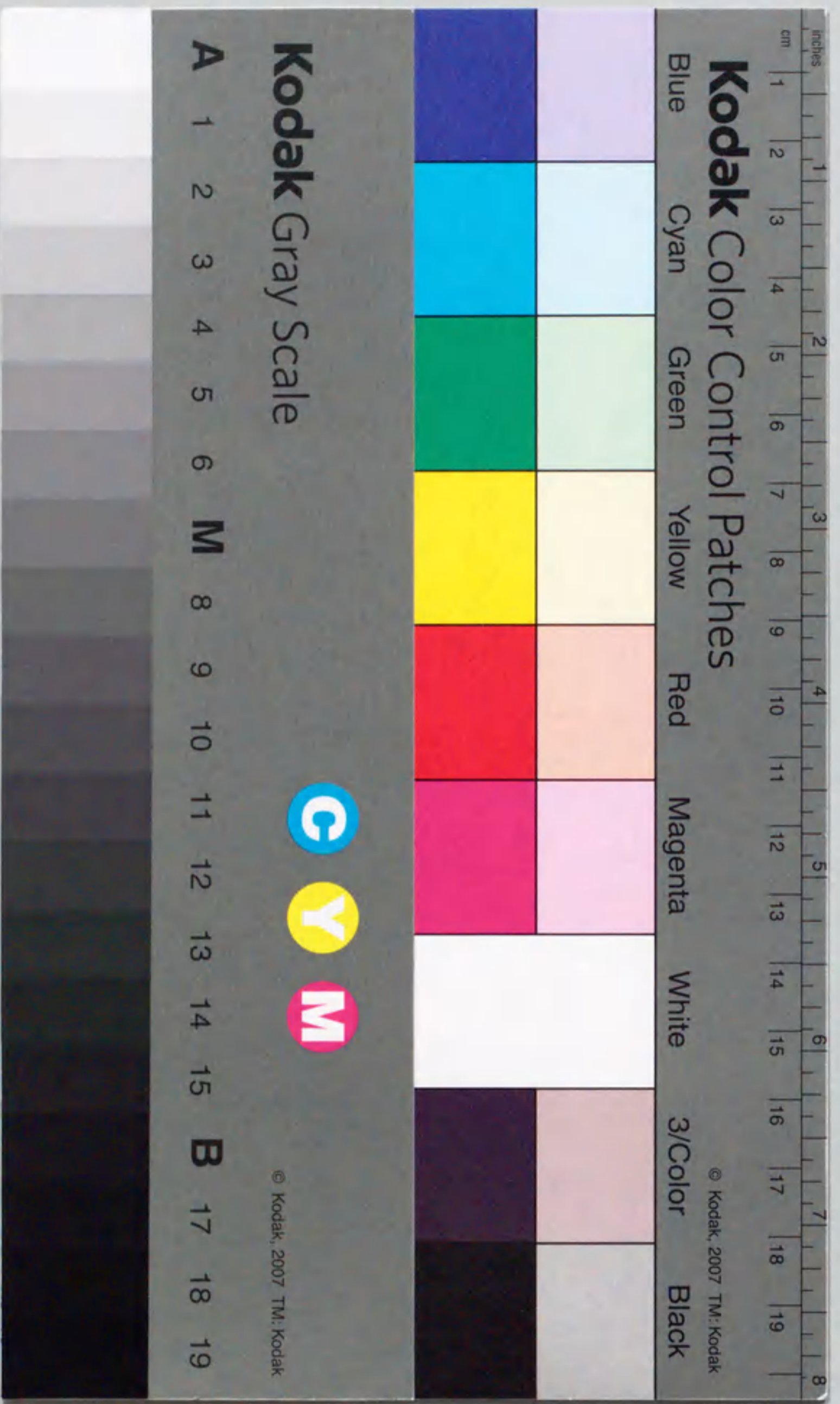


報告番号 乙第 5645 号

電子線結晶学による
バクテリオロドプシンの構造解析

平井 照久



①

電子線結晶学によるバクテリオ
ロドプシンの構造解析

平成 11 年

平井照久

要約

バクテリオロドプシン (以下 BR) は高度好塩菌の中に紫膜として存在する 7 本ヘリックス膜貫通型の蛋白質で光のエネルギーを利用して細胞の外へプロトン汲み出すプロトンポンプである。このバクテリオロドプシンは Henderson らにより 1990 年に 3.5 Å 分解能で電子顕微鏡法により初めて立体構造が報告された。本研究では試料の包埋方法を始め試料作製法を工夫した解析システムの改善を行った結果、ループ領域の構造も含め 3.0 Å 分解能での構造解析に成功した (Kimura *et al.*, 1997) (PDB コード: 1AT9)。さらに精密化されたモデルも既に PDB (Protein Data Bank) に登録されている (Mitsuoka *et al.*, 1999) (2AT9)。

試料作製法に関しては例えばカーボン支持膜の作製には、蒸着の基盤には雲母のへき開面をへき開してすぐに使い、またカーボンロッドには純度の高い (99.9999% 以上) のものを使用するなど注意した。また電顕用グリッドには特別にデザインし加工されたモリブデン製のグリッドを使用し (Fujiyoshi, 1998)、カーボン膜が急速凍結時のグリッドの収縮により歪んだりエッジの加工が荒いためにしわがよったりしないようにした。これらの工夫は 2 次元結晶の平面性を保つために重要で一般に 60 度傾斜前後が限界なところ 70 度傾斜までの回折データを収集できた。本研究では従来のグルコース包埋法 (Unwin and Henderson, 1975) と比較検討した結果、凍結時の BR の分子構造をなるべく維持するためにトレハロース包埋法を採用した (Hirai *et al.*, 1999)。トレハロースは 2 分子のリグルコースが結合した 2 単糖で特に乾燥や凍結の中を生き抜く動植物に広く多発的に使用され、そういった極限の状況下でも水を置き換えて生体の構造を保つと考えられている (Roser, 1991)。実際に BR に対してグルコース包埋とトレハロース包埋それぞれにおいて乾燥を充分に行なったものを行なわなかったもの 2 種類を用意し計 4 つの場合で 10 数枚づつ回折像を撮影し比較した。この時、平均化されたデータからのバラツキを示す R_{merge} の値を比較すると半乾燥状態のトレハロース包埋での値がもっとも小さく好ましいことが分かった。本研究で得た BR の構造と以前の構造とを比較すると膜貫通部分のヘリックス領域では構造に大差なかったが、膜表面に露出しているループ領域では本研究の構造の方が明瞭に観察され新しく短い反平行ベータ構造が含まれることも明らかになった。これには電子顕微鏡の性能の良さ (Fujiyoshi *et al.*, 1998) や 2 次元結晶の平面性の改善によるデータの完全度 (completeness) の向上に加え包埋剤の違いも反映していると考えられる。

本研究では最終的に全傾斜合わせて、像と回折像それぞれ 200 枚前後のデータをマージし密度図を計算したが、そこに至るまでにはデータの取り込みやその解析処理の効率向上も重要であった。回折像の撮影には画素数が $1k \times 1k$ さらに $2k \times 2k$ のスローキャン CCD カメラ (Gatan 社製) を採用した。フィルムから回折データを読み込んでいた時と比べ強度の測定精度が上がりまたリアルタイムに回折像の良否が判断でき収集効率が格段に向上した。特に $2k \times 2k$ のサイズの大きい CCD を使用した時はカメラ長を $1k \times 1k$ の時よりも長くとれ回折点間の分離も十分となり R_{prede} や R_{merge} の値が $1k \times 1k$ のものと比べても 1/2 近くに良くなった。実像のフィルムのスキャンには 1 次元 CCD 型のスキャナである Leafscan (日本サイテックス社製) を使用することにより従来の点照射型のマイクロデンシトメータでは 1 枚に 8 時間程かかっていたスキャン時間を 20 分程にまで短縮できた。1 次元的に光をあてるために光のにじみだしなどのために量子検出効率 (DQE) が 0.8 から 0.5 に下がったが、これは操作性の良さやスキャン時間の短さで十分補える範囲のものであった (Mitsuoka *et al.*, 1997)。回折像の解析には主として Henderson らが開発した MRC パッケージ (Crowther *et al.*, 1996) を使用した。本研究ではさらにそのためのグラフィカルユーザインターフェースとしてプログラム XDP を開発した。このイン

ターフェースには本研究で MRC パッケージに対し補足的に追加したビームストップ部分の切り出しや大局的バックグラウンド補正のための面フィッティングなどの実行も組み込まれている。回折点積分用および局所的バックグラウンド計算用ボックスの効率的な決定にも有効であった。実像の解析にも MRC パッケージを使用した実行時間の長いジョブも多く効率よく最適なパラメータを引き渡してジョブを起動するためのインターフェースを開発し使用した。また結晶性のよい領域を画面上で解析情報を見ながら多角形に切り出すための専用グラフィカルユーザインターフェースも用意した。

電子顕微鏡法の 1 つの特徴として電荷により特に低角 (低分解能) 側で散乱因子が大きく変化することが知られており、本研究ではそれを利用して残基の電荷状態を議論した。プロトンポンプのメカニズムを原子レベルで理解するためには残基の電荷状態を知ることは必須である。この議論にはモデルの精度向上が不可欠であったが本研究で行われたモデルの精密化によりこれが可能となった (Mitsuoka *et al.*, 1999)。精密化には X-Plor (Brünger, 1992) を使用した。X-Plor で電子線の原子散乱因子 (atomic scattering factor) を使用するためには 4 つの Gauss 関数と 1 つの定数で原子散乱因子を近似することが求められている。International Tables for X-Ray Crystallography (Vol. IV の 155 ページ以降) に載っている電子線用の数値をもとにプログラム SCATTER (Ceska, 1994) を使用してこの近似を行なった。精密化には 3.0 Å までのデータを使用した振幅情報だけでは充分ではないので位相情報も利用した。電荷の状態を議論するには低角の情報に依る必要がある。実験の密度図 ($|Fo|$ 密度図) とモデルからの密度図 ($|Fc|$ 密度図) が高角部分で異なると電荷の議論ができなくなるので高角部分を使ってモデルをよく合わせ込んだ。8.0 Å から 3.0 Å の範囲で R 因子 (R-factor) は 23.7%、自由 R 因子 (free R-factor) は 33.0% であった。電荷の有無で低角における散乱因子が大きく違うので、 $|Fo|$ 密度図と中性の散乱因子を使用して計算した $|Fc|$ 密度図とは低角部分も含めて計算すると電荷の存在する部分で差がでるはずである。実際その差である $|Fo| - |Fc|$ 密度図を計算したところ主に主鎖の周辺に差が現れこれは主鎖の極性グループが分極しているためと考えられた。主鎖の極性グループが中性ではなく 50% 分極していると考えた時、R 因子が最も良くなり $|Fo|$ 密度図と $|Fc|$ 密度図の差も小さくなり最もよく実験データを説明できることが確認された。この分極の値は X-Plor などの分子動力学で使用する分極割合にもほぼ一致するものである。全データ領域 (54 Å から 3 Å) を使用して計算された $|Fo| - |Fc|$ 密度図において主鎖の周辺以外にもいくつかの残基の周辺で 3.5σ レベル以上の強いピークが見られた。これらのピークは 5 つの酸性残基 (Asp36, Asp102, Glu74, Glu194 と Glu212) の周辺に存在した。低角領域のデータからの影響が主なために必ずしも原子の位置は正確ではないかも知れないが、低角領域を含めることにより底上げされたことからこの周辺に正電荷を持つ原子があると考えられる。 $2|Fo| - |Fc|$ 密度図の見えかたを合わせて検討することによりこの 5 つの正電荷を持つ原子は 2 つに分類できた。1 つは $2|Fo| - |Fc|$ 密度図の 1σ レベルが同じ位置にはっきりと現れるものでカチオンと結合していると考えられ、Asp36 と Asp102 がこれに当てはまる。もう 1 つは $2|Fo| - |Fc|$ 密度図の 1σ レベルがやはり存在するが同じ位置ではなくすぐ横に (1.0 Å 程離れて) 存在するもので分極した水分子または水酸基と考えられ、Glu74, Glu194 と Glu21 がこれに当てはまる。これらの電荷分布の状態に基づいて光サイクルの初期段階における Asp85 から Glu204 へ繋がる水素結合のネットワークにおける電荷状態の変化を議論した。

目次

1. 序論	9
1.1. プロトンポンプ, バクテリオロドプシン	10
1.1.1. バクテリオロドプシン	10
1.1.1.1. 構造解析の歩み	10
1.1.1.2. 高度好塩菌と紫膜	10
1.1.1.3. 光受容蛋白質とレチナル	12
1.1.1.4. 明順応と暗順応	12
1.1.2. ポンプメカニズム	13
1.1.2.1. チャネルの構造	14
1.1.2.2. 光サイクル	14
1.1.2.3. スイッチ	15
1.1.2.4. 変異体と残基の役割	16
1.1.2.5. 中間体と構造変化	17
1.2. 電子線 2次元結晶解析	18
1.2.1. 電子顕微鏡法	18
1.2.1.1. 波長と分解能	18
1.2.1.2. レンズと収差	19
1.2.1.3. 弾性散乱と非弾性散乱	22
1.2.1.4. 振幅コントラストと位相コントラスト	22
1.2.1.5. コントラスト伝達関数	22
1.2.2. 極低温電子顕微鏡	23
1.2.2.1. 相互作用と損傷	23
1.2.2.2. 試料温度	23
1.2.2.3. 電子線源	24
1.2.3. 膜蛋白質と2次元結晶	24
1.2.3.1. なぜ2次元結晶か	24
1.2.3.2. 2次元結晶例	24
1.2.3.3. 2次元結晶化法	25
1.2.3.4. 対称性	25
1.2.4. 試料作製	25
1.2.4.1. 真空と試料作製	25
1.2.4.2. 急速凍結法	26
1.2.4.3. 包埋剤	26
1.2.5. 3次元再構成	27
1.2.5.1. 3次元再構成の歩み	27
1.2.5.2. 回折像	27
1.2.5.3. 実像	29
1.2.5.4. 格子線	29
1.2.5.5. ミッシングコーン	29
1.2.5.6. 双晶問題	31
1.2.6. 電子線結晶学の特徴	32
1.2.6.1. X線結晶学との比較	32
1.2.6.2. 電子線散乱因子の電荷による影響	32
2. データ収集法とその改善点	36
2.1. カーボン支持膜と電顕用グリッド	37
2.1.1. 2次元結晶の平面性	37

2.1.2. カーボン支持膜	37
2.1.3. 電顕用グリッド	37
2.2. トレハロース包埋法	38
2.2.1. トレハロースの特徴	38
2.2.2. グルコース包埋法との比較	39
2.3. スロースキャン CCD カメラとスキャナ	41
2.3.1. スロースキャン CCD カメラ	41
2.3.2. 1次元 CCD 型スキャナ	43
3. 解析システムとその改善点	44
3.1. 回折像の処理	46
3.1.1. 処理の流れ	46
3.1.1.1. ビクセル感度の補正	46
3.1.1.2. 回折点位置の補正	46
3.1.1.3. 擬似フリーデルペアの平均化	47
3.1.1.4. 傾斜角と傾斜軸の計算	48
3.1.1.5. 広域的バックグラウンドの補正	48
3.1.1.6. 回折点用および局所的バックグラウンド用ボックス	49
3.1.2. 表示システム (XDP)	50
3.2. 実像の処理	50
3.2.1. 処理の流れ	50
3.2.1.1. 光回折	50
3.2.1.2. スキャナ	50
3.2.1.3. OD 値	52
3.2.1.4. データの圧縮	52
3.2.1.5. フィルタ像	52
3.2.1.6. 相関関数	53
3.2.1.7. マスクサイズと参照領域のサイズ	53
3.2.1.8. 相関変位図	53
3.2.1.9. 歪み補正	53
3.2.1.10. CTF と TTF の補正	55
3.2.1.11. デフォーカス値	56
3.2.1.12. IQ 値	56
3.2.1.13. ビーム傾斜の補正	56
3.2.2. ジョブ実行時の入力支援ツール	57
3.3. 回折像のマージ	57
3.3.1. 変数の決定	57
3.3.1.1. スケール因子と温度因子	57
3.3.1.2. 双晶比率	58
3.3.1.3. 傾斜軸と傾斜角	58
3.3.2. 格子線のための線フィッティング	58
3.4. 実像のマージ	59
3.4.1. 変数の決定	59
3.4.1.1. 結晶学的原点	60
3.5. 両方のマージ	60
3.5.1. 格子線の計算	60
4. 結果と考察	62
4.1. モデルの精密化	63
4.1.1. 精密化の方法	63
4.1.2. ラマチャンドラン図	65

4.1.3. 温度因子.....	65
4.2. モデルの構造.....	65
4.2.1. 2次構造.....	65
4.2.2. ループ領域.....	67
4.2.3. 脂質.....	67
4.3. 電荷の観察.....	69
4.3.1. 電子線散乱因子の計算とシミュレーション.....	69
4.3.2. 主鎖での電荷の分布.....	72
4.3.3. カチオンと水分子.....	73
4.4. プロトン経路.....	75
5. 謝辞.....	77
6. 参考文献.....	78
7. 付録 A 材料と方法.....	87
7.1. 2次元結晶.....	88
7.2. 試料作製.....	88
7.3. 回折像および実像の撮影条件.....	88
8. 付録 B 像形成.....	89
8.1. 試料面.....	90
8.2. 回折面.....	90
8.3. 像面.....	91
9. 付録 C フーリエ変換の像解析への応用.....	92
9.1. フィルタリング (FILTERING).....	93
9.2. 畳み込み定理 (CONVOLUTION THEOREM).....	94
9.3. 相関定理 (CORRELATION THEOREM).....	94
9.4. 回折点の形状.....	94
10. 付録 D 回折像解析グラフィカルシステム (XDP) 使用手順概説.....	96
10.1. 回折像の登録.....	97
10.2. データ変換.....	97
10.3. 処理領域の選択.....	97
10.4. 指数付け.....	97
10.5. 格子ベクタの精密化.....	98
10.6. バックグラウンドの計算.....	98
10.7. 強度の積分.....	98
10.8. 結果のグラフ表示.....	99
10.9. その他.....	99
11. 付録 E 実像解析インターフェースツール使用手順概説.....	100
11.1. データ変換.....	101
11.2. フーリエ変換.....	101
11.3. 指数付け.....	101
11.4. マスク用格子点の選択.....	101
11.5. フィルター像と相関図の作成.....	101
11.6. 歪み補整用範囲の選択.....	102
11.7. 歪みの補正.....	102
11.8. コントラスト伝達関数の見積もり.....	102
11.9. 評価.....	102

図の目次

図 1 好塩菌と4種のロドプシン.....	11
図 2 プロトンチャネル.....	13
図 3 光サイクル.....	15
図 4 スイッチ.....	16
図 5 レンズと収差.....	21
図 6 温度と損傷.....	23
図 7 2次元結晶と包埋剤.....	26
図 8 解析全体の流れ.....	28
図 9 格子線とミッシングコーン.....	30
図 10 双晶とその比率の計算.....	31
図 11a 電子線散乱因子とポテンシャル(中性原子).....	33
図 11b 電子線散乱因子とポテンシャル(電荷を持つ原子).....	34
図 12 トレハロースの構造式.....	38
図 13 回折ピークの比較.....	42
図 14 回折像の解析.....	45
図 15 反射球と擬似フリーデルペア.....	47
図 16 XDP(グラフィカルユーザインターフェース).....	49
図 17 実像の解析(傾斜データ).....	51
図 18 歪み補正の流れ.....	54
図 19 両方のマージ.....	61
図 20 ラマチャンドラン図.....	64
図 21 密度図例.....	66
図 22 脂質の配置.....	68
図 23 負電荷によるマップの減衰.....	70
図 24 分極効果による見かけの原子位置の移動.....	71
図 25 分極割合とR因子.....	72
図 26 主鎖周辺の FO-FC マップ.....	73
図 27 カチオンと水.....	74
図 28 プロトン経路.....	75

表の目次

表 1 トレハロース包埋とグルコース包埋 (R_{model} と R_{merge} の比較).....	39
表 2 格子ベクタの分散の比較.....	40
表 3 フィルムとCCD.....	41
表 4 結晶学テーブル.....	63
表 5a 中性原子の Gaussian 係数とそのエラー.....	70
表 5b 電荷を持つ原子の Gaussian 係数とそのエラー.....	70

略語表

2D ; Two dimensional (2次元の)
3D ; Three dimensional (3次元の)
BR ; bacteriorhodopsin (バクテリオロドプシン)
CCD ; Charge Coupled Device (電荷結合素子)
CCP4 ; Collaborative Computational Project, number 4
DTAC ; Dodecyl Triammonium Chloride (ドデシルトリアンモニウムクロライド)
DQE ; Digital Quantum Efficiency (量子検出効率)
EM ; Electron Microscopy (電子顕微鏡法)
FEG ; Field Emission Gun (電界放射型電子銃)
FTIR ; Fourier Transform InfraRed (フーリエ変換赤外分光法)
HR ; halorhodopsin (ハロロドプシン)
HtrI,II ; halobacterial transducers for sensory rhodopsin I and II
LHC-II ; Light-Harvesting chlorophyll a/b-protein Complex associated with photosynthetic II (集光性クロロフィル a/b-蛋白質複合体II)
MDS ; Minimum Dose System
Mo ; Molybdenum (モリブデン)
MRC ; Medical Research Council
OD ; Optical Density
OG ; Octyl Glucoside (オクチル グルコサイド)
PGP-Me ; phosphatidyl glycerophosphate monomethyl ester with dihydrophytol chains
PDB ; Protein Data Bank
RH ; Rhodopsin (ロドプシン)
RMSD ; Root Mean Square Deviation
SEM ; Scanning Electron Microscope (走査型電子顕微鏡)
TEG ; Thermal Emission Gun (熱電子放出型電子銃)
TEM ; Transmission Electron Microscope (透過型電子顕微鏡)
TTF ; Tilt Transfer Function
S/N 比 ; Signal to Noise ration (信号対雑音比)
SR ; Sensory Rhodopsin
電顕 ; 電子顕微鏡

1. 序論

1.1.プロトンポンプ, バクテリオロドプシン

1.1.1. バクテリオロドプシン

1.1.1.1. 構造解析の歩み

バクテリオロドプシン (bacteriorhodopsin 以下 BR) は 248 のアミノ酸残基からなる1本鎖の蛋白質で7本の膜貫通ヘリックス中にレチナール(ビタミンAアルデヒド)を発色団として持っている。視物質であるロドプシン (rhodopsin) を始めとして G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptors) も BR と同じ 7 回膜貫通型の構造を持つと考えられている。1975 年に Henderson と Unwin により BR の 3 次元再構成が行われた。この時の分解能は 7Å であった。ハードウェア、ソフトウェア両面の進歩により、1990 年には Henderson らにより BR の原子モデル (PDB コード; 1BRD) が 3.5Å の分解能で報告された。中でも低温技術の確立が大きく貢献した。1996 年には精密化されたモデル (2BRD) が Gregorieff らにより報告された。1997 年には本研究による 3.0 Å の構造 (1AT9) が報告された。X 線結晶構造解析による BR の構造解析も進み、Pebay-Peyroula らは紫膜が 500 層程積層した微結晶を調整し 1997 年に 2.5 Å 分解能で構造を決定 (1AP9) した。c 軸方向の双晶問題を考慮してなかったことを問題視した Leucke らは 1998 年に 2.3 Å 分解能の構造 (1BRX) を報告した。彼らは現在 1.5 Å での精密化を進めている。他にも Essen らは有機結晶を核として結晶を成長させるエピタキシャル結晶という手法で 2.9 Å の構造 (1BRR) を得ている。本研究により精密化された 3.0 Å の構造 (Mitsuoka *et al.*, 1999) も既に PDB (Protein Data Bank) に登録されている (2AT9)。

1.1.1.2. 高度好塩菌と紫膜

BR は光駆動型のプロトン (H^+) ポンプであり、高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarium* (*Halobacterium halobium* とも言う) 中で紫膜 (purple membrane) と呼ばれる 2 次元結晶を作っている。この好塩菌は 10 億年以上も前から地球上に存在しており現在でも塩湖などに多く生息し湖を紫色にしている程である。好塩菌はこのプロトンの汲み出しにより発生し保たれるプロトン勾配による電気化学ポテンシャルを利用し細胞内で ATP を合成しまたその他の代謝や運動に必要なエネルギーを得ている。好塩菌は BR 以外に BR と相同性のある塩素イオン (Cl^-) ポンプであるハロロドプシン (halorhodopsin 以下 HR) も持っている。BR がプロトンを細胞の外に汲み出すのに対し HR は塩素イオンを細胞の内側へと取り込む。つまり HR は BR と同じく膜の外側が陽性に過分極するように働くわけで、細胞内を極度のアルカリ性にする事なしに流入するプロトンがもつ膜電位ポテンシャル部分のエネルギーを大きく保つことに役立っている。HR も BR と同じようにレチナールの異性化のメカニズムを利用していると考えられている。興味深いことに BR の Asp85 を Thr に改変しただけの変異体がプロトンではなく HR と同じように今度は塩素イオンを逆向きにポンプするようになる (Sasaki *et al.*, 1995)。ちなみに HR の Asp85 に相同な位置にある残基が Thr である。

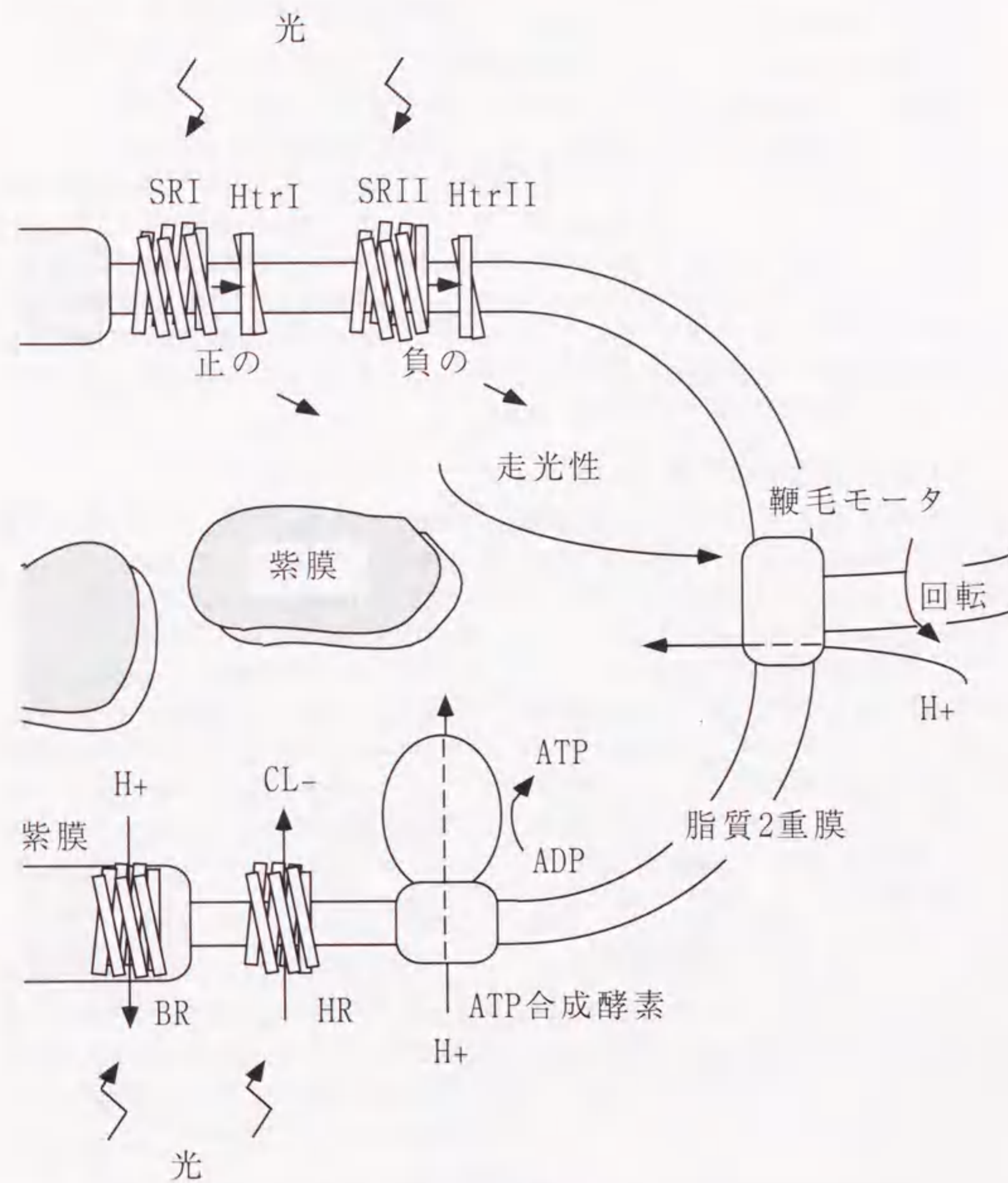


図1 好塩菌と4つのロドプシン

好塩菌はさらに BR と HR 以外にも光感知センサーである 2 つのロドプシン SRI,II (sensory rhodopsin I,II) を持っている。好塩菌は好気的な環境において従属栄養でもっともよく育つ。酸素と呼吸基質が多いときは光による酸化のダメージを避けるために光を避けようとしロドプシンとしては SR II のみが作られる。SR II は太陽光のエネルギーピークである青から緑の光を受容し負の走光性を示す。酸素分圧が下がった嫌気的な環境では SR II の生成は抑えられ代わりに BR,HR および SRI が作られる。SRI は橙色の光に対して正の走光性を示し、BR や HR が最大限に働けるような明るい場所への移動を可能にする。ただし紫外線に近い光があるところでは長寿命の SRI の中間体 (S_{373}) が強い負の走光性を引き起こし有害な高エネルギーの光は避ける機能も併せ持っている。BR や HR が単独で光エネルギーを使ってプロトンや塩素イオンを膜間で移動させるのと異なり、SRI,II は光を受容すると複合体を作っている隣のトランスジューサ蛋白質 HtrI,II (halobacterial transducers for sensory rhodopsin I and II) を介し最終的に鞭毛モータ (flagella motor) へ信号を送る。この一連の流れは G 蛋白質共役型受容体の原形とも言える蛋白質を含みさらに情報の入力からそれに対応した行動まで比較的良く理解された完結したシステムとして大変興味深い (Spudich, 1998)。

1.1.1.3. 光受容蛋白質とレチナール

レチナール (retinal) は β イオン環およびポリエーテル鎖を含み、BR 中では末尾のアルデヒド基部分でプロトン化された Schiff 塩基により 216 番のリジン残基に結合している。溶液中では全トランス型のレチナール (プロトン化 Schiff 塩基) は光反応により 80% 以上が 11 シス型に異性化し 13 シス型になるのは数% しかない (Koyama *et al.*, 1991)。ところが BR 中では全トランス型のレチナールは選択的に 13 シス型へ異性化するようになる。量子収率も 20% 程度から 60% へと向上する。これは BR 蛋白質が 13 シス型への異性化のみを選択的に有利に導く環境を与えているためと考えられる。ロドプシンなどの視物質では 11 シス型から全トランス型へが異性化の方向で蛋白質毎に異なるのも興味深い。1 つにはプロトンポンプの場合は各蛋白質分子が繰り返しポンピングを行い 1 回の光反応サイクルが短い程効率が良くなることと関係しているかもしれない。視物質では一旦異性化が起こると退色過程を経てレチナールは蛋白質からはずれてしまい溶液中においてはじめてもとの 11 シス型に戻る。

1.1.1.4. 明順応と暗順応

紫膜中で BR は全トランス型 (BR_{570}) と 13 シス型 (BR_{550}) の両形態を取ることができ暗所に長時間置くとこの 2 つの型は約 1:1 の割合になる (暗順応状態)。全トランス型のみがプロトンポンプに関与する。光照射下ではシス型も全トランス型からはじまるプロトンポンプサイクル (光サイクル) に参加し結果としてほとんどが全トランス型となる (明順応状態)。

