

2017年ノーベル化学賞

山野 昭人*

2017年のノーベル化学賞は、米国コロンビア大学のヨアヒム・フランク (Joachim Frank)、フランスローザンヌ大学のジャック・ドゥボシエ (Jacques Dubochet)、英国MRC分子生物学研究所のリチャード・ヘンダーソン (Richard Henderson) に贈られた。受賞理由は「溶液中の生体分子を高分解能で構造決定できるクライオ電子顕微鏡法の開発」だった⁽¹⁾。

蛋白質の高分解能の3次元分子構造は、生命現象そのものの理解や、それに付随する病変の原因の特定や治療に必須である。特に医薬品の開発では、医薬品候補化合物の構造の最適化の指針を得るための、最も強力な情報となる。化合物と標的蛋白質の原子レベルでの相互作用や、化合物周辺の空間や環境が分かると、化合物の改良の明確な指針を得ることができるためである。

従来、蛋白質分子の原子レベルでの構造解析は、単結晶X線構造解析とNMRが主な分析手法であった。電子線回折法やコンピュータトモグラフィー (CT) など、電子線を使った構造解析も行われてはきたものの、これまで主役となることはなかった。いずれの方法も、電子線の照射による高分解能の構造解析は、真空中に試料を置かなければならない、電子線によるダメージに耐えなければならないなど、蛋白質分子を水和した状態で見るという観点からは、決定的な欠点があったためである。加えて、水を主成分とする溶媒領域と、主に軽元素からなる蛋白質分子とのコントラストが低いという原理的な問題や、蛋白質分子に電子線を照射すると、電子との相互作用や温度により蛋白質分子が動いてしまうという問題もある。後者は比較的小さい蛋白質でより顕著である。しかしながら2013年を境に、電子顕微鏡による構造解析は大きな転換を果たした。いまや蛋白質分子の原子レベルでの構造解析手法の花形に躍り出た。この大転換の要因はいくつかあるが、数々のソフトウェア・ハードウェア・測定手法の開発改良の積み重ねにより、電子線回折法とCTに続く第3の電子顕微鏡による解析手法、いわゆる単粒子解析での近原子分解能での構造解析が可能と

なったためである。単粒子解析では非常に薄い非晶質の水の中に、溶液中に単分散で存在している蛋白質分子を包埋した状態を作成する。この凍結した多数の蛋白質分子に電子線を照射することで、様々な方向を向いた蛋白質分子の画像が得られる。得られた2次元透過像を再構成することにより、3次元の分子構造を得ることができるのである (図1)。電子顕微鏡による単粒子解析が得意とするターゲットは、単結晶X線構造解析がどちらかというと不得手とする、巨大蛋白質複合体であることも現在の隆盛の理由の一つである。巨大蛋白質複合体は、単結晶X線構造解析に必須となる結晶化が困難である場合が多い。また運よく単結晶が得られても、長大な結晶格子や結晶性に起因する回折点の空間分解能や光学的分解能、位相決定などの困難が付きまとう。しかしながら、単粒子解析では元来実像を扱うため、逆空間から実空間へのフーリエ変換に必要となる、回折強度の測定と位相情報の取得という結晶学的な問題は、原理的に存在しない。

2017年のノーベル化学賞の受賞者3人は、電子顕微鏡による単粒子構造解析のパイオニア的な研究や、単粒子構造解析に必須な手法の開発を行った。

電子顕微鏡により近原子レベルでの高分解能構造を得られることを、最初に示したのがリチャード・ヘンダーソン (Richard Henderson) である⁽²⁾。1975年当初は7 Å分解能という低分解能の構造であったが、15年後の1990年には、凍結した2次元結晶を用い、クライオ電子顕微鏡のCT画像を再構成して得られた構造からの位相情報と、電子線回折で得られた回折強度とを組み合わせ、3.5 Å分解能の高分解能構造に到達した。

