

## 膜タンパク質の cryo-EM 解析

小川治夫 Haruo OGAWA 京都大学大学院薬学研究科准教授  
加藤博章 Hiroaki KATO 京都大学大学院薬学研究科教授



## 1 はじめに

クライオ電子顕微鏡法(cryo-EM)は、現在、タンパク質の立体構造解析で最も注目されている解析技術の1つである。2013年の「分解能革命(The Resolution Revolution)」<sup>1)</sup>を契機に、急速にその実用化と普及が進み、現在では膜タンパク質を含む分子の理解において不可欠な技術となっている。2017年のノーベル化学賞は、「溶液中の生体分子の高分解能での構造決定のためのクライオ電子顕微鏡法(cryo-EM)の開発」に対して Jacques Dubochet, Joachim Frank, Richard Henderson の3氏に授与された。この受賞は、現在の cryo-EM 技術の画期的な進展を考慮すれば当然の結果と言えよう。

本稿では、膜タンパク質の立体構造解析を主眼にこの cryo-EM 技術についての解説を行い、読者の方々が実践に活かすための手引き、筆者らによる実際の解析例や、構造解析の現状、そして今後残された課題について記述したい。

## 2 2013年の分解能革命以前での膜タンパク質の立体構造解析の問題点

2013年以前の立体構造解析において、原子分解能を達成し、アミノ酸側鎖まで解像できる唯一の手法はX線結晶解析であった。しかし、X線結晶解析には結晶が必要であるという制約がある。膜タンパク質は水溶性タンパク質とは異なり、疎水的な膜貫通領域と膜外の親水的な領域の両方を持つため、解析に耐えうる品質の「三次元結晶」を作成することが非常に困難であった。最終的な解析に至るまでには、大量の高純度で精製された標品を準備する必要があり(10~50 mg 程度)、この過程も大きな障壁

となっていた。これらの問題のうち、大量の精製標品の準備に関しては、バキュロウイルスを哺乳類培養細胞へ感染させる大量発現系の一般化や、<sup>2)</sup> 遺伝子工学的に GFP 等の蛍光タンパク質をあらかじめ融合させ、大量発現したりコンビナントタンパク質の素性を GFP 等の蛍光を指標に評価する系の開発などが進み、<sup>3)</sup> これにより大きくハードルが下がった。また、結晶化に関しても、汎用性の高い lipid cubic phase(LCP) 法や、<sup>4)</sup> 脂質を用いた結晶化法などが開発され、<sup>5)</sup> そのハードルは多少低くなった。特に LCP 法は、G タンパク質共役受容体(GPCRs)の結晶解析を実現しただけでなく、<sup>6)</sup> サブマイクロメートルサイズの微結晶を用いた ABC トランスポーターの構造決定も可能にしている。<sup>7)</sup> とは言え、結晶化が構造解析の最大のボトルネックであることには変わりはない。

## 3 2013年の分解能革命

2013年12月5日号の *Nature* 誌において、cryo-EM を用いた単粒子解析により、マウス由来の  $Ca^{2+}$  チャンネルである TRPV1 の近原子分解能の立体構造が連報で報告された。<sup>8,9)</sup> 全てのアミノ酸側鎖が可視化されたわけではないが、一部は十分に可視化できる EM マップが提示されていた。まさに Henderson がその約20年前に予言したことが現実のものとなった瞬間である。<sup>10)</sup> その報告直後から次々に高分解能の構造が *Nature*, *Science*, *Cell* といった主要な科学誌に発表されるようになった。cryo-EM を用いた単粒子解析の最大の特徴は、試料溶液そのものから電子顕微鏡による撮影のみで、近原子分解能の立体構造を再構成できる点である。さらに、三次元結晶化に必要なほどの高濃度かつ大