本研究では通常の室内の明るさの下で試料を調整し明順応状態である BR の構造、すなわち全トランス型の基底状態での構造を明らかにした。

1.1.2. ポンプメカニズム

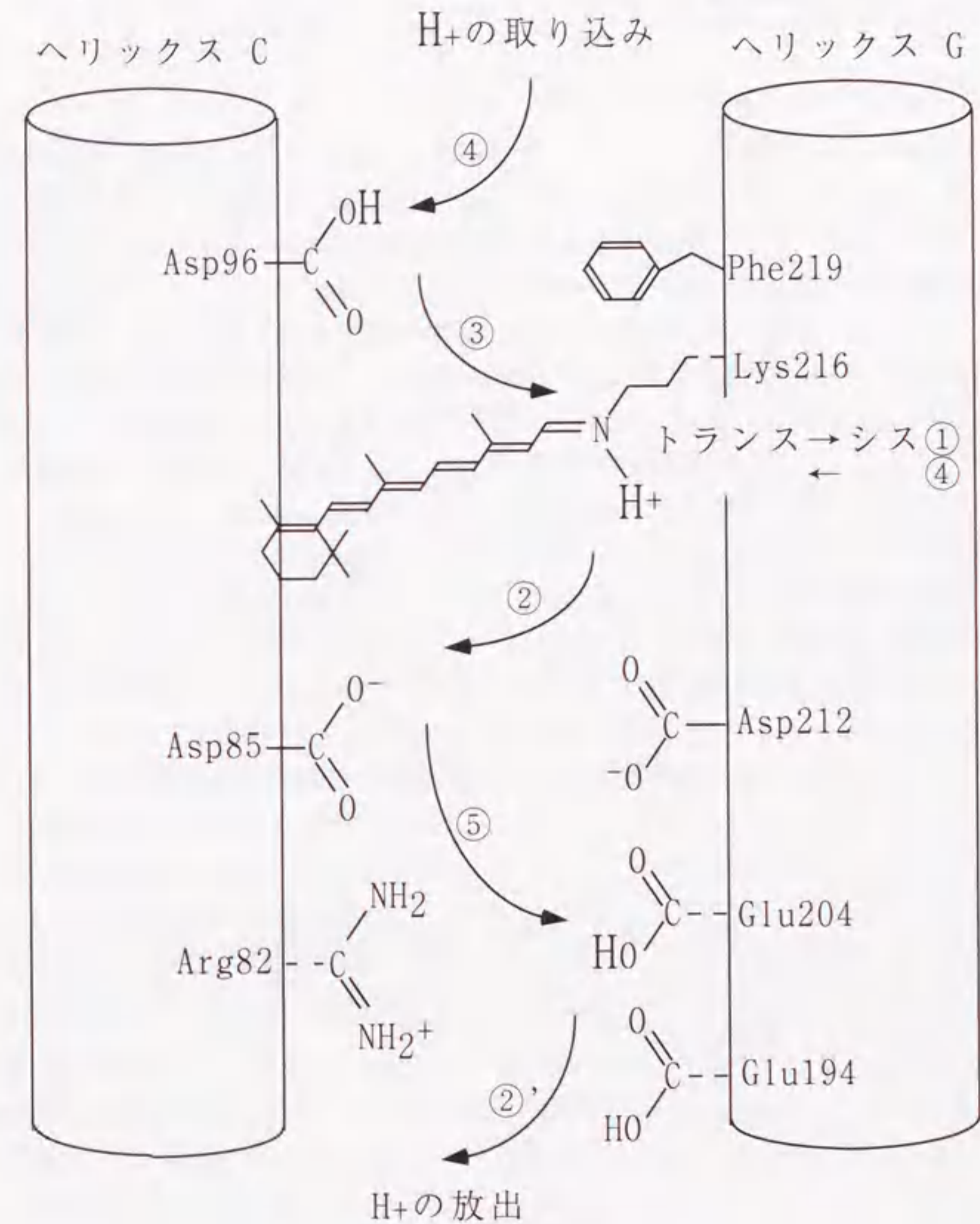


図2 プロトンチャンネル

1.1.2.1. チャネルの構造

レチナールは膜と平行に配置されプロトンチャネルは膜に垂直に通っている。プロトンチャネルはヘリックス B,C,G の間を通りそこには Asp85, Asp96, Glu204, Lys216 など実際のプロトン移動に関与するアミノ酸残基が存在している。

1.1.2.2. 光サイクル

光エネルギーの吸収によりレチナールは全トランス型から 13 シス型へと異性化する。K₅₉₀, L₅₅₀, M₄₁₂, N₅₆₀, O₆₄₀ 中間体を経由して再び基底状態の BR に戻る。レチナールは N から O 中間体へ移行する時に全トランス型へ再異性化する(図 光サイクル)。これらの中間体は可視光の吸収スペクトルから同定され添え字は吸収極大の波長(nm)を示す。プロトンの移動を見ると、①レチナールが 13 シス型へ異性化して K さらに L 中間体が生成した後、②L 中間体から M 中間体への移行に伴いシッフ塩基にあったプロトンが Asp85 に移動し、解離していた Asp85 がプロトン化される。②' Asp85 のプロトン化は同時に少し離れた Glu204 の pK_a の低下による解離すなわち細胞外へのプロトンの放出を促す。③次の M から N 中間体への移行で Asp96 からプロトンをもらうことでシッフ塩基は再びプロトン化される。④N から O への移行では解離した Asp96 が細胞質側からプロトンを取り込み再びプロトン化される。この時レチナールの全トランス型への再異性化も共役していると考えられている。⑤最後に O から基底状態に戻るときに Asp85 がプロトンを手放しそれにより Glu204 が再プロトン化される。この一連のサイクルをまとめると光の吸収により起こったレチナールの 1 回の異性化によりプロトンが膜の内から外へ 1 つ汲み出されることになる。時間単位では最初の K 中間体はピコ秒単位で生成する。L, M 中間体はマイクロ秒、N, O 中間体はミリ秒単位である。BR の励起状態および K 中間体の前身の J 中間体はフェムト(10⁻¹⁵)秒単位で生成すると言われる。エネルギーの流れとしては、光の吸収自体はフェムト秒程度の極めて短い時間で起こり 40~70kcal/mol のエネルギーをもらう。光エネルギーの約 70%はレチナールのねじれなどとして K 中間体において貯えられている。それ以降の緩和過程はすべて熱反応となる。M から N 中間体への遷移ではレチナールより蛋白質の構造変化が先行する現象(M_N 中間体)も報告されており(Sasaki et al., 1992)、M 中間体の時点ではレチナールではなく蛋白質側に駆動力が移っていると考えられる。

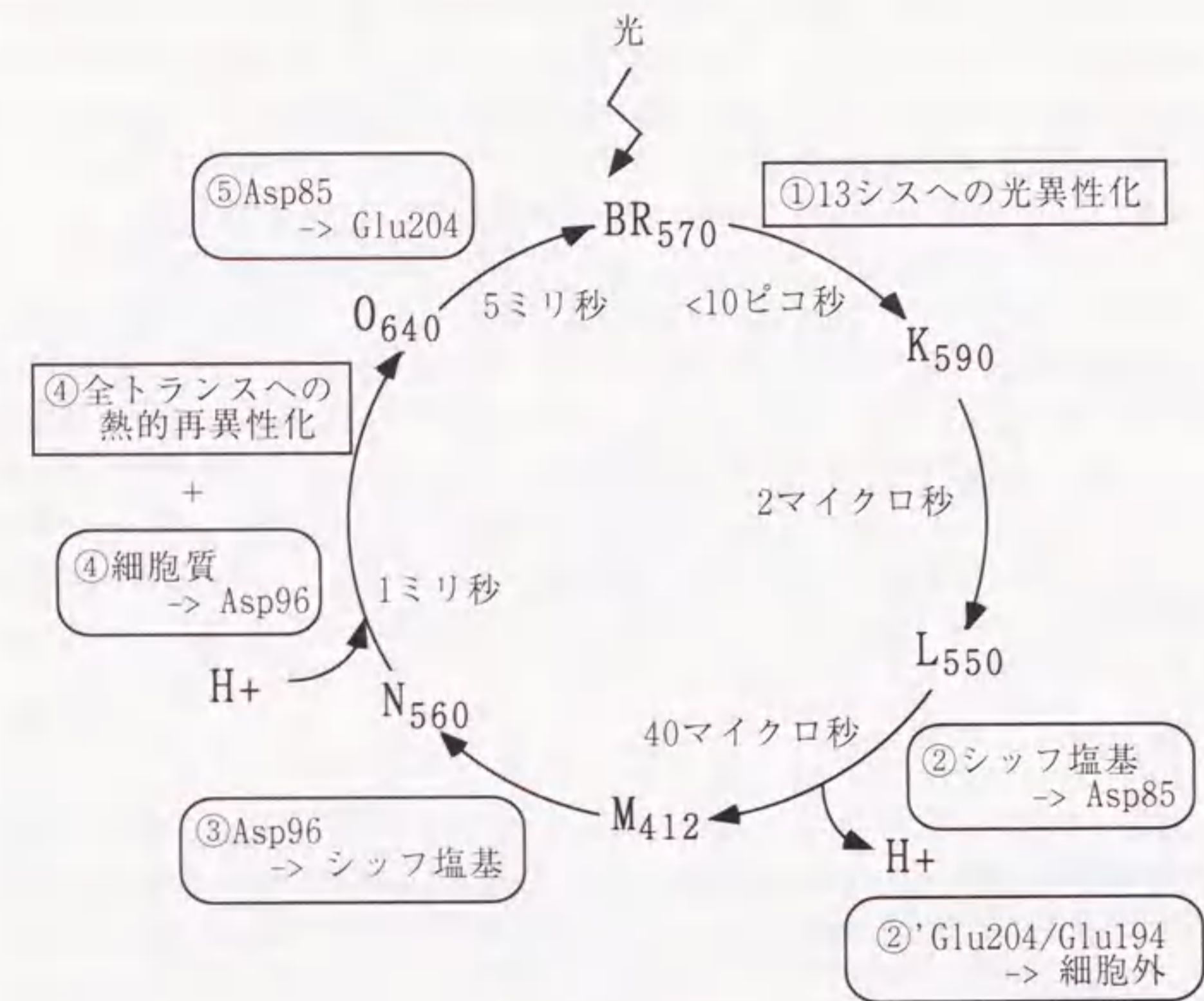


図3 光サイクル

1.1.2.3. スイッチ

BR では対イオンとプロトン受容体を Asp85 が兼ねている。このことはもともと近かった受け取るべきプロトンがレチナールの異性化により逆の方に向いてしまうことになる。シッフ塩基から Asp85 へのプロトン移動は L 中間体の時に起こるがこの L 中間体はシッフ塩基の部分局所的に歪んだ遷移状態と考えられる。プロトンを渡した後の M, N 中間体ではシッフ塩基の歪みは元に戻り孤立電子対は細胞質側を向く。特に M 中間体ではプロトンを渡した直後のシッフ塩基の歪みが元に戻る前を M₁、シッフ塩基の歪みが元にもどった後を M₂ 中間体として分けて呼ばれる。このシッフ塩基の歪みとその戻りの切り替えがシッフ塩基についていたプロトンをチャネルの細胞の外側へ通じる側へ放出させた後にチャネルの細胞の内側に通じる側からプロトンを受け取るというスイッチとしての働きを可能にしていると考えられる。L と M₁ また M₂ と N 中間体は平衡状態にあるが M₁ と M₂ 中間体では平衡が極端に M₂ に片寄っていてプロトンが逆向きにながれなくなっていると考えられる(Maeda et al., 1997)。

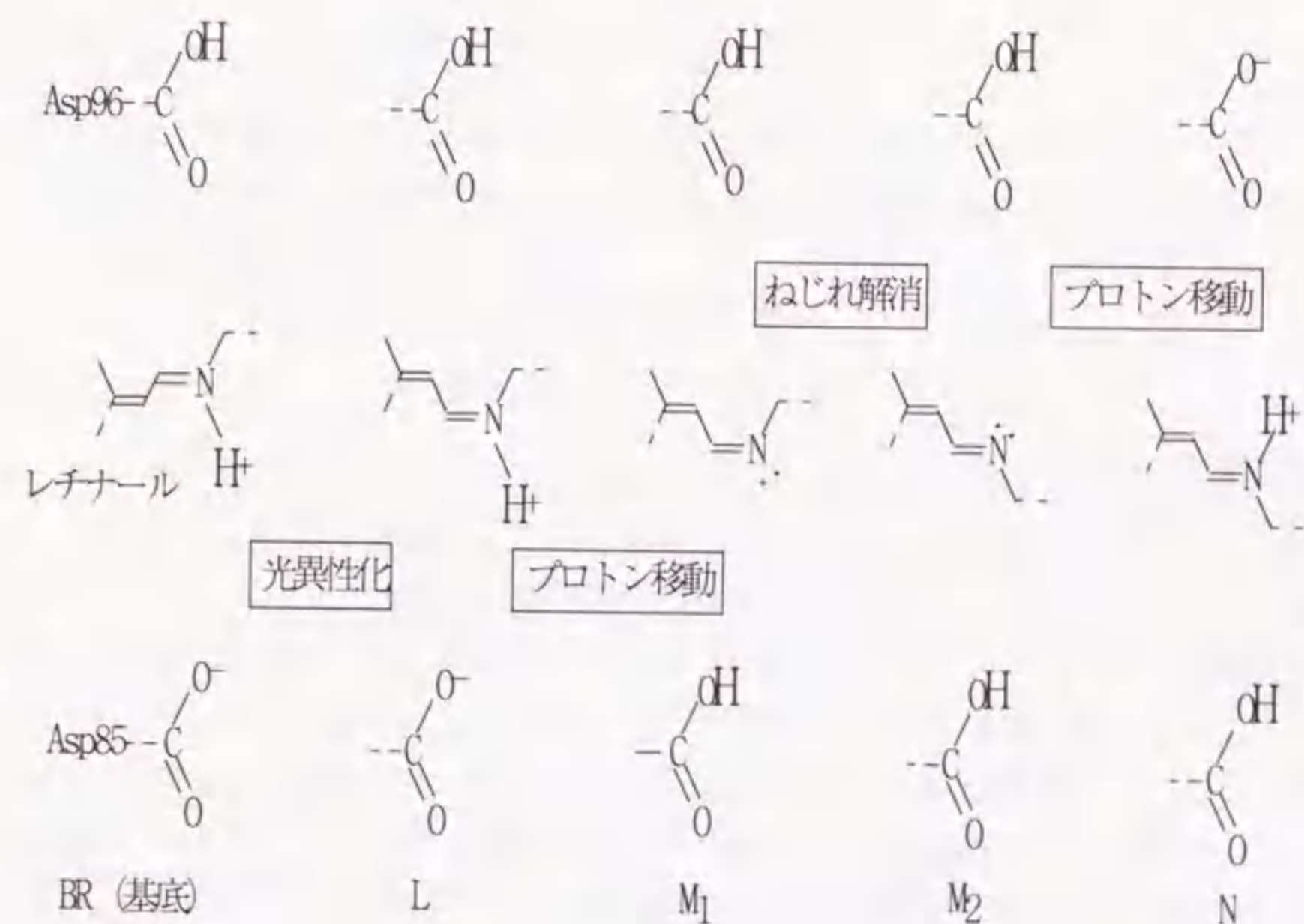


図4 スイッチ

L 中間体ではレチナールは異性化しているがシッフ塩基と結合している H^+ はまだ Asp85 の方(細胞外側)を向いている。その H^+ が Asp85 に移動した後 (M_1 中間体) では直ぐにねじれが解消しシッフ塩基の孤立電子対は Asp96 側(細胞質側)を向き (M_2 中間体)、 H^+ が逆向きに戻らないようにスイッチとして働く。

1.1.2.4. 変異体と残基の役割

スイッチ部分さえあればプロトンポンプとして機能することがいくつかの変異体から確かめられている。具体的にはシッフ塩基、Asp85、Asp212 および関連する水分子の特定の構造変化がプロトンの移動に不可欠とされる。D85N など Asp85 を中性化した変異体ではプロトン受容体がなくなりプロトン移動が起こらなくなる。また Asp85 を Thr に変えた D85T は塩素イオンを逆向きにポンプした。プロトン移動に直接関与しない Asp212 を中性化した変異体 D212N でもプロトン移動は起こらなくなる。ちなみに Asp85 ($pK_a=2.2$) と Asp212 ($pK_a<2.5$) は共に pK_a が低く基底状態ではプロトンは解離している。

スイッチ部分ではないプロトン結合基 Asp96 や Glu204 を非解離性残基に置換してもプロトンポンプ機能自体は保たれる。例えば E204Q では Asp96 が始めにプロトン化された時には細胞の外側へのプロトン放出はないが細胞質側からプロトンの取り込みがあった後に Asp96 から直接、プロトンが放出されることになる。ただし BR は活性を最大にするようにデザインされおり多くの変異体ではポンプ機能が残されていたとしてもポンプ活性は落ちてしまう。プロトンポンプ活性は光異性化の量子収率および光反応サイクルの寿命により影響される。定常光照射状態で光反応サイクルが長いと効率のよい光励起が行えずみかけの活性を落とすことになる。

1.1.2.5. 中間体と構造変化

チャンネルはシッフ塩基をはさんで細胞外側の半分と細胞質側の半分とに分けられる。細胞外側の半分は広く親水性であるが細胞質側の半分は逆に狭く疎水性である。特に Asp96 は疎水性の高い領域に存在し基底状態での pK_a は 11.4 と高い。また Asp96 とシッフ塩基との間には嵩だかい側鎖がいくつか存在している。細胞の外側へのプロトンの放出後、Asp96 の pK_a が下がりシッフ塩基が Asp96 からプロトンを受けて再プロトン化しさらに引き続いて細胞質側から Asp96 へプロトンが取り込まれるためには M および N 中間体で構造変化により細胞質側のチャンネル部分がより開いて(widening) 親水的な環境になることが必要と考えられている。

構造変化についてはそれぞれの中間体を完全に単離することが実験的に困難なため諸説があったが M 中間体ではヘリックス F が細胞質側でチャンネルから離れる方向に移動することが 1993 年に Subramaniam らにより示された。この時レチナールの β イオン環を支点としてレチナールのポリエーテル鎖がヘリックス F の Trp182 へより近づきヘリックス F を動かすと考えられる。この時ヘリックス F は Pro186 周辺を支点に動く予想される。ヘリックス F の移動距離は細胞質側の端で 2 Å は超えないと考えられている。ヘリックス F は G 蛋白質共役型受容体でも G 蛋白質を活性化するのに重要な働きをすることも分かっておりこのヘリックス F の移動が大きなファミリー全体に共通するメカニズムと推定され興味深い。

本研究では電子線結晶学による BR の立体構造解析により BR のループ部分の構造を初めて明らかにし表面部分における流れも含めたプロトンの取り込みや放出の経路を議論することを可能とした。またさらに電荷の可視化によりプロトン経路中の酸性残基の電荷状態を考察した。さらにそれに基づき Asp85 から Glu204 に至る水素結合のネットワークについて議論した。

1.2. 電子線 2次元結晶解析

1.2.1. 電子顕微鏡法

1.2.1.1. 波長と分解能

顕微鏡の分解能 (resolving power) は使用する波長が短いほど高い。電子のもつ波長 (100KV の加速電圧で 0.037Å) は光 (紫外線で数千 Å 程度) に比べてずっと短くそのため電子顕微鏡では数千倍から百万倍までものを拡大して見ることが理論的に可能である。レンズをある周期以上の格子パターンのみを通過させて結像させる周波数フィルターと考えると、その最小周期 δ_D は以下のアッベ (Abbe) の式で計算できる。N を試料場所における屈折率、 α を最大入射角とすると $n \sin \alpha$ は開口数 (numerical aperture) と呼ばれ対物レンズの重要な性能を示す指標である。

$$\delta_D = \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

この周波数の制限により小さな点の像もエアリーディスク (Airy's disk) と呼ばれる回折パターンに広がって見えてしまう。このパターンの中心のピークが始めに落ち込む位置が隣りにある点のピークの中心に重なるところまで 2 点を分離できると考えて分解能を定義するとその分解能は次の式で表せる。これはレイリー (Rayleigh) の定義と呼ばれる。

$$\delta_D = 0.61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

電子顕微鏡では最大入射角が小さく $\sin \alpha = \alpha$ で良く近似できまた試料以外では常に真空中を電子が通るので屈折率を 1 とすると以下の回折収差を表す式になる。

$$\delta_D = 0.61 \frac{\lambda}{\alpha}$$

電子の波長 λ (Å) は相対論に基づく補正を考慮すると加速電圧 V (volt) から次の式で計算できる。

$$\lambda = 12.261 / \sqrt{V(1+0.97880 \times 10^{-6} V)}$$

加速電圧と波長の関係

上の式は電子の運動量 p とエネルギー E をそれぞれ求めそれらの関係式に入れて導くことができる。ドブロイ (de Broglie) の式より電子の運動量 p は電子の波長 λ に反比例する。ここで h はプランク定数である。

$$p = h/\lambda$$

電子のエネルギーは静止時の質量を m_0 としてその質量エネルギー ($m_0 c^2$) に電子 (電荷 e) が加速電圧 V で加速された時の運動エネルギー eV を加えて得られる。

$$E = m_0 c^2 + eV$$

上記 2 式を下の運動量とエネルギーの関係式に代入し各定数を数値に置き換えるとはじめの加速電圧 V から電子の波長 λ を計算する式が得られる。

$$\frac{E^2}{c^2} - p^2 = m_0^2 c^2$$

例えば 100KV の加速電圧で約 0.037Å と計算される。電子線の波長は International Tables Vol3 p174 にも記載されている (100KV で 0.037013Å)。電子顕微鏡のレンズは収差が大きいので中心部のみしか使用できず開口数が 20 ミリラジアン程と小さくなり約 2Å (0.037Å/0.02) 程度の分解能に抑えられる。また開口数が小さいことにより焦点が合う奥行き (焦点深度) が深くなっており薄い試料の像を撮影した場合はその投影像が得られていると考えてよい。

1.2.1.2. レンズと収差

電顕用のレンズには静電レンズと磁界レンズがあるが多くの磁界レンズが使われている。このレンズには凸レンズしかないため凹レンズと組み合わせて収差を消すことができない。ドーナツ型の励磁コイルの回りを磁気ヨークで覆い中心上部にポールピースと呼ばれる磁束の引き出し窓を設けてありこの部分がレンズ作用をする。

球面収差 (spherical aberration)

光学理論で扱われるザイデル (Seidel) の 5 収差 (球面、コマ、軸外非点、湾曲、歪像) のうちの 1 つ。このうち球面収差のみが光軸上でも現れる軸上収差でそれ以外は軸外収差となる。球面収差はレンズの光軸近傍よりも周辺部を通る電子線の方が強く屈折し焦点でレンズの近い側に集まることにより生じる。点光源からでた光がそのため円形に広がってしまう。散乱角 α と焦点のぼけの半径 δ_s との関係を示したのが球面収差係数 C_s である (入射角と試料面換算のぼけの半径の関係も同様に表せる)。

$$\delta_s = C_s \alpha^3$$

回折収差は入射角が大きい程小さく球面収差は入射角が大きい程大きくなり両方の収差の足しあわせが最小になるところで電子顕微鏡の分解能が決まることになる。この球面収差係数はコントラスト伝達関数に直接関係する。

色収差(chromatic aberration)

加速電圧(V)の変動(ΔV)により発生する。これはエネルギーが小さく波長(λ)が長い電子ほどより大きく屈折レンズ寄りに焦点を結ぶためである。レンズの励磁電流が変動すると屈折率が変わり同様の現象が起こる。散乱角 α と焦点のぼけの半径 δ_{ch} との関係を示したのが色収差係数 C_{ch} である。電子線源のエネルギー的ばらつきが大きいとこの色収差によりコントラスト伝達関数が減衰させられて高分解能の情報が失われる。

$$\delta_{ch} = C_{ch} \alpha \frac{\Delta V}{V}$$

非点収差(astigmatism)

ザイデル(Seidel)の5収差に含まれる軸外非点収差とは別の軸上非点収差も電子顕微鏡では分解能に影響する。この収差はレンズの工作誤差や絞りの汚れなどにより磁場が回転対称でない場合に発生する。正焦点前後で一方向に焦点が合うとその直角方向では像が流れるようになり焦線と呼ばれるものができる。この焦線間の焦点位置の差を非点隔差(Δf_a)という。試料面からレンズへの入射角 α と試料面換算のぼけの半径 δ_a との関係を示したのが非点収差係数 C_a であり、 Δf_a も次の式より C_a で表せる。非点収差のために方向により焦点位置が変わりコントラスト伝達関数も回転対称ではなくなる。

$$\delta_a = C_a \alpha$$

$$\Delta f_a = 2C_a$$

本研究では球面収差係数 C_s は対物レンズにかかる電圧との対応表から求めたものを解析時の補正に使用した。非点収差はHendersonら(Henderson et al., 1986)の方法により直交する2つの方向でのデフォーカス値を考慮して解析時にプログラムにより精密化した。デフォーカス値の初期の推測値がこの精密化に重要であったがこれはバックグラウンドの周波数成分の傾向より見積もった。色収差については電界放射型電子銃を使用することにより電子線源のエネルギーのばらつきを小さくした。

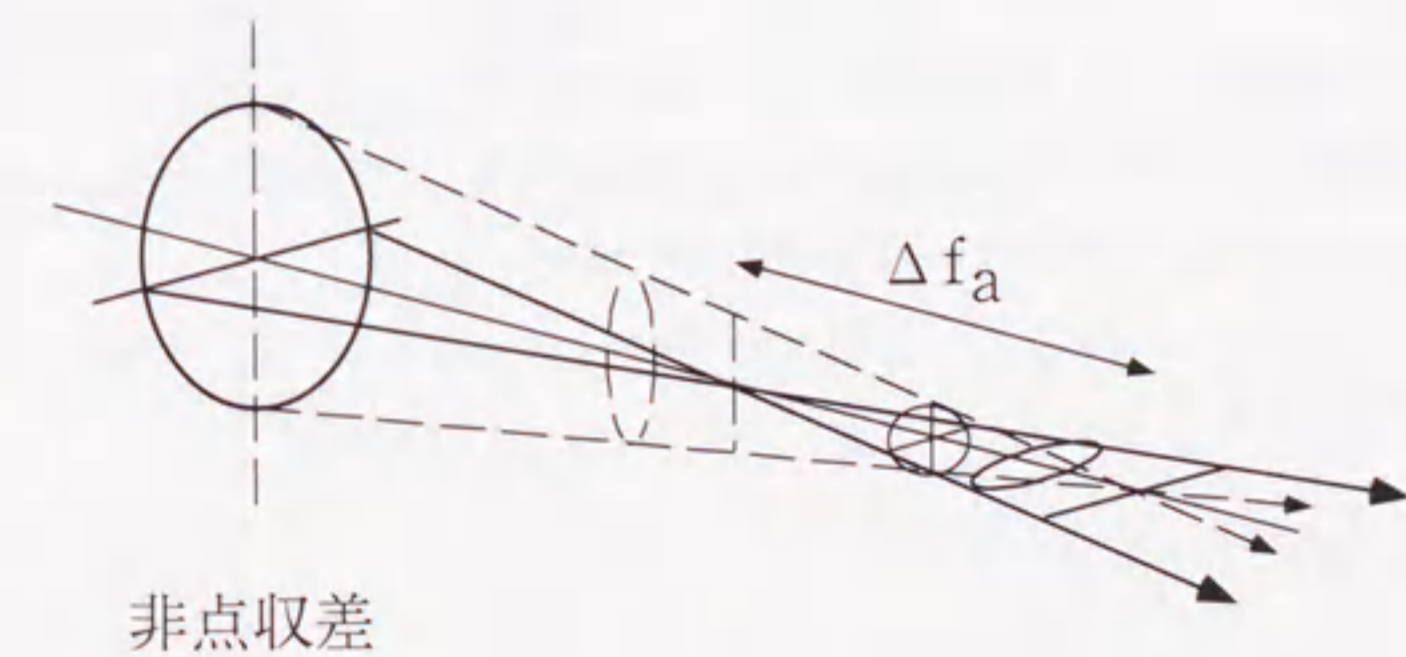
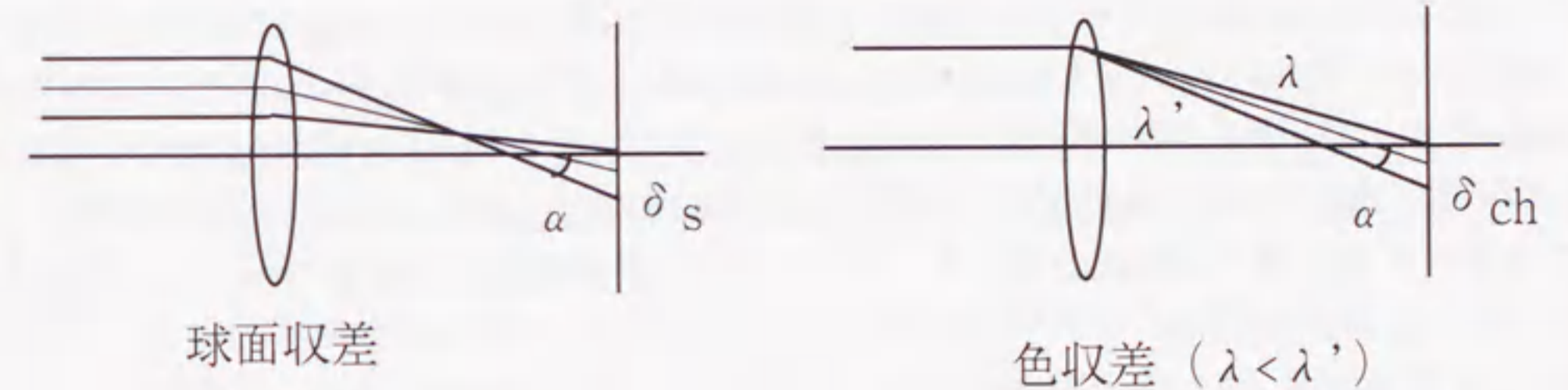
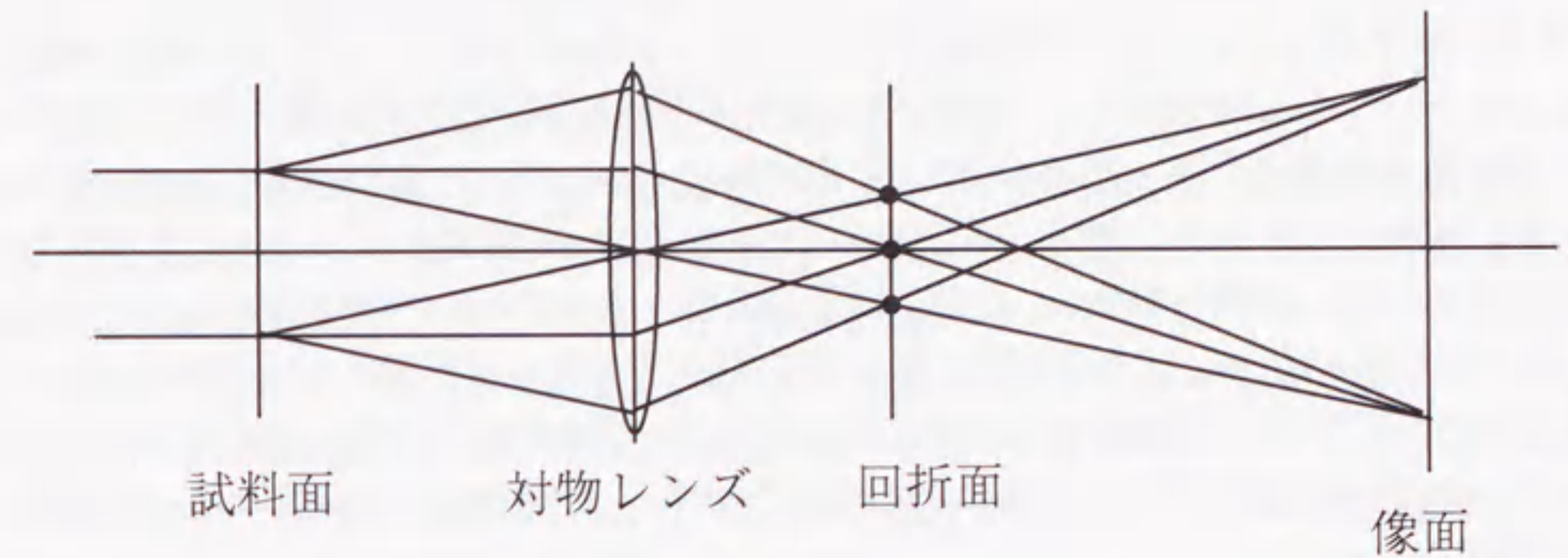


図5 レンズと収差

1.2.1.3. 弾性散乱と非弾性散乱

電子が原子核により作られる静電場(クーロンポテンシャル)と相互作用すると通常、弾性散乱(elastic scattering)を起こす。この時波長は変化しないが方向は変わり位相も $\pi/2$ 程ずれる。原子核の外側の電子と相互作用をすると非弾性散乱(inelastic scattering)になる。波長は若干変化し試料にエネルギー(数十 eV 程)を移す。軽元素ほど弾性散乱に対する非弾性散乱の比率が大きくなる。非弾性散乱をした電子はその低いエネルギーのために磁気レンズではより大きく曲げられ像においてはうまく焦点が合わずぼけを生じさせ、回折像において中心付近に強く集められバックグラウンドを高くする。エネルギーフィルター装置を使用するとこの非弾性散乱した電子のみを選択的に取り除いたり逆に特定のエネルギー分を吸収された電子のみで結像させることができる。

1.2.1.4. 振幅コントラストと位相コントラスト

電子線は試料により吸収されることはほとんどなく透過する。ただし大きく散乱した電子は対物絞りで遮られあたかも試料に吸収があるように見えて(散乱吸収)、結果として像にコントラストが生じる。これは散乱コントラスト(scattering contrast)と呼ばれ振幅コントラスト(amplitude contrast)の1つである。重金属などで染色されている時は特にこのコントラストの寄与が大きくなる。蛋白質を構成する軽い元素ではこの散乱コントラストは大きくなく、これとは別に弾性散乱によって位相がずれた電子と散乱を受けずに来た電子との干渉によりできるコントラストで像が見える。このコントラストを位相コントラスト(phase contrast)という。ちなみに振幅コントラストは負染色の場合は35%程度、氷包埋の場合は6%程度と言われる(Toyoshima *et al.*, 1988)。

1.2.1.5. コントラスト伝達関数

電子顕微鏡像のフーリエ変換は、試料のフーリエ変換にコントラスト伝達関数を乗じたものである。コントラスト伝達関数は電子顕微鏡レンズの周波数特性のようなもので空間周波数に対して基本的にサイン関数が高周波数になるにつれて振動が激しくなる形をとる。この関数はフォーカスのずれ(デフォーカス値)の関数で以下の式で表される。

$$ctf(\theta) = -2 \sin \chi$$

$$\chi = 2\pi\lambda^{-1}(\delta f \theta^2/2 - C_s \theta^4/4)$$

ここで θ は反射角、 δf はデフォーカス値、 C_s は球面収差係数である。空間周波数(θ/λ)によっては全くコントラストがなくなったりまた符号(黒白)の逆転がおこったりする。負染色試料などでは上記の位相コントラスト以外に振幅コントラストの影響も大きい。その伝達関数は $-\cos \chi$ で表されアンダーフォーカスの時は位相コントラストと同じ符号を持ち $|\sin \chi|$ が小さいところで影響が大きくなる。コントラスト伝達関数は電子線の照射角の広がりや色収差のために高分解能の領域で次第に減衰してしまう。振幅情報は回折データから得るので像から位相情報を得る時にはこの減衰関数までは考慮しないで補正を行なう。

