

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657111

研究課題名(和文)電子線結晶構造解析によるクーロンポテンシャルの可視化

研究課題名(英文)Visualization of Coulomb potential by electron crystallography

研究代表者

米倉 功治(YONEKURA, Koji)

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・准主任研究員

研究者番号：50346144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：X線回折が利用できない微小な薄い三次元の蛋白質結晶から、電子線結晶構造解析により構造決定を行う新しい技術を開発した。電子線は負の電荷を持ち、同じ原子でも電荷を持ったものと中性のもので、その散乱のされ方は大きく異なる。開発した技術を用いて、膜蛋白質等の薄い結晶から機能部位のイオンやアミノ酸等の荷電状態を可視化することに成功した。生体分子が機能を発揮する上で、機能部位の荷電状態は大きな影響を及ぼすため、本研究により、蛋白質のより詳細な作動原理の解明に繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Electron crystallography has the potential to analyze crystals of membrane proteins and macromolecular complexes too small or too thin for X-ray crystallography, as electrons are scattered 4 - 5 orders of magnitude more strongly than X-rays. Electron crystallography yields Coulomb potential maps, rather than electron density maps as X-rays do, providing information on charged states of amino-acids and metals. We presented such Coulomb potential maps at 3.4 and 3.2 Angstrom resolution, respectively, of calcium-ATPase and catalase obtained from crystals of just a few layers thick. These maps demonstrate that it is indeed possible to build atomic models from such crystals and charge information is included, often critical in understanding protein function.

研究分野：生物学

キーワード：構造生物学 結晶構造解析 電子顕微鏡 膜蛋白質 超分子複合体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase カタラーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

複雑で多岐にわたる生命活動の理解には、生体高分子の構造を高い空間分解能で決定することが必要となる。現在、X線結晶構造解析法が、その主要な役割を担っている。同法を適用するためには、通常5 ~ 100 μm以上の良質な結晶を作成する必要があるが、膜蛋白質や生体超分子複合体では、結晶作成は一般的に容易でない。これらの試料では、X線の回折に利用できないごく薄い三次元結晶しか得られる場合もある。

電子線はX線と比べて十数万倍も強く物質と相互作用するため、大きさ1 μm以下、厚さ数十 nm以下の結晶からでも、原子モデルの構築の目安となる3.5 Å分解能を超えて回折点が観測されることがある。実際、二次元結晶の電子線回折から、2 Åより良い分解能で構造決定がされているが(1)、良質な二次元結晶の作成は容易でないということが分かってきた。それに対して、電子線回折に用いることができる数百 nm以下の厚さの非常に薄い三次元結晶が得られることは、多く経験される。特に、膜蛋白質結晶は二次元的には大きく成長するが、数層の重なりにしかならない場合もある。しかし、これまでこれらの試料は、構造解析の対象にならなかった。

X線が原子の電子雲に散乱されるのに対して、荷電粒子である電子の散乱は原子のクーロンポテンシャルを反映する。クーロン力は長距離に渡って影響を及ぼすため、生体分子が機能を発現する上で非常に重要な因子である。例えば、プロトン輸送やイオンの配位、蛋白質の安定性、化学反応にも深く関与している。これまで、バクテリオロドプシンの二次元結晶の電子線回折から、荷電残基が同定されプロトンの輸送経路の推定がされている(2)。しかし、これが唯一の例で、分子のクーロンポテンシャルを実験的に測定する汎用的な手法は、これまでに存在していなかった。

### 2. 研究の目的

上述のように、電子線は、X線と比べて十数万倍も強く物質と相互作用する。X線が電子密度マップを与えるのに対して、電子線はクーロンポテンシャルマップを与える。この2つの特徴を利用して、薄い三次元結晶から3.5 Åより高い分解能で構造解析し、アミノ酸側鎖のプロトン化状態等、原子モデルにクーロンポテンシャル情報を付加、荷電情報を取得する基礎技術として確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

薄い結晶の構造解析のために開発した電子顕微鏡システム(図1a)は、1) 高い角度読み取り精度で回転制御できる試料ステージを備え、X線結晶回折の強度測定で採られている手法と同様に、結晶を回転させながら電子線回折パターンを記録し、回折点の正確

な強度情報を取得できる。また、2) 電子分光装置を搭載し、試料のクーロンポテンシャルを正確に反映する弾性散乱された電子を選択、結像に用いることができる。さらに、ソフトウェアに関しては、3) 電子線回折パターンを処理する新しいパッケージを開発し(図1b)、回折点の指数付け、三次元プロファイルフィッティングを行うプログラムにより、回折パターンから正確な強度情報を抽出することが可能である。

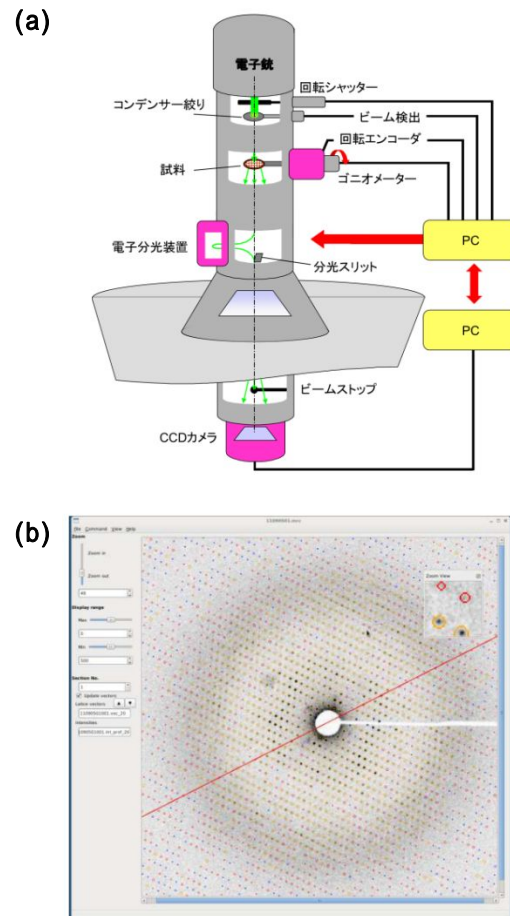
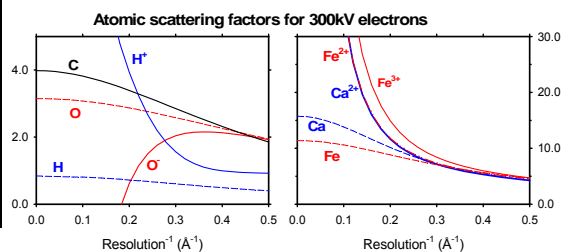


図1 電子線回折計の模式図(a)と回折パターン処理ソフトウェアの一部(b)。

以上の開発を、牛肝臓カタラーゼ、ウサギ筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase のごく薄い三次元結晶に適用した。そして、中性とイオン化した原子の電子線に対する原子散乱因子(図2)を用いて、荷電情報を詳細に解析した(3)。

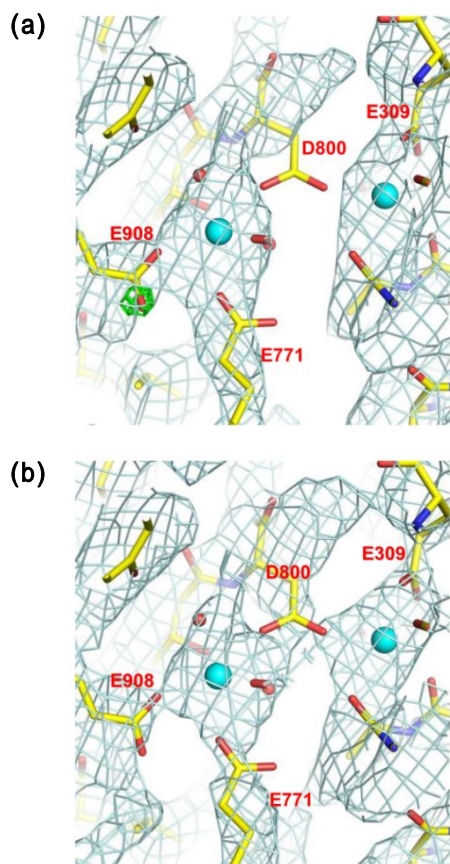


**図2 加速電圧300 kVの電子線に対する原子散乱因子。**文献4より計算。H<sup>+</sup>は文献5の値を用いた。表示の範囲で、Ca<sup>2+</sup>とFe<sup>2+</sup>の散乱因子はほぼ重なっている。

#### 4. 研究成果

筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase は筋小胞体にある膜蛋白質で、筋収縮の際に放出される Ca<sup>2+</sup>を筋小胞体に回収する。Ca<sup>2+</sup>-ATPase の膜内部にある Ca<sup>2+</sup>結合部位は、主に、アスパラギン酸とグルタミン酸の酸性アミノ酸で構成される。

電子線の散乱因子を用いたモデルでは、負電荷を持つ原子の密度は低くなる。実際、8 Å ~ 3.4 Å 分解能の電子線回折データから取得したマップでは、2つの Ca<sup>2+</sup>に挟まれた 800 番目のアスパラギン酸側鎖の密度を表す部分が欠失する(図3a; 3)。電荷の影響は低い分解能領域でより顕著になり(図2)、低い分解能領域を除いた 5 Å ~ 3.4 Å 分解能のデータから計算したマップでは、この負電荷を持つアスパラギン酸側鎖の密度を表す部分が現れる(図3b)。以上から、このアミノ酸側鎖が負電荷を持っていることを実験的に明らかにできた。

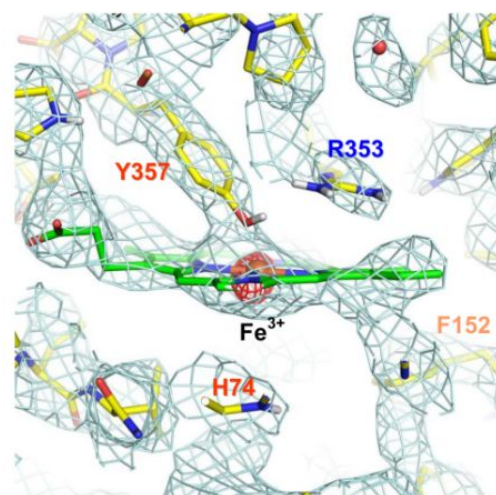


**図3 Ca<sup>2+</sup>-ATPase の Ca<sup>2+</sup>結合部位のクーロンポテンシャルマップ。**(a) 8 Å ~ 3.4 Å 分

解能の電子線回折から得られたマップ。800 番目のアスパラギン酸 (D800) 側鎖に相当する密度を表す部分(図中の網目)が欠損している。また、負電荷を仮定したモデルとの差マップでは、908 番目のグルタミン酸 (E908) 側鎖にプロトン化を示す差(緑)が現れる。(b) 5 Å ~ 3.4 Å 分解能の電子線回折から得られたマップ。D800 の側鎖の密度を表す部分が現れる。D: アスパラギン酸、E: グルタミン酸。水色の球は Ca<sup>2+</sup>。薄い青のネットは 1、(a)の緑のネットは 3.5 相当する。

一方、負電荷を仮定したモデルとの差マップでは、908 番目のグルタミン酸の側鎖に大きな差が現れ、この部位にプロトンが結合していることが示された(図3aの緑のネット; 3)。このプロトン化により、近傍の 771 番目のグルタミン酸との水素結合が形成され、Ca<sup>2+</sup>結合部位の安定化に寄与することが示される。

さらに、水溶性の超分子複合体であり、有害な過酸化水素を分解する酵素であるカタラーゼでも、8 Å ~ 3.2 Å 分解能の電子線回折から計算したクーロンポテンシャルマップから、その活性部位にあるヘムの鉄の荷電状態に関する情報を得ることができた(図4; 3)。



**図4 カタラーゼの活性部位のクーロンポテンシャルマップ。**8 Å ~ 3.2 Å 分解能の電子線回折から得られたマップ。活性部位の中央にあるヘムの鉄の荷電状態に関する情報(赤いネット)が得られた。Y: チロシン、R: アルギニン、F: フェニルアラニン、H: ヒスチジン。薄い青のネットは 1.3 に、赤いネットは -3 に相当する。

ここに示した特定のアミノ酸だけでなく、

すべてのアミノ酸のクーロンポテンシャルマップを統計的に処理したところ、8 Åまでの低分解能の情報を含んだ場合、アスパラギン酸とグルタミン酸の側鎖の密度が減少するという明瞭な傾向が明らかになった。以上から、開発したシステムが、アミノ酸やイオンの荷電状態を解析する汎用性の高いツールになることを示すことができた(3)。

#### <引用文献>

1. T. Gonen *et al.*, Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature* **438** (2005) 633 - 638.
2. K. Mitsuoka *et al.*, The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. *J. Mol. Biol.* **286** (1999) 861 - 882.
3. K. Yonekura, K. Kato, M. Ogasawara, M. Tomita and C. Toyoshima, Electron crystallography of ultra-thin 3D protein crystals: atomic model with charges, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** (2015) 3368 - 3373.
4. Prince E (Editor), *International Tables for Crystallography* (John Wiley & Sons Inc.), Vol. C (2006) pp 263 - 281.
5. T. Hirai, K. Mitsuoka, A. Kidera and Y. Fujiyoshi, Simulation of charge effects on density maps obtained by high-resolution electron crystallography. *J. Electr. Microsc.* **56** (2007) 131 - 140.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 4件)

- K. Yonekura, K. Kato, M. Ogasawara, M. Tomita and C. Toyoshima, Electron crystallography of ultra-thin 3D protein crystals: atomic model with charges, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有り, **112** (2015) 3368 - 3373.
- K. Yonekura, M. Watanabe, Y. Kageyama, K. Hirata, M. Yamamoto and S. Maki-Yonekura, Post-transcriptional regulator Hfq binds catalase HP11: crystal structure of the complex, *PLoS ONE*, 査読有り, **8** (2013) e78216.
- R. H. J. Staals, Y. Agari, S. Maki-Yonekura, Y. Zhu, D. W. Taylor, E. van Duijn, A. Barendregt, M. Vlot, J. J. Koehorst, K. Sakamoto, A. Masuda, N. Dohmae, P. J. Schaap, J. A. Doudna, A. J. R. Heck, K. Yonekura, J. van der

Oost and A. Shinkai, Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR-Cas complex of *Thermus thermophilus*, *Molecular Cell*, 査読有, **52** (2013) 135-145.

米倉 功治、眞木 さおり、低温電子顕微鏡法による蛋白質構造の可視化、感染 炎症免疫、査読無し、**43** (2013) 307-312.

#### [学会発表](計 20件)

- 米倉 功治、低温電子顕微鏡法によるタンパク質構造解析 “膜タンパク質及びタンパク質複合体の構造解析”、理研-武田 WS 「インシリコ技術による効率的な創薬手法の開発」～タンパク質構造解析の最前線～、武田薬品工業(株)湘南研究所(神奈川県藤沢市)、2014年10月28日
- K. Yonekura, Electron crystallography of thin protein crystals 第87回日本生化学会大会 「生化学研究における電子顕微鏡技術の最前線 - The cutting edge of electron microscopy for the field of biochemistry -」, 京都国際会館(京都府京都市左京区) 2014年10月16日
- K. Yonekura, Electron crystallography of 3D protein crystals, 3DEM Gordon Research Conference, Melia Golf Vichy Catalan Business & Convention Center, (Girona, Spain), June 22-27, 2014
- 米倉 功治、SPRING-8 - 医療分野での展望 -、兵庫県保険医協会姫路・西播支部第28回支部総会・記念講演会、じばさんびる(兵庫県姫路市) 2013年7月20日
- 米倉 功治、眞木 さおり、低温電子顕微鏡法による生体超分子複合体の構造解析、第13回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム、チサンホテル新大阪(大阪府大阪市淀川区) 2012年11月24日

#### [その他]

#### プレスリリース

- 「微小で薄いタンパク質結晶の電子線構造解析 - これまで利用できなかった結晶から電荷を可視化 -」  
[http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150223\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150223_1/)  
<http://www.riken.jp/en/research/rikenresearch/highlights/8014/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

米倉 功治 (YONEKURA, Koji)  
独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・准主任研究員  
研究者番号：50346144

##### (2) 研究分担者

眞木 さおり (MAKI-YONEKURA, Saori)  
独立行政法人理化学研究所・放射光科学総



合研究センター・研究員  
研究者番号：20513386

(3)連携研究者

豊島 近(TOYOSHIMA, Chikashi)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授  
研究者番号：70172210