量の精製標品を準備する必要がないことも、大きな利点である。cryo-EM では必要な試料量が大幅に少なく、1回の凍結には、1~10 mg/mL の濃度で最低 3  $\mu$ L の試料があれば十分である(つまり、必要量は 3~30  $\mu$ g とオーダーが一桁異なる)。すなわち、X線結晶解析の10分の1でよいのだ。しかも、結晶化ほどの純度は要求されないため、操作の繰り返しで精製収率を低下させることもない。

このような利点により、Protein Data Bank (PDB) へのタンパク質構造データの登録状況は、2013年を境に劇的に状況が変化している(図1)。2013年以前はX線結晶解析による登録数がcryo-EMの登録数を大きく上回っていた。しかし、2013年以降はcryo-EMによる登録数が急激に増加し、現在ではX線結晶解析に迫る勢いを見せている(図1)。この流れは、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の構造解析を例に挙げても明らかである。GPCRの立体構造自体は、前述のLCP法の開発を契機に、X線結晶解析によってGPCRの最初の原子分解能の構造として $\beta_2$ アドレナリン受容体とインバースアゴニスト複合体の構造が決定された。<sup>6)</sup>

さらに、2011年には $\beta_2$ アドレナリン受容体、アゴニスト、および3量体Gタンパク質複合体の構造が解明され、<sup>11)</sup> GPCRがシグナル伝達を行う仕組みの理解が大きく前進した。一方で、GPCRは分子量が50 kDa程度と小さく、分子の向きを特定しにくいため、当初はcryo-EMによる構造解析が困難ではないかと考えられていた。しかし、この予想に

反し、2017年にはcryo-EMによる最初の構造が報告された。<sup>12)</sup> 実際、この構造は3量体Gタンパク質との複合体として決定されており、cryo-EMがGPCR研究においても有力な手段となることを示した。2023年時点ではcryo-EMで解析されたGPCR構造の数は、X線構造解析による数を30%上回り、PDBには650を超える固有の構造が登録されている。この急速な進展により、過去6年間で0.63年ごとに登録数が倍増しており、減速の兆候は見られない。<sup>13)</sup> このままのペースが続けば、今後数年以内にヒトGPCRの90%の構造情報が得られる可能性が高い。

分解能革命の背景であるが、cryo-EM装置の自動化や、ほぼ同時期に登場したベイズ推定を利用した解析ソフトウェアの貢献も大きい。<sup>14)</sup> しかし、最も決定的な違いは、「電子線直接検出器」の登場にある。それ以前の高解像度な電子線検出手段としては、電子顕微鏡フィルムが唯一の選択肢であった。CCDカメラも存在したが、これは電子線を直接検出できず、シンチレーターで電子をいったん光に変換し、その光を検出する方式だった(図2)。しかし、この方法にはシンチレーターでの光変換時に信号が広がるため、画像の分解能が低下するという問題があった。さらに、フィルムと同様に積算された

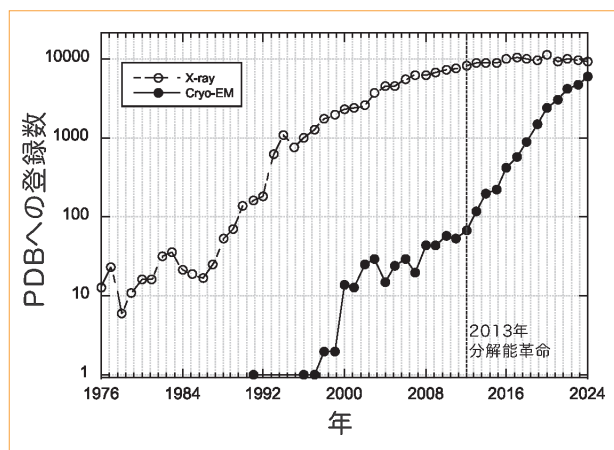


図1 PDBへの登録数の推移

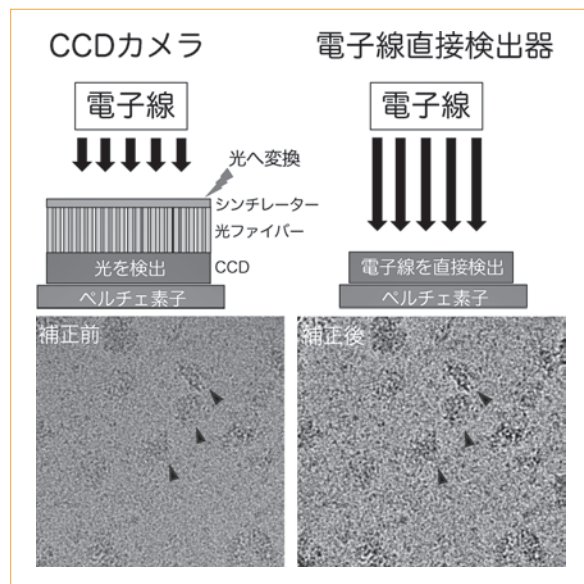


図2 検出器の種類と Motion Correction

検出器の模式図(上)と Motion Correction によるブレ補正。

像が記録されるため、動きによるブレが避けられないという課題も存在していた。一方、電子線直接検出器は、入射する電子数を直接カウントできるため、高感度かつ高分解能での画像取得が可能である。さらに、高速読み取りが可能であり、フレームレートの高いムービーとして画像を記録できる(図2)。この特性を活かし、ムービーとして記録されたフレームごとに試料の動きを補正し、それらを統合する解析手法(Motion Correction)が導入された。<sup>15)</sup> これにより、試料の微細な動きによるブレを除去し、画質を飛躍的に向上させることが可能となった。図2にその実例を示すが、Motion Correctionを適用することで、画像の鮮明さが劇的に向上していることが確認できるだろう。

#### 4 cryo-EM での膜タンパク質の立体構造解析の実際-2型リアノジン受容体の解析例

cryo-EMでの精製標品は、結晶化に必要とされるほどの高純度は求められないが、異種タンパク質の混入は解析の妨げとなるため、初めての試料の場合は可能な限り高純度であることが望ましい。cryo-EMの試料調製では結晶を作成する必要がないため、精製のために付加したHisタグなどを必ずしも除去する必要はない。また、結晶化を阻害する要因となる糖鎖修飾についても、必ずしも除去する必要はない。筆者らの経験では、糖鎖修飾が原因で結晶化が困難だった分子について cryo-EM で解析を行ったところ、驚くほど簡単に原子分解能の構造を得ることができた。一部の精製標品は精製後に時間の経過とともに凝集を引き起こす場合があるため、可能な限り精製直後に凍結するのが望ましい。

筆者らが解析を行った2型リアノジン受容体(RyR2)を例として、<sup>16)</sup> その解析の実際を解説する。RyR2は、心筋の収縮に不可欠な巨大な小胞体Ca<sup>2+</sup>チャンネルであり、心筋の筋小胞体に局在する。RyR2には300箇所以上の疾患関連遺伝子変異が報告されており、<sup>17)</sup> 重度の不整脈との関連も示されている。哺乳類培養細胞で大量発現・精製を行ったRyR2は、約4 mg/mL程度に濃縮して急速凍結し、その後 cryo-EM による撮影解析を行っている。cryo-EMの試料をガラス状の水に包埋する凍結手

法は、1980年代にDubochetらによって確立されたもので、<sup>18)</sup> 凍結溶媒には主に液体エタンを用いる。3 μLのRyR2精製標品を電子顕微鏡用の試料支持体であるグリッド上に添加し、ろ紙を用いて余分な溶液を素早く除去して試料を薄く均一に分布させた後、液体エタンへ高速で落下させることで急速凍結を行う(図3)。<sup>付図1)</sup> 筆者らの場合は、1条件につき、2~3枚のグリッドを作成している。

次に、実際の解析について説明する。cryo-EMによる単粒子解析の原理についての詳細な説明は専門書に譲るが、<sup>19)</sup> この手法はFrankらによって開発された歴史あるものである。<sup>20)</sup> X線CTスキャンに類似しており、試料がガラス状の水に包埋され、ランダムな方向を向いていることを利用する(図3)。<sup>付図1)</sup> すなわち、「試料に対して異なる方向から取得した投影像をもとに、元の立体構造を再構成する」という中央断面定理がこの手法の基盤となっている。cryo-EMへ凍結したグリッドをロードした後、氷の厚みが適切であり、多数の精製標品が明確に観察できるグリッドを選別し、撮影を行う。撮影したムービーは、まずMotion Correctionを実施し、電子線照射による試料の動きを補正してブレのない高分解能の画像を取得する(図3)。<sup>付図1)</sup> その後、各画像から単粒子を抽出し(図3)。<sup>付図1)</sup> 類似し

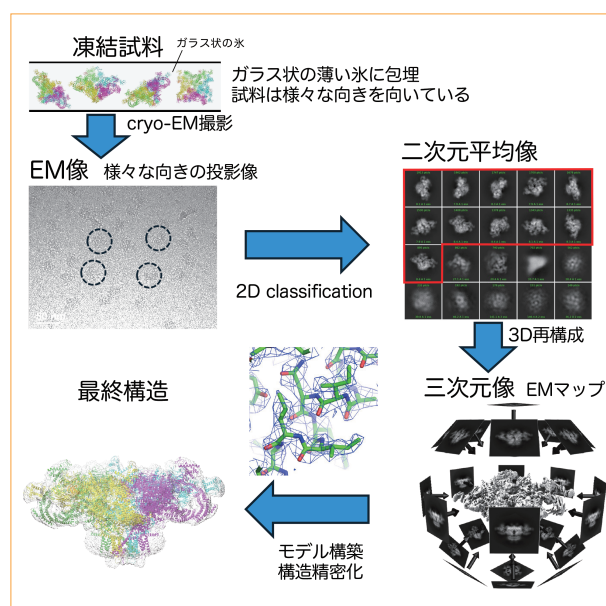


図3 cryo-EMでの解析  
J-STAGEではカラーでご覧いただけます(付図1)。

た特徴を持つ粒子ごとに分類し平均化を行う(2D classification)(図3).<sup>付図1)</sup> 解析に適した粒子クラスを選択し(図4),<sup>付図2)</sup> 三次元像の再構成と精密化を行うことで、最終的なEMマップを得る(図3).<sup>付図1)</sup> このEMマップにアミノ酸モデルを当てはめ、分子モデルを構築し、EMマップに最適にフィットさせることで、原子レベルの構造情報を得ることができる(図3).<sup>付図1)</sup>

cryo-EM 解析において最も興味深いプロセスの1つが、3次元クラス分け(3D classification)である。この手法を用いることで、解析対象の分子が複数の異なる構造状態を持つ場合、それらを分離し、個別に解析することが可能となる。例えば、RyR2の解析では、特に膜貫通領域に焦点を当てるため、それ以外の領域をマスク(mask)で隠した状態で3D classificationを行っている(図4).<sup>付図2)</sup> その結果、RyR2はチャンネルが開いた状態と閉じた状態の2つの異なる構造クラスに分かれた(図4).<sup>付図2)</sup> この試料は低Ca<sup>2+</sup>条件で撮影されたものであり、生理的にはチャンネルの開閉状態が共存する可能性があることが知られている。このため、3D classificationによって得られた結果は、生体内でのRyR2の動的な構造変化を忠実に反映していると考えられる。この

ように、cryo-EMでは3D classificationを活用することで、単一の静的な構造にとどまらず、複数の機能状態を持つタンパク質の動的な構造変化を捉えることができる。これは従来のX線結晶解析では難しかった、タンパク質の柔軟な構造変化を解析するうえで、cryo-EMが強力なツールとなることを示している。

## 5 今後残された課題

これまでの記述を通じてcryo-EMによる膜タンパク質解析の革新性を実感していただけたかと思う。しかし、cryo-EMは依然として発展途上の技術であり、更なる改善の余地がある。そのなかでも最大の課題の1つは、構築したモデルの妥当性を評価する方法が未だ確立されていない点にある。X線結晶解析では位相問題が存在するため、正しいモデルを構築することで位相の改善が可能となり、最終的に確からしいマップが得られる。また、R因子などの確立した指標を用いることで、構築したモデルの妥当性を評価できる。

一方、cryo-EMでは、計算によって得られたEMマップが解析結果の全てであり、X線結晶回折のよ

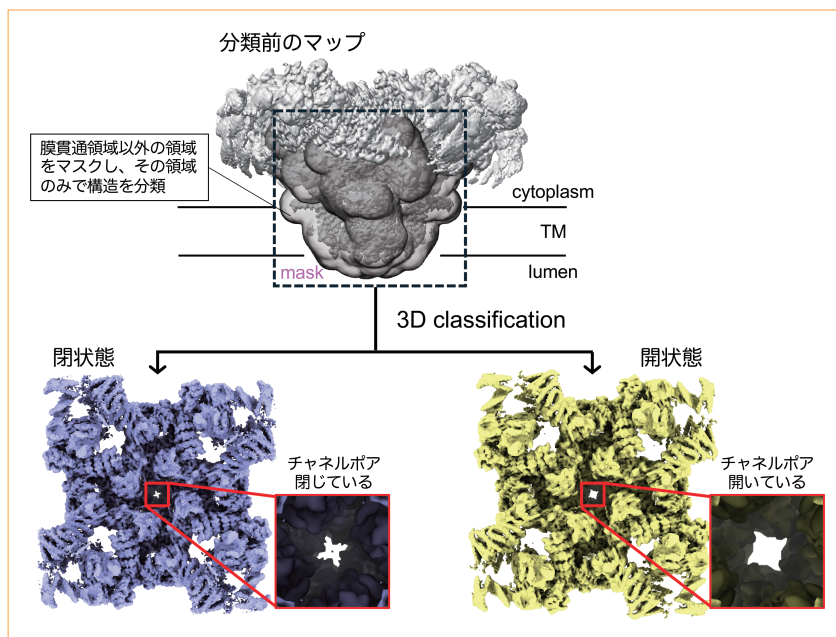


図4 3D classification の実際

J-STAGE ではカラーでご覧いただけます(付図2)。

うに位相改善によるマップの精度向上は望めない、そのため、得られたマップの精度がそのまま解析の限界を決定づけることになる。また、構築したモデルの信憑性を評価するために、マップとモデルの相関係数などの指標が用いられるが、計算されたマップ自体に誤りが含まれている場合、それをもとに構築されたモデルも不完全になる可能性がある。そのため、cryo-EM 解析では、得られたマップの信頼性を慎重に評価し、他の補助的データと組み合わせながら解析を進めることが重要である。実際、近年では多くの X 線結晶解析の経験がない研究者が cryo-EM での解析に参画した結果、たとえ一流の学術誌に掲載された構造であっても、筆者らが確認した限りでは問題のある構造が多数見受けられることがある。そのため、PDB に登録された原子モデルを完全に信用するのではなく、EM マップ(PDB からダウンロード可能)も同時に確認することを強く推奨する。

一方、あまり知られていないかもしれないが、X 線結晶解析と cryo-EM では「観測対象」が異なるという重要な違いがある。X 線結晶解析では X 線が原子の電子雲によって散乱されるため、得られるのは電子密度マップである。したがって電子密度は原子番号に比例し、重元素ほど強い電子密度が観測される。それに対し、電子線を用いる cryo-EM では、電子雲だけではなく原子核も散乱に寄与する。そのため、得られる EM マップのコントラストは単純に原子番号に比例するものではなく、X 線結晶解析の電子密度マップとは異なる特徴を持つ。X 線結晶解析では、タンパク質に結合した特定の金属イオンを同定するために、異常分散効果を利用することができる。これは金属イオンに由来する特定の波長の X 線を照射することで生じる散乱の違いを解析し、特定の金属種を識別する手法である。一方、現在のところ cryo-EM では、特定の金属イオンを直接同定する確立された手法は存在しない。しかも前述の通り、得られる EM マップのコントラストは原子番号に単純に依存しないため、X 線結晶解析のように金属種を特異的に識別することは困難である。

現状では、cryo-EM によるタンパク質の立体構造解析には分子量の限界がある。特に、小分子の解

析は難しく、現在の技術では約 50 kDa が下限とされている。これは、cryo-EM で得られる画像のコントラストが分子量の減少に伴い低下し、ノイズに埋もれやすくなるためである。また、分子が小さいと試料の向きを特定することが困難になり、解析の精度が低下することも要因の 1 つである。一方で、Fv、Fc、ナノボディーなどの抗体フラグメントとの複合体を形成させることで、cryo-EM の適応範囲を小分子にも広げる試みが進められている。

## 6 おわりに

cryo-EM による解析にはまだいくつかの問題点はあるものの、Structure-Based Drug Design (SBDD) による創薬にも応用可能であり<sup>21)</sup>、膜タンパク質の立体構造解析において今後も極めて重要な技術であることには間違いない。本稿を読んで興味を持たれた読者の方々には、ぜひ積極的にこの技術を活用していただければと思う。

### 参考文献

- 1) Kühlbrandt W., *Science*, 343, 1443-1444 (2014).
- 2) Goehring A. *et al.*, *Nat. Protoc.*, 9, 2574-2585 (2014).
- 3) Kawate T., Gouaux E., *Structure*, 14, 673-681 (2006).
- 4) Landau E. M., Rosenbusch J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 14532-14535 (1996).
- 5) Toyoshima C. *et al.*, *Nature*, 405, 647-655 (2000).
- 6) Cherezov V. *et al.*, *Science*, 318, 1258-1265 (2007).
- 7) Pan D. *et al.*, *IUCrJ*, 9, 134-145 (2021).
- 8) Liao M. *et al.*, *Nature*, 504, 107-112 (2013).
- 9) Cao E. *et al.*, *Nature*, 504, 113-118 (2013).
- 10) Henderson R., *Q. Rev. Biophys.*, 28, 171-193 (1995).
- 11) Rasmussen S. G. F. *et al.*, *Nature*, 477, 549-555 (2011).
- 12) Liang Y. L. *et al.*, *Nature*, 546, 118-123 (2017).
- 13) Duan J. *et al.*, *Nat. Rev. Endocrinol.*, 20, 349-365 (2024).
- 14) Scheres S. H. W., *J. Struct. Biol.*, 180, 519-530 (2012).
- 15) Li X. *et al.*, *Nat. Methods*, 10, 584-590 (2013).
- 16) Kobayashi T. *et al.*, *Nat. Commun.*, 13, 2821 (2022).
- 17) Ogawa H. *et al.*, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 42, 291-304 (2021).
- 18) Dubochet J. *et al.*, *Q. Rev. Biophys.*, 21, 129-228 (1988).
- 19) Glaeser R. M. *et al.*, "Single-particle Cryo-EM of Biological Macromolecules", Inst of Physics Pub Inc, 2021.
- 20) Frank J., *Microscopy (Oxf)*, 65, 3-8 (2016).
- 21) García-Nafria J., Tate C. G., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 60, 51-71 (2020).

### キーワード

クライオ電子顕微鏡, cryo-EM, 膜タンパク質, 立体構造解析