水の中にランダムに分散した、対称を持たない蛋白質分子の構造決定における基本的な問題は、S/Nの悪い画像から形状の特徴をつかんで分類しなければならない点にある。ヨアヒム・フランク (Joachim Frank) らは相互相関関数を用いることにより異なる構造をとっている分子を分類し、各々得られた多数の画像を平均化することにより高解像度の像が得られることを示した。Frankはその他一連のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析の基礎となるツールを開発し、SPIDERと呼ばれるプログラムパッケージにまとめて公開する

*株式会社リガク 応用技術センター

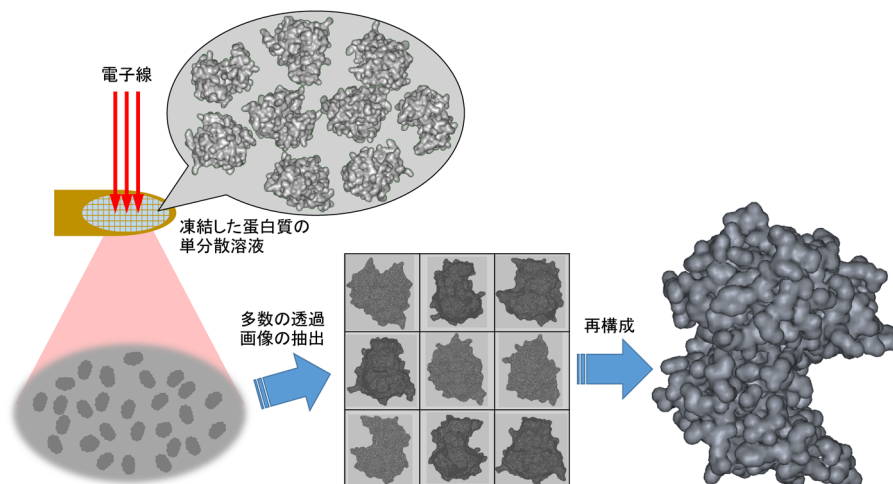


図1. クライオ電子顕微鏡による単粒子解析の概念図。蛋白質の単分散溶液の凍結した剥片に電子線を照射し、多数の分子の透過画像を取得。さまざまな方向を向いた蛋白質分子の透過画像を抽出し、平均化や再構成することで分子の高分解能3次元分子構造を得ることができる。

ことにより、クライオ電子顕微鏡による蛋白質構造解析に多大な貢献をした。

上記で述べたように、蛋白質分子の電子顕微鏡による単粒子解析の問題点は、水和した状態を真空中で保たなければならないこと、電子線照射によるダメージに耐えなければならないことである。ジャック・ドゥボシエ (Jacques Dubochet) は、この問題の解決に大きく貢献した。蛋白質溶液を薄膜状にして急速凍結すると、ガラス化することを示したのである。これによりコントラストが改善したばかりか、真空中でも水和状態が保たれ、加えて蛋白質溶液を薄い薄膜状にして急速凍結することにより、蛋白質分子が重なり合うことなく、多数かつ様々な方向を向いた蛋白質分子の画像の取得を可能とした。Dubochetが開発した蛋白質溶液の凍結方法は瞬刻間に広まり、単粒子構造解析ばかりかCTにも採用され、現在に至っている。

3人の業績を振り返ると、単粒子解析の理論的、実験的な基本技術は2013年以前に確立されていたことになる。ではなぜ2013年を境に飛躍的に解析数が増えているのだろうか。複数の理由があるのだと思うが、装置メーカーの一員として挙げたいのは、電子線直接検出型の検出器の採用である。電子線直接検出器の高いS/Nにより、従来と同様な電子線の照射量でも飛躍的に高質な透過像が得られるようになった。逆に電子線を弱めても従来と同様な画像が得られるため、試料へのダメージを減らすことも可能となった。さらに、電子線照射時の電子の衝突や温度変化による蛋白質分子の揺らぎも、動画として撮影することにより克服された。要素技術の進歩が決定的な役割を果たしたのである。

電子顕微鏡による単粒子解析は、2018年現在、構造生物学分野で最も注目を集めている分析手法であ

る。著名な結晶学者も、電子顕微鏡による構造解析を採用しはじめている。ほとんどの結晶学者は、X線構造解析との併用が望ましいとの見解を持っているが、中にはX線不要との見方をする研究者も出てきている。しかしながら、電子顕微鏡による単粒子解析にもいくつかの問題点がある。一つは手法として比較的新しいために、測定解析を行える研究者・技術者の数が不足している点である。結晶化も不要、結晶学も不要との事から、誰でもすぐに使える手法であると思われるが⁽³⁾、実際には試料の調整を始めとし、訓練を受けた技術者でなければ適切な試料の準備や解析ができないのが現状である。

解析の間違いが生じうるという指摘もある⁽⁴⁾。クライオ電子顕微鏡では、実空間で分子そのものの構造を見ているとはいえ、S/Nの低い2D画像から透過像を抽出する段階で、テンプレートの形状の影響を大きく受ける可能性がある。クライオ電子顕微鏡による構造解析と単結晶X線構造解析による反応機構が異なっていた例として、イノシトール-1,4,5-トリスホスフェート (IP₃) 受容体 (IP₃R) の解析が挙げられる。IP₃Rは細胞質ゾルCa²⁺シグナル伝達に関与し、筋収縮や分泌、細胞の増殖から細胞死に至る幅広い細胞プロセスに必須の遍在的なイオンチャネルである。2015年米国のグループがクライオ電子顕微鏡の単粒子解析により決定した構造をNature誌に掲載したが、イオンチャネルのアロステリック機構のメカニズムを特定することはできなかった⁽⁵⁾。一方理化学研究所のグループはIP₃とIP₃RのIP₃結合部位からCa²⁺チャネル部位にまたがる遺伝子工学的に改変した一連の巨大細胞質ドメインの構造解析により、IP₃の結合による構造変化が、3つの α -ヘリックス領域HD1~HD3を伝搬し、最終的にHD3領域にある21アミノ酸残基からなる「小

葉型構造」を通じてCa²⁺イオンチャンネルに伝わることを明らかにした⁽⁶⁾。このIP3の構造解析の経緯から、電子顕微鏡による単粒子解析法一辺倒ではなく、単結晶X線構造解析など確実に正しい答えを導き出す手法を併用すべきとの警告も発せられている。

科学的・分析的な問題ではないが、構造生物学用電子顕微鏡は非常に高価であるという問題もある。単粒子解析用の電子顕微鏡市場は、現在、FEIが市場を席捲しており、競争がないためである。日本の電子顕微鏡メーカーもようやく市場への参入を開始したが、試料凍結から測定・解析を含む全体的なシステムとして同等となるには、更なる注力と時間を要すると思われる。自動測定や大量の画像データの高速処理という、ハードウェア偏重の傾向がある日本のメーカーが不得手とする、広義のソフトウェア上の課題が大きいためである。

単結晶X線構造解析で得られる、高分解能の構造の有用性は議論を待たない。一方単粒子解析は結晶化が不要であるとの強みから、巨大蛋白質複合体や、結晶化が困難な柔軟性の高い蛋白質分子の構造解析が得意

である。重なる領域はあるものの、基本的に両手法は相補的な手法である。単結晶X線構造解析とクライオ電子顕微鏡による単粒子解析の併用により、構造生物学の進歩は今後ますます加速して行くものと期待される。

参考文献

- (1) The Royal Swedish Academy of Sciences (2017) “Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2017”, https://6702d.https.cdn.softlayer.net/2017/10/sciback_ke_en_17.pdf.
- (2) R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K. H. Downing: **213** (1990), *J Mol Biol*, 899–929.
- (3) たとえば https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/press.html
- (4) R. Henderson: **110** (2013), *Proc Natl Acad Sci USA*, 18037–18041.
- (5) G. Fan, M. L. Baker, Z. Wang, M. R. Baker, P. A. Sinyagovskiy, W. Chiu, S. J. Ludtke and I. I. Serysheva: *Nature*, **527** (2015), 336–341.
- (6) K. Hamada, H. Miyatake, A. Terauchi and K. Miko-shiba: *Proc Natl Acad Sci USA*, **111** (2017), E3966–E3975.