

電子顕微鏡写真からの三次元像再構成

— 特に筋収縮などの生物物理への応用 —

若 林 健 之 (物理)

生物における運動 — 例えば筋肉収縮, 細菌の遊走, 原形質流動, 細胞分裂など — の分子レベルでの機序の理解の為に電子顕微鏡による構造解析が果たした役割は大きく, 蛋白質などの生体高分子の構造を高い分解能で観察でき, その大きさ・概形そして他の蛋白質分子との相互作用の様式などを明らかにしてきた。特に最近の進歩として電子顕微鏡写真から蛋白分子の三次元像を再構成する方法の確立があり, 電子顕微鏡法を更に強力なものとした。

これまで, 蛋白分子のグロスな形の知見は沈降・拡散・粘度, 流動複屈折, 光散乱, X線小角散乱, 偏光解消などから得られ, 分子内部のミクロな又はローカルな構造を知るには旋光分散・円二色性, 紫外・可視・赤外吸収スペクトル, ESR, NMR, 蛍光などが活用されてきたが, Perutz や KendrewらがX線結晶解析法を用いて蛋白の分子構造を解き, 構造と機能の理解を飛躍的に高めたのも, それが蛋白分子の三次元像を高い分解能で総体として明らかに出来たためであろう。

しかしX線結晶解析法は蛋白分子を結晶化し, 通常二つ以上の同型置換体を得なければならないという制約をもつ。単純な酵素蛋白は結晶化しやすいが, 複合酵素や分子集合体を作って機能するようにデザインされた蛋白(筋肉の収縮をもたらすフィラメントを構成するアクチンやミオシン, 細菌性鞭毛を構成するフラジェリン, バクテリオファージのコート蛋白など)は良い結晶が得られていない例が多い。

電子顕微鏡像からの三次元像再構成法はX線結晶

解析法のこのような弱点を克服するものとして, 蛋白のX線結晶解析法の発祥の地, 分子生物学研究所(ケンブリッジ)でKlugを中心として提起され実用段階に入った研究法である。

X線結晶解析法は蛋白分子の構造を約1 Åの分解能で明らかにできたが, 電子顕微鏡写真ではそれほど良い分解能は得られず, 装置自体の限界は約2 Åであり, 蛋白分子像は試料作製の困難もあり, 負染色法により10~30 Åの分解能が得られ, グルコース包埋法により7 Åの分解能に達している。これは蛋白分子中の α -ヘリクスの確認に十分な分解能である。

しかし生物試料のコントラストは非常に低く電顕像の画像情報としての信号/雑音比は低く, 電子計算機で画像を処理し信号/雑音比を向上させて後はじめて蛋白分子像を高い分解能で観察できる。

三次元像再構成法は複数種の蛋白の相互作用の様式を三次元的に直接観察できるので, 生物物理・生化学的研究にとって貴重な知見を与えるものであるが, 試料作製・電子顕微鏡法・画像情報処理の三つの技術を駆使する必要がある装置の制約もあるため, 現在の所, 外国では分子生物学研究所(ケンブリッジ), ロックフェラー大(ニューヨーク), ビオツェントルム(バーゼル)などで三次元再構成に成功しているにすぎないが, これからこの研究法は広く用いられるであろう。

これまで三次元像再構成法により分子構造が15~30 Å程度の分解能で明らかにされた例としてはT₄

ファージの尾部, タバコモザイクウイルス, ヘモシアニン, 筋肉の細いフィラメント, クロマトイド体, 種々の球状ウイルスなどがあり, 細菌の紫膜を構成するバクテリオロドプシンについてはグルコース包埋法を用いて7 Åの分解能が得られている。

これらの例はすべて何らかの対称性を持ち正三角二十面体対称性 (icosahedral symmetry) をもつ球状ウイルス, 二次元結晶格子対称性をもつ紫膜の他はすべてラセン対称性をもつ。ラセン対称性をもったものが成功例に多いのは, 試料を一方向から見た電顕像が三次元情報を十分含んでいる場合が多いからであり, 正三角二十面体対称性の場合には二つの独立な方向からの電顕像が要り, 二次元結晶格子の場合は試料を種々の角度に傾斜させて得た電顕像の画像情報を集積してはじめて三次元情報が揃うので, より困難な仕事となる。

私達が研究している筋肉の細いフィラメントはCaイオンによる筋収縮制御の場であり, アクチン(分子量4.2万), トロポミオシン(分子量7.0万), トロポニン(分子量8.0万)が7モル:1モル:1モルの割合で集合した(細胞内では細いフィラメント1本は46個のトロポニン分子を含む)ラセン対称性をもった分子集合体であり, 電顕像から15 Åの分解能で三次元像を再構成できる。私達は筋収縮制御の際に細いフィラメントに生じている三次元的構造変化を探る目的で細いフィラメントの収縮可能な状態(活性状態)を代表するアクチン-トロポミオシン複合体(図1(a))と収縮できない状態(阻害状態)を代表するアクチン-トロポミオシン-トロポニンT-トロポニンI複合体(図1(b))の三次元像を再構成した。

球状に囲んだ領域はアクチン分子, 紐状に囲んだ部分はトロポミオシン分子の一部である。活性状態ではアクチンとトロポミオシンの結合がゆるいが, 阻害状態では著明に緊密となっている。

図2はアクチンとトロポミオシン(白丸は活性状態, 黒丸は阻害状態, 大きい丸は平均フーリエ法により求めた夫々の状態の位置)の相対的位置をフィラメントの上方から鳥瞰したもので阻害状態ではトロポミオシンは約10 Åだけアクチン分子の方へシフトしていることを示す。

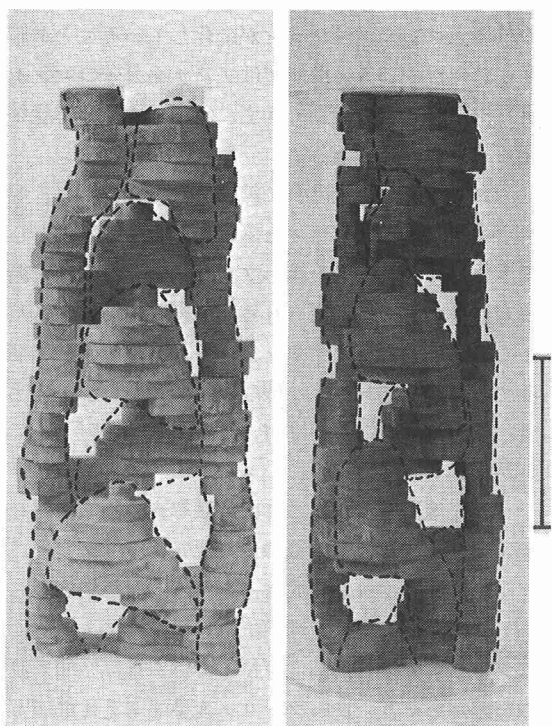


図1 筋肉の細いフィラメントの活性状態(a)と阻害状態(b)の三次元像 (分解能15 Å, 右のスケールは50 Å)

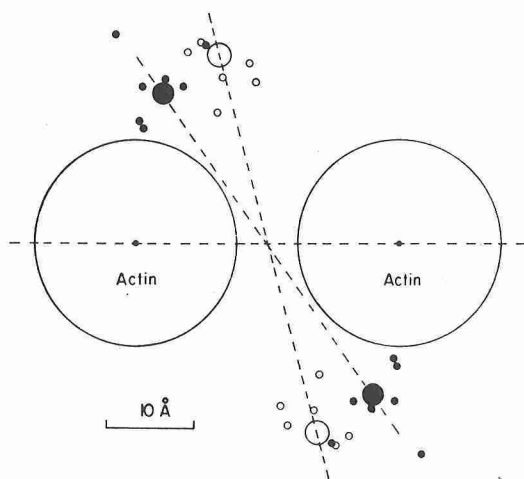


図2 筋肉の細いフィラメントにおけるアクチンとトロポミオシン(白丸は活性状態, 黒丸は阻害状態)の鳥瞰図

こうして収縮阻害が生ずる際トロポミオシン分子の位置とコンホメーションが変化していることが確認されたが、 15\AA 分解能ではアクチン分子のコンホメーション変化は識別できず、現在 10\AA の分解能を得るべく努力している。

これらの知見と筋肉のX線回折像の知見から、トロポミオシンがアクチンと緊密に結合する結果として太いフィラメントと細いフィラメントの安定な結合が立体障害的に邪魔されるために収縮阻害がもたらされるとする「ステリック・ブロック仮説」が筋収縮制御の分子レベルの機序の作業仮説として提唱され検討されている。(cf. Nature(1975) Vol. 256, 543-544)

三次元像再構成のためには電顕写真の画像情報をデジタル化し大型計算機で二次元フーリエ変換、フーリエ・ベッセル合成などを行う。計算機によるフーリエ変換の前に、光回折計を用いてアナログ的にフーリエ変換し、画像の持っている最高空間周波数を確かめたり、良いフーリエ変換を与える電顕写真を迅速に選択する。

画像のデジタル化には自動二次元マイクロデンストメーターを用い、数万～数十万点での光学密度を測り、デジタル化された画像情報を一旦磁気テープに貯え、大型計算機に入力する。このようなデンストメーターは約五千万円で市販されているが、私達はこれを科研費一般研究(B)、特定研究の援助を受け、物理教室の回路室・金工室の協力の下に約2年がかりで製作した。計算のためのプログラムはFORTRAN 語で約四千行であり、計算の中間結果の保存のために6メガバイトのファイル領域を利用し、計算は多くのステップでの中間結果をチェックしながら進めるので、電話回線を用いた公衆網TSSの利用により研究室と大型計算機センターを結びつけて能率を上げている。

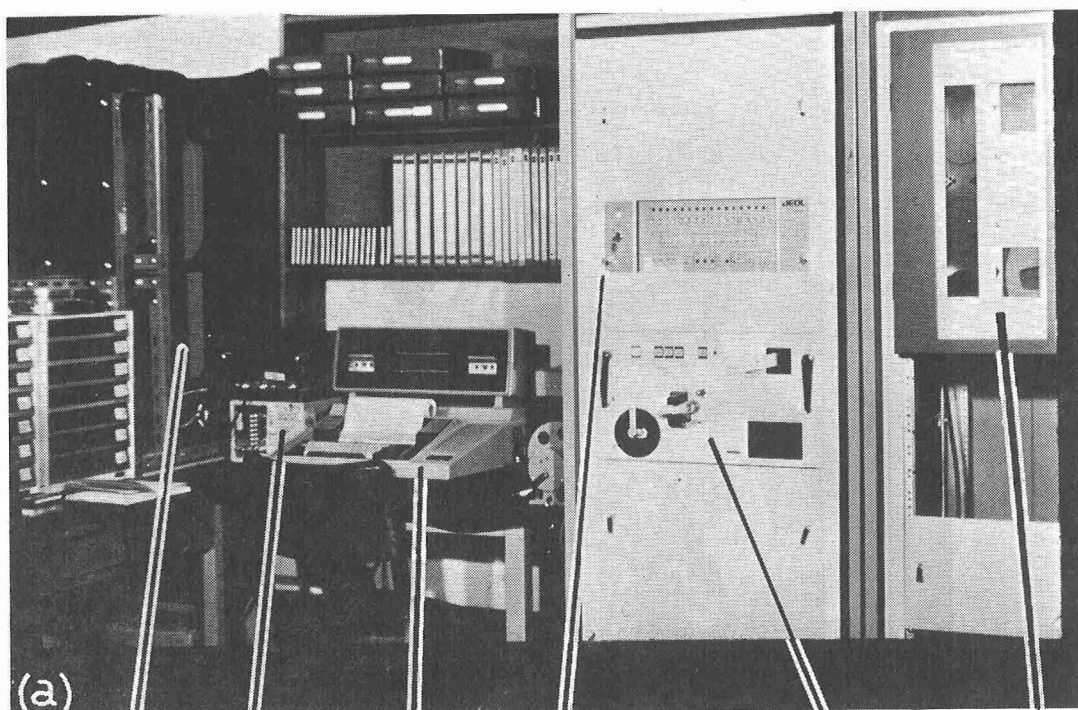
こうして作り上げたささやかな画像解析システム(図3)を用いて、大学院生の白木原康雄君と私は細菌が遊走するのに使っている鞭毛の構造解析を飯野教授(植物)が分離された直線型鞭毛について行い、 20\AA の分解能で三次元像を再構成するのに成功した(図4)。得られた三次元像は期待以上のもので、鞭毛を構成する蛋白フラジリンは分子集合体

に組み込まれると二つの異なる形をとることが直接的に証明され、分子間には極めて著明な相互作用があることも示された。現在は 12\AA 分解能のフーリエ合成の作業が進行している。

これ以上電顕写真の分解能を高めることは市販の電子顕微鏡をそのまま用いるのでは難しいので大学院生の窪田道典君と私は二次元電子増倍板(micro-channel plate)を電子顕微鏡の鏡筒中で用いて試料への電子照射量の最少化する研究を進めており、これを用いて筋肉の細いフィラメントや細菌性鞭毛の構造を 10\AA より良い分解能で明らかにすることを目指している。

三次元再構成法は電子顕微鏡写真をその出発点としており、そこに生ずる可能性のあるアーテファクトについて慎重に考慮すべきで、電顕写真のフーリエ変換とX線回折像との類似性に着目し、同一試料について電顕観察とX線回折法とを並行して行うことが重要であり、これまでも筋肉の細いフィラメント、タバコモザイクウィルス、紫膜などでは両方法のデータを比較しつつ研究がなされ、得られた三次元像の解釈をより容易で安全なものにしてきている。X線回折像は試料のフーリエ変換の強度を与えるが位相角は与えない。一方電顕写真のフーリエ変換はその両方を与えるので、フーリエ解析を基軸とした三次元像再構成法とX線回折法を組み合わせることは魅力があり、特にシンクロトロン放射(SOR; Synchrotron orbital radiation)によるX線は平行性のよい強力なX線源であり、収縮しつつある筋肉の筋フィラメントの小角への回折像を 10 msec の時間分解能で記録でき、時間分解能のほとんどない電子顕微鏡法の弱点を補うことができる。現在ドイツ・シンクロトロン(DESY)を用いた研究が欧州分子生物研究所(EMBL)で始められているが、一日も早い日本のフォトン・ファクトリー計画の実現を私達は待っている。

先に電子顕微鏡法における試料への電子照射量最少化についてふれたが、それは生物試料が電子照射により傷害を受けるためである。電子で物を見ようとする場合、試料が電子によって傷害を受けるのならば、一旦試料に当てた電子からは最大限の情報を絞り取るべきであり、このような目的に適った電子



(a)

DENSITOMETER

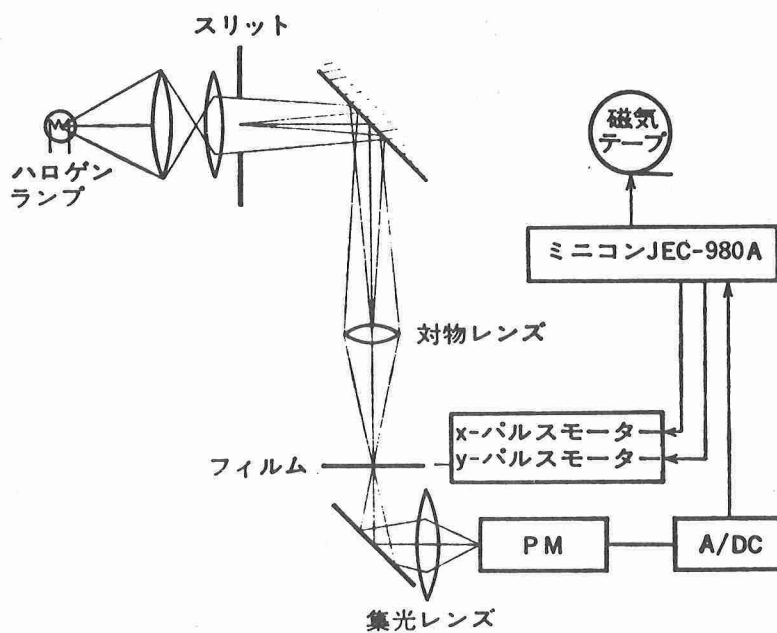
PULSE MOTOR DRIVER

KEY BOARD PRINTER/CASSETTE MT

MINI-COMPUTER

PAPER TAPE PUNCH/READER

MAGNETIC TAPE DRIVE



(b)

図3 画像解析システム全景(a)とデンストメーターのブロック図(b)

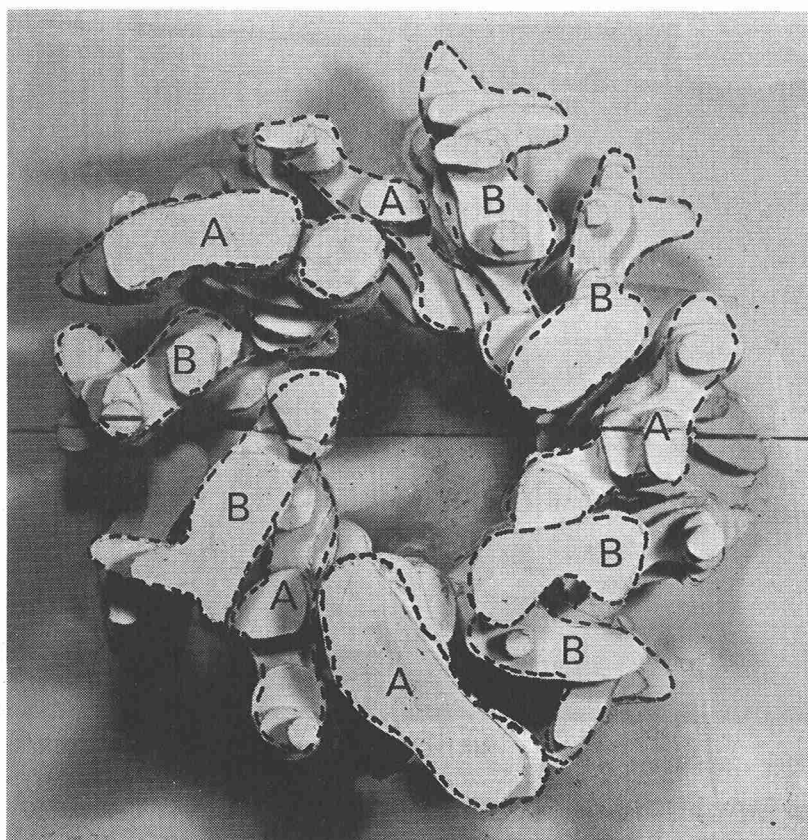


図4 サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の鞭毛の三次元像 (分解能 20Å , 右のスケールは 50Å) の鳥瞰図。点線でフラジェリン分子を囲んである。A, B 2つのコンフォメーションがある。

顕微鏡として透過型走査電子顕微鏡 (STEM; scanning transmission electron microscope) がある。

STEMはGrewe (シカゴ大) らによって開発された電子顕微鏡で冷電界放射電子銃を用い、電子ビームを 3Å 以下に絞って試料に当て、弾性散乱と非弾性散乱を散乱角の差によって分別し、非弾性散乱した際のエネルギー損失を測定することにより散乱を起させた原子の核種を区別できる。これらの特色は生物試料の低いコントラストを向上させる上にも有用である上、画像情報を写真フィルムを媒介とせず直接に得ることができる点でも三次元像再構成法にマッチした型の電子顕微鏡と云える。一億円近くするとはいえ、日本の大学では一台も稼動していないのは残念なことであり、様々な可能性を秘めたこの電子顕微鏡と三次元像再構成法の結合による新たな飛躍を期したい。

医学部から数年前に物理教室へ移って来た時、私達はいくつかの期待を持っていたが、特に物理の方々の発想法、研究方法や実験技術を「門前の小僧…」式に習うこともその一つであった。

実際、私達が自動マイクロデンストメーターを自ら組み立てる際にミニコンピューターによるオンライン制御の手法を学ぶことにより、比較的容易に高性能で信頼性のある装置を極めて安価に作る事が出来たのは、物理教室という環境のお蔭にほかならない。私達はこれからも生体における運動の分子レベルでの機序をとことんまで理解することを目指して研究する中で、ある場合は電子シンクロトロンのお世話になり、電子と生物試料との相互作用を考えたり、分子遺伝学の力を借りたりする必要に迫られることになるかと存じますが、どうぞこれからも宜しくお願い致します。

(1977.1.3)