1.2.2. 極低温電子顕微鏡

1.2.2.1. 相互作用と損傷

電子線はX線と比べ物質との相互作用が1万倍と格段に大きいので、金属などでは個々の原子を直接観察することも可能である。一方、相互作用が大きいために生体高分子を観察する場合はその損傷も無視できなくなる。これは電子線により分子の一部が切れていろいろな長さのラジカルやイオンができ、それらが移動して近くに新たな結合を作る(クロスリンクする)ことで構造変化が起きるためと考えられる。電子線が直接原子核に運動量を渡すはじき出しも起こり得るがイオン化や励起に比べるとずっと確率は小さい。蛋白質は室温では $0.5e/\text{\AA}$ の電子線照射でも損傷を受ける。焦点合わせに必要な電子線だけで損傷を受けてしまう。そのため必要最小限の電子線で高分解能像を撮影できるMDS(minimum dose system)装置も開発されている。

1.2.2.2. 試料温度

試料温度がより低温なほど電子線による試料への損傷を小さくでき、損傷を受けるまでにより多くの電子線を照射できる。20K(-253.15°C)以下で室温の10倍、8K(-265.15°C)以下で20倍の電子線を照射できることがカタラーゼの結晶とtRNAの結晶を用いた測定の結果より示されている(Fujiyoshi, 1998)。また凍結試料を低温に保存したまま試料ステージに移送するためにクライオトランスファー装置が工夫されている。

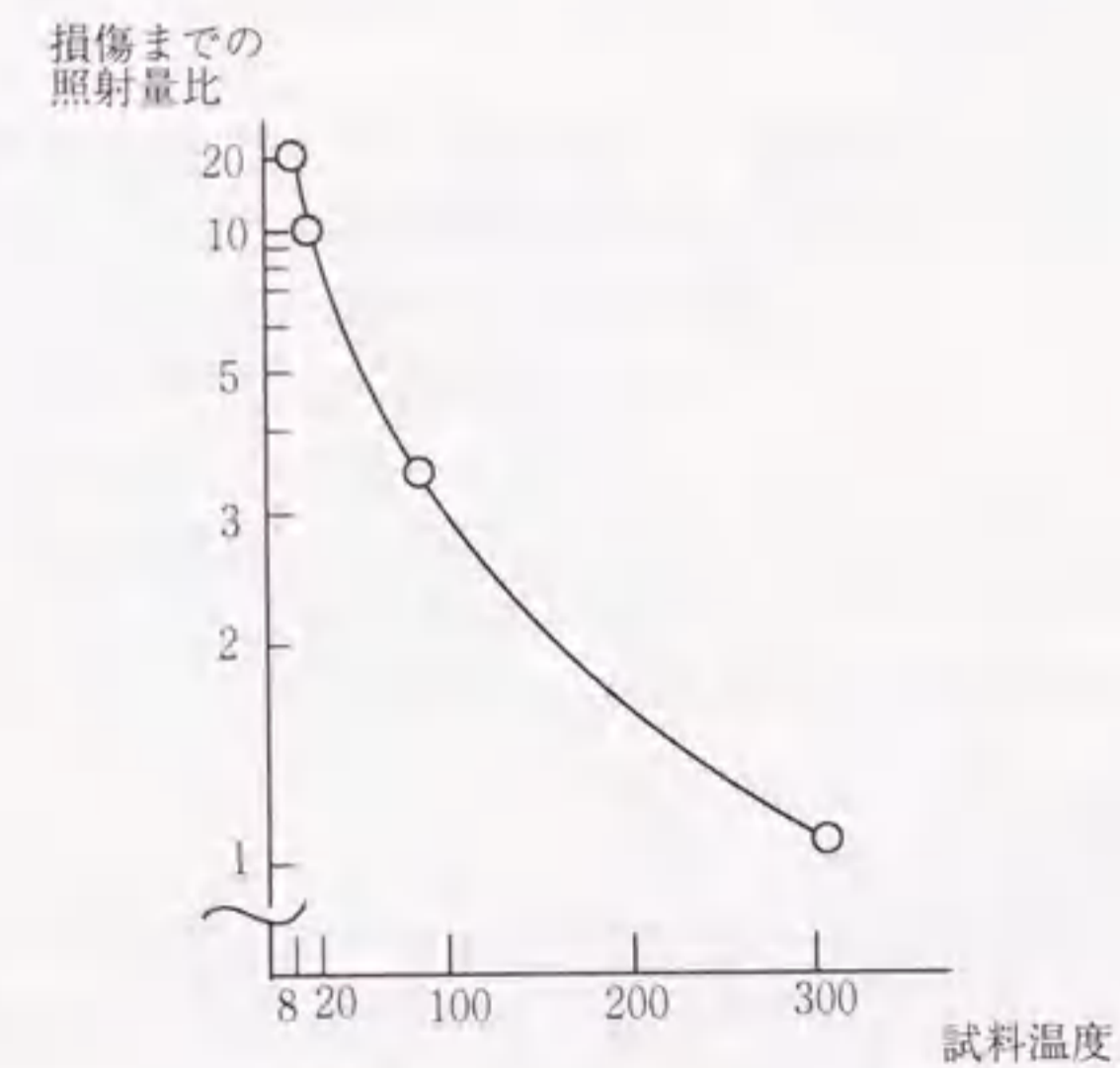


図6 温度と損傷

Fujiyoshi 1998のデータより

1.2.2.3. 電子線源

電子の波長にばらつきがあると色収差により像の分解能が落ちてしまう。透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope; TEM) の中でもより高分解能を目指す極低温電子顕微鏡にはコヒーレンスがよい(波の進行方向、波長および位相がそろっている)電子線源が特に重要である。従来の方式は熱電子放出型電子銃(Thermal Emission Gun; TEG)と呼ばれ、タングステン(W)やランタンヘキサボレート(LaB6)の結晶で作られたフィラメントに電流を流し熱して放出された熱電子を利用して数 eV のエネルギーのゆらぎが生じる。電界放出型電子銃(Field Emission Gun; 以下 FEG)は高真空中で先の極めて小さい針状の陰極先端に電界を集中させてトンネル効果により電子を引き出す方式である。FEG によりエネルギーのゆらぎを約 0.2eV にまで落とすことができ、コヒーレンスがよく高輝度な電子線源が得られ色収差による高分解能成分の減衰が抑えられる。

本研究では液体ヘリウムステージを持つ JEOL4000SFX(400KV)、さらに FEG や後述するスロースキャン CCD カメラも装備した JEM3000SFF(300KV)極低温電子顕微鏡(日本電子社製)を使用してデータ収集を行なった。これらの極低温電子顕微鏡は液体ヘリウム温度(-272.2°C)に近い 1.5K(-271.65°C)までステージを冷却でき、2 Å 分解能での撮影が可能な設計がされている(Fujiyoshi *et al.*, 1991)。

1.2.3. 膜蛋白質と 2 次元結晶

1.2.3.1. なぜ 2 次元結晶か

蛋白質は室温では $0.5\text{eV}/\text{\AA}^2$ の電子線照射でも損傷を受けるのでとも 1 分子中の全原子に電子を当てることはできない。そこで原子レベルでの構造解析を行なう場合、多数の分子を観測し平均化を行うことになる。1 つ 1 つの分子にはところどころしか電子が当たっていても平均化することにより完全な形で分子を浮かびあがらせることが可能になる。このために 2 次元結晶やチューブ状結晶が使用される。2 次元結晶を使うと 10^3 から 10^4 個の分子を平均化することができる。電子顕微鏡用の試料としては多重散乱を起こさないように数百 Å 以下と充分薄く、個々の入射電子はたかだか 1 回散乱する程度のものが理想的である。X線結晶回折で使われているような 3次元結晶(10^{17} 分子程度)では試料が厚すぎ電子が通らない。

1.2.3.2. 2 次元結晶例

現在のところ電子線結晶学により原子レベルの分解能(resolution)で構造解析に成功しているのは 2 次元結晶を用いたもののみである。膜蛋白質や一部の蛋白質は 3 次元結晶より 2 次元結晶を作り易いといわれ、BR 以外に集光性クロロフィル *a/b*-蛋白質複合体 II(LHCII)(Kühlbrandt *et al.*, 1994) および細胞骨格蛋白質チューブリン $\alpha\beta$ 複合体(Nogales *et al.*, 1998)の構造が解かれている。LHCII は 3.4 Å, チューブリンは 3.7Å 分解能で構造解析された。

1.2.3.3. 2 次元結晶化法

BR はもともと好塩菌中に天然に紫膜として 2 次元結晶を作っており、限られた表面積に多くのプロトンポンプを配置できるように進化してきていると思われる。BR のように天然状態で 2 次元結晶を作っているのは例外的で多くの場合、膜蛋白質の大きい 2 次元結晶を成長させるためにはいったん可溶化して精製後、脂質 2 重膜中へ再構成させる必要がある。LHCII や現在解析が進められている水を選択的に通すチャンネルであるアクアポリン 1(AQP1)(Walz *et al.*, 1997)はこの例である。2 次元結晶化については 1992 年の Kühlbrandt の総説によくまとめられているがまだ試行錯誤の色彩が強い。

1.2.3.4. 対称性

再構成により 2 次元結晶化された LHCII と AQP1 の場合はそれぞれ 3 分子および 4 分子単位が膜に対して上下逆に交互に入るような対称性をもって 2 次元結晶化している。再構成することにより本来脂質 2 重膜に対して一方向で入り込んでいる膜蛋白質がその方向性から解放されてこのような結晶形が可能になると考えられる。全てでうまくいくわけではないが膜の上下で非対称な膜蛋白質でも膜に交互に入ることにより曲率を持たずに平面的に結晶を成長させられるというのは膜蛋白質 2 次元結晶化の 1 つの典型的な形式であると思われる。逆に同じ方向に入って曲率を持っている場合の 1 つの形態としてチューブ状結晶があると考えられる。

上記の LHCII と AQP1 の 2 次元結晶の対称性はそれぞれ p3 および p321 と呼ばれる。このような 2 次元結晶の対称性を記述するための表裏を考慮した平面群(two-sided plane group)には理論的には 80 通りあるが生物試料では一般にその鏡像は存在しないので鏡面(mirror plane)、映進面(glide plane)、対称心(centre of inversion)を持つことができず実際には 17 通りのうちのいずれかに限られる(Amos *et al.*, 1982)。

本研究で使用した紫膜は BR の 3 量体が 2 次元結晶化したもので p3 の対称性を持っている。紫膜は 2 次元結晶としては理想的であるがそれでも数百 nm という直径では高分解能の構造解析には充分ではない。そこで 1984 年の Baldwin らの方法により膜を融合させ、直径が数 μm の 2 次元結晶を作製して使用した。

1.2.4. 試料作製

1.2.4.1. 真空と試料作製

電子線は物質との相互作用が強いので試料を真空中に置かないと電子は試料以外の粒子との相互作用で消滅してしまう。この真空中でも試料の構造を保ちまた電子線照射による損傷を最小限にするために試料を保護する必要がある。重金属を使用した負染色ではせいぜい 20 Å の分解能しか得られない。高分解能の構造解析では最適な包埋剤を使用した上での急速凍結法が有効である。

1.2.4.2. 急速凍結法

実際に極低温電子顕微鏡で撮影する試料を作製する場合は、カーボン膜を張ったグリッド上に包埋剤を溶かした試料溶液を吸着させその後余分な液を除いてから、液体エタン中に落下させ急速凍結する。液体エタンは比熱が大きく融点(-183.6°C)と沸点(-89.0°C)の幅が大きいので急速凍結剤として好ましい。液体窒素のように比熱が小さく融点(-209.9°C)と沸点(-195.8°C)が近いと試料表面に気化した気体が覆ってしまい熱伝導を悪くし急速に冷却できない。

1.2.4.3. 包埋剤

支持膜には電子線照射に対する強度、電気伝導性、耐熱性の良さなどからカーボン膜が使用されている。2次元結晶を包み込んだ形となる包埋剤は結晶がカーボン膜に吸着するときの緩衝材の働きをするがまた試料の乾燥を防ぎ分子の構造を保つ働きもする。最適な包埋剤の種類やその濃度などの条件は試料毎に異なるのでその都度検討する必要がある。BRがHendersonらによって最初に構造解析された時はグルコースが使用された(Baldwin *et al.*, 1984)。LHCII(Wang *et al.*, 1991)やチューブリン(Nogales *et al.*, 1995)ではタンニンが、また本研究によるBRではトレハロースがよい成績をあげている。

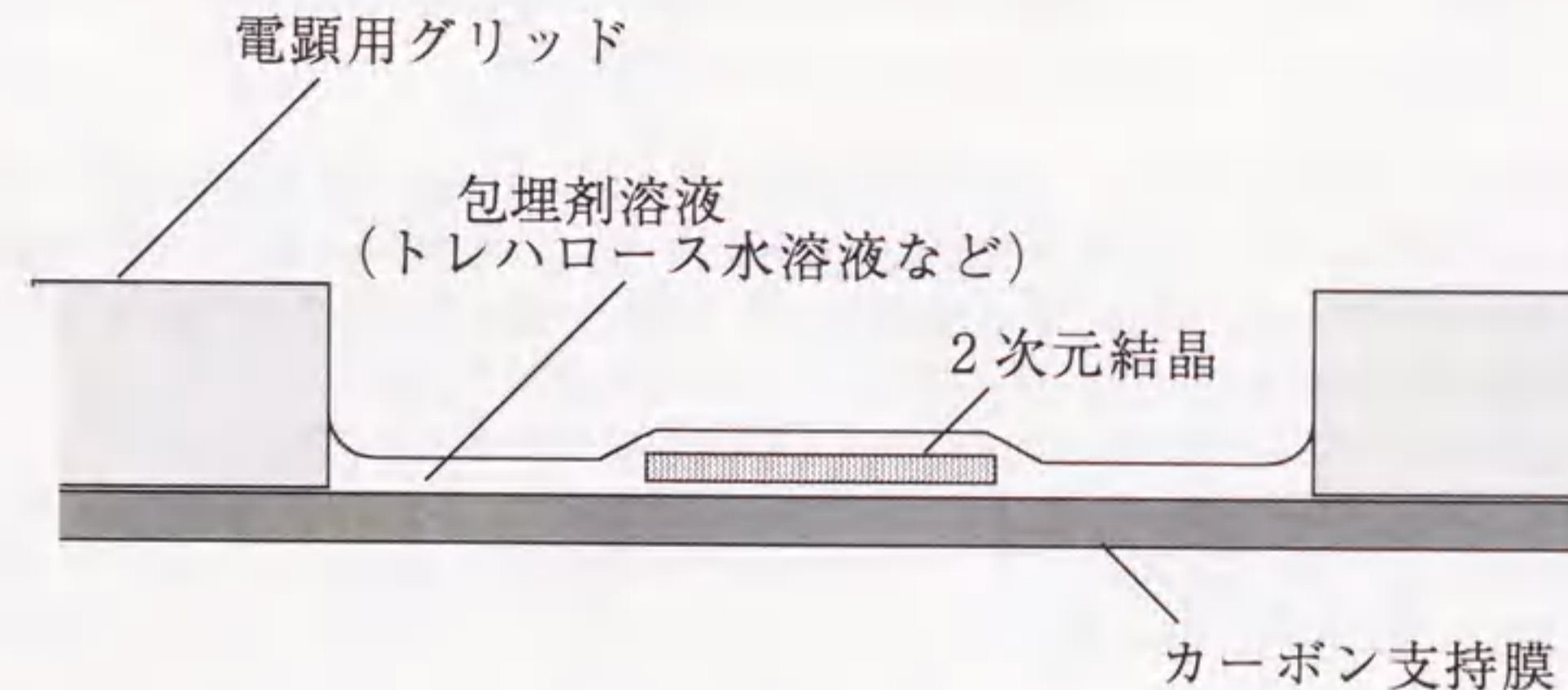


図7 2次元結晶と包埋剤

1.2.5. 3次元再構成

1.2.5.1. 3次元再構成の歩み

立体構造を再構成するための解析的手法は1968年にDeRosierとKlugにより導入された。試料は重金属塩(酢酸ウラニル)中に包埋され乾燥されたバクテリオファージt4の尻尾であった。分解能は30 Åだった。この試料は十分な多重度を持つ螺旋対称性を持っており1枚の像からの3次元再構成が可能であった。もう少し対称性が落ちるicosahedral virusesも3枚かそれ以上の像を使用して解析が行われた(Crowther *et al.*, 1970)。1975年にHendersonとUnwinによりBRの2次元結晶を用いた3次元再構成が始められた。この時点では7 Å分解能で、この解析にはずっと多くのいく通りかに傾斜させた像および回折像が使用された。

1.2.5.2. 回折像

隣り合った格子面で散乱された電子波の光路差がちょうど波長の整数倍になると強め合うことになる。そのため次のブラッグ(Bragg)の条件を満たすところで回折点が現れる。ここでdは格子面の間隔、θは回折角、nは正の整数、λは電子の波長である。

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

高エネルギーの電子は波長が短く反射球(Ewald sphere)の測定範囲部分をX線(例えばCu Kα、8keV)と比べてずっと部分的すなわち平面的にすることができる。そのため実際の処理では単純に逆空間中での原点を通る平面として扱える。電子線回折は結晶から直接振幅情報を得ることができそれだけでも2次構造に関する知見などを与える。電子が干渉する前に撮影されるのでコントラスト伝達関数による劣化が原因で分解能を下げることはない。ただし位相情報は含んでおらず、低分解能領域では非弾性散乱の電子がかぶってしまい情報が得られない。また実像でできるような結晶性のよい領域のみを測定後に切り出すような操作が行えない。回折像の方が実像を撮影する時よりも試料に電子線を広範囲に薄く照射できより正しい強度を回折点より得られる。2次元結晶は直径で最低0.5 μm必要であり多くの試料では回折像を撮影するのに十分な大きさの2次元結晶を得るのは容易ではない。

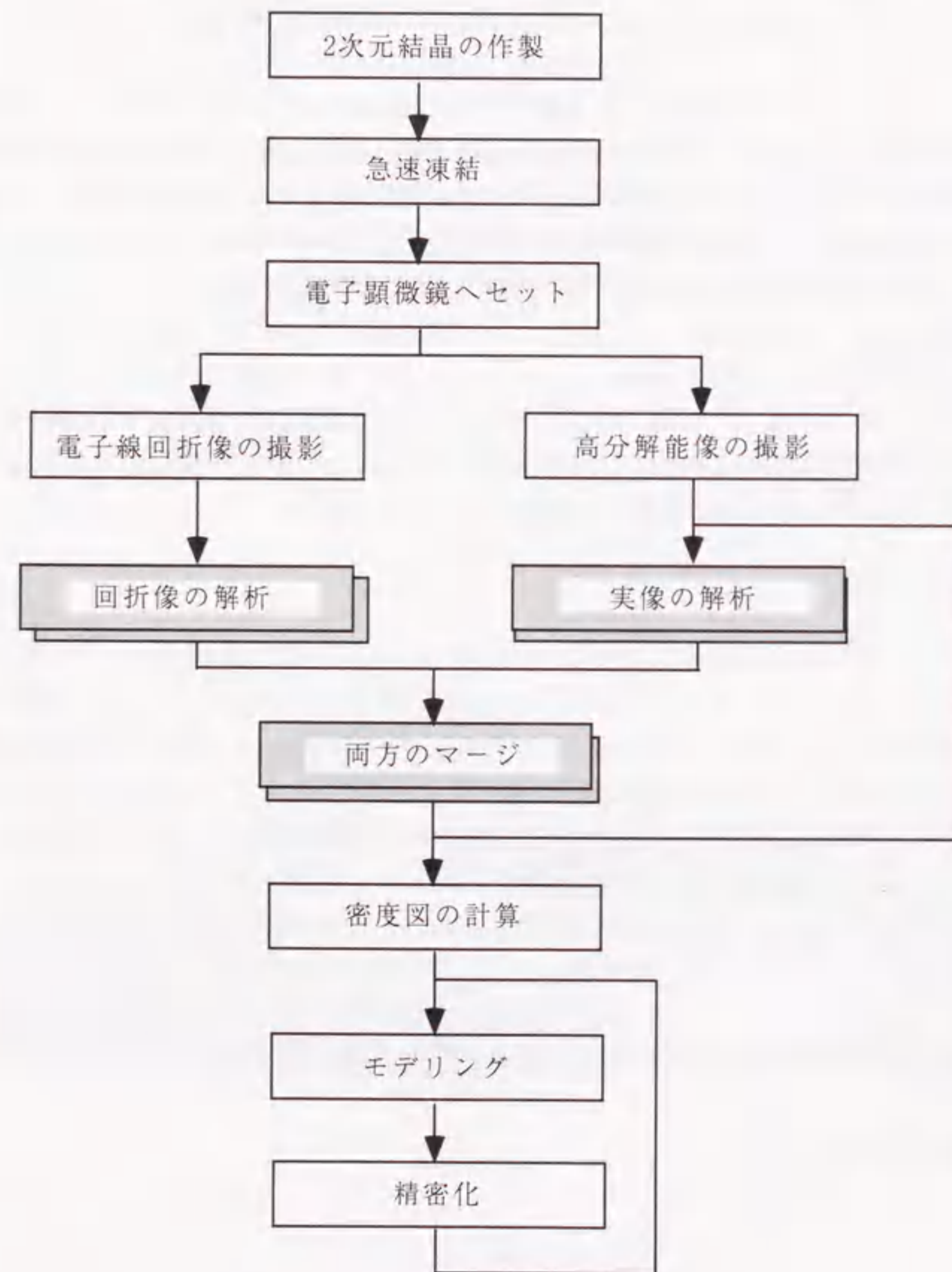


図8 解析全体の流れ

1.2.5.3. 実像

生体試料を用いて実像を撮影する場合は 5 万倍程度までの倍率で撮影する。試料に対する照射量が限られる中であまり倍率を上げ過ぎるとフィルム上では信号が薄くなり S/N 比を悪くしてしまう。逆にあまり倍率を下げ過ぎるとフィルムの粒状性の問題などから分解能が制限を受けてしまう。不足焦点量は 1,000 から 10,000 Å ほどで撮影する。不足焦点の方が低分解能領域における位相コントラストと振幅コントラストの符号が同じになり理解し易い像が得られる。負染色で 20 Å 程度までの像を扱う時はあまり大きな不足焦点にしなければその分解能の範囲で本質的にコントラスト伝達関数は大きく変わらなくていいのでコントラスト伝達関数の補正は必要ない。ただし高分解能での構造解析ではコントラスト伝達関数の補正は必須となる。得たい情報のコントラストを最大にするために焦点をどのくらいずらすかを判断する必要があるが、あまり焦点に近いと位相コントラストが付かなくなってしまう逆に焦点をはずし過ぎると高分解能領域でコントラスト伝達関数の変動がより激しくなり電子線のコヒーレンスの悪さに起因するコントラスト伝達関数の減衰のため分解能が制限されてしまうことになる。実像をフーリエ変換することにより振幅と位相の両方の情報が得られるが高分解能の構造解析では位相情報のみ最終的に使用され振幅情報は回折像からのものを使用する。

1.2.5.4. 格子線

2次元結晶のフーリエ変換像は格子線 (lattice line) と呼ばれる線の集まりになる。2次元結晶では3次元目に周期性がないため c^* 軸方向に連続となるためである。電子顕微鏡像は投影像なのでそのフーリエ変換像もしくは電子線回折像は 3次元フーリエ空間 (逆空間) の原点を通る 1断面となる。2次元結晶から3次元の構造情報を得るためにはいくつかの傾斜角度で実像や回折像を撮影し逆空間の位相や振幅情報を埋めていく (マージする) 必要がある。結晶の厚さや対称性および目標とする分解能で必要とする枚数は変わってくるが一般に高傾斜のデータ程傾け方がいろいろある分多くの枚数を必要とする。格子線をデータで埋め始める場合は、 z^* の正負を正しく判断しないと手形 (Handedness) を誤り結果として鏡像の密度図を得てしまう。傾斜の像においてフィルム上のどちら側でデフォーカスがより大きいかを調べることで像の傾きの正負を判断できる。

1.2.5.5. ミッシングコーン

一般に 3次元構造解析には ± 60 度傾斜前後までのデータが使われるがそれ以上高角の領域ではデータを集められない。逆空間中で円錐状に残されたこの領域はミッシングコーン (missing cone) と呼ばれ、結果として実際の密度図では垂直方向 (膜に垂直方向) の分解能が落ちてしまうことになる。(0,0,1) の格子線のデータが得られないために 2次元結晶を横から見た時の各スライスの密度の平均値が全て 0 となり正しい密度分布が得られず、特に膜と垂直方向に密度が大きく変わるような蛋白質の場合に問題になる可能性がある。 ± 60 度傾斜までデータを集められれば全逆空間の 87% を、 ± 70 度傾斜まで集められれば全逆空間の 94% をカバーすることができる。

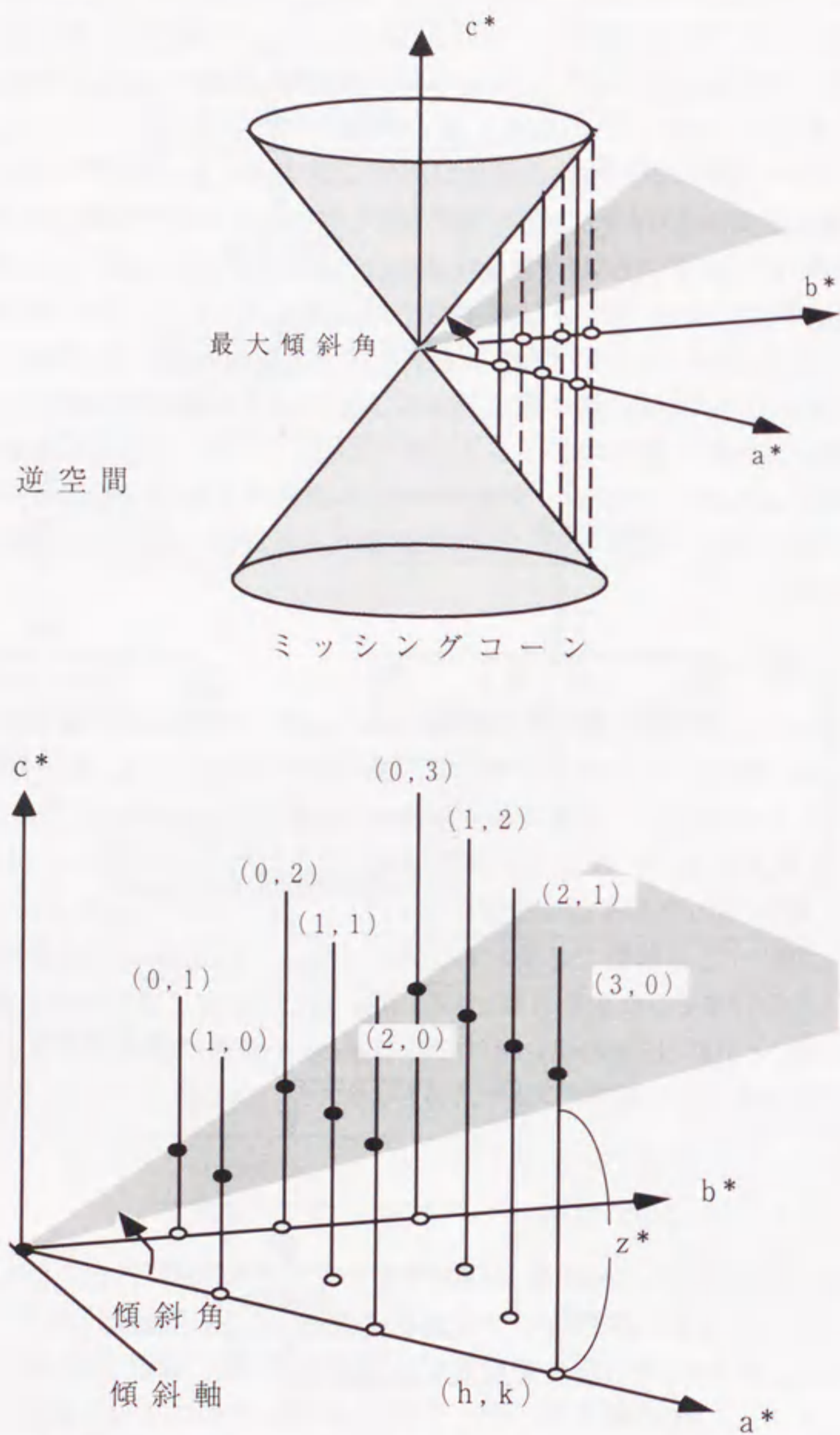


図9 格子線とミッシングコーン

1.2.5.6. 双晶問題

BR の場合 2 次元結晶を大きくし高分解能データを得るために紫膜の融合処理を行なう (Baldwin & Henderson, 1984)。融合前の結晶は直径で $1 \mu\text{m}$ にも満たないが融合処理を行なうことにより大きいもので $10 \mu\text{m}$ にも達する結晶が得られるようになる。ただしこの時、単一の結晶ではない双晶 (Twin) 状態になる可能性が高い。そのため回折データでは双晶比率に応じて積分強度を分配 (Detwin) する必要がある。そこでまず融合処理をしていないデータのみを先に処理してマージを行い低分解能の 3 次元セットを作成しておく。その後融合処理をしているデータを収集、処理し先にマージした非融合の 3 次元セットを参照し双晶比率を決めながら追加的にマージしていく。実像の場合は歪み補整の時に双晶があれば領域の歪み方が明らかに境界があるように見えるのでそれぞれの領域を別々に切り出して処理するようにした。

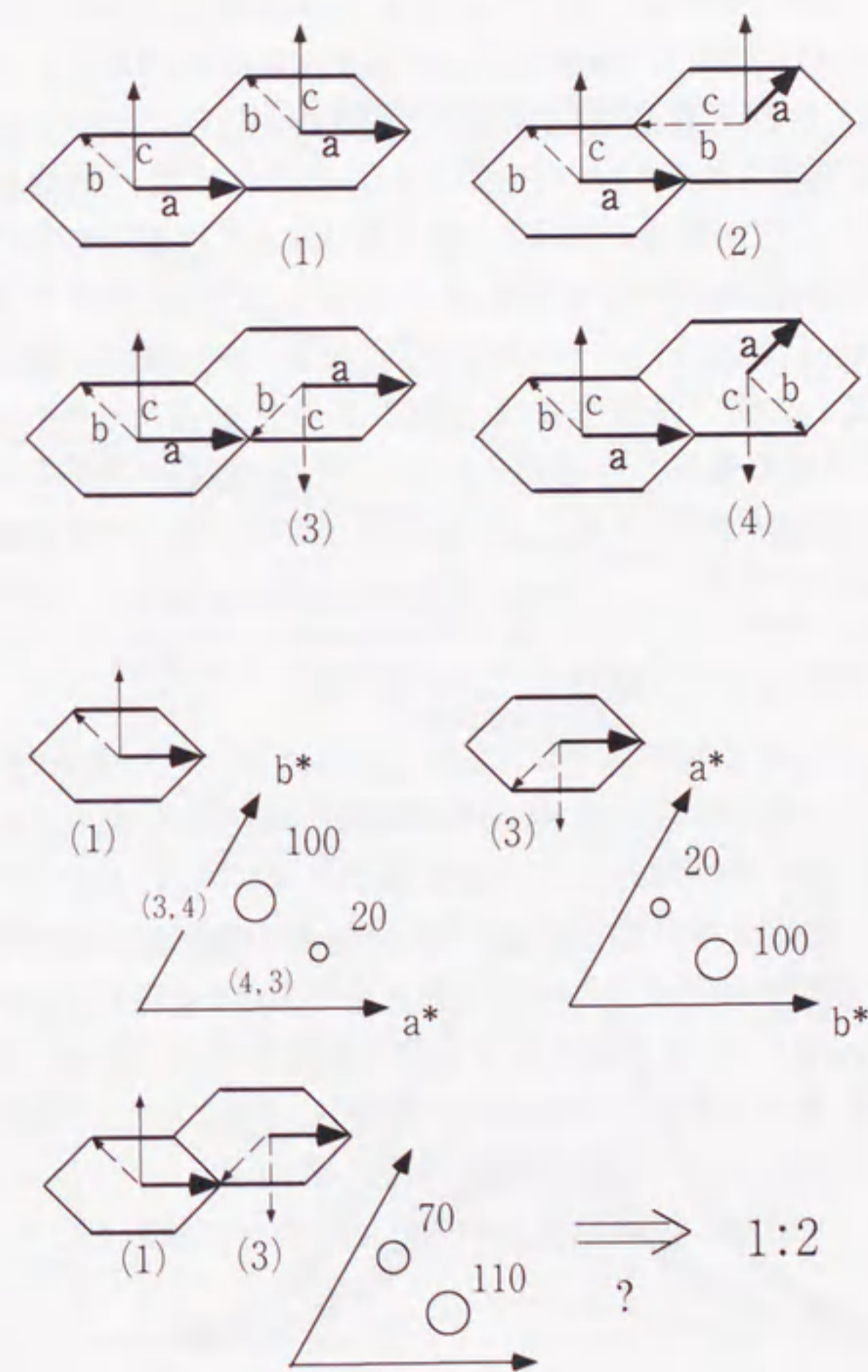


図10 双晶とその比率の計算

本研究では 3.0 Å 分解能での BR の構造解析を行なったが、試料作製法の工夫により平面性を改善し一般には 60 度程度の傾斜が限界であるところ、70 度傾斜までデータを収集しデータの完全度 (completeness) を向上することができた。

1.2.6. 電子線結晶学の特徴

1.2.6.1. X 線結晶学との比較

X 線結晶学 (X-ray crystallography) と対比して電子線結晶学 (electron crystallography) という言葉が使われる。3 次元結晶を使用する X 線結晶解析と 2 次元結晶やチューブ状結晶を使用する電子線結晶解析とは異なる結晶を用いるという点では相補的な関係にあるといえる。X 線による構造解析はシンクロトロン放射光 (synchrotron radiation) の利用などで非常に強い X 線が得られるようになり小さい 3 次元結晶 (微小結晶) でも解析が可能になってきている。電子線結晶学では直接位相情報が観察されるところが利点となる。そのため電子線結晶学では結晶の程度に応じてどのようなレベルでも構造が求まる。蛋白質によっては両者の長所を組み合わせる形で、電子線結晶学で求めた位相情報を初期値として利用し X 線結晶学では重原子同型置換法などを行なうことなく native の回折データのみを使用してより高分解能で構造を解くことが可能である。機能的に重要で関心の高い膜蛋白質は一般に 2 次元結晶になりやすいと言われる。また 2 次元結晶の方が膜蛋白質の現実の存在様式に近く、構造と機能の関係を調べるのに有利である。例えば BR の 2 次元結晶に光を照射しその後適当な時間を置いて急速凍結することにより反応中間体の構造解析を行なうということもできる (Subramaniam *et al.*, 1993, 1999)。

1.2.6.2. 電子線散乱因子の電荷による影響

X 線では電子雲が見えており X 線の原子による散乱のされ方はその原子内の電子の総和 (電荷がない時は原子番号 Z) に依存する。そのため X 線解析で得られた密度図は電子密度図と呼ばれる。電子線では X 線と異なり原子核のつくる静電場が見えている。入射した電子が原子核の回りの電子雲と相互作用した時は非弾性散乱となり高分解能の像形成には寄与しない。入射波に対してそれぞれの反射方向で原子がどの程度の散乱を与えるかを表したものを原子散乱因子 (atomic scattering factor) という。電子線に対する原子散乱因子を $f(\mathbf{k})$ とすると以下のように各体積要素 ($d\tau$) からの散乱寄与分を原子全体で総和 (積分) することにより計算できる。(それぞれの位置 \mathbf{r} からの散乱の振幅はその位置における原子の静電ポテンシャル $\rho(\mathbf{r})$ に比例し、またその位置 \mathbf{r} からの \mathbf{k} 方向への散乱の位相は原点からの \mathbf{k} 方向への散乱と比べて $e^{2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}}$ だけシフトしている。)

$$f(\mathbf{k}) = \int_{\text{原子}} \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} d\tau$$

$$\text{ただし、} \mathbf{k} \equiv \frac{1}{\lambda} (\mathbf{s}_1 - \mathbf{s}_0)$$

ここで \mathbf{k} は入射方向の単位ベクトル \mathbf{s}_0 と反射方向の単位ベクトル \mathbf{s}_1 の差を波長 λ で割ったものである。(既に波長で割ってあるのでスカラー積 $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}$ は \mathbf{r} 地点の反射方向へ投影された原点からの距離ではなく $2\pi \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}$ でその位相差を表すことになる。) 上の式から分かるように散乱因子と原子の静電ポテンシャルはフーリエ変換の関係になっている。ここで静電ポテンシャルを原子の中心から見て球対称と考えると原子の中心からの距離 r の関数 $\rho(r)$ として表される。また \mathbf{s}_0 と \mathbf{s}_1 の作る角度を 2θ とすると \mathbf{k} の大きさ k は下のようになる。

$$k = 2 \sin \theta / \lambda$$

そこで原子散乱因子も k の関数ひいては θ のみの関数として $f(k)$ で表せる。

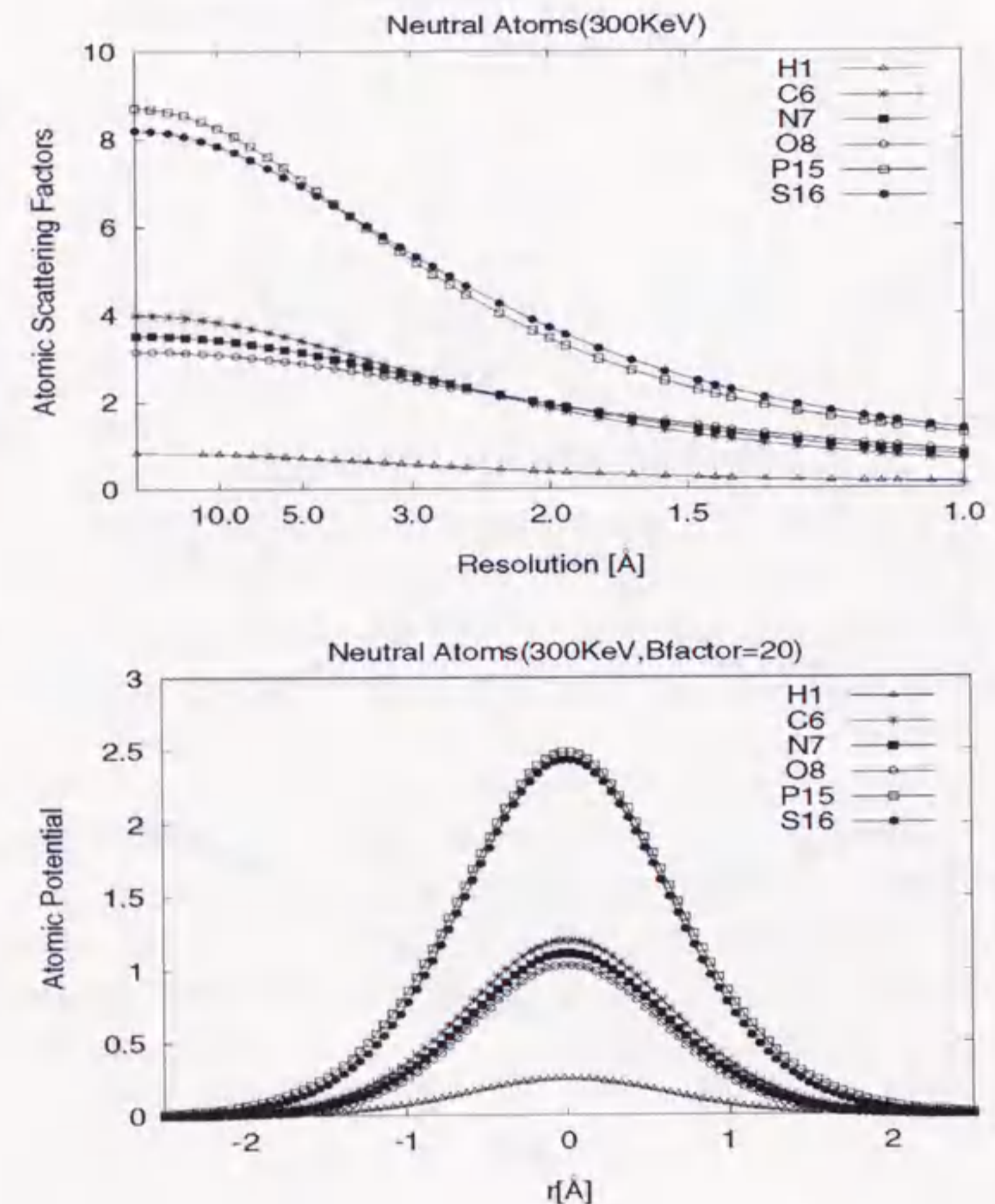


図 11a 電子線散乱因子とポテンシャル (中性原子)

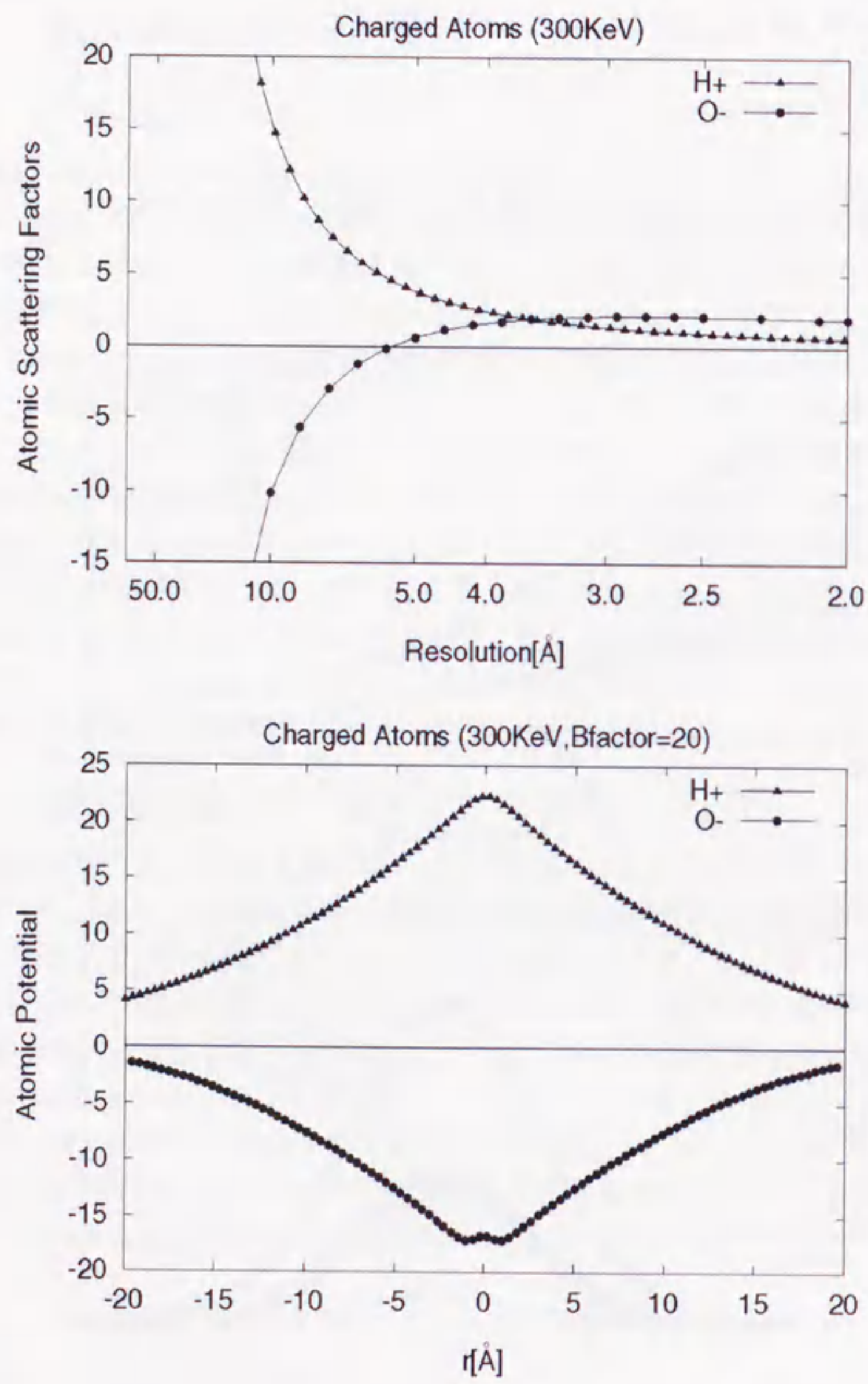


図 11b 電子線散乱因子とポテンシャル (電荷を持つ原子)

J を単位格子内の原子の総数とすると単位格子内の散乱因子 $F(\mathbf{k})$ は各原子からの散乱の寄与の総和として次のように表される。

$$F(\mathbf{k}) = \sum_{j=1}^J \int_{\text{原子}j} \rho_j(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} d\tau$$

ここで \mathbf{r} は単位格子の原点から見た座標で、 \mathbf{r}_j を単位格子の原点から見た原子の中心の座標、 \mathbf{R} をその原子の中心から見た座標とすると $\mathbf{r} = \mathbf{r}_j + \mathbf{R}$ と置き換えられる。またこの時単位格子の原点から見た \mathbf{r} における原子の密度 $\rho(\mathbf{r})$ は原子の中心から見た \mathbf{R} における原子の密度 $\rho(\mathbf{R})$ と同じで、 $\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{R})$ となる。よって上の式は次のように書き直せる。

$$\begin{aligned} F(\mathbf{k}) &= \sum_{j=1}^J \int_{\text{原子}j} \rho_j(\mathbf{r}_j + \mathbf{R}) e^{2\pi i \mathbf{k} \cdot (\mathbf{r}_j + \mathbf{R})} d\tau \\ &= \sum_{j=1}^J e^{2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_j} \int_{\text{原子}j} \rho_j(\mathbf{R}) e^{2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{R}} d\tau \\ &= \sum_{j=1}^J f_j(\mathbf{k}) e^{2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_j} \end{aligned}$$

ここでは、原子の中心から見た原子散乱因子 $f_j(\mathbf{k})$ を単位格子の原点から見たようにするために、いいかえるとその分の位相のずれを調整するために $e^{2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_j}$ の項が加わっていると考えられる。電荷を持った原子(Oや H⁺)の場合、その静電ポテンシャルは電荷を持たない原子(O や H)と比較して特に 5 Å 以下の低角部分で大きく異なる。電子はこの静電ポテンシャルにより散乱されるので電荷の有無により電子の散乱のされ方も影響を受ける。電子線を利用した高分解能構造解析では単位格子内の散乱因子をデータとして収集しそれを逆フーリエ変換することにより密度図を計算する。そのため電荷による静電ポテンシャルの違いが原子散乱因子、さらに単位格子内の散乱因子に反映され最終的に電子線構造解析で得られた密度図で観測されることが考えられる。

本研究では精密化を行なう前には実験で得られたデータから密度図を計算する時に低角の領域 (8 Å 以下) を含めた時と含めなかった時とで得られた密度図の違いを検討し電荷の状態を議論した (Kimura *et al.*, 1997)。精密化が進んだ時点では、電荷情報を含む実験からの密度図 (Fo) と中性を仮定した時のモデルからの密度図 (Fc マップ) との差から正電荷のある部分を議論した (Mitsuoka *et al.*, 1999)。

2. データ収集法とその改善点

2.1.カーボン支持膜と電顕用グリッド

2.1.1. 2次元結晶の平面性

蛋白質の2次元結晶は柔らかいため試料作製や電顕撮影時に注意しないと平面性を崩してしまふ。高分解能での構造解析で許される平面性は 0.2 度以内と言われ大変厳しいものである (Glaeser *et al.*, 1991)。特に高傾斜の像や回折像を撮影する場合、2次元結晶の平面性が悪いと分子を同方向から均一に観察することができず平均化の効果があがらず分解能を下げる結果となる。本研究ではカーボン支持膜の作製法や電顕用グリッドの工夫などにより試料の平面性を向上させ高傾斜データを含め 3.0 Å 分解能での解析が可能になった。

2.1.2. カーボン支持膜

カーボン支持膜は直接2次元結晶に接するため2次元結晶の平面性を保つために重要である。より表面のスムーズなカーボン支持膜を蒸着装置で作製するために次の点に注意した。

- ①蒸着の基盤にはステップのない雲母のへき開面をへき開してすぐに使う。
- ②純度の高い(99.9999%以上)カーボンロッドを使用する。
- ③始めはカーボンの大きな塊が飛び易いので、一度基盤を入れずに加熱した後で(ロッドの接点に溶けたカーボンの房がついてから)蒸着する。
- ④高真空(1×10^{-6} torr 以上)を保った状態で蒸着し、放電が起きてしまったものは使用しない。

カーボン膜を電顕用グリッドに張る時はカーボン膜を水面上で剥離後、表面に光を反射させスムーズな部分を確認してから電顕用グリッドですくい取った。

2.1.3. 電顕用グリッド

電顕用グリッドの品質もカーボン支持膜さらに2次元結晶の平面性に影響する。一旦カーボン膜が吸着するとカーボン膜と電顕用グリッド間ではすべりは起こらず急速凍結した時に電顕用グリッドが縮むとカーボン膜を歪めてしまう。材質としては銅よりも熱膨張係数がより小さくカーボン膜の熱膨張係数に近いモリブデン(Mo)を使用した方が好ましい(Booy *et al.*, 1993)。またエッジの加工が荒いとそのためにカーボン膜にしわがよってしまう場合がある。そのため特別にデザインし加工されたモリブデン製のグリッドを使用した(Fujiyoshi, 1998)。

2.2.トレハロース包埋法

本研究では従来のグルコース包埋法と比較検討した結果、凍結時の分子構造をなるべく維持するためにトレハロース包埋法を採用した。我々が解析した BR の構造と以前の構造とを比較すると膜貫通部分のヘリックス領域では構造に大差なかったが、膜表面に露出しているループ領域では我々の構造の方が明瞭に観察された。これは電子顕微鏡の性能の良さや高傾斜データの収集以外に包埋剤の違いも反映していると考えられる。またこのトレハロース包埋法は AQP1 や解毒作用に関わる膜蛋白質型グルタチオン転移酵素の構造解析 (Hebert *et al.*, 1997, Schmidt-Krey *et al.*, 1999) にも適用されて効果を挙げており汎用性の高いものと思われる。

2.2.1. トレハロースの特徴

トレハロースは2分子のDグルコースが α, α -C(1), C'(1)結合した2単糖で生物でも広く使用されている。特に乾燥や凍結の中を生き抜く動植物に多発生的に使用されており、そういった極限の状況下でも水を置き換えて生体の構造を保つと考えられている。水 100mg にトレハロース 120mg が溶解することに象徴されるようにトレハロースは水分子が作る水素結合のネットワークを無理なく置換できる。またそれでいて還元性がなく乾燥しても粘性の高いガラス状態を保ち包埋物の構造を壊さない、吸湿性が低いなど包埋剤として求められる性質の多くを満たしている (Roser, 1991)。トレハロースの結晶構造中ではトレハロースは2水和物を形成していることが知られている (Brown, 1972)。この時2つのグルコースの間には直接水素結合はできておらず水分子を介して水素結合している。このため2つのグルコースはその結合の回りを自由に動くことができ様々な分子と水素結合ができるものと考えられる。

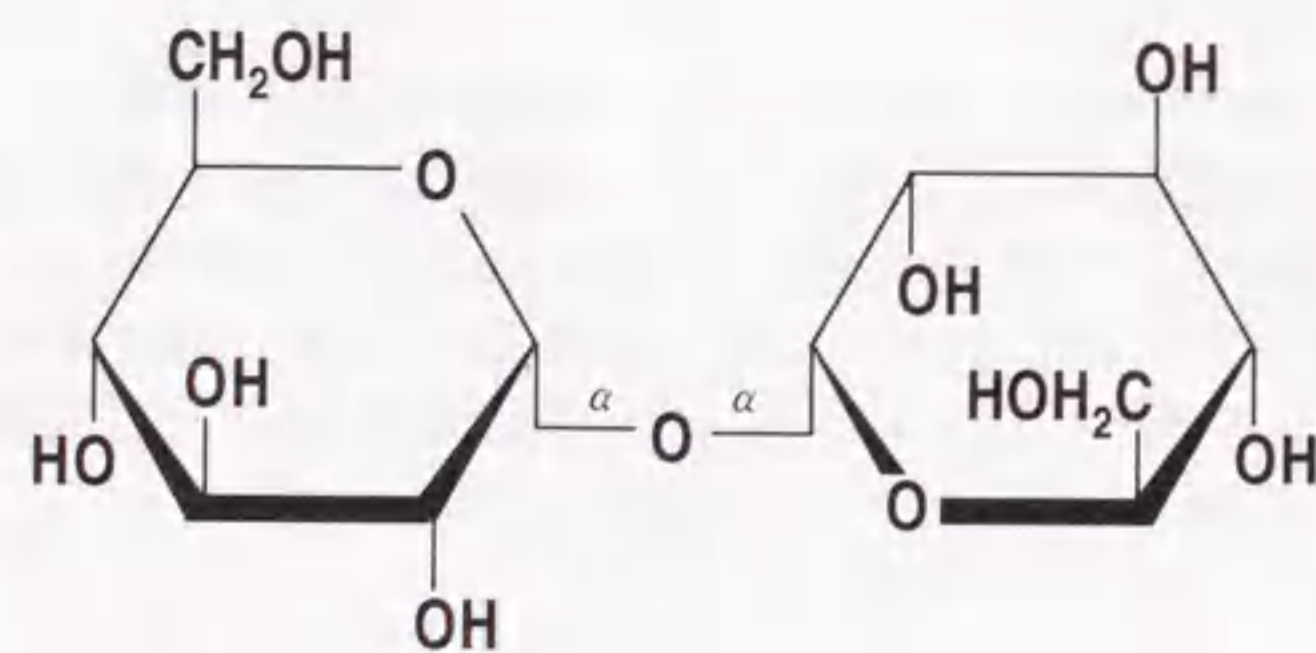


図12 トレハロースの構造式

2.2.2. グルコース包埋法との比較

実際に BR に対してグルコース包埋とトレハロース包埋の効果を比較した。それぞれの包埋法に対し乾燥を充分に行なったもので行なわなかったもの2種類を用意し計4つの場合で約10枚から20枚ずつ回折像を撮影し比較した。以下‘半乾燥’という場合は包埋剤を含む試料を電顕用グリッドに加えた後にろ紙で余分な液を吸い取って10秒程時間を置いてからすぐに急速凍結したものをいい、‘乾燥’という場合はデシケータに数時間放置した後に急速凍結したものを指すことにする。半乾燥時に10秒程時間を置くのは試料の厚みを調整するためで、試料が厚すぎると特に傾斜のデータを撮影時にノイズが多くなり高分解能まで回折点が出なくなってしまう。個々の回折データ内での対称点同志のパラツキを示す $R_{Friedel}$ の分布を見ると乾燥したグルコース包埋(4.96%)以外は同様の値(5.48~5.68%)を示した。乾燥したグルコース包埋の場合に $R_{Friedel}$ が良くなる理由としては乾燥に強くそれにより試料の厚さを薄くできることが考えられる。グルコース包埋とトレハロース包埋のデータを全て同時にマージし平均化された強度データを得た。この時、平均化されたデータからのパラツキを示す R_{merge} の値を比較すると次のような順番になった。

$$R_{merge}(\text{トレハロース、半乾燥}) < R_{merge}(\text{グルコース、乾燥}), R_{merge}(\text{トレハロース、乾燥}) < R_{merge}(\text{グルコース、半乾燥})$$

表1 トレハロース包埋とグルコース包埋 ($R_{Friedel}$ と R_{merge} の比較)

	回折像の数	$R_{Friedel}$ (%)	全条件のデータをマージしたものに對する R_{merge} (%)	各条件のデータをマージしたものに對する R_{merge} (%)
(a)トレハロース、半乾燥	18	5.49 (0.97) [#]	9.3 (2.2) [#]	9.1 (2.3) [#]
(b)グルコース、半乾燥	17	5.68 (0.94) [#]	12.8 (3.4) [#]	13.2 (3.6) [#]
(c)トレハロース、乾燥	7	5.48 (0.56) [#]	10.8 (2.5) [#]	10.8 (2.4) [#]
(d)グルコース、乾燥	9	4.96 (0.55) [#]	10.5 (3.0) [#]	10.5 (3.3) [#]

[#]括弧内の数字は標準偏差

半乾燥のトレハロースで R_{merge} の値は最も良く 9.3% であった。この R_{merge} の値の大小関係は統計検定 (スチューデント T テスト、有為水準 0.05) によって有為なものであることが確認された。包埋法による R_{merge} の値の違いが結晶の歪み易さの違いに起因しているとする包埋法によって格子パラメータのばらつき方も異なると予想される。実際に格子パラメータのばらつき方を最も R_{merge} の差が大きかった半乾燥のトレハロース包埋と半乾燥のグルコース包埋で比較してみたが殆ど同じであった (a^* ベクトルのピクセル長は半乾燥のトレハロース包埋と半乾燥のグルコース包埋でそれぞれ 43.98 と 44.01、標準偏差も 0.17 と 0.18)。そのため、格子パラメータに影響を与えるような結晶の歪み方の違いにより R_{merge} の値が異なるのではないと考えられた。またもし包埋法によって BR の構造が部分的にでも異なりそのために全体で平均化された構造に対する R_{merge} の値が違ってきているとしたら、それぞれの包埋法のデータのみをマージして個別に平均化した構造に対しては R_{merge} の値が改善することが期待される。そこで個別に各包埋法のデータのみをマージしそれに対する R_{merge} の値も計算してみたが、全体をマージした構造に対する R_{merge} の値と変わりがなかった (例えば半乾燥のグルコース包埋では全体をマージした構造に対する R_{merge} の値は 12.8%、標準偏差 3.4 で個別にマージした構造に対する R_{merge} の値は 13.2%、標準偏差 3.6 で改善する傾向は見られなかった)。これにより包埋法によっては別の構造に収束するという可能性も否定された。これらの考察の結果、BR 分子が包埋法により別の構造をとるのではなく平均的な構造は同じであるが包埋法によりその平均の構造からのばらつき方が異なることが考えられた。半乾燥のトレハロース包埋の場合に R_{merge} の値が最も良くなる (9.3%) のでその場合が最も構造的なばらつきが小さいと考えられる。トレハロース包埋でも完全に乾燥させてしまうと R_{merge} が悪くなってしまふ (10.8%)。これはトレハロースが 2 水和物を形成している時にもっとも自由に水素結合を作ることに関与があるかも知れない。グルコース包埋の場合は乾燥させた場合の R_{merge} の方 (10.5%) が、半乾燥の場合 (12.8%) より良かった。これはグルコースで水分子を置換するには十分な乾燥が必要なのかも知れない。もしくは十分に乾燥させた方がグルコースの包埋が薄くきれに行なわれ残った水分子も含めて急速凍結、電子線照射時に試料をよく保護できるのかも知れない。

表 2 格子ベクタの分散の比較

	回折像の数	a^* (ピクセル数)	b^* (ピクセル数)	γ^* (°)
(a) トレハロース, 半乾燥	18	47.60 (4.67) [#]	47.52 (4.83) [#]	60.09 (0.26) [#]
(b) グルコース, 半乾燥	17	47.86 (4.75) [#]	47.66 (4.77) [#]	60.11 (0.14) [#]

[#] 括弧内の数字は標準偏差

2.3. スロースキャン CCD カメラとスキャナ

本研究では結局全傾斜合わせて、像と回折像それぞれ 200 枚前後を処理した。極低温用の染色をしていない (コントラストの低い) 試料を用いてこのような枚数の解析に使用できるデータを収集するのは容易ではなく、効率のよいデータの取り込みが重要であった。回折像の撮影にはスロースキャン CCD カメラを採用し実像のフィルムのスキャンには 1 次元 CCD 型のスキャナを使用した。

2.3.1. スロースキャン CCD カメラ

回折像のデータ収集には画素数が $1k \times 1k$ さらに $2k \times 2k$ のスロースキャン CCD カメラ (Gatan 社製) (Krivanek et al., 1993) を使用した。以前フィルムから回折データを読み込んでいた時と比べ強度の測定精度が上がりまたリアルタイムに回折像の良否が判断でき収集効率が格段に向上した。実際、フィルムと CCD の回折点の形状を比較するとフィルムに比べ CCD からデータの精度が良いのが容易に分かる。CCD で測定精度が向上する理由としては、量子検出効率 (Digital Quantum Efficiency; DQE) が 1 に近い、ダイナミックレンジが広い (14 ビットで A/D 変換される)、リニアリティが良い、フィルムに見られる粒状性や、ほこりや傷などのノイズがなくピクセル単位での感度差の補正も可能であることなどが挙げられる。ここで DQE は次の式で表され S/N 比を全く落とさずに信号を伝える場合に 1 となる。

$$DQE \equiv \frac{(S/N)_{out}^2}{(S/N)_{in}^2}$$

実際にフィルムと CCD のデータを解析して比較した結果を表に示す。特に $2k \times 2k$ のサイズの大きい CCD を使用した時はカメラ長を $1k \times 1k$ の時よりも長くとり回折点間の分離も十分となり $R_{Friedel}$ や R_{merge} の値が $1k \times 1k$ のものと比べても 1/2 近くに良くなった。 ($2k \times 2k$ で $R_{Friedel}$ が 5.6%、 R_{merge} が 8.9%、 $1k \times 1k$ で $R_{Friedel}$ が 13.3%、 R_{merge} が 16.5% であった。)

表 3 フィルムと CCD データとの比較

	回折像の数	$R_{Friedel}$	R_{merge}
フィルム	27	12.7 (3.2) [#]	17.6 (7.5) [#]
CCD $1k \times 1k$	36	13.3 (2.3) [#]	16.5 (2.8) [#]
CCD $2k \times 2k$	30	5.6 (0.9) [#]	8.9 (1.1) [#]

[#] 括弧内の数字は標準偏差

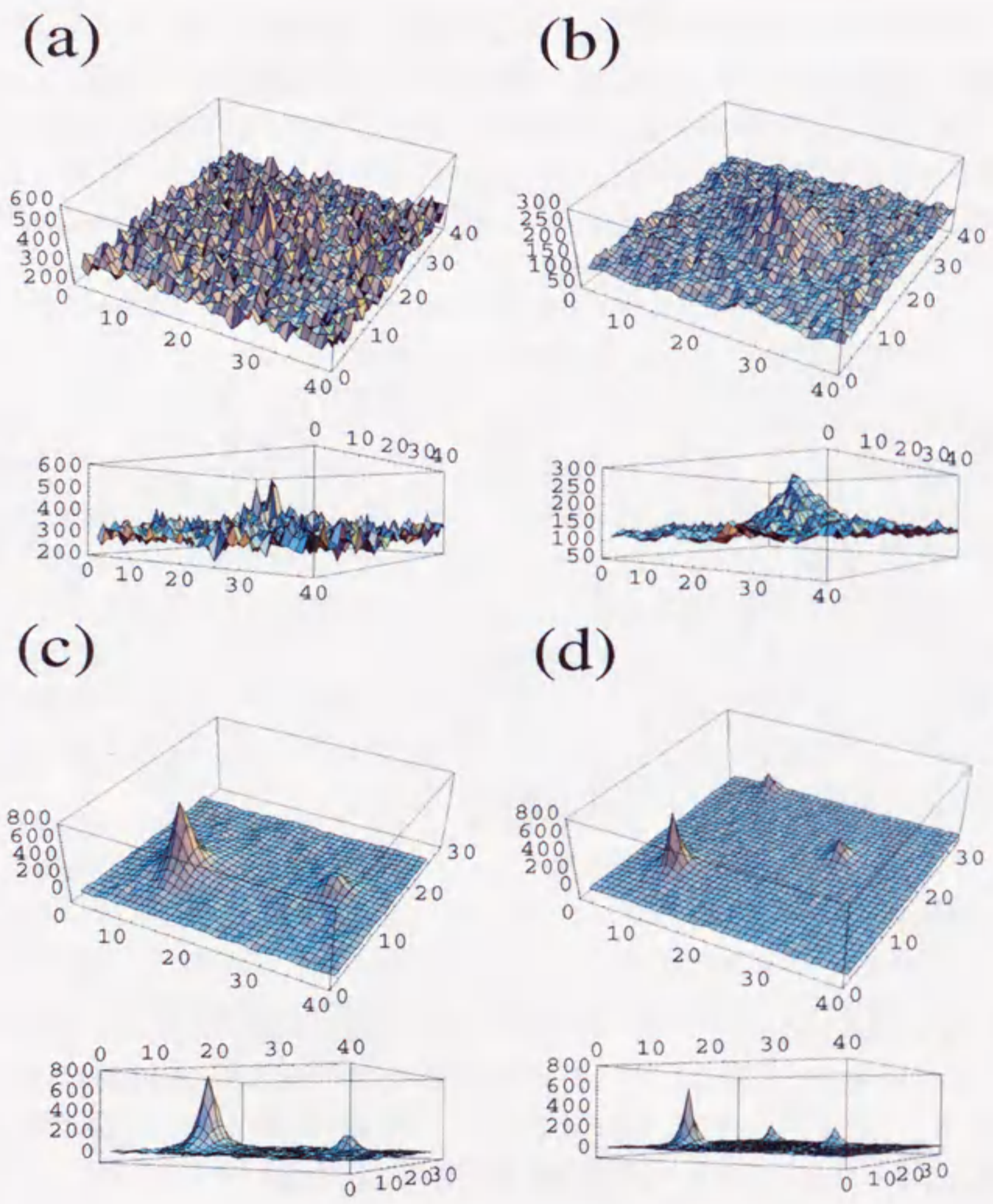


図 13 回折ピークの比較

(a) フィルムの回折点の形状。比較的弱くブロードな回折点を選んだ。(b) 1k×1k の CCD の a と同じ回折点の形状。(c) 1k×1k の CCD の回折点。比較的強い回折点を選んだ。(d) 2k×2k の CCD の c と同じ領域の回折点。

2.3.2. 1次元 CCD 型スキャナ

像のデータをその後のコンピュータ解析のためにデジタル化するためにはフィルムをスキャナで読み込む必要がある。従来は Perkin-Elmer 社製のマイクロデンシトメータを使用していた。このデンシトメータは1点のみを照射するタイプで位置精度もよいがスキャンするのに時間がかかることが問題であった。例えば標準的な設定で5 μ mのステップサイズで6000×6000の領域を読み込むと8時間以上かかった。1次元 CCD をもつ日本サイテックス社製の Leafscan を使用することによりスキャンスピードを飛躍的に早くすることができた。同様の条件でスキャンした場合 20 分以下で読み込みが可能であった。ただし 1 次元的に光をあてるためどうしても光のにじみだしが発生し、また端に近い程度位置精度が悪くなる傾向がある。原子レベルで構造解析をする場合振幅情報は回折像より得るので位相情報のみが問題となるが DQE で比較すると従来のマイクロデンシトメータで0.8だったものがLeafscanでは0.5にまで下がっていると見積もられた(Mitsuoka et al., 1997)。もっともこれは操作性の良さやスキャン時間の短さで補える範囲のものであった。

3. 解析システムとその改善点

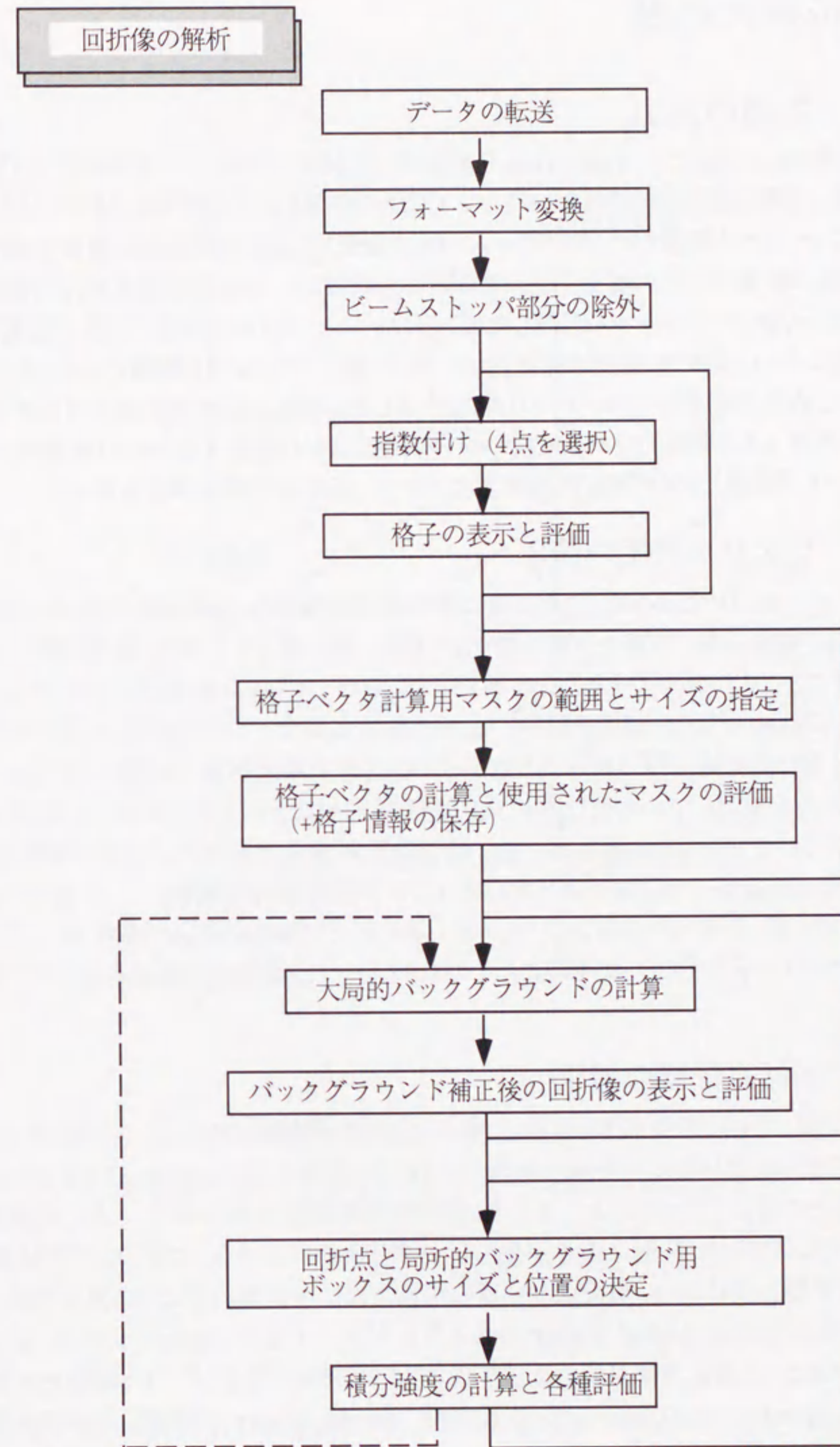


図14 回折像の解析

3.1. 回折像の処理

3.1.1. 処理の流れ

回折像の解析には主として Henderson らが開発した MRC パッケージを使用した (Crowther *et al.*, 1996)。手順としてはまずスロースキャン CCD で収集された回折像を MRC パッケージの標準形式にフォーマット変換した。次にビームストップを使用している時はその領域を選択的に切り出して、以降の計算ではその部分を使用しないようにした。4 つの回折点を選んで指数付けを行ないおおまかな格子パラメータを計算した後、そのパラメータから予想される格子位置近くに現れる S/N 比の良いより多くの回折点を使用してさらに格子パラメータを精密化した。次に回折像から差し引くための大域的なバックグラウンドを計算した。最後に回折点を積分するための回折点用ボックスのサイズと局所的なバックグラウンドを回折点から補正するための局所的バックグラウンド用ボックスの位置とサイズを回折点周辺に決めて、回折点の積分強度を求めた。

3.1.1.1. ピクセル感度の補正

スロースキャン CCD ではそのピクセル毎に若干感度が異なる。この感度の違いは毎回同じなので一様に電子線を照射した場合と電子線を全く照射しない場合と 2 通りの条件のデータを予め撮影しておくことにより補正できる。この補正にはスロースキャン制御用プログラム Digital Micrograph (Gatan 社製) の機能を利用した。また感度が異なってもそれぞれのピクセルで直線性は保たれており感度補正後の読み取り値がそのまま電子線照射量に比例していると考えてよい。以前フィルムを使用していた時は特に強い電子線照射のところでは飽和して直線性が保たれていなかったのでフィルムの読み取り値と電子線照射量を対応づけるための参照テーブル (look-up table) を使用する必要があった。そのため実際に照射時間をいくつか変えて同じフィルムにスポット照射して作った校正用フィルムから得られたデータを用いて参照テーブルを作成していた。スロースキャン CCD 使用時にはこの参照テーブルを完全に直線的なものに置き換えた。

3.1.1.2. 回折点位置の補正

電子線の干渉により回折像が作られる。X 線のように電子線照射後にレンズを使用しないで測定することも可能かも知れないが普通は対物レンズにより後焦点面 (back focal plane) に一旦回折像を結像しその後いくつかのレンズを通し拡大して回折像を撮影する。これらの磁気レンズにより回折像では回折点の位置に歪みが生じる。ただし実像における CTF のような周波数に依存した成分の変調は受けない。回折点の位置のずれ方には回折像の中心から見て半径 (中心からの距離) が変わる歪み (radial distortion) と方位が変わる歪み (spiral または azimuthal distortion) がある。一般に方位が変わる歪みは大きくなく無視できる。そこで Baldwin らの方法 (Baldwin & Henderson, 1984) に従って反射球 (Ewald sphere) を考慮した半径の歪みを補正した後半径の 3 乗に比例した半径の歪み (pincushion distortion) の補正を行なった。上記の補正をして回折点の位置を求めてから、さらに各回折点の強度の重心位置を計算してその回折点の最終的な中心位置とした。強い回折点から回折点位置を補正しておくことにより弱い回折点の中心位置を予め正しく予測できるようになった。

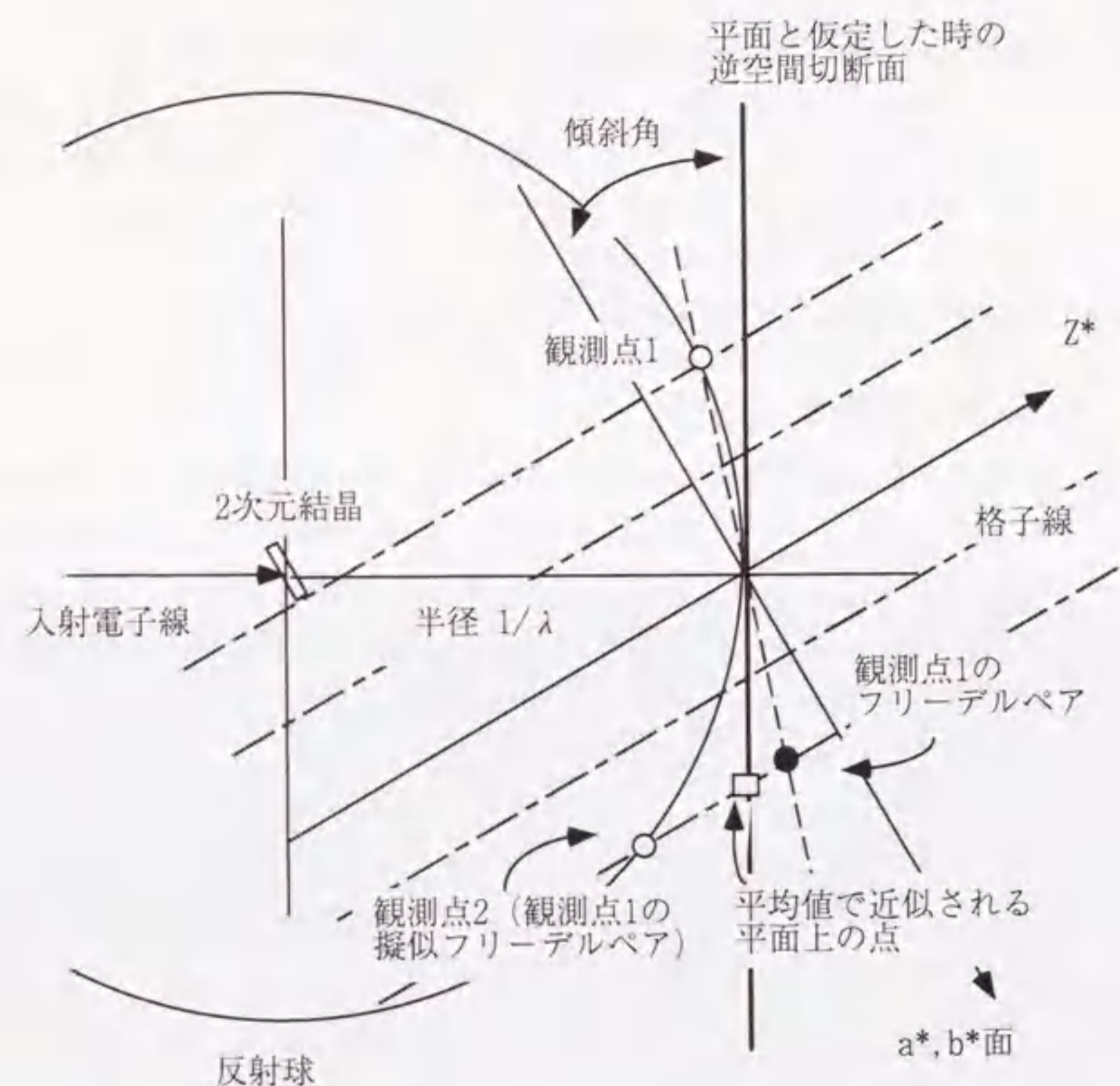


図15 反射球と擬似フリーデルペア

観測点1と2 (擬似フリーデルペア) の強度の平均値で平面上の点の強度を近似する

3.1.1.3. 擬似フリーデルペアの平均化

1 つの回折像の中で中心の (0,0) からみて点対称にある 2 つの回折点 (h, k) と (-h, -k) の組みを近似的な意味でフリーデルペア (Friedel pair) と呼ぶ。反射球による逆空間の切断部分が完全な平面でないために、このフリーデルペアの 2 点は逆空間の中心を通る同一の平面上には厳密には載らない。言い換える z^* の絶対値が正確に同じ値ではなく、厳密な意味でのフリーデルペアとはならない。このことを強調したい場合には特にこの 2 点を擬似フリーデルペアと表現すること

にする。ある回折点の正しいフリーデルペアと擬似フリーデルペアの 2 つの点は同じ格子線上ではあるが反射球による断面を近似する平面(入射電子線に垂直で反射球に接する平面)から見るとそれぞれ反対側に位置することになる。つまりもともと擬似フリーデルペア同士で Z^* の違いは小さいがさらにその 2 つの平均値(近似面を挟む正しいフリーデルペアと擬似フリーデルペアの平均値と同じ)を計算することで、近似面での Z^* における強度が正しく得られると考えて問題ない。実際このエラーは結晶の平面性の悪さなどに起因する回折点のにじみによるエラーよりずっと小さく無視できる。またこの同一の回折像内の 2 点をフリーデルペアとして扱うことによりその強度の差を測定誤差の目安にできる。ただし格子線上で強度が急激に変化するような場所では擬似フリーデルペア間の強度の差が大きくなることが考えられる。フリーデルペアの強度の差に対してしきい値を設けることによりフリーデルペアの片側だけにノイズがのった場合のデータを除去できるがこのような急激に強度変化する点を落としてしまう可能性があるので注意を要する。

3.1.1.4. 傾斜角と傾斜軸の計算

解析の初期に傾斜角と傾斜軸を見積もることが必要な場合は非傾斜時の格子定数と現在の格子ベクトルの比較からそれらを計算し(Shaw & Hills, 1981)使用した。この計算方法は傾斜が小さい時は傾斜角の見積もりエラーが大きくなる傾向がある。実際に回折データを 3 次元的にマージする場合にははじめはこの計算で求めた傾斜角と傾斜軸を使用するが後の段階ではデータがもっともつじつまがあうように傾斜角と傾斜軸を調整し精密化した。

3.1.1.5. 広域的バックグラウンドの補正

Baldwin らの方法に従いまず回折像の中心点で回転対称を持つバックグラウンド要素の補正(radial background subtraction)を行なった(Baldwin *et al.*, 1984)。これは主に非弾性散乱により低角側に生じたバックグラウンドを除去するための補正で、ちなみに非弾性散乱は弾性散乱の 3~4 倍発生する。この補正ではまず回折点からの影響を排除するために同じ円周のデータから 3σ 以上の点を除外した残りの点を平均してその半径でのバックグラウンド値とする。さらにスムージングを行なうために近くの前 15 点の半径でのバックグラウンド値を平均化してその半径での最終的なバックグラウンド値とした。以前回折像の撮影にもフィルムを使用しデンストメータでスキャンしていた時には、デンストメータの光源における分オーダでの変動(drift)を補正するために回転対称のバックグラウンド補正に続いて Y 軸方向でのバックグラウンド補正(Y-correction)も行なっていた。この補正は読み取りラインとは垂直(Y 軸方向)のフィルムの端の読み取り値の変動を調べて行なっていたがスロースキャン CCD を使用するようになった今では必要なくなった。本研究では回転対称のバックグラウンド補正に加えて回折像全体に 2 次元のなめらかな面をフィッティングする面フィッティングの手法を取り入れてより柔軟な広域的なバックグラウンド補正を行なえるようにした。このなめらかな面は格子点の周辺に用意したバックグラウンド計算用ボックスにおける平均値に対して Plot79 ルーチンにある FITVSF サブルーチンを使用して求めた(Mitsuoka *et al.*, 1999)。特に高傾斜のデータの場合傾斜軸からはなれた場所に非等方的にバックグラウンドの高い領域が生じる傾向がありそれを除去するのに効果があった。

3.1.1.6. 回折点用および局所的バックグラウンド用ボックス

回折点強度を積分する場合、そのボックスサイズを x, y 方向のピクセルサイズで指定する。必要があれば傾斜軸からの距離(傾斜軸への垂線の長さ)に応じてそのボックスサイズを直線的に変化させることができる。この機能は特に傾斜データにおいて傾斜軸から離れたすなわち z^* の大きな回折点がぼやける傾向があるのでそれに対応して回折点用ボックスも大きくするために使用した。回折点用ボックスの周辺に 4 つまたは 6 つの局所的バックグラウンド用ボックスを配置できる。この局所的バックグラウンド用ボックスから得られたバックグラウンド値で回折点用ボックスのピクセル値を補正した後にその回折点の強度を積分した。回折点用ボックスは不必要に大きくとるとノイズを拾ってしまったたりまたバックグラウンドの見積もりエラーの影響が大きくなるので注意を要した。局所的バックグラウンド用ボックスは回折点用ボックスと重ならない範囲でできるだけ大きくとった。

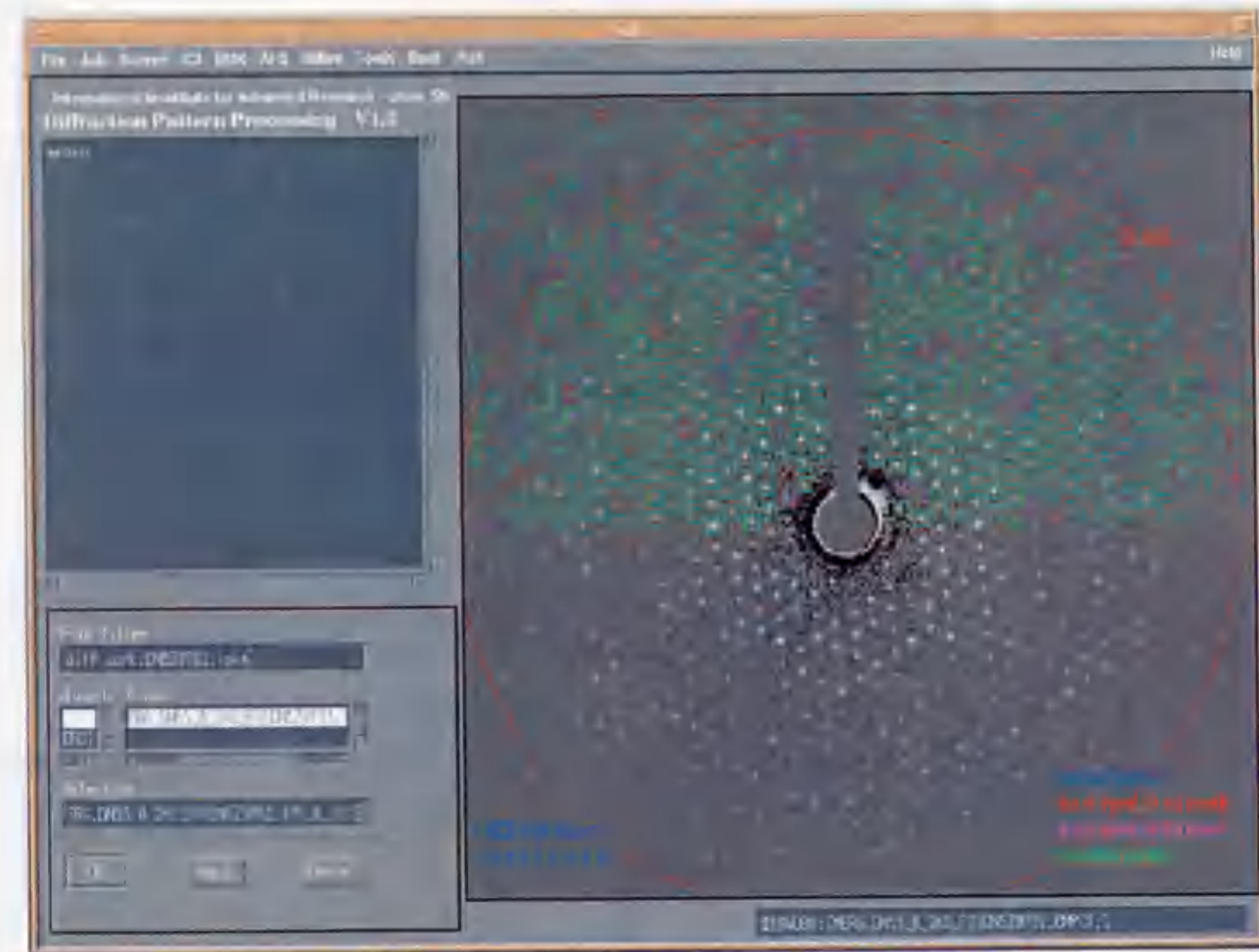


図 16 XDP (グラフィカルユーザインターフェース)

この例では回折像を S/N 比(IQ 値)の良い回折点をより大きなボックスで囲んで表示している。また R_{Friedel} の良い回折点は緑色のボックス表示になっている。

3.1.2. 表示システム (XDP)

本研究では MRC パッケージに加えさらにそれらのプログラムを効率良く使用できるようにするためのグラフィカルユーザインターフェースとして X11/Motif の機能を利用した回折像用の解析、表示システム (XDP と呼ぶ) を開発した。本研究で MRC パッケージに対し補足的に追加したビームストップ部分の切り出しや面フィッティングなどの実行も組み込まれている。この XDP システムを使用することにより解析ジョブの実行を対話形式で行なえまた各種の実行結果をわかりやすく画面表示できるようになった。回折点用および局所的バックグラウンド用ボックスの効率的な決定にも有効であった。このシステムの使用手順の概説を付録 D に記載した。

3.2. 実像の処理

3.2.1. 処理の流れ

実像の解析にも回折像の場合と同様、主に MRC パッケージを使用した。6000×6000 ピクセル前後のサイズのデータをまずスキャナで読み込んだ。このデータをフーリエ変換後、回折点の指数付けを行い格子ベクトルを求めた。S/N 比の良い回折点のみを残すようにマスクを設定しフーリエ逆変換を行なった。これにより周期性のない雑音を除かれたフーリエフィルタ像が作れる。このフィルタ像を使用して格子の歪みを補正した。これにはまずフィルタ像の中心に単位格子より少し広い領域を参照領域として選びフィルタ像の全領域との相関関数を計算した。基本的に単位格子分ずれたところに周期的に相関関数のピークが現れるがそのピーク位置のずれから格子の歪みを判断し元の像を補正した。この格子の歪み補正は通常 2 サイクル行い必要があればさらに繰り返した。2 回目以降の歪み補正には参照領域としては元の像のフィルタ像ではなく前回のサイクルで歪みを補正された像のフィルタ像を使用した。ただし実際の歪み補正自体は常に補正を行っていない元の像を対象に行われた (Henderson et al., 1990)。

3.2.1.1. 光回折

実像に関してはまず光回折装置 (optical diffractometer) を使用してよいフィルムのみを選び出しそのフィルムのなかでも結晶性のよい領域を選択した。一般にこの段階で十分に時間をかけた方が以降の解析を無駄なく効率よく行なえる。回折点がぼやけていたり線を引いていたりせずにシャープなままで必要とする分解能まで出ているのを確認した。光を照射する領域を移動させてその光回折パターンの変化を確認しながら結晶性の良いスキャンすべき領域を判断した。

3.2.1.2. スキャナ

スキャナで傾斜データを読み込む場合、傾斜軸に平行に読み込んでいくと CTF の補正を行なう場合に配列の参照効率がよく計算時間を短縮できる。ただしスキャナの特長で常にそれが最善とは限らない。LeafScan を使用した時は 1 次元 CCD の大きさにより横方向のサイズが限られることと CCD の両端側の位置精度がよくないことから傾斜データなどでその投影像が細長く見える場合には傾斜軸に垂直に置いて CCD の中心部分のみをスキャンに使用するようにした。

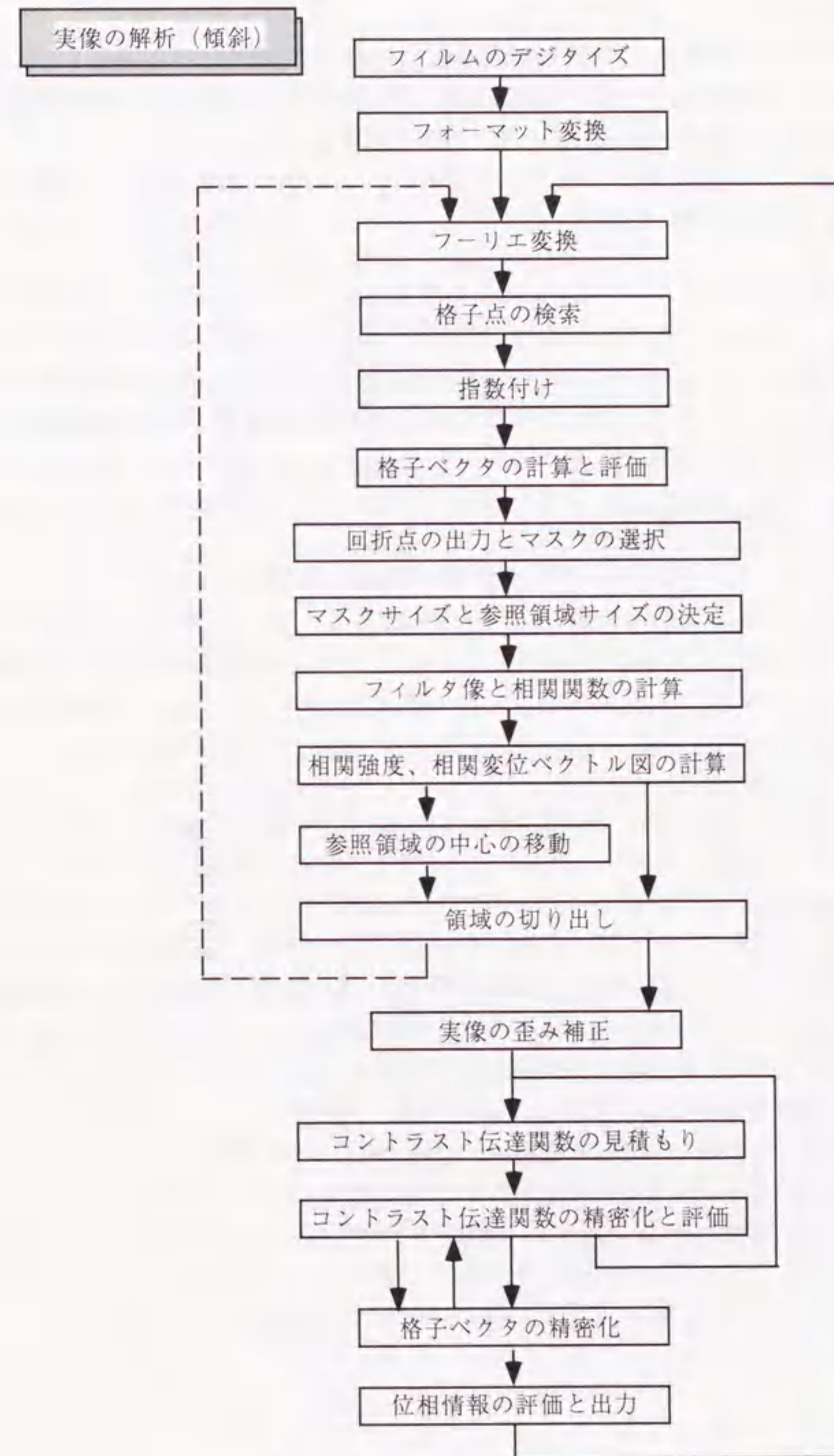


図17 実像の解析 (傾斜データ)

3.2.1.3. OD 値

フィルムを読み取った時のその各点(ピクセル)の黒化度(吸光度)、OD(optical density)値は下記の式で求められランベルト・ベール(Lambert-Beer)の法則より単位面積当たりのフィルムの黒化した粒子量に比例することになる。

$$OD \text{ 値(吸光度)} = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \epsilon bc$$

ここで I は透過光量、 I_0 は入射光量、 ϵ はモル吸光係数、 b はセル長(cm)、 c は濃度(mol/l)である。回折像のように広いダイナミックレンジで精度が要求される場合、この OD 値(黒化粒子量)と電子線照射量とが完全に比例しないのでその補正を行なう必要があるが像の場合はコントラストが低く OD 値は狭いレンジに納まるのでその範囲では OD 値と電子線照射量は比例する、すなわち線形性(linearity)が保たれていると考えてよい。

3.2.1.4. データの圧縮

各種の補正を行なうまではまだ高分解能の領域の情報は意味を持たないのでスキャンされた実像は始めのうちは圧縮した(通常 2x2ピクセルを平均して1ピクセルに置き換えた)状態で計算に使用した。ディスクやメモリ領域の使用を小さくし、かつフーリエ変換などの計算時間を短縮するのに有効であった。

3.2.1.5. フィルタ像

実像のフーリエ成分には結晶中の試料以外にカーボン支持膜やその他のノイズからの寄与も含まれる。逆空間の全領域に現れるこれらのバックグラウンドノイズは、実像を一旦フーリエ変換し続いて回折点周辺のデータのみを用いるようにフーリエ像にマスクをかけてフーリエ逆変換することにより効果的に取り除くことができる。このようなフィルタリング操作(filtering)によりノイズを落として作り直された像をフィルタ像(filtered image)と呼ぶ。この操作は実空間では単位格子内にある分子に対してその単位格子からの距離に応じて周囲の単位格子内にある分子に重みをつけて足しあわせ平均化することと同等で、結晶学的に周期性のないノイズさらに個々の分子の向きの乱れや統計的ノイズを平均化して取り除くことができる。この時マスクのサイズが大きい程、局所的な平均化を行なうことになる。例えばマスクのサイズを10ピクセルとすると各単位格子においてそこを中心に像の1/10の範囲でこの平均化が行われることになる。歪み補正はこのフィルタ像をもとに行うのでマスクサイズをあまり小さくすると広範囲で平均化されてしまい歪みが見えなくなってしまう。逆にあまりマスクサイズを大きくすると平均化の効果がなくノイズを落とせない。S/N比の良い回折点のみをマスクとして選ぶことで明瞭な繰り返し構造のみが平均化されて作られたフィルタ像が得られる。

3.2.1.6. 相関関数

通常はフィルタ像の中心領域を切り出して参照領域とする。この参照領域はフィルタ像全体に対して相関関数を計算するために使用する。参照領域をフィルタ像と正確に同じサイズになるようにパディングしたもののフーリエ変換像と元(オリジナル)の像のフィルタリング(マスク)されたフーリエ変換像の複素共役とを掛け合わせてから最後にフーリエ逆変換することにより相互相関関数が計算される。この計算は相関を求めることがフーリエ空間では複素共役と掛け合わせることに対応しているという相関定理(付録 C 参照)に基づいている。

3.2.1.7. マスクサイズと参照領域のサイズ

マスクするためのマスクサイズと参照領域の大きさは注意深く決定する必要がある。もしマスクサイズが大きすぎるとフィルタ像から十分にノイズを除去できない。そうすると相関関数のピークがはっきりと出ず格子上での詳細な歪みを補正できなくなる。逆にもしマスクサイズが小さすぎると相関関数を計算する前の段階でフィルタリングのため広い領域が平均化されてしまい歪み補正の効果がでなくなってしまう。マスクの半径は10から20、参照領域のサイズは像のサイズの1/10から1/20を使用した。

3.2.1.8. 相関変位図

相互相関関数からピーク位置を探し相関変位図を作成する。ピーク位置の検索は単位格子よりもずっと小さい半径の局所的な範囲で行われる。ただしピーク位置の変位は積算されていくので像全体では単位格子の半分やそれ以上の変位でも扱える。ピーク位置はフィルタ像の中心付近の参照領域の自己相関関数のピーク形状を楕円で近似してそれを相互相関関数にプロファイルフィッティングして求めた。

3.2.1.9. 歪み補正

相関変位図をもとにその変位を双3次スプライン(bicubic spline)関数でスムージングし歪み補正用の変位図を作成する。この歪み補正用の変位図を逆向きに用いて元の像から修正像を作成する。この変位図は変位ベクトルの集まりであるが像そのもののサイズよりは小さく、1つの変位ベクトルが80x80ピクセル程の範囲で共有されている。つまり歪み補正時にはその大きさの像の断片がまとまって平行に移動されることになる。この変位ベクトルは実数で表されているので補正後のピクセルの値はそのピクセルが含まれる断片が共有する変位ベクトル先の周辺4つのピクセルの値を用い2次元で線型的に内挿(双一次補間;bilinear interpolation)して求められる。

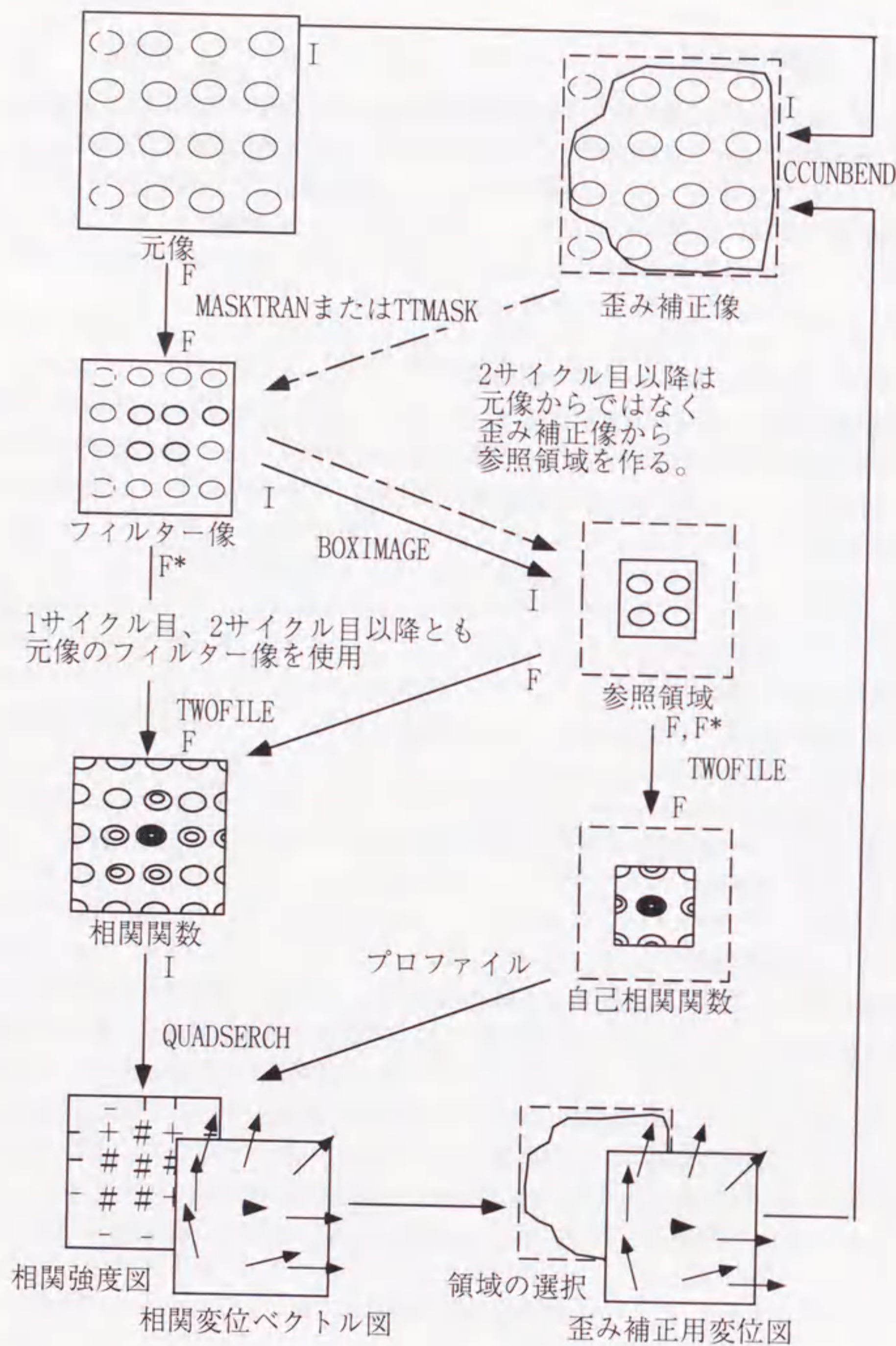


図 18 歪み補正の流れ

I; 像
 F; フーリエ像
 F*; フーリエ像複素共役

3.2.1.10. CTF と TTF の補正

コントラスト伝達関数(CTF)は以下の式で表せた。

$$CTF(\theta) = -2 \sin \chi$$

$$\chi = 2\pi\lambda^{-1} \left(\delta f \frac{\theta^2}{2} - C_s \frac{\theta^4}{4} \right)$$

ここで θ は反射角、 δf はデフォーカス値、 C_s は球面収差係数である。実像が非傾斜の場合はデフォーカス値は全領域で同じなのでコントラスト伝達関数は反射角(分解能)のみの関数となり同じ分解能の反射点には一定の CTF 値がかけられることになる。実像が傾斜している場合はデフォーカス値 δf は傾斜軸からの距離 p に応じて以下のように変化する。

$$\delta f = p \tan \alpha + \delta f_0$$

ここで δf_0 は座標原点でのデフォーカス値、 α はビームに垂直な面からの傾斜角である。この傾斜によるデフォーカス値の変化も考慮して CTF を表現したものを特に TTF (Tilt Transfer Function) という。

$$TTF(\theta, p) = -2 \sin(cp + \chi_0)$$

ここで c と χ_0 は下の式で表されるが与えられた θ においては定数と考えられる。

$$c = 2\pi\lambda^{-1} \left(\frac{\theta^2}{2} \tan \alpha \right)$$

$$\chi_0 = 2\pi\lambda^{-1} \left(\delta f_0 \frac{\theta^2}{2} - C_s \frac{\theta^4}{4} \right)$$

つまり特定の反射角 θ (分解能 $2 \sin \theta / \lambda$) のみで考えると TTF 値は傾斜軸からの距離 p に応じて sin カーブ的に変化するようになる。実空間中でのこの sin 関数が掛け合わされると結果として逆空間中ではそのフーリエ変換が畳み込まれることになる。sin 関数のフーリエ関数は 2 つの δ 関数の組み合わせになるのでそれが畳み込まれた結果 sin の周期に対応する値だけピークが中心からずれて傾斜軸に垂直方向に分離して見える。このままでは正しい位相情報が得られないがこの TTF を補正しやすいように像の各ピクセルにさらに予想したデフォーカス値から計算される TTF の値を掛け合わせてすなわち $(TTF)^2$ が掛け合わせられた新しい像を計算する。この像では TTF すなわち sin 関数が 2 乗されているがこれは逆空間では前と同じ 2 つの δ 関数がさらに畳み込まれて再び 2 重に分離することになり今度は格子点の中心に最大の極大が出るように 3

つに分離する。このピークを最大にするようにデフォーカス値を探すことによりデフォーカス値を精密化できその値で TTF を補正できる。

3.2.1.11. デフォーカス値

非点収差のためにデフォーカス値はフーリエ空間の異なる場所にある回折点毎に異なってくる。デフォーカス値は3つの変数で表される。この3つの変数は像の中心においてお互いに直行する方向での2つのデフォーカス値 ΔF_1 、 ΔF_2 とその1つ目のデフォーカス値が像の中での x 軸に対してとる角度 Φ_1 である。この3つのパラメータによりフーリエ空間中の Φ 方向への回折点におけるデフォーカス値 ΔF は下の式により与えられる。

$$\Delta F = \Delta F_1 \cos^2(\Phi - \Phi_1) + \Delta F_2 \sin^2(\Phi - \Phi_1)$$

3.2.1.12. IQ 値

各回折点の品質を評価するために IQ 値が使われる。これは次の式で定義される。ここで A はバックグラウンド補正後の回折点の振幅、B は回折点近くのバックグラウンドである。つまり S/N 比の逆数に 7 をかけたものである。

$$IQ = 7(B/A)$$

IQ=1 は大変良い回折点で S/N 比が 7.0 以上であることを示す。

IQ=7 はその回折点が大変弱く S/N 比が 1.0 程度であることを示す。

IQ=8 は振幅がバックグラウンド以上ではあるがその超える量はバックグラウンド以下である (S/N 比が 0 以上 1.0 未満である) ことを意味する。

IQ=9 は振幅がバックグラウンド以下 (A が負) になることを意味する。

試料なしのノイズのみのデータでは統計的に IQ=8 と 9 のみで 65% を占めるようになると言われる (Hayward & Stroud, 1981)。

3.2.1.13. ビーム傾斜の補正

入射電子線 (ビーム) が対物レンズの光軸に対して正しく調整されておらず傾斜している時には軸上コマ収差 (axial coma) が起こる。このビーム傾斜によるコマ収差は高分解能解析で問題となり、特に 5.5 Å を超える高分解能成分に大きく影響する。CTF や非点収差は常に問題になるが球面収差はその CTF に 2 次のオーダーで影響する (Smith *et al.*, 1983)。コマ収差は像の高分解能成分をビーム傾斜および分解能の 2 乗に比例して位置的にシフトさせこのことは位相に対して分解能の 3 乗に比例した影響を与える。このため 5.5 Å を超える分解能ではこのビーム傾斜の補正なしではデータが信用できなくなってしまう。位相の原点 (OX, OY) とビーム傾斜 (TX, TY) は同時に精密化される。

3.2.2. ジョブ実行時の入力支援ツール

実像の解析にも主に MRC パッケージを使用したが発行時間が長いジョブも多い。本研究ではさらに効率よくパラメータを引き渡してジョブを起動するためのインターフェースを開発して使用した。また相関強度図と相関変位ベクトル図を交互に参照しながら結晶性のよい領域を多角形に切り出すためのグラフィカルユーザインターフェースも本研究で作成し利用した。これらの入力支援ツールの使用手順の概説を付録 E に記載した。

3.3. 回折像のマージ

3.3.1. 変数の決定

回折像のマージには mergediff プログラム (Ceska & Henderson, 1990) を使用し、スケール因子 (scale factor)、温度因子 (temperature factor)、双晶比率 (twin proportion)、傾斜軸 (tilt axis) および傾斜角 (tilt angle) の精密化を行なった。

3.3.1.1. スケール因子と温度因子

回折像は一枚一枚撮影する度に異なる 2 次元結晶を使用する。それぞれの回折像からのデータを 3 次元的にマージするためには回折像毎に異なる回折点の強度 (スケール因子) やまた高分解能データの落ち込み方の違い (温度因子) を合わせる必要がある。特に高傾斜のデータでは同じ分解能の回折点でも傾斜軸方向より傾斜軸に垂直方向の方が減衰のされ方が大きい。そこで低傾斜のデータは等方温度因子 (isotropic temperature factor)、高傾斜のデータ (± 45 度以上) では非等方温度因子 (anisotropic temperature factor) を使用した。等方温度因子を使用した場合のスケール補正後の回折点の強度 I_{scaled} は以下の式で表される。

$$I_{scaled} = S \times I_{observed} \times e^{2B(\sin\theta/\lambda)^2}$$

ここで $I_{observed}$ は観測された回折点強度である。S はスケール因子、B は等方温度因子で回折像毎に値が決める。高分解能のデータの落ち込みが激しい回折像ほど温度因子 B はマイナスの大きな値が使われる。

非等方温度因子を使用する場合は以下の式を適用した。

$$I_{scaled} = S \times I_{observed} \times e^{2(B_{||}(\sin\theta_{||}/\lambda)^2 + B_{\perp}(\sin\theta_{\perp}/\lambda)^2)}$$

ここで $B_{||}$ は傾斜軸に平行な方向での温度因子、 $\theta_{||}$ は同じく傾斜軸に平行な方向での反射角で、同様に B_{\perp} は傾斜軸に垂直な方向での温度因子、 θ_{\perp} は同じく傾斜軸に垂直な方向での反射角である。このスケール補正された回折強度に変換してからそれぞれの回折像のデータをマージした。

3.3.1.2. 双晶比率

BRには4つの双晶タイプがあるが現在ある格子線データでのそれぞれのタイプの強度を I_n 、今考えている回折像におけるそれぞれの双晶タイプの割合を k_n とすると、観測されている強度 I_{obs} は以下の式のように4つのタイプからの寄与の和で表せる。1つの回折像全体で同じ双晶比率を適用し観測されている強度 I_{obs} をもっともエラーが少ないように説明できる k_n を求めた。

$$I_{obs} = k_1 I_1 + k_2 I_2 + k_3 I_3 + k_4 I_4$$

3.3.1.3. 傾斜軸と傾斜角

傾斜軸と傾斜角が決まると各回折点(h, k)での z^* の値が決まり対応する現在の格子線データでの値も判る。観測されたデータ $I_{obs(h,k)}$ とこの格子線データ $I_{crv(h,k)}$ とを最小2乗法でもっとも良く一致させる(下式の L を最小化させる)ことにより傾斜軸と傾斜角を精密化できる。

$$L = \sum_{h,k} w_{(h,k)} (I_{crv(h,k)} - I_{obs(h,k)})^2$$

またここで $W_{(h,k)}$ は、観測されたデータ $I_{obs(h,k)}$ の標準偏差から計算される。

$$w_{(h,k)} = 1/\sigma_{(h,k)}^2$$

3.3.2. 格子線のための線フィッティング

さらに `mergediff` プログラムでマージされたデータは `syncfitp3` プログラムを使用して減衰 `sinc` 関数を用いてフィッティングした。正方形のフーリエ変換は `sinc` 関数となる。

$$\text{sinc}(x) \equiv \frac{\sin \pi x}{\pi x}$$

2次元結晶の c 軸方向は繰り返し構造がなく膜の厚さの上限を d とするとその範囲に分子による密度分布が存在することになる。この実空間における制約を回折データを各 h,k における格子線にマージする時に適用することにより最終的に得られる密度図のノイズを小さくすることができる。強度分布は直接に密度分布のフーリエ変換ではなくそのパターン関数のフーリエ変換なのでその場合は $2d$ を厚さの上限と考えることができる。パターン関数に対して $2d$ の幅を持つ矩形を掛け合わせてその範囲内に収めるということは逆空間においては`sinc`関数で畳み込みを行なうことになる。さらに温度因子も考慮すると、回折像の強度を示す各格子線は c^* 方向に少しずつずれたの総和で近似することができる。回折データをマージする場合は最小二乗法を用いてマージする。減衰 `sinc` 関数は下記の式で表される。

$$I(z^*) = \sum_{i=-n}^{i=n} A_i \left(\frac{\sin \pi(z^* - z_i)2d}{\pi(z^* - z_i)2d} \right) \times e^{-\frac{1}{2}B(z^* - z_i)^2}$$

ただし $z_i = n(1/2d)$

フィットされた格子線から個々の強度データがどのくらいばらついているかを評価するために次の2通りの `Rmerge` を使用できる。

$$R_{merge1} = \frac{\sum |I_{obs} - I_{curve}|}{\sum I_{curve}}$$

$$R_{merge2} = \frac{\sum \sigma_{I_{curve}}}{\sum I_{curve}}$$

フィットされた曲線は 0.01 \AA^{-1} の間隔でサンプリングされる。CCP4 パッケージにある `TRUNCATE` プログラムによりこの強度は振幅に変換される。負の強度もこのプログラムにより正しく変換される。

3.4. 実像のマージ

実像のマージは `origtilt` プログラムにより行われる。下記の変数は各実像データ毎に決定される。組み合わせる時は異なった断面間の位置関係すなわち位相の原点を合わせる必要がある。傾斜角や傾斜軸も精密化していく。ビームの傾斜角も同様に精密化していく。高分解能の領域ではこのビームの傾斜角の精密化は特に重要である。

3.4.1. 変数の決定

像のデータでは以下の15の変数が決定される。マージする時にはスケール因子と温度因子が必要になる。

倍率(変数1)

デフォーカス値(変数3)

非点収差のために直交する2つのデフォーカス値と1つめのデフォーカスを生じる角度が必要。
傾斜データの場合は像の中心点での値

球面収差(変数1)

これは別の測定で決定されているものを使用する。

試料の傾斜角と傾斜軸(変数 2)

結晶学的原点(OX,OY) (変数 2)

X,Y 方向でのビーム傾斜(TX,TY)(変数 2)

単位格子を示す 2 つのベクタ(変数 4)

3.4.1.1. 結晶学的原点

原点(phase origin)は対称性から一義的に決められている場合もあるし、また p1 対称性の時のように任意に決められる場合もある。いずれにしろ原点を移動させて行きもつとも対称性を示す位置やそれまでマージされたものにもつとも一致する場所を検索する。はじめは単位格子を例えば 60x60 の領域に分けて大まかに検索しもつともよい領域を中心にまたその近くをさらに細かく 60x60 の領域に分けて検索するといったことを繰り返して十分小さなステップサイズで原点を検索する。原点をずらす操作では振幅は変化しない。位相は例えば a 軸に沿って単位格子の 360 分の 1 だけ像をずらすとすると h=1 の格子点では位相は 1° だけ変化するが h=2 の格子点ではその倍の 2°、h=3 の格子点では 3 倍の 3° といったように周波数に比例して変化することになる。

3.5. 両方のマージ

3.5.1. 格子線の計算

latlined により振幅と位相情報が各格子線にフィットされる。この時 Z 軸(c 軸)方向の厚さに制約を与えることができる。指定した膜の厚さ外には密度がないとしてフィッティングが行われる。脂質 2 重膜は最小でも 45 Å はあると考えられる。

振幅が小さい時は位相は大きく変化することができるが振幅が大きいたきは位相はゆっくりとしか変化しない。

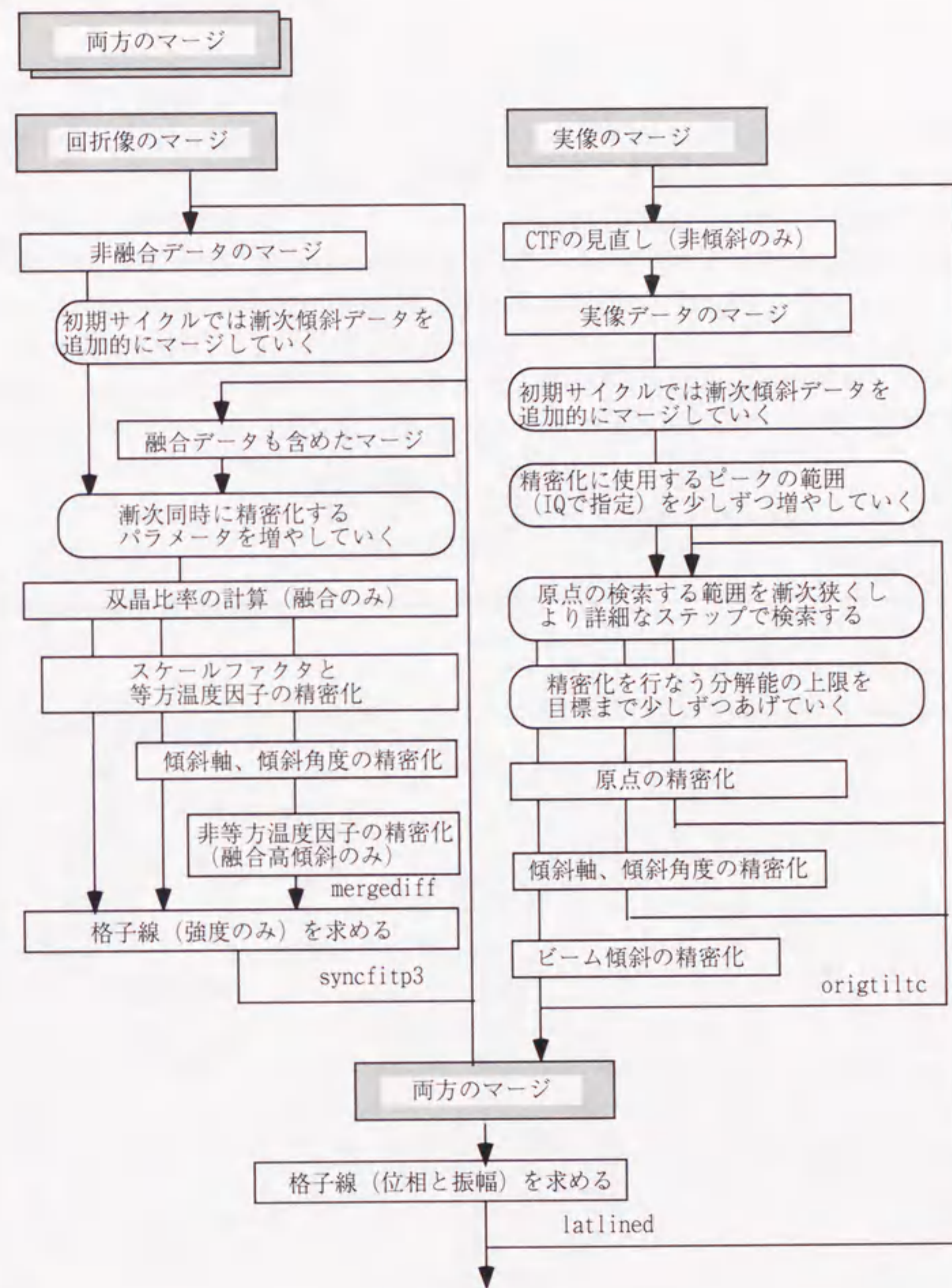


図19 両方のマージ

4. 結果と考察

4.1. モデルの精密化

4.1.1. 精密化の方法

精密化には X-Plor を使用した。3.0 Å までのデータを使用した。振幅情報だけでは精密化には充分ではないので位相情報も精密化に利用した。これは X 線と異なり電子線構造解析では位相情報も独立に直接実験データとして得られるので可能となる。電荷の状態を議論するには低角の情報に依る必要がある。実験の密度図とモデルからの密度図が高角部分で異なると電荷の議論ができなくなるので高角部分を使ってモデルをよく合わせ込んだ。モデルを 8.0 Å 以下のデータからは影響を受けないようにするために 8.0 Å 以下のデータは精密化には使用しなかった。8.0 Å から 3.0 Å の範囲で R 因子は 23.7%、自由 R 因子は 33.0% であった。2|Fo|-|Fc| マップは精密化されたモデルによく一致した。|Fo|-|Fc| マップで見るとヘリックスの膜貫通領域では 3.5 σ レベル以上の密度は存在しなかった。

表 4 結晶学テーブル

結晶学パラメータ	
空間群 (2 面性層群)	P3(p3)
格子定数	a = b = 62.45 Å, γ = 120° c = 100 Å (精密化で使用)
厚さ	70 Å (LATLINE で使用)
電子線回折 (振幅情報)	
回折像の数	339
分解能の上限設定値	3.0 Å
最大傾斜角度	70.6°
観察された反射の数	110812
FriedelR 因子	17.6%
実像 (位相情報)	
実像の数	181
分解能の上限設定値	3.0 Å
最大傾斜角度	61.2°
観察された反射の数	25225
データのマージ	
分解能	3.0 Å
独立な反射の数	6892 (振幅と位相、両方の情報を持つもの)
マージング R 因子	の)
位相残差 (phase residual)	31.3%
完全度 (completeness)	46.8° 78.4%
精密化	
自由度	6672
R 因子	23.7%
Free R 因子	33.0%
位相残差	54.4%
Free 位相残差	63.3°

精密化されたモデルが実験からの密度図に良く一致する理由として位相情報を精密化に取り入れたことが考えられる。密度図の見え方は振幅の正確さよりも位相の正確さにより影響されるといことが知られている。像からの位相情報は 4 Å までのデータは一般に問題がない。それを超すと S/N 比が悪くなったりビーム傾斜の補正が難しくなるなどの影響で悪くなっていく傾向がある。本研究のモデルでは 8.0 Å から 4.0 Å の範囲で位相残差(Phase Residual)は 45.4°、自由位相残差(Free Phase Residual)は 50.1° であった。

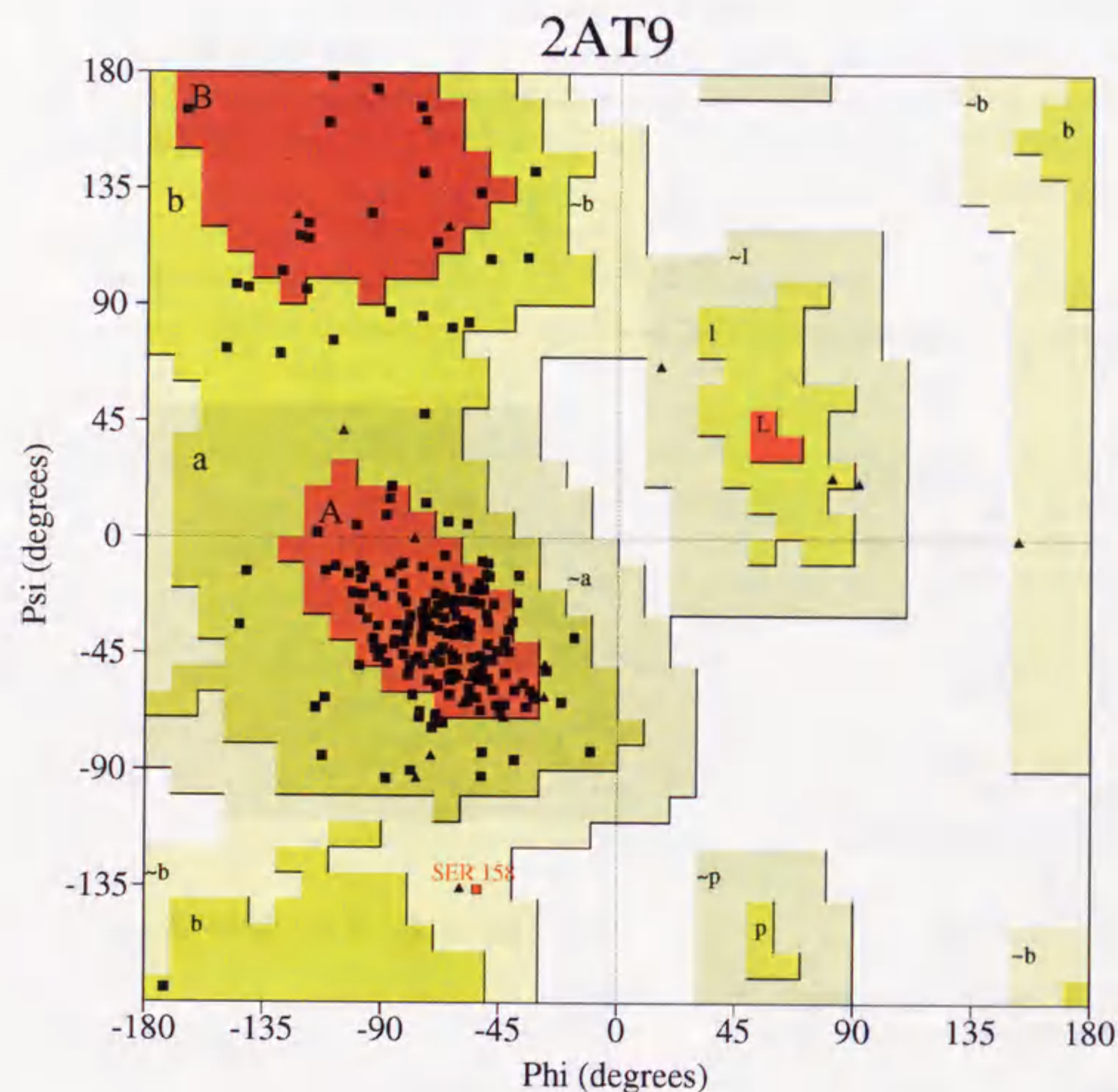


図 20 ラマチャンドラン図

4.1.2. ラマチャンドラン図

精密化されたモデルのラマチャンドラン(Ramachandran)図を見ると禁止されている領域に入る残基は1つもなかった。最も甘い基準での許容領域内に存在するのもグリシンとプロリン以外では1残基(Ser158)のみであった。好ましくない領域に存在している残基がこのように少ない反面、最も好ましい領域に存在する残基も77.9%止まりでこれは決して良い値ではない(Laskowski 1993)。Kleywegt と Jones による(1996)単純な許可領域の内外判定では、15.8%が領域外であった。この値は少し高いが 3.0 Å のモデルとしては許される範囲のものである。ただ先にも記したように高角でモデルと実験の密度図を一致させるようにしているため多少構造をくずしてでも実験の高角データを説明する方を選択しておりそのことがこれらの値を悪くしている一因とも考えられる。

4.1.3. 温度因子

静止した原子の散乱因子を $f_0(s)$ で表し平衡位置を中心に揺らいでいる原子の散乱因子を $f(s)$ で表すと、以下の式で示される。ここで B は温度因子(temperature factor)と呼ばれる。

$$f(s) = f_0(s)e^{-B(\sin\theta/\lambda)^2}$$

原子の平衡位置からの変位の2乗平均を \bar{u}^2 とすると次の式で与えられる。

$$B = 8\pi^2\bar{u}^2$$

図にあるように温度因子は 2 Å² から 40 Å² であった。AB と EF ループの温度因子が高く、反平行ベータシートがある BC ループの温度因子は比較的lowかった。細胞質側の方が細胞外側より温度因子が高い傾向があった。膜貫通領域では図にあるようにちょうどレチナールが位置する当たりの高さで温度因子が高くなっていた。Grigorieff らの温度因子と比較すると全体的に本研究の温度因子の方が低かった。これは液体ヘリウムステージを持つ電子顕微鏡の性能や試料の作製法の工夫などが影響していると考えられる。

4.2. モデルの構造

4.2.1. 2次構造

DSSP プログラム(Kabsh et al., 1983)を使用して2次構造部分を判定した。Henderson らとの構造(2BRD)とはヘリックス C の始まり部分(77 から 80)とヘリックス E の始まり部分(131 から 134)で差があった。その他の膜貫通ヘリックス部分は 2BRD とほとんど同じで、膜貫通ヘリックス部分のみで比較した RMSD(root mean square deviation)は 0.97 Å であった。

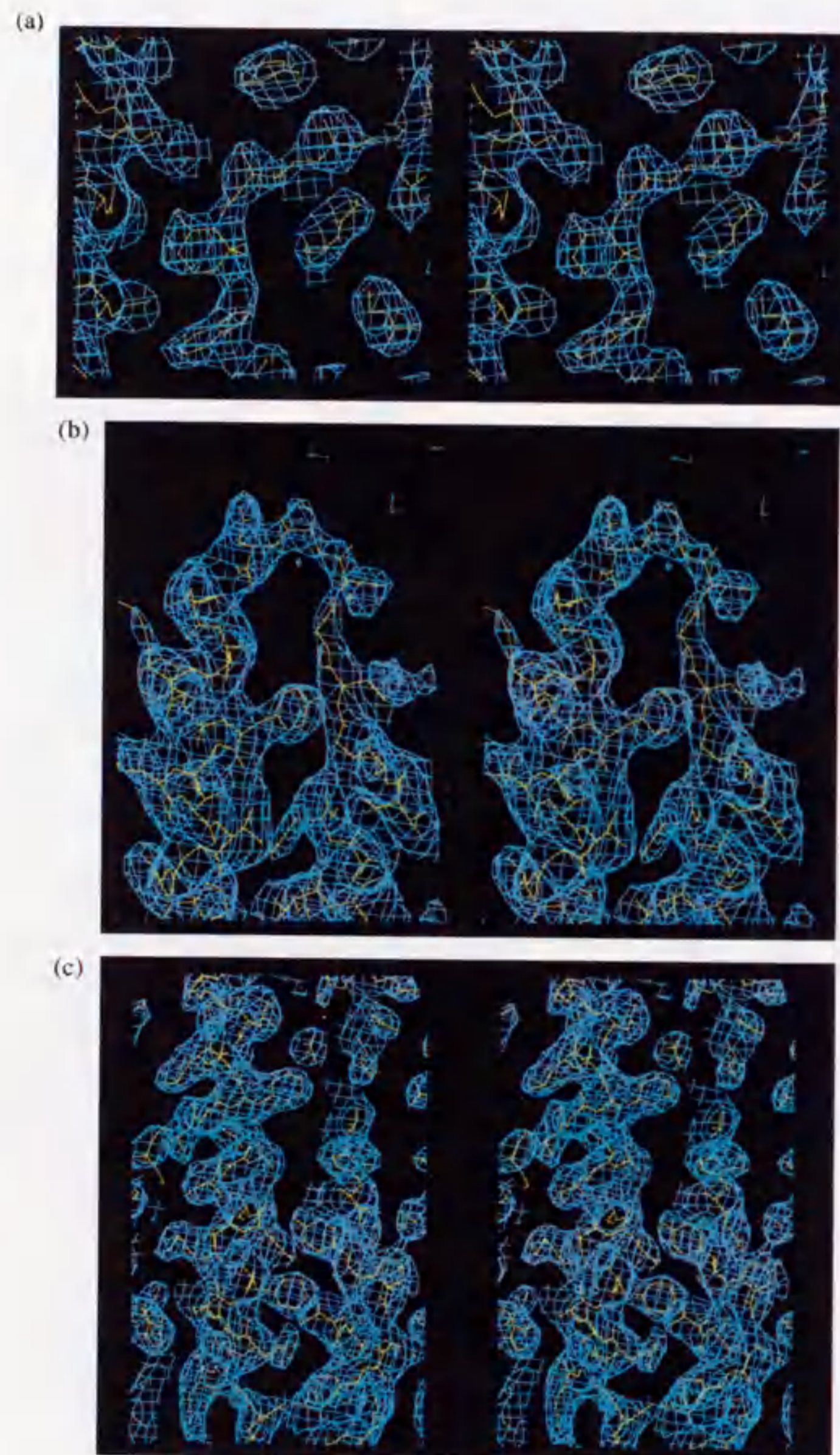


図 21 密度図例

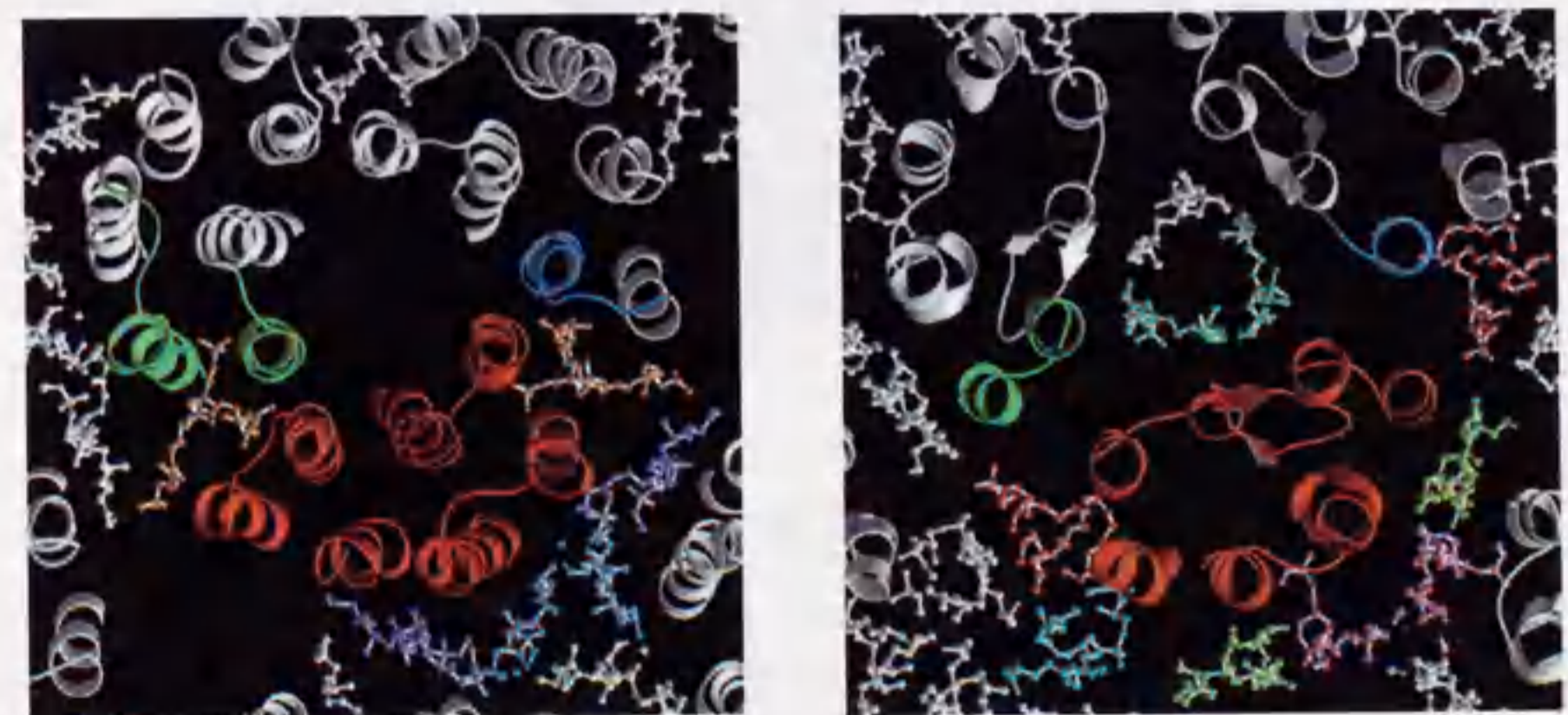
2|Fo|-|Fc| マップのステレオ図 (a) レチナール (b) AB ループ (c) G ヘリックスの kink と F ヘリックスの細胞外側の半分

4.2.2. ループ領域

細胞外側の BC ループにおいて残基番号 67 から 69 までと 76 から 78 までの残基間で 3 つの水素結合でつながれた反平行の β シートが作られている。2 つの反平行の β 鎖は間の 6 残基からなるヘアピンループでつながれている。この β 鎖のアサインは Raman スペクトルによる β 鎖の含有率の実験値 (2-11%) と一致している (Vogel & Gärtner 1987)。Glu194 がプロトンの放出に関与していると指摘した (Kimura *et al.*, 1997) がこれは変異体の実験で確認された (Dioumaev *et al.*, 1998)。FTIR の実験でも支持されているが、これらの残基間には距離がありプロトン放出のメカニズムにはその間の水分子が関与していると考えられる。

4.2.3. 脂質

非対称単位当たり 8 つの脂質分子が観察された。この 8 つは全て PGP-Me (phosphatidyl glycerophosphate monomethyl ester with dihydrophytol chains) としてモデリングした。PGP-Me は紫膜中の主要な脂質として知られている。脂質のヘッドグループが直接蛋白質と接している場合は脂質のヘッドグループは 2|Fo|-|Fc| 密度図中では明瞭に観察され、PGP-Me の分子構造で説明することが可能であった。実際は紫膜の脂質の内 20% は glycolipid sulfate であり 10% は squalene であることが知られている。しかしこれらの分子構造を脂質の密度図に合わせることは困難であった。いくつかの PGP-Me 分子は glycolipid sulfate や squalene と相互に置換が可能であるかも知れないが後者の比率が少ないために現在の密度図ではそれが観測されないのかも知れない。8 つの脂質分子の内 5 つは細胞外側に見つかり 3 つは細胞質側に置かれた。Grigorieff らが置いた脂質の位置と大差なかったが、細胞質側で 3 回軸の回りに Grigorieff らが置いた 2 つの脂質分子が見えていないことが異なっている。この理由としては、これらの分子が正確な 3 回対称を持っておらず平均化した時に見えなくなってしまうかまたは温度因子が高いために見えないかが考えられる。



(図の説明は次ページに)

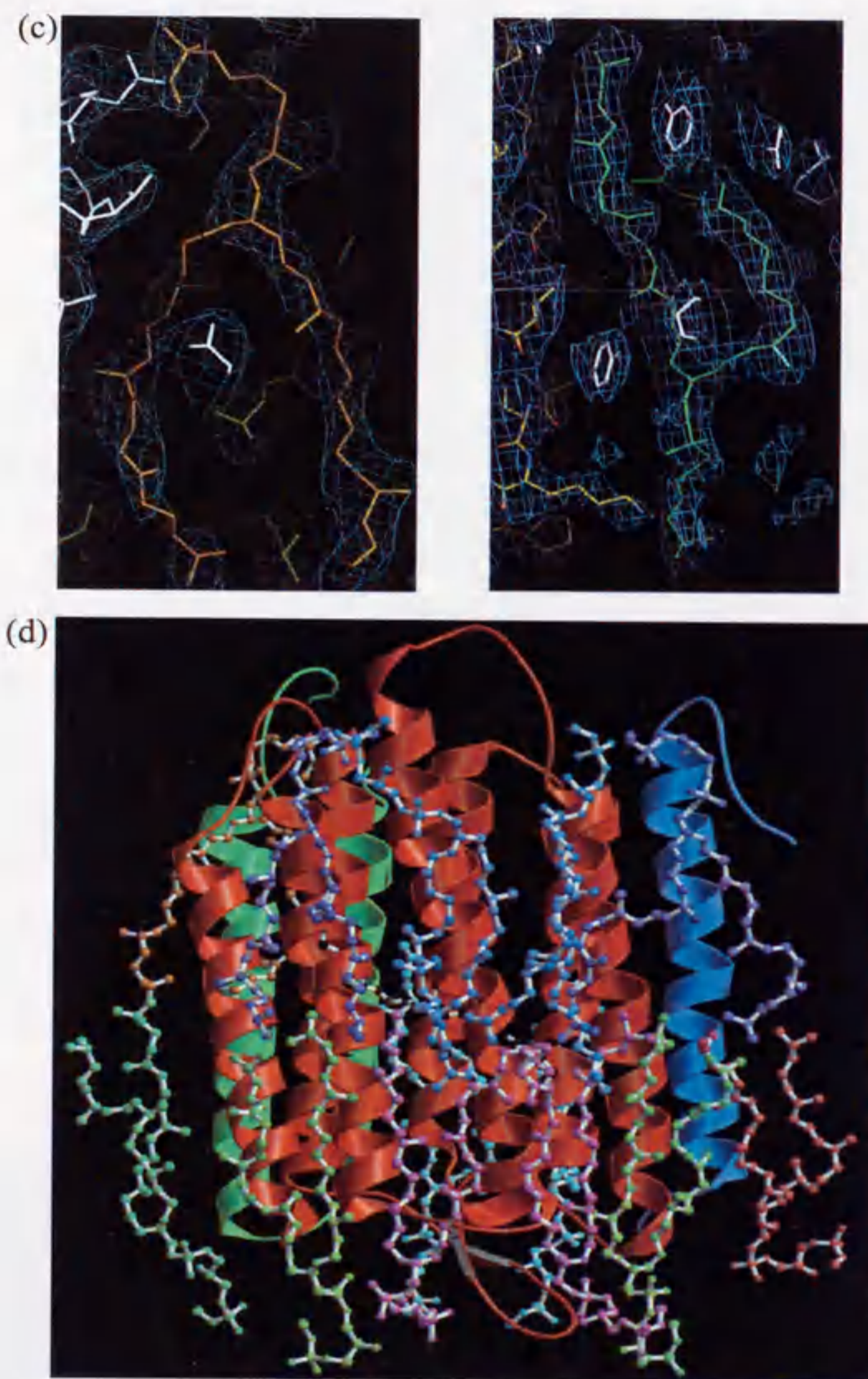


図 22 脂質の配置

前ページ(a) 細胞質側、(b)細胞外側から膜に垂直に見た BR の 3 量体。蛋白質はリボンモデル、脂質はボール&スティックモデルで表示してある。(c) 脂質を表す $2|F_o|-|F_c|$ マップ、脂質のモデルの色は他の図に合わせてある。(d) 膜と平行に横から見た時のモデル。

4.3. 電荷の観察

4.3.1. 電子線散乱因子の計算とシュミレーション

電子線に対する原子散乱因子 (atomic scattering factor または atomic form factor) の値は International Tables for X-ray Crystallography Volume IV の 155 ページ以降に数値が載っている。実際に X-Plor や CCP4 のプログラムでこの電子線の原子散乱因子を使用するためには 4 つまたは 5 つの Gauss 関数と 1 つの定数で近似することが求められている。プログラム SCATTER (Ceska, 1994) を使用してこの近似を行ない 4 つの Gauss 関数の係数と定数を得た。原子散乱因子は球対称として扱っている。

$$f_j(k) = \sum_{n=1}^4 A_{nj} e^{-B_{nj} k^2 / 4} + c_j$$

中性の原子に関しては容易に 4 つの Gauss 関数と 1 つの定数で近似することができた (表 4a)。電荷を持つ O⁻ や H⁺ (Kakitani *et al.* の計算) の場合は特に低角の領域で急激に変化するため 4 つの Gauss 関数と 1 つの定数で低角を含めた領域を近似するのは困難であった。そこで $\sin \theta / \lambda$ が 0.01~0.2 (50~2.5Å) の領域を中心にフィッティングを行なったが中性の原子の場合と比較すると 2 桁程エラーが大きくなった。ただし最大でも数%の範囲のエラーなので電荷が存在する場合のシュミレーション等には問題がないと思われる。ただしフィッティングの範囲外では急激にエラーが大きくなるので使用には注意を要する。また差マップを計算しやすいように O⁻ や H⁺ の近似とは別に O⁻ と O の差 (O⁻-O) 及び H⁺ と H の差 (H⁺-H) を 4 つの Gauss 関数と 1 つの定数で近似した。この差は電荷の効果を純粋に表す部分と考えられ O⁻-O と H⁺-H では符号は逆であるが全体的な傾向は似たものになっており、O⁻ や H⁺ 以外のイオンでも同様である。International Tables に載っていない電荷を持つ原子や部分的に分極している原子に対しては線型性を仮定して International Tables に載っているものの電荷の有無による差を加算したり分極の割合に応じて線型的に内挿したりして散乱因子を計算した。

表 5a 中性原子の Gaussian 係数とそのエラー
300KeV、 ∞ から 1.0 Å までの範囲でフィッティング

	a_1	b_1	a_2	b_2	a_3	b_3	a_4	b_4	c	Error Average (Max)	Error(%) Average (Max)
H	0.1297	46.8016	0.2112	15.9941	0.2311	15.9003	0.3039	2.3250	-0.0393	0.0007 (0.0016 at 1.79 Å)	0.21 (0.98 at 1.00 Å)
C	0.3952	57.2981	1.6383	21.5154	1.5133	6.5505	0.2279	1.7733	0.2074	0.0004 (0.0009 at 1.39 Å)	0.02 (0.08 at 1.39 Å)
N	0.3298	42.6954	1.3152	16.7093	1.5101	5.1343	0.2977	0.3550	-0.0571	0.0004 (0.0009 at 1.19 Å)	0.02 (0.09 at 1.19 Å)
O	0.0809	45.4657	0.6058	21.9993	1.5891	7.8305	1.2088	0.8786	-0.3366	0.0004 (0.0009 at 5.00 Å)	0.02 (0.06 at 1.43 Å)
P	0.7370	76.5599	3.0716	32.2621	3.0952	12.2991	1.4714	2.5098	0.3349	0.0004 (0.0008 at 3.33 Å)	0.01 (0.04 at 1.14 Å)
S	0.9514	55.0850	3.5797	21.3364	2.7300	6.4516	0.4257	1.4133	0.5039	0.0004 (0.0012 at 3.33 Å)	0.01 (0.07 at 1.11 Å)

表 5b 電荷を持つ原子の Gaussian 係数とそのエラー
300KeV、50 から 2.5 Å までの範囲でフィッティング

	a_1	b_1	a_2	b_2	c	Error Average (Max)	Error(%) Average (Max)
H ⁺	812.7002	14278.1309	183.0536	3461.7549		0.1238 (0.4713 at 49.02 Å)	2.90 (8.42 at 3.17 Å)
O ⁻	-631.0347	9194.4463	-103.0768	2409.6470	0.9183	0.0161 (0.0548 at 2.94 Å)	1.12 (5.97 at 5.56 Å)
H ^{+1/2}	406.0906	14151.8887	90.7672	3377.4961		0.0573 (0.1701 at 19.69 Å)	2.47 (6.71 at 2.98 Å)
O ^{-1/2}	-37.7416	12620.5059	-284.0005	7977.5732	0.6636	0.0420 (0.0933 at 3.33 Å)	12.21 (209.18 at 7.14 Å)
H ⁺ - H	814.1870	14318.3643	183.8043	3490.0320		0.1017 (0.2917 at 19.69 Å)	4.31 (13.44 at 3.08 Å)
O ⁻ - O	-621.7397	6873.5820	-50.4690	921.3515	0.4217	0.0316 (0.1888 at 10.00 Å)	1.10 (3.30 at 2.50 Å)
H ⁺	H + (H ⁺ - H)					0.1019 (0.2905 at 19.69 Å)	2.84 (8.11 at 3.08 Å)
O ⁻	O + (O ⁻ - O)					0.0318 (0.1895 at 10.00 Å)	1.83 (21.91 at 5.56 Å)

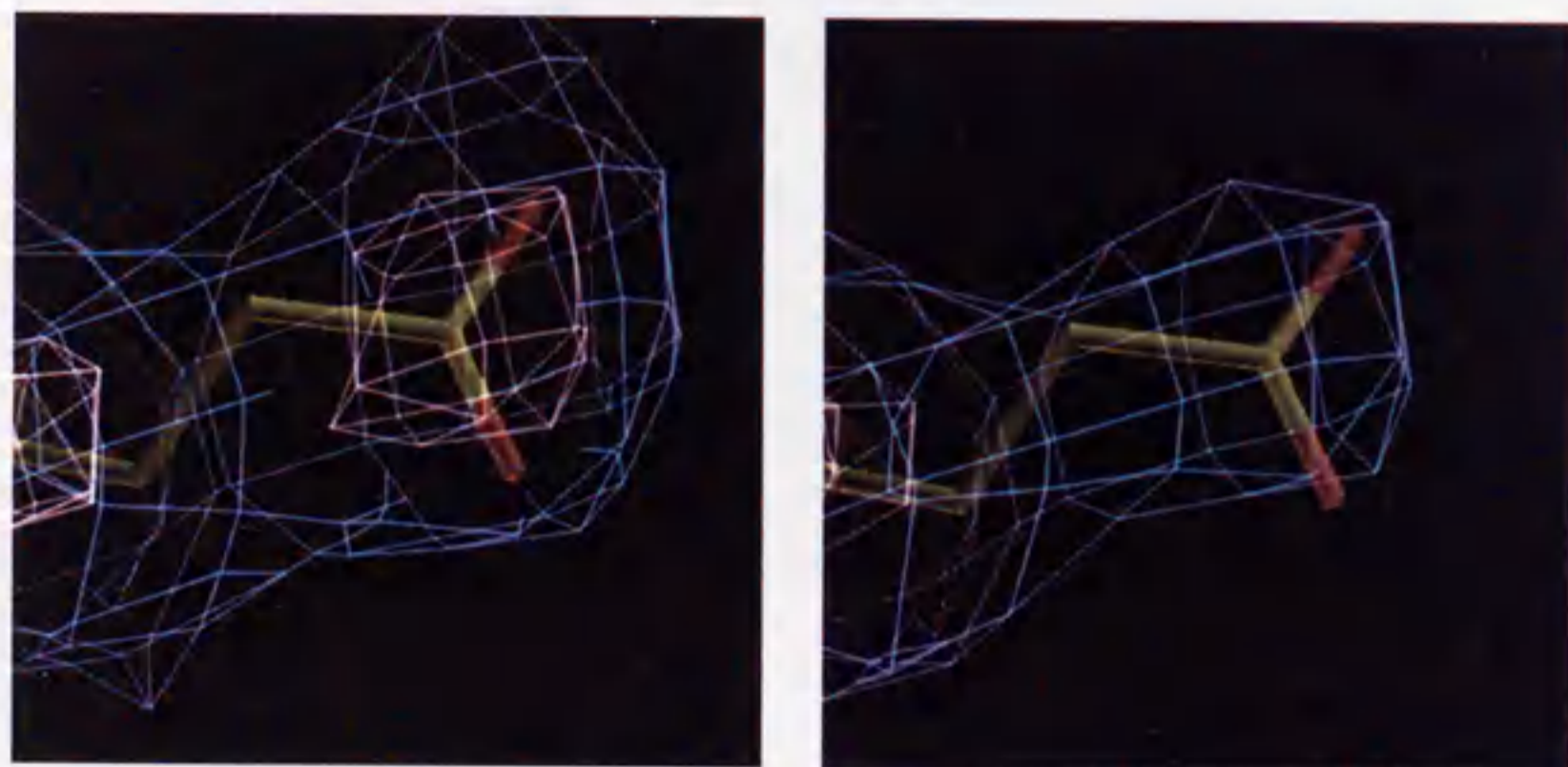


図 23 負電荷によるマップの減衰

低角領域も計算に入れた(50 から 3 Å) F_c マップ、左は中性の散乱因子を使用、右はグルタミン酸の 2 個の酸素がそれぞれ 1/2 の負電荷を持つとして計算。

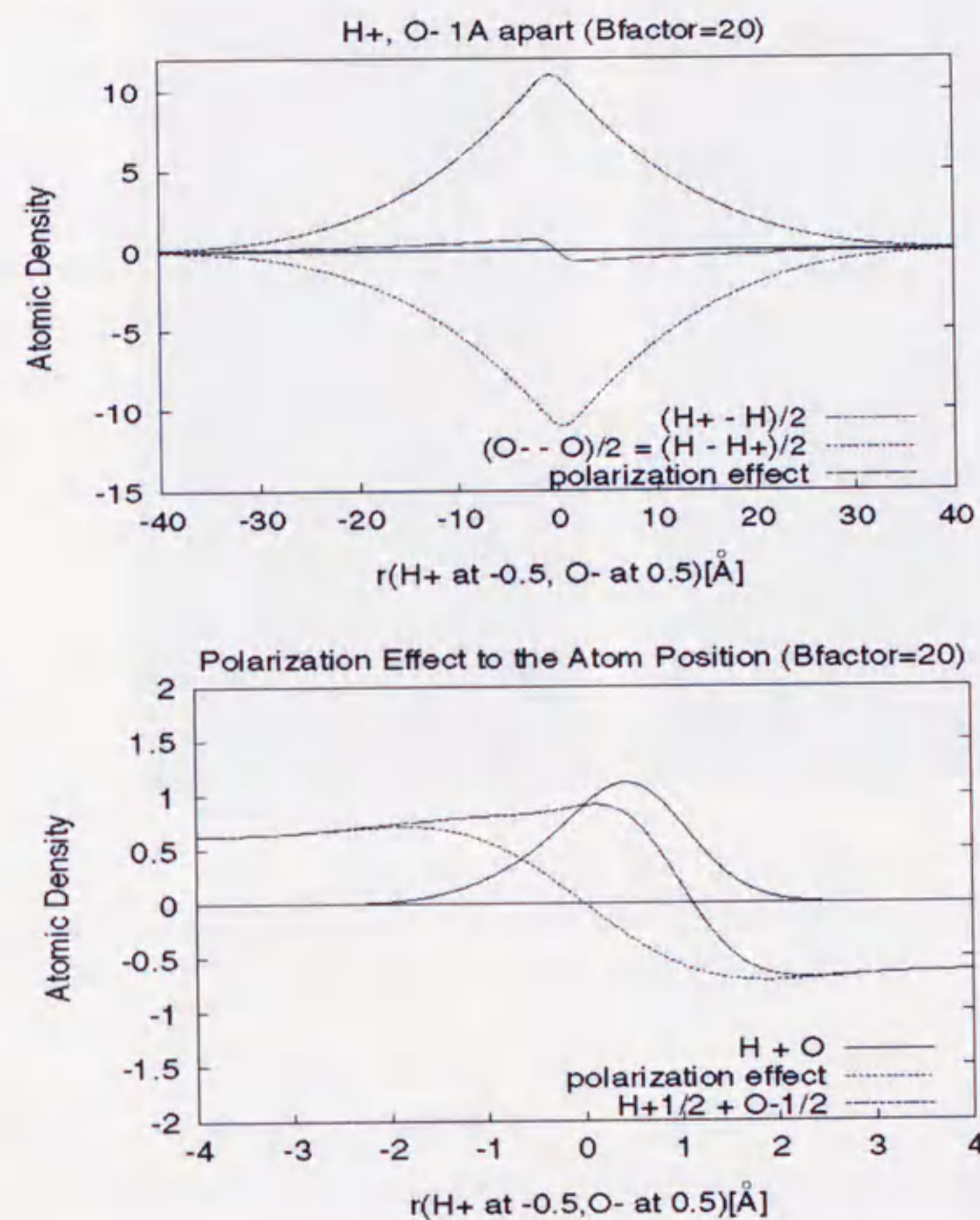


図 24 分極効果による見かけの原子位置の移動

正の電荷と負の電荷の効果は符号は逆であるが傾向はほぼ同じである。H と O が 1 Å 離れて 50% 分極していると仮定するとその効果の和は上図のようになる。下図はその分極効果を局所的に見た図で分極していない場合の H+O (ほとんどが O の寄与) の山型の Density が分極効果を考慮すると左側(H+寄り)に山が多少くずれながら重心が移動して見えることになる。

4.3.2. 主鎖での電荷の分布

電荷の有無で低角における散乱因子が大きく違うので、 $|F_0|$ 密度図と中性の散乱因子を使用して $|F_c|$ の密度図を計算した時では電荷の存在する部分で差がでるはずである。そこで $|F_0|$ ・ $|F_c|$ 密度図を低角部分も計算に含め $|F_c|$ には中性の散乱因子を使用して計算した。主な差は主鎖の周辺に生じこれは主鎖の極性グループにおける分極から来るものと判断した。主鎖のペプチド結合中のOとCの原子が分極していると考えその分極の割合を0から1まで0.1刻みで変えてR因子(R-factor)および自由R因子(Free R-factor)を最もよくする分極割合を探した。主鎖のペプチド結合中でOとCが40%分極していると仮定すると自由R因子は結果が最もよく50%を仮定するとR因子は最もよくなった。これらの値はX-Plorなどの分子動力学で使用する分極割合にもほぼ一致するものである。分極を50%と仮定した時の $|F_0|$ ・ $|F_c|$ 密度図も計算し分極の効果を入れることにより $|F_0|$ と $|F_c|$ の差がより小さくなることを確認した。3.5 σ レベルの体積でみると分極の効果を入れた方が体積が7.3%減った。ちなみに精密化に使用した高角の領域のみを使用すると分極の効果を入れる入れないに関わらず3.5 σ レベルの差は見当たらない。分極を仮定した時の $|F_0|$ ・ $|F_c|$ 密度図でまだ3.5 σ レベルの差が残る理由の1つとしてはここでは考慮していない窒素と水素間の分極が考えられる。

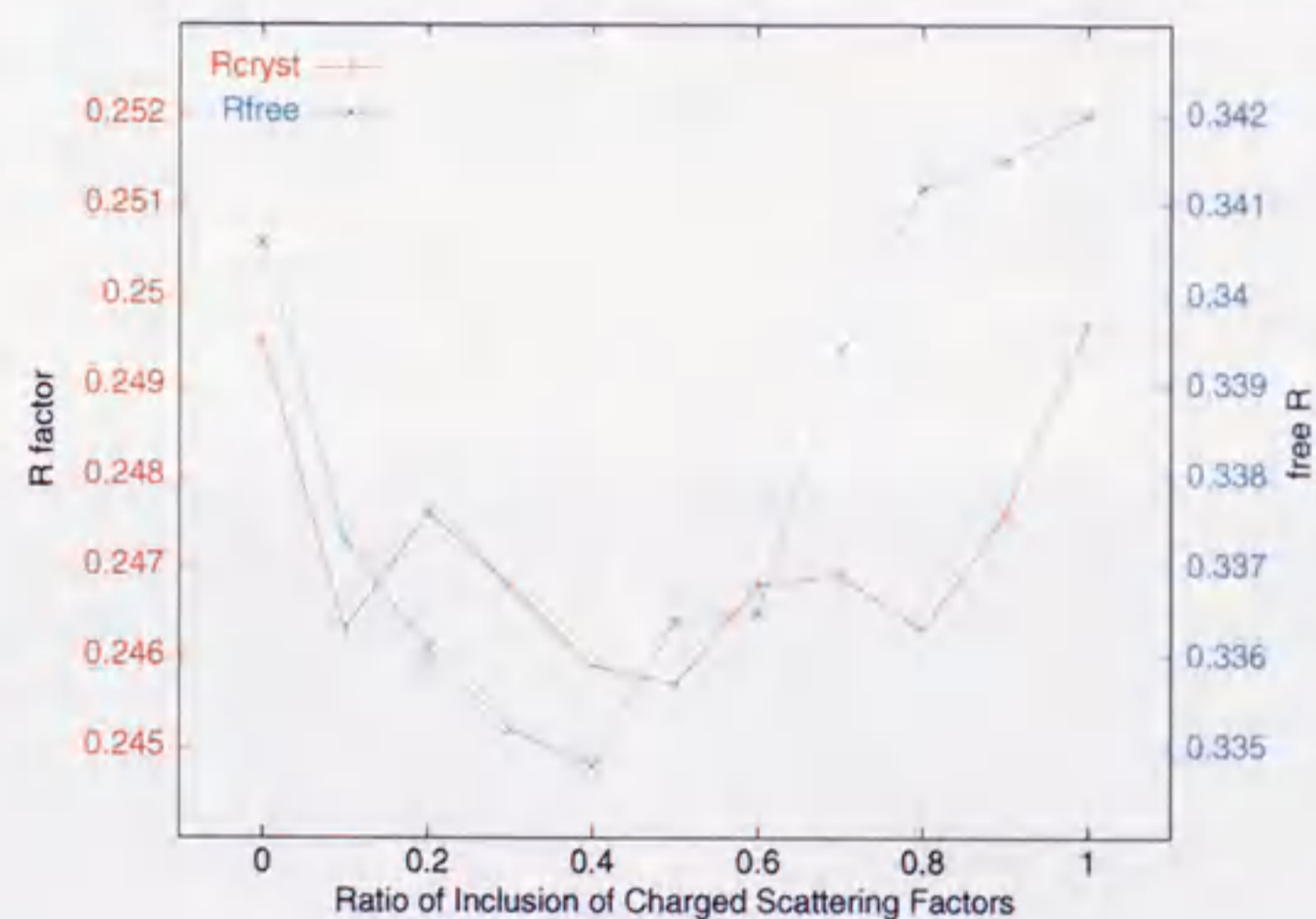


図 25 分極割合と R 因子

分極割合を0.5とした時にR-factorは最も良く、0.4とした時にfree R-factorは最も良くなった。

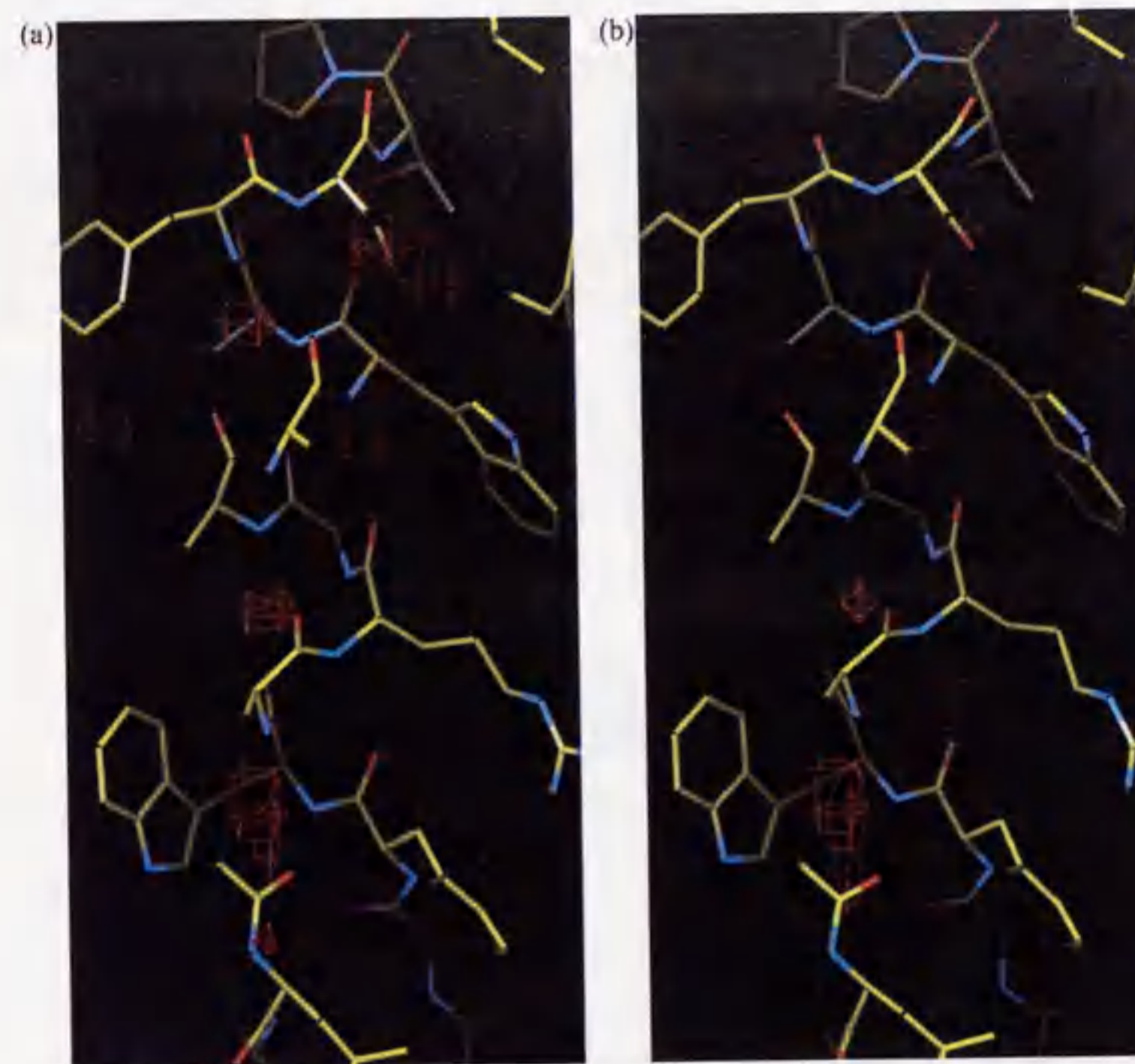


図 26 主鎖周辺の $|F_0|$ ・ $|F_c|$ マップ

$|F_0|$ ・ $|F_c|$ マップ(3.5 σ)。(a) $|F_c|$ の計算には中性の原子散乱因子を使用。(b) $|F_c|$ の計算には主鎖のペプチド中のCとOには0.5の割合で分極していると仮定した。

4.3.3. カチオンと水分子

全データ領域(54 Åから3 Å)を使用して計算された $|F_0|$ ・ $|F_c|$ 密度図において主鎖の周辺以外にもいくつかの残基の周辺で3.5 σ レベルの強いピークが見られた。これらのピークは5つの酸性残基(Asp36、Asp102、Glu74、Glu194とGlu212)の周辺に存在した。低角のデータを含めない時には観察されないこのピークは正電荷を示すものと考えられる。正電荷をもつ原子の位置は低角領域のノイズのために必ずしもピークを中心ではないかも知れないが、低角領域を含めることにより底上げされたことからこの周辺に正電荷を持つ原子があると考えられる。

2 $|F_0|$ ・ $|F_c|$ 密度図の見えかたを合わせて検討することによりこの5つの正電荷を持つ原子は2つに分類できた。1つは2 $|F_0|$ ・ $|F_c|$ 密度図の1 σ レベルが同じ位置に重なるもので、Asp36とAsp102がこれに当てはまる。もう1つは2 $|F_0|$ ・ $|F_c|$ 密度図の1 σ レベルがやはり存在するが同じ位置ではなくすぐ横に(1.0 Å程離れて)存在するもので、Glu74、Glu194とGlu212がこれに当てはまる。前者は高角の領域でも強い散乱因子を持っているのでカチオンと結合していると考えられ、後者は高角では強い散乱因子を持っていないが近くに正電荷を持たない原子を伴っているので分極した水分子または水酸基と考えられる。

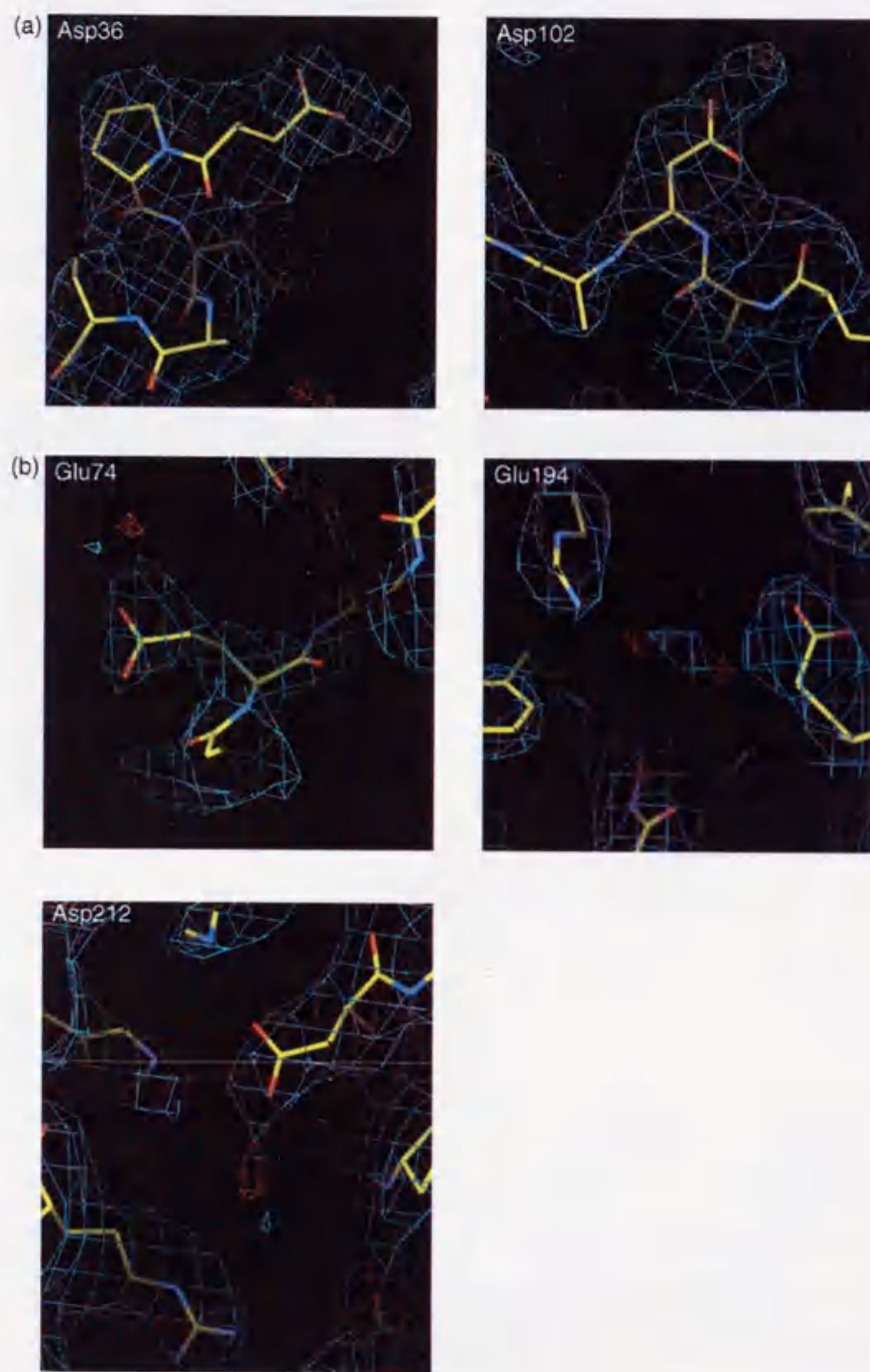


図 27 カチオンと水分子

赤色は低分解能まで計算に入れた|Fo|-|Fc|マップ(3.5σ)、青色は2|Fo|-|Fc|マップ(1σ) (a)の2つの残基では赤色のdensityが青色のdensityで包含されている。(b)の残基では赤色のdensityの1Å程横に青色のdensityが存在している。

4.4. プロトン経路

電荷分布の議論に基づいて光サイクルの初期段階において次のような電荷状態の変化を提案した。電荷の観察により負の電荷を持つ酸性残基 Asp212 と Glu194 が水酸基または水分子を介して Arg82 と間接的に結合していることを見出した。Arg82 と結合している2つの分子は|Fo|-|Fc|密度図において正の電荷を持つ水素原子が見られるのでイオン化しているかまたは極度に分極している。この酸性残基である Arg82 と2つの塩基性残基 Asp212 および Glu194 のイオンまたは水を介した結合は Arg82 の正電荷を安定化していると考えられる。そのため Arg82 から 4.0 Å 離れた Glu204 が FTIR でも示されているように (Brown *et al.*, 1995) プロトン化することが可能となる。

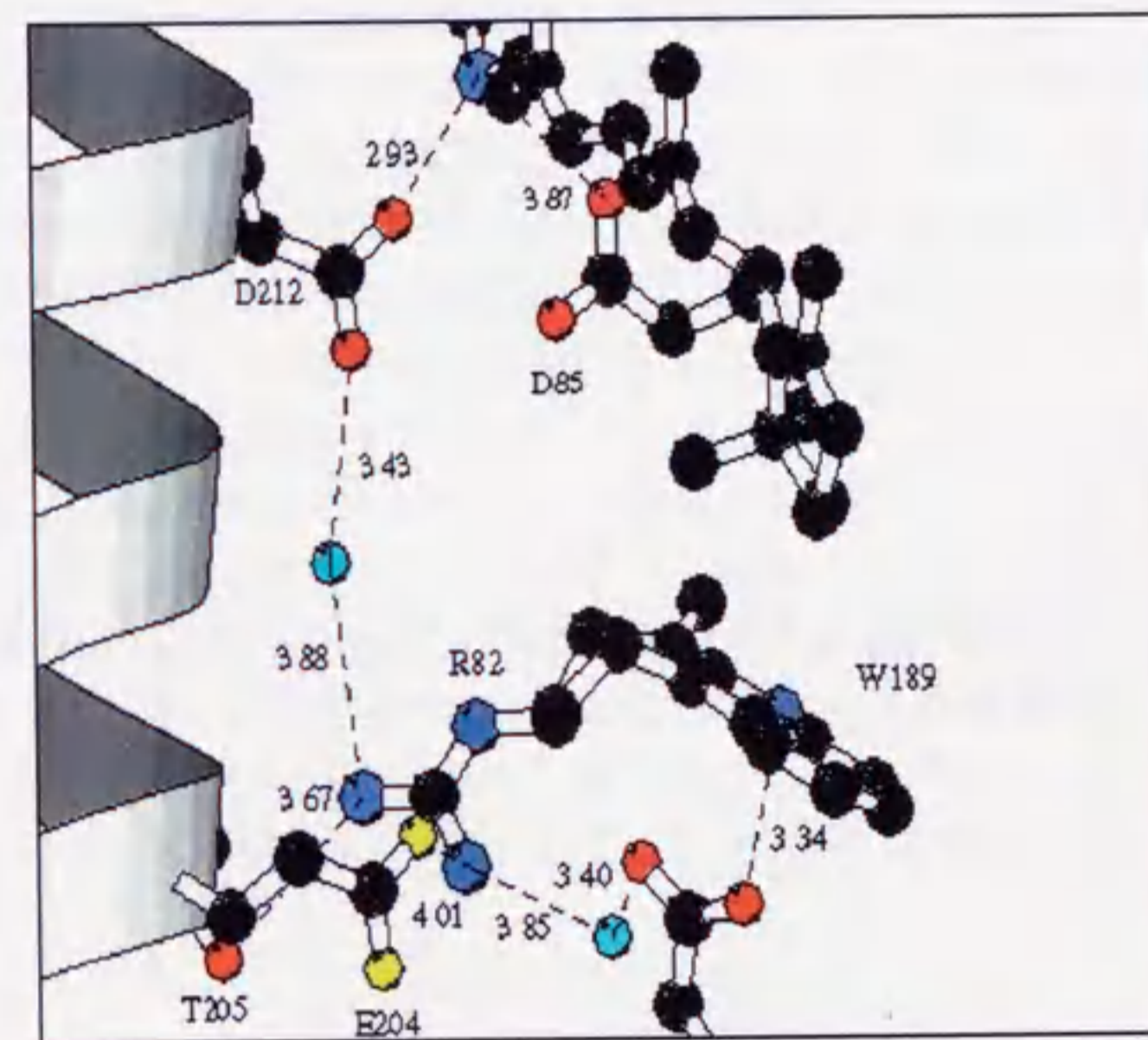


図 28 プロトン経路

本研究での密度図でもそこに負電荷は観察されていない。シッフ塩基が Asp85 をプロトン化して中性になると Asp212 とシッフ塩基間の結合が変わりイオンまたは水分子を含む水素結合のネットワークによる Arg82 の正電荷の安定化が弱められる。それにより Arg82 と Glu204 のイオンペアがより強く結合し Glu204 のプロトンの放出を促進すると考えられる。Glu204 は細胞外へプロトン放出する最終の残基と考えられている。別の可能性としては Arg82 に結合している水酸基または水分子がプロトンを放出するのかもしれない。いずれにしても Asp85 のプロトン化が細胞外表面からのプロトン放出を引き起こす。Asp85 と Glu204 が Asp212 および水分子を介して結合していることは Y185F 変異体により2つの残基の間の結合が乱されることにより支持されている (Richter *et al.*, 1996)。ちなみに Tyr185 は Asp212 と水素結合を行なっている。さらに E194C 変異体が BR の速いプロトン放出を阻害する (Balashov *et al.*, 1997) という結果がありこれは Glu194 がイオンまたは水分子を介して Arg82 にある正電荷を安定化しているという考えに矛盾

しない。またこれは Glu194 と結合している水酸基イオンまたは水分子から直接プロトンが放出されている可能性も残している。

この仮説を確認するためには BR の光サイクルにおける中間体の原子レベルでの構造解析が必要でそれによりプロトンポンプのメカニズムを完全に理解することが可能になると思われる。中間体の構造解析においても電子顕微鏡で可能となる電荷の可視化が役に立つことが期待される。

謝辞

私が研究者としてこれまでやってこられたのは全面的に藤吉好則教授のご指導のおかげです。心より感謝の意を表します。また今回博士の申請をお認めいただいた宝谷絃一教授に深く感謝致します。生物分子工学研究所の木村能章博士には特に蛋白工学研究所時代、この分野において全くの初心者だった私に辛抱強くご指導をいただきました。BR の研究は木村博士なくしては成立しなかったものです。ここに感謝致します。京大理学部的光岡薫博士には松下国際研に移ってから解析全般について多くのご助言をいただきました。また本研究の精密化や電荷分布の解析における進展は光岡博士のお力によるものです。ここに明記し感謝致します。電顕像や回折像のデータ収集は、蛋白工学研究所では宮澤淳夫博士、松下国際研では村田和義氏により多大のご苦勞のもと行われたものです。ここに感謝致します。また共同研究者である 理化学研究所の Dmitry G. Vassylyev 博士、創薬技術研究所の松島正明博士、京大理学部の木寺詔紀助教授にも心より感謝致します。学部時代には西郷和彦助教授(当時)および米澤宣行助手(当時)に何かとご指導頂きました。ここに感謝致します。またこの論文を書くにあたって BR についてお詳しい土井知子博士にご助言や貴重な資料を提供していただきました。ここに感謝致します。電顕画像のコンピュータ解析については当時 EMBL 研究所におられた Werner Kühlbrandt 博士と DaNeng Wang 博士にご教授頂きました。ここに感謝致します。MRC パッケージの最新版を提供して下さった MRC 研究所の Richard Henderson 博士には感謝の意とともに敬意を表します。また現在籍を置いている京都大学生物物理学教室藤吉研究室の皆様方および難波啓一博士をはじめとする科学技術振興事業団難波プロジェクトの皆様方にもいろいろとお世話になりました。ここにお礼を申し上げます。最後になりますが、二人の小さい娘、万莉(4才)と友加里(1才)の育児を一手に引き受け私を何かと励ましてくれた妻、嘉寿江に感謝の意を表します。

参考文献

- Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. & McDowell, A. W. (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* **308**(1 March), 32-36.
- Agard, D. A. (1982). A Least-squares Method for Determining Structure Factors in Three-dimensional Tilted-view Reconstructions. , 849-852.
- Amos, L. A., Henderson, R. & Unwin, P. N. T. (1982). Three-Dimensional Structure Determination by Electron Microscopy of Two-Dimensional Crystals. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **39**, 183-231.
- Aurora, R., Srinivasan, R. & Rose, G. D. (1994). Rules for α -Helix termination by Glycine. *Science* **264**(20 May), 1126-1130.
- Bairoch, A., Bucher, P. & Hofmann, K. (1996). The PROSITE database, its status in 1995. *Nucleic Acids Research* **24**, No. 1, 189-196.
- Balashov, S. P., Govindjee, R., Imasheva, E. S., Misra, S., Ebrey, T. G., Feng, Y., Crouch, R. K. & Menick, D. R. (1995). The Two pKa's of Aspartate-85 and Control of Thermal Isomerization and Proton Release in the Arginine-82 to Lysine Mutant of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **34**, 8820-8834.
- Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Ebrey, T. G., Cheng, N., Menick, D. R. & Crouch, R. K. (1997). Glutamate-194 to Cysteine Mutation Inhibits Fast Light-Induced Proton Release in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **36**, 8671-8676.
- Baldwin, J. & Henderson, R. (1984). Measurement and Evaluation of Electron Diffraction Patterns from Two-dimensional Crystals. *Ultramicroscopy* **14**, 319-336.
- Baldwin, J. M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *The EMBO Journal* **12** No.4, 1693-1703.
- Baldwin, J. M., Henderson, R., Beckman, E. & Zemlin, F. (1988). Images of Purple Membrane at 2.8 Å Resolution Obtained by Cryo-electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* **202**, 585-591.
- Bamberg, E., Tittor, J. & Oesterhelt, D. (1993). Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(January), 639-643.
- Bashford, D. & Gerwert, K. (1992). Electrostatic Calculations of the pKa Values of Ionizable Groups in Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **224**, 473-486.
- Birge, R. R. (1994). A nonlinear proton pump. *Nature* **371**(20 October), 659-660.
- Birge, R. R. & Cooper, T. M. (1983). Energy Storage in The Primary Step of The Photocycle of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **42**(April), 61-69.
- Booth, P. J. & Curran, A. R. (1999). Membrane protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 115-121.
- Booy, F. P. & Pawley, J. B. (1993). Cryo-crianking: what happens to carbon films on copper grids at low temperature. *Ultramicroscopy* **48**, 273-280.
- Bowie, J. U., Clarke, N. D., Pabo, C. O. & Sauer, R. T. (1990). Identification of Protein Folds: Matching Hydrophobicity Patterns of Sequence Sets With Solvent Accessibility Patterns of Known Structures. *Proteins* **7**, 257-264.
- Brink, J. & Chiu, W. (1994). Applications of a Slow-Scan CCD Camera in Protein Electron Crystallography. *J. Struct. Biol.* **113**, 23-34.
- Brown, G. M. (1972). The Crystal Structure of α,α -Trehalose Dihydrate from Three Independent X-ray Determinations. *Acta Cryst.* **B28**, 3145-3158.
- Brown, L. S., sasaki, J., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1995). Glutamic Acid 204 is the Terminal Proton Release Group at the Extracellular Surface of Bacteriorhodopsin. *The Journal of Biological Chemistry* **270**(10 November), 27122-27126.
- Brünger, A. T. (1987). Chapter 12. Crystallographic Diffraction Data. In *X-Plor*, pp. 159-163. Yale University Press.
- Brünger, A. T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**(30 January), 472-475.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). 14-4 electron Microscopy. In *Biophysical Chemistry Part II*, pp. 820-828. W. H. Freeman and Company, New York.
- Ceska, T. A. (1994). SCATTER - a program for calculating atomic scattering-factor coefficients for electrons. *Journal of Applied Crystallography* **27**, 200-201.
- Ceska, T. A. & Henderson, R. (1990). Analysis of High-resolution Electron Diffraction Patterns from Purple Membrane Labelled with Heavy-atoms. *J. Mol. Biol.* **213**, 539-560.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F. & Wistrom, C. A. (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* **242**, 1986-1987.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Nguyen, K. H. N. & Crowe, L. M. (1996a). Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? *Biochimica et Biophysica Acta* **1280**, 187-196.
- Crowe, J. H., Leslie, S. B. & Crowe, L. M. (1994). Is Vitrification Sufficient to Preserve Liposomes during Freeze-Drying? *Cryobiology* **31**, 355-366.
- Crowe, L. M., Reid, D. S. & Crowe, J. H. (1996b). Is Trehalose Special for Preserving Dry Biomaterials? *Biophysical Journal* **71**(October), 2087-2093.
- Crowther, R. A., Amos, L. A., Finch, J. T., DeRosier, D. J. & Klug, A. (1970). Three Dimensional Reconstructions of Spherical Viruses by Fourier Synthesis from Electron Micrographs. *Nature* **226**(May 2), 412-425.
- Crowther, R. A., Henderson, R. & Smith, J. M. (1996). MRC Image Processing Programs. *J. Struct. Biol.* **116**, 9-16.
- Delaney, J. K., Schweiger, U. & Subramaniam, S. (1995). Molecular mechanism of protein-retinal coupling in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11120-11124.
- DeRosier, D. J. & Klug, A. (1968). Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs. *Nature* **217**(13 January), 130-134.
- Dioumaev, A. K., Richter, H.-T., Brown, L. S., Tanio, M., Tuzi, S., Saito, H., Kimura, Y., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1998). Existence of a Proton Transfer Chain in Bacteriorhodopsin: Participation of Glu-194 in the Release of Protons to the Extracellular Surface. *Biochemistry* **37**, 2496-2506.
- Donnelly, D., Johnson, M. S., Blundell, T. L. & Saunders, J. (1989). An analysis of the periodicity of conserved residues in sequence alignments of G-protein coupled receptors. *FEBS Letters* **251** No.1,2(July), 109-116.
- Downing, K. H. & Hendrickson, F. M. (1999). Performance of a 2k CCD camera designed for electron crystallography at 400kv. *Ultramicroscopy* **75**, 215-233.
- Doyle, P. A. & Cowley, J. M. (1974). 2.4. Scattering Factors for the Diffraction of Electrons by Crystalline Solids. In *International Tables for X-ray Crystallography* (Ibers, J. A. & Hamilton, W. C., eds.), Vol. IV, pp. 152-175. The Kynoch Press, Birmingham.
- Essen, L.-O., Siegert, R., Lehmann, W. D. & Oesterhelt, D. (1998). Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(September), 11673-11678.
- Frank, J., Chiu, W. & Henderson, R. (1993). Flopping polypeptide chains and Suleika's subtle imperfections: analysis of variations in the electron micrograph of a purple membrane crystal. *Ultramicroscopy* **49**, 387-396.
- Fujiyoshi, Y. (1992). Two Dimensional Crystallization and Structure Analysis of Protein by Electron Crystallography. *Tanpakushitsu Kakusan Kousei* **37** No.3, 560-566,457-458.
- Fujiyoshi, Y. (1996). Structure analysis of biological macromolecules by electron microscopy. *Seibutsu-Butsuri* **36** No.5, 221-225.
- Fujiyoshi, Y. (1998). The structural study of membrane proteins by electron crystallography. *Adv. Biophys.* **35**, 25-80.
- Fujiyoshi, Y., Ishizuka, K., Tsuji, M., Kobayashi, T. & Uyeda, N. (1983). *Seventh International Conference on High Voltage Electron Microscopy*. University of California Berkeley.
- Fujiyoshi, Y. & Kaoru, M. (1997). Structural analysis of membrane proteins by electron crystallography. *Saibou-Kougaku* **16** No.11, 1677-1689.
- Fujiyoshi, Y., Mizusaki, T., Morikawa, K., Yamagishi, H., Aoki, Y., Kihara, H. & Harada, Y. (1991). Development of a superfluid helium stage for high-resolution electron microscopy. *Ultramicroscopy* **38**, 241-251.
- Fujiyoshi, Y., Uyeda, N., Morikawa, K. & Yamagishi, H. (1984). Electron Microscopy of tRNA Crystals II. 4 Å Resolution Diffraction Pattern and Substantial Stability to Radiation Damage. *J. Mol. Biol.* **172**, 347-354.
- Fukada, Y. (1993). Photoreceptors and GTP-binding protein in visual cells. *Seikagaku* **65** No.7, 513-536.

- Glaeser, R. M. (1982). 9. Electron Microscopy. In *Methods of Experimental Physics*, Vol. 20, pp. 391-444. Academic Press, Inc.
- Glaeser, R. M. & Downing, K. H. (1990). *XIIIth International Congress for Electron Microscopy*.
- Glaeser, R. M. & Downing, K. H. (1993). High-resolution electron crystallography of protein molecules. *Ultramicroscopy* **52**, 478-486.
- Glaeser, R. M., Zilker, A., Radermacher, M., Gaub, H. E., Hartmann, T. & Baumeister, W. (1991). Interfacial energies and surface-tension forces involved in the preparation of thin, flat crystals of biological macromolecules for high-resolution electron microscopy. *Journal of Microscopy* **161**(January), 21-45.
- Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M. & Henderson, R. (1996). Electron-crystallographic Refinement of the Structure of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **259**, 393-421.
- Grigorieff, N. & Henderson, R. (1995). Diffuse scattering in electron diffraction data from protein crystals. *Ultramicroscopy* **60**, 295-309.
- Han, B.-G., Vonck, J. & Glaeser, R. M. (1994). The Bacteriorhodopsin Photocycle: Direct Structural Study of Two Substates of the M-Intermediate. *Biophysical Journal* **67**(September), 1179-1186.
- Harper, E. T. & Rose, G. D. (1993). Helix Stop Signals in Proteins and Peptides: The Capping Box. *Biochemistry* **32** No.30(3 August), 7605-7610.
- Harris, J. R., Gerber, M., Gebauer, W., Wernicke, W. & Markl, J. (1996). Negative Stains Containing Trehalose: Application to Tubular and Filamentous Structures. *JMSA* **2** No.1, 43-52.
- Hasler, L., Heymann, J. B. & Engel, A. (1998). 2D Crystallization of Membrane Proteins: Rationales and Examples. *J. Struct. Biol.* **121**, 162-171.
- Hatanaka, M., Kandori, H. & Maeda, A. (1997). Localization and Orientation of Functional Water Molecules in Bacteriorhodopsin as Revealed by Polarized Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biophysical Journal* **73**(August), 1001-1006.
- Hatanaka, M., Sasaki, J., Kandori, H., Ebrey, T. G., Needleman, R., Lanyi, J. K. & Maeda, A. (1996). Effects of Arginine-82 on the Interactions of Internal Water Molecules in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **35**, 6308-6312.
- Havelka, W. A., Henderson, R., Heymann, J. A. W. & Oesterhelt, D. (1993). Projection Structure of Halorhodopsin from Halobacterium halobium at 6 Å Resolution Obtained by Electron Cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **234**, 837-846.
- Havelka, W. A., Henderson, R. & Oesterhelt, D. (1995). Three-dimensional Structure of Halorhodopsin at 7 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **247**, 726-738.
- Hayward, S. B. & Stroud, R. M. (1981). Projected Structure of Purple Membrane Determined to 3.7 Å Resolution by Low Temperature Electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* **151**, 491-517.
- Heberle, J., Riesle, J., Thiedemann, G., Oesterhelt, D. & Dencher, N. A. (1994). Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. *Nature* **370**(4 August), 379-382.
- Hebert, H., Schmidt-Krey, I., Morgenstern, R., Murata, K., Hirai, T., Mitsuoka, K. & Fujiyoshi, Y. (1997). The 3.0 Å Projection Structure of Microsomal Glutathione Transferase as Determined by Electron Crystallography of p2₁, 2₁, 2 Two-dimensional Crystals. *J. Mol. Biol.* **271**, 751-758.
- Hellling, B., Souvignier, G. & Gerwert, K. (1993). A Model-Independent Approach to Assigning Bacteriorhodopsin's Intramolecular Reactions to Photocycle Intermediates. *Biophysical Journal* **65**(November), 1929-1941.
- Henderson, R. (1975). The Structure of the Purple Membrane from Halobacterium halobium: Analysis of the X-ray Diffraction Pattern. *J. Mol. Biol.* **93**, 123-138.
- Henderson, R. (1992). Image contrast in high-resolution electron microscopy of biological macromolecules: TMV in ice. *Ultramicroscopy*, 1-18.
- Henderson, R. (1993). , Geneva.
- Henderson, R. (1995). The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Quarterly Reviews of Biophysics* **28** No.2, 171-193.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E. & Downing, K. H. (1990). Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High-resolution Electron Cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Downing, K. H., Lepault, J. & Zemlin, F. (1986). Structure of Purple Membrane from Halobacterium Halobium: Recording, Measurement and Evaluation of Electron Micrographs at 3.5 Å Resolution. *Ultramicroscopy* **19**, 147-178.
- Henderson, R. & Unwin, P. N. T. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**(4 September), 28-32.
- Hirai, T., Murata, K., Mitsuoka, M., Kimura, Y. & Fujiyoshi, Y. (1999). Trehalose embedding technique for high-resolution electron crystallography: application to structural study on bacteriorhodopsin. *Journal of Electron Microscopy*.
- Hirasawa, K. (1993). Trehalose Mimics a Role of Water in Dryness. *Nippon-Kesshou-Gakkaishi* **35** No.220, 3-34.
- Hoff, W. D., Jung, K.-H. & Spudich, J. L. (1997). Molecular Mechanism of Photosignaling by Archaeal Sensory Rhodopsins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 223-258.
- Ibers, J. A., Templeton, D. H., Vainshtein, B. K., Bacon, G. E. & Lonsdale, K. (1983). 3.3. Atomic Scattering Factors. In *International Tables for X-ray Crystallography* (Lonsdale, K., ed.), Vol. III, pp. 216-245. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht.
- Ishizuka, K. (1993). Analysis of electron image detection efficiency of slow-scan CCD cameras. *Ultramicroscopy* **52**, 7-20.
- Jap, B. K., Downing, K. H. & Walian, P. J. (1990). Structure of PhoE Porin in Projection at 3.5 Å Resolution. *J. Struct. Biol.* **103**, 57-63.
- Jap, B. K. & Glaeser, R. M. (1978). The Scattering of High-Energy Electrons. I, Feynman Path-Integral Formulation. *Acta Cryst.* **A34**, 94-102.
- Jap, B. K., Walian, P. J. & Gehring, K. (1991). Structural architecture of an outer membrane channel as determined by electron crystallography. *Nature* **350**(14 March), 167-170.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y. & Cowan, S. W. (1991). Improved Methods for Building Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in these Models. *Acta Cryst.* **A47**, 110-119.
- Jung, K.-H. & Spudich, J. L. (1996). Protonatable residues at the cytoplasmic end of transmembrane helix-2 in the signal transducer HtrI control photochemistry and function of sensory rhodopsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6557-6561.
- Kamikubo, H., Kataoka, M., Varo, G., Oka, T., Tokunaga, F., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1996). Structure of the N intermediate of bacteriorhodopsin revealed by x-ray diffraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(February), 1386-1390.
- Kandori, H. (1994). Ultrafast Spectroscopy as a Challenger in Biophysics - Primary Processes in Retinal Proteins. *Seibutsu-Butsuri* **34** No.4, 13-19.
- Kandori, H. (1995). Ultrafast Spectroscopy of Photoreceptive Proteins. *Kagaku-to-Kougyo* **48** No.2, 111-114.
- Kandori, H. & Maeda, A. (1997). How Does Bacteriorhodopsin Convert Light into Energy? *Tanpakushitsu Kakusan Kousei* **42** No.2, 101-109.
- Kandori, H., Yamazaki, Y., Hatanaka, M., Needleman, R., Brown, L. S., Richter, H.-T., Lanyi, J. K. & Maeda, A. (1997). Time-Resolved Fourier Transform Infrared Study of Structural Changes in the Last Steps of the Photocycles of Glu-204 and Leu-93 Mutants of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **36**, 5134-5141.
- Kandori, H., Yamazaki, Y., Sasaki, J., Needleman, R., Lanyi, J. K. & Maeda, A. (1995). Water-Mediated Proton Transfer in Proteins: An FTIR Study of Bacteriorhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2118-2119.
- Kataoka, M., Kamikubo, H., Tokunaga, F., Brown, L. S., Yamazaki, Y., Maeda, A., Sheves, M., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1994). Energy Coupling in an Ion Pump The reprotonation Switch of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **243**, 621-638.
- Kawai, H., Sakurai, M., Inoue, Y., Chujo, R. & Kobayashi, S. (1992). Hydration of Oligosaccharides: Anomalous Hydration Ability of Trehalose. *Cryobiology* **29**, 599-606.
- Khorana, H. G. (1988). Bacteriorhodopsin, a Membrane Protein That Uses Light to Translocate Protons. *The Journal of Biological Chemistry* **263**(5 June), 7439-7442.
- Kimura, Y., Vassilyev, D. G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T. & Fujiyoshi, Y. (1997a). High Resolution Structure of Bacteriorhodopsin Determined by Electron Crystallography. *Photochemistry and Photobiology* **6** No.66, 764-767.
- Kimura, Y., Vassilyev, D. G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T. & Fujiyoshi, Y. (1997b). Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* **389**(11 September), 206-211.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996a). Efficient Rebuilding of Protein Structures. *Acta Cryst.* **D52**, 829-832.

- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996b). Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure* **4** No.12, 1395-1400.
- Koch, M. H. J., Dencher, N. A., Oesterhelt, D., H.-J. Ploehn, Rapp, G. & Bueldt, G. (1991). Time-resolved X-ray diffraction study of structural changes associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *The EMBO Journal* **10** No.3, 521-526.
- Koyama, T. & Ikegami, A. (1990). Light-driven proton pump. In *SeitaiMaku-no-BunshiSoshi, BunshiKikai* (Seibutsu-Butsuri-Gakkai, ed.), pp. 125-142. Gakkai-Shuppan-Center.
- Koyama, Y., Kubo, K., Komori, M., Yasuda, H. & Mukai, Y. (1991). Effect of Protonation on The Isomerization Properties of n-Butylamine Schiff Base of Isomeric Retinal as Revealed by Direct HPLC Analyses: Selection of Isomerization Pathways by Retinal Proteins. *Photochemistry and Photobiology* **54**, 433-443.
- Krivanek, O. L. & Fan, G. Y. (1991). *10th Pfefferkorn conference, Cambridge*.
- Krivanek, O. L. & Mooney, P. E. (1993). Applications of slow-scan CCD cameras in transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy* **49**, 95-108.
- Kühlbrandt, W. (1992). Two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* **25**, 1-49.
- Kühlbrandt, W. (1997). Pumping ions. *Nature Structural Biology* **4** No.10(October), 772-773.
- Kühlbrandt, W., Wang, D. N. & Fujiyoshi, Y. (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**(17 February), 614-621.
- Lanyi, J. K. (1995). Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps. *nature* **375**(8 June 1995), 461-463.
- Lanyi, J. K. (1997). Mechanism of Ion Transport across Membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **272** No.50(12 December), 31209-31212.
- Lanyi, J. K. (1998). Understanding Structure and Function in the Light-Driven Proton Pump Bacteriorhodopsin. *J. Struct. Biol.* **124**, 164-178.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
- Leifer, D. & Henderson, R. (1983). Three-dimensional Structure of Orthorhombic Purple Membrane at 6.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **163**, 451-466.
- Lepault, J. & Pitt, T. (1984). Projected structure of unstained, frozen-hydrated T-layer of *Bacillus brevis*. *The EMBO Journal* **3** No.1, 101-105.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H. & Crowe, L. M. (1995). Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. *Applied and Environmental Microbiology* **61** No.10(October), 3592-3597.
- Leslie, S. B., Teter, S. A., Crowe, L. M. & Crowe, J. H. (1994). Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1192**, 7-13.
- Linder, M. E. & Gilman, A. G. (1992). G Proteins. *Scientific American*(July).
- Luecke, H., Richter, H.-T. & Lanyi, J. K. (1998). Proton Transfer Pathways in Bacteriorhodopsin at 2.3 Angstrom Resolution. *Science* **280**(19 June), 1934-1937.
- Maeda, A., Kandori, H., Yamazaki, Y., Nishimura, S., Hatanaka, M., Chon, Y.-S., Sasaki, J., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1997). Intramembrane Signaling Mediated by Hydrogen-Bonding of Water and Carboxyl Groups in Bacteriorhodopsin and Rhodopsin. *J. Biochem.* **121**, 399-406.
- Maeda, A., Sasaki, J., Shichida, Y. & Yoshizawa, T. (1992). Water Structural Changes in the Bacteriorhodopsin Photocycle: Analysis by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 462-467.
- Maeda, A., Sasaki, J., Yamazaki, Y., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1994). Interaction of Aspartate-85 with a Water Molecule and the Protonated Schiff Base in the L Intermediate of Bacteriorhodopsin: A Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Study. *Biochemistry* **33**, 1713-1717.
- Mitsuoka, K. & Fujiyoshi, Y. (1995). Structural analysis of Biomolecule at atomic resolution. *6th Denken Summer School*.
- Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., Miyazawa, A., Kidera, A., Kimura, Y. & Fujiyoshi, Y. (1999). The Structure of Bacteriorhodopsin at 3.0 Å Resolution Based on Electron Crystallography: Implication of the Charge Distribution. *J. Mol. Biol.* **286**, 861-882.
- Mitsuoka, K., Murata, K., Kimura, A., Namba, K. & Fujiyoshi, Y. (1997). Examination of the LeafScan 45, a line-illuminating micro-densitometer, for its use in electron crystallography. *Ultramicroscopy* **68**, 109-121.
- Mogi, T. & Kandori, H. (1999). Crystal Structure and Proton Pump Mechanism of Bacteriorhodopsin. *Tanpakushitsu Kakusan Kousei* **44** No.1, 51-57.
- Mukohata, Y., Ihara, K., Tamura, T. & Sugiyama, Y. (1999). Halobacterial Rhodopsins. *J. Biochem.* **125**, 649-657.
- Müller, D. J., B·dt, G. & Engel, A. (1995a). Force-induced Conformational Change of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **249**, 239-243.
- Müller, D. J., Schabert, F. A., B·dt, G. & Engel, A. (1995b). Imaging Purple Membranes in Aqueous Solutions at Sub-Nanometer Resolution by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **68**(May), 1681-1686.
- Murata, K. & Fujiyoshi, Y. (1996a). Specimen preparation methods for high-resolution structure analysis of protein. *Denshi-Kenbikyoku* **31** No.2/3, 149-152.
- Murata, K. & Fujiyoshi, Y. (1996b). Structural analysis of proteins by electron crystallography. *7th Denken Summer School*, 239-248.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crysta.* **D53**, 240-255.
- Nakasako, