問題がある。このため、従来、特に結晶性の低い試料でX線回折法により3次元構造を決定するのが難しかった。本研究では2つの方法により失われた位相情報を回復し、回転平均化された回折像しか得られない試料であっても3次元構造を実空間で復元できることを明らかにした。これは今回対象とした昆虫飛翔筋のみならず、材料科学方面にも適用できるきわめて有益なものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Two methods were developed to perform the 3-D imaging of the molecular arrangement within insect flight muscle by means of X-ray diffraction. The first one is the cylindrically averaged Patterson function method. This is an original method developed by the principal investigator. By using this method, I clarified the structure of the myosin filament in bumblebee flight muscle. The second one is the iterative calculation (oversampling) method. This is a 3-D expansion of the commonly used 2-D calculation, aimed to restore the 3-D structure of an object from its rotationally averaged 2-D diffraction pattern. By using this method, the 3-D structure of the filament lattice model of insect flight muscle was well restored from its calculated rotationally averaged diffraction pattern.

研究分野：X線回折学、生物物理学

キーワード：X線回折 シンクロトロン放射光 昆虫飛翔筋

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最高で毎秒 1000 回にも及ぶ高速の羽ばたきを担う昆虫の飛翔筋は、高度に特殊化された筋肉である。その高速羽ばたきを可能にする仕組みは分かっていなかったが、研究代表者は毎秒 5000 コマという世界最高速の X 線回折像撮影によって、収縮タンパクのミオシンが重要な役割を担うことを突き止めた(文献 1)。しかし、全てが逆数になる「逆空間」のデータとして表現される X 線回折像は解釈が難しく、モデル計算によって解釈を模索するしかなかった。

一方近年、X 線回折像から我々が日常目にする「実空間」の映像を直接復元するイメージング技術は進歩が目覚ましい。そこで、本研究では、最新のイメージング技術を適用し、動作中の飛翔筋内のタンパクが動く様子を実空間で観察することを試みようと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、近年進歩の著しい実像復元アルゴリズムを筋肉の X 線回折実験に適用することで、動作中の飛翔筋線維内でタンパク分子が動作している様子を、リアルタイムでイメージングするために必要な技術を開発することである。そのためには、まず静的条件で昆虫飛翔筋の X 線回折像から飛翔筋線維の 3 次元微細構造を復元する技術を確立することが必要で、それが達成されたら、飛翔筋収縮時の時間分解 X 線回折像は既に記録しているため、それを用いて飛翔筋内のタンパクが動く様子を再構成する。

3. 研究の方法

X 線回折像とは、試料の構造のフーリエ変換であり、振幅と位相の情報を持っている。長さは逆数に変換される(逆空間)。これをもう一度フーリエ変換(逆フーリエ変換)すると、元の試料の実像が(拡大されて)復元される(実空間に戻る)。光学顕微鏡のレンズは、この逆フーリエ変換を行う光学素子である。しかし、X 線回折像は、それが検出器に記録される際に位相情報が失われてしまうため、それをそのまま逆フーリエ変換しても、元の試料の実像には戻らない。これは「位相問題」と呼ばれ、X 線回折データを解釈するうえでの最大の障害となってきた。先に述べた「実像復元アルゴリズム」というのは、失われた位相情報を回復するアルゴリズムにほかならない。実像復元のため、本研究では以下の 2 つの方法を試みた。

(1) 円筒平均化パターン関数法。これは位相情報がなくても回折像から計算できる実空間の関数で、試料の中に存在する 2 点間を結ぶあらゆるベクトルを、原点からスタートするように平面に並べたものである。これらのベクトルを全て矛盾なく 3 次元空間でつなぎ合わせると、試料の 3 次元構造が復元されるはずである。これは今まで世界でも試みられていない新規な方法である。

(2) 繰り返し計算法(オーバーサンプリング法)。記録された回折像を出発点とし、逆フーリエ変換→再フーリエ変換を多数繰り返す方法で、現在主流の方法である。回折像記録以降は全て計算機上で行うため、生成された位相情報は保存される。筋線維内のタンパクのジオメトリは大体分かっているため、繰り返し計算の過程でありえないタンパクの密度を排除するように位相情報を修正していくと、最後には正しい位相情報が得られる(正しい実像が復元される)。復元しようとする試料が 3 次元であることと、回折像が回転平均化されて情報が失われている点で困難が予想された。

4. 研究成果

(1) 円筒平均化パターン関数法。円筒平均化パターン関数は上に記したように、試料の中に存在する 2 点間を結ぶあらゆるベクトルを、原点からスタートするように平面に並べたものである。この関数は、全ての位相が 0 であると仮定して X 線回折像を逆フーリエ変換することによって得られる。また試料の構造が既知であればそれから計算することもできる。まず円筒平均化パターン関数から試料の 3 次元構造を求めるのが理論的に可能であるかを検証するため、簡単なモデル構造を仮定して計算を行った。最も単純なモデル構造として、3 次元空間中にある正三角形(頂点だけを考える)を仮定した(図 1A)。これの頂点間を結ぶベクトルは合計 12 本あり、これを平面に並べた円筒平均化パターン関数が図 1B であるが、この中で独立なベクトルは 1 象限にある 3 本だけである。これらのベクトルを、軸中心の回転、反転、平行移動だけを用いて矛盾なくつなぎ合わせると、元の 3 次元構造が復元できる。これは 1 種のパズルである。このパズルを解くプログラムを作成したところ、瞬時に解を求めることができた(図 1C)。

もっと複雑な例として、アクチン繊維(13 回転でモノマー 28 個のらせん対称性を持つ)と、DNA

の 2 重らせんのモデル構造を作ったが、これらについても同じプログラムを用いて 3 次元構造を解くことができた(図 2)。

実際の試料から得られた円筒平均化パターン関数として、マルハナバチ飛翔筋の回折像から計算したものも試した。飛翔筋線維の中にはアクチンとミオシンの 2 種類のタンパク質の繊維があるが、ゲルゾリンという酵素を用いてアクチン繊維のみを選択的に取り除いたため、その円筒平均化パターン関数を解けばミオシン繊維の構造が復元されるはずである。実際の回折像から計算した円筒平均化パターン関数は連続関数になるため解くのが難しいが、それでもマルハナバチ飛翔筋のミオシン繊維がよく研究されているタガメ飛翔筋のものと同じのらせん対称性をもつこと、ミオシン頭部がいわゆる” Interacting heads motif” の配置をとるらしいことが分かった(図 3)。

これらの成果は国際結晶学連合が刊行する国際誌、IUCrJ に掲載された(文献 2)。

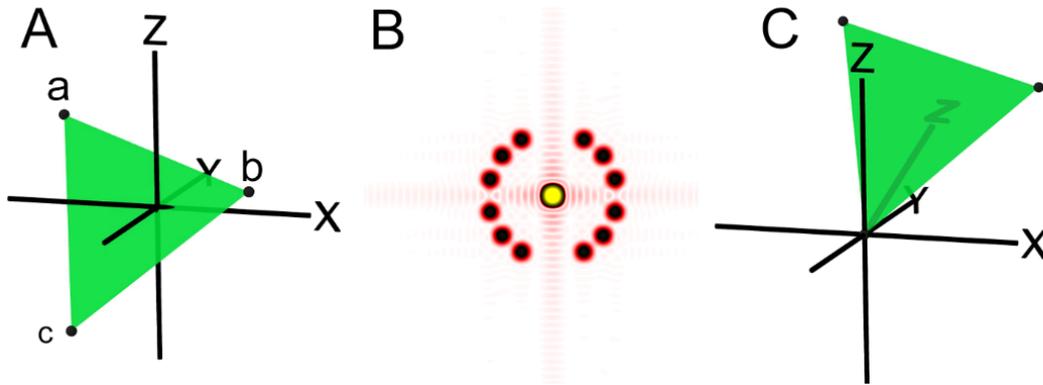


図 1. 円筒平均化パターン関数法による簡単な 3 次元空間上の物体(正三角形)の再構成例。A、仮定した正三角形。B、その円筒平均化パターン関数。C、復元された正三角形。

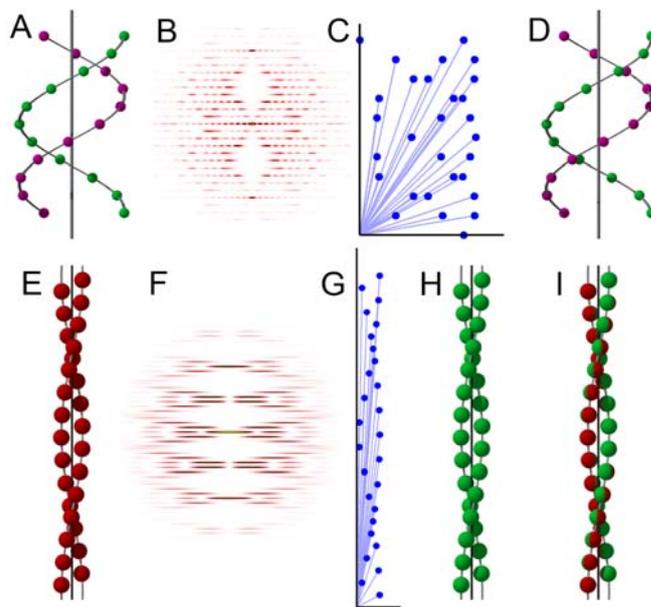


図 2. 円筒平均化パターン関数法による DNA 繊維(A-D)とアクチン繊維(E-I)の再構成例。A、E：仮定した 3 次元構造。B、F：それらの X 線回折像(計算)。C、G：それらの円筒平均化パターン関数。D、H：復元された構造。I、E と H を重ね合わせたところ。よく一致しているのが分かる。

(2) 繰り返し計算法(オーバーサンプリング法)。この方法は従来、主に平面的な試料から記録された 2 次元回折像から、試料の 2 次元構造を復元するのに用いられてきた。これを 3 次元に拡張すると、計算量が膨大になる問題点が生じ、実用的には 256x256x256 ボクセルが限度となる。しかし回転平均化されない回折像を用いるのであれば、通常はオーバーサンプリング法を用いて構造を解くのが難しい繊維状試料であっても 3 次元構造を解くことができることが分かった(そのようなプログラムを開発できた)。このプログラムを用い、クシクラゲの櫛板(クシクラゲが遊泳に使う細胞小器官)から記録した回転平均化されない回折像を使って、その中にある繊維軸糸の 3 次元構造を復元したのが図 4 である。

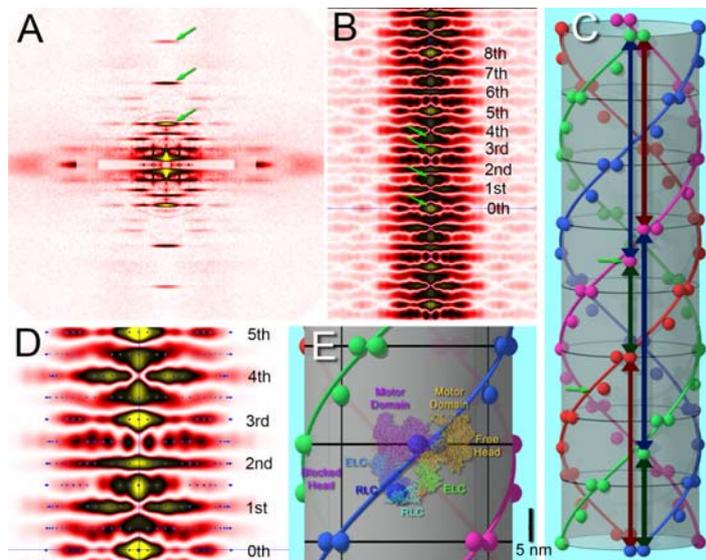


図 3. マルハナバチ飛行筋から記録された X 線回折像に適用した例。A、回折像(アクチン繊維を取り除いたもの)。B、D: 回折像から計算された円筒平均化パターン関数。C、E: 復元されたミオシン繊維のらせん対称性を示す模式図。

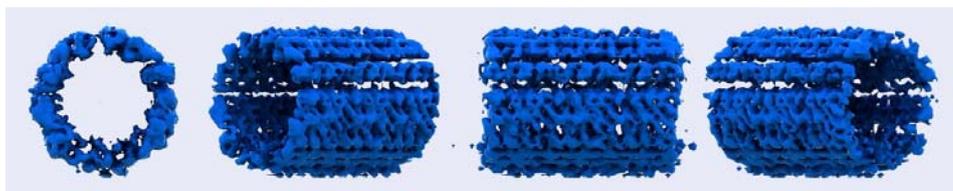


図 4. 繰り返し計算法で復元したクシクラゲ櫛板の軸糸の 3 次元構造。

一方昆虫飛行筋からは回転平均化された回折像しか得られないので、情報が大幅に減少しており、構造復元が困難である。また昆虫飛行筋の回折像は非常に複雑であるのに対し、計算に使えるボクセル数が限定されるのも問題を複雑にする。しかしあらゆる方向に回転平均化され、1次元情報しかないタンパク質の溶液散乱曲線からオーバーサンプリング法で 3 次元構造を復元することは成功している(低解像度であるが、文献 3)ので、1 軸方向だけに回転平均化されている昆虫飛行筋の回折像から構造復元は可能であろうとの信念のもとにプログラムの開発を行った。

プログラムの開発は困難をきわめ、なかなか計算が収束しなかったが、収束を妨げる誤差が発生する箇所を突き止め、それを修正するルーチンを組み込んだところ、計算が収束するようになり、昆虫飛行筋の筋原繊維の 3 次元モデル構造から計算した回転平均化 2 次元回折像から元の 3 次元構造を復元できた。詳細は現在執筆中の論文原稿に書くが、要点は以下のとおりである。

a. タガメ飛行筋の研究により判明している構造の対称性を元に、飛行筋のモデル構造を $256 \times 256 \times 256$ ボクセルの 3 次元空間に構築する。これから 3 次元の回折像を計算し、それを回転平均化すると 256×256 ピクセルの 2 次元回折像が得られる。これが通常記録される回折像に相当する。この 2 次元回折像から、モデル構造が復元できるかを試す。

b. アクチン繊維、ミオシン繊維が 6 角格子の配列に並んでいることは分かっているので、アクチン繊維、ミオシン繊維に見立てた微細構造が一切ないただの円筒をその配列に並べ、これを出発構造とする。これから計算される回転平均化 2 次元回折像はモデル構造の回折像と大きく異なるが、図 5 に示す繰り返し計算によって両者の間の誤差が小さくなるように出発構造を変えていく。

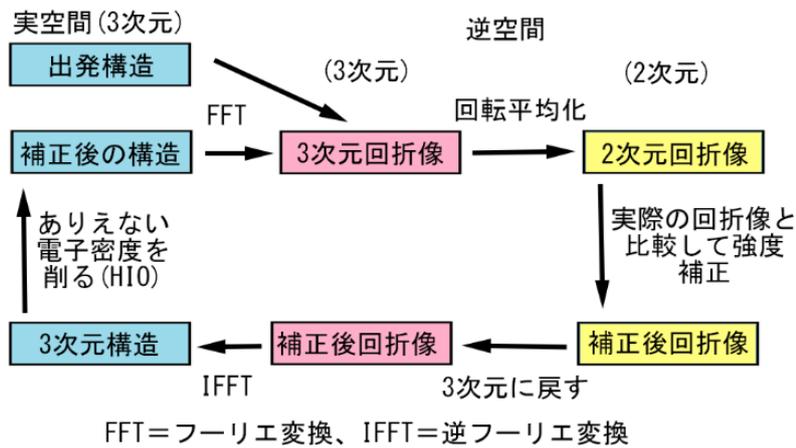


図 5. 繰り返し計算の手順。2次元回折像を3次元に戻すには、3次元回折像上の同じ軸上の位置、同じ半径の強度を、補正した2次元回折像の強度に合うように補正する。

図 6 は出発構造と、2000 回の繰り返し計算で得られた構造をモデル構造(正解)と比較したものである。ミオシン繊維、アクチン繊維それぞれのらせん対称性が再生されているのが分かる。現在はモデル構造ではなく、実際に飛行筋から記録された回折像から 3次元構造復元を試みているところであり、それが成功すれば飛行筋内のタンパクが動く様子を可視化できると考えられる。

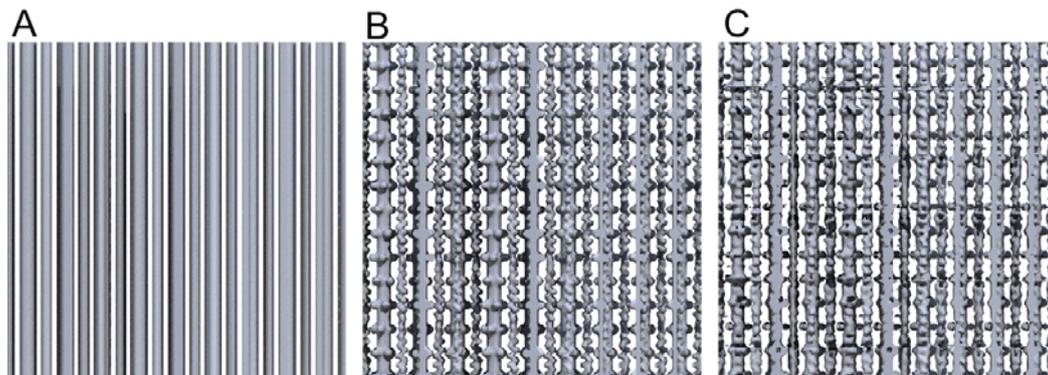


図 6. 繰り返し計算による昆虫飛行筋微細構造の復元。A、出発構造(ただの円筒の集まり)。B、モデル構造。太い繊維がミオシン、細い繊維がアクチン。C、復元された構造。アクチン、ミオシンそれぞれのらせん周期構造が復元されている。

(3) その他の成果。研究代表者はフロリダ州立大の K. A. Taylor 博士の研究室と共同で、クライオ電顕によりマルハナバチ飛行筋のミオシン繊維の立体構造を 6 Å の空間分解能で決定した(文献 4)。

<引用文献>

- 1) Iwamoto, H. and Yagi, N. The molecular trigger for high-speed wing beats in a bee. *Science*, 341: 1243-1246 (2013). doi: 10.1126/science.1237266.
- 2) Iwamoto, H. The 3D structure of fibrous material is fully restorable from its X-ray diffraction pattern. *IUCrJ*, 8: 544-548 (2021), doi: 10.1107/S2052252521004760.
- 3) Grant, T.D. Ab initio electron density determination directly from solution scattering data. *Nature Methods*, 15: 191-195 (2018), doi: 10.1038/nmeth.4581.
- 4) Li, J., Iwamoto, H. and Taylor, K.A. et al. Structure of the flight muscle thick filament from the bumblebee, *Bombus ignitus*, at 6 Å resolution. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 377 (2022). doi: 10.3390/ijms24010377.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Li Jiawei, Rahmani Hamidreza, Abbasi Yeganeh Fatemeh, Rastegarpouyani Hosna, Taylor Dianne W., Wood Neil B., Previs Michael J., Iwamoto Hiroyuki, Taylor Kenneth A.	4. 巻 24
2. 論文標題 Structure of the Flight Muscle Thick Filament from the Bumble Bee, <i>Bombus ignitus</i> , at 6 angstrom Resolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 377 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwamoto Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 The 3D structure of fibrous material is fully restorable from its X-ray diffraction pattern	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 544 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252521004760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iwamoto Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 The 3-D structure of fibrous material is fully restorable from its X-ray diffraction pattern	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.02.09.430379	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iwamoto Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Synchrotron radiation X-ray diffraction studies on muscle: past, present, and future	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 547 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-019-00554-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 H. Iwamoto
2. 発表標題 RECONSTRUCTION OF REAL-SPACE 3-D STRUCTURE FROM X-RAY FIBER DIFFRACTION PATTERN: APPLICATION TO MUSCLE PROTEIN FILAMENTS
3. 学会等名 Biophysical Society (USA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本裕之
2. 発表標題 X線繊維回折から試料の3次元構造を復元する方法
3. 学会等名 2020年 生体運動合同班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Iwamoto
2. 発表標題 Synchrotron radiation X-ray diffraction reveals the highly ordered structure of axonemes in the comb plate of ctenophores
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Iwamoto
2. 発表標題 Recent progress in synchrotron radiation X-ray diffraction studies for non-crystalline biological specimens
3. 学会等名 日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本裕之
2. 発表標題 クシクラゲの櫛板は織毛でできた巨大単結晶である
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本裕之
2. 発表標題 X線回折イメージングはどこまで動物学に応用できるか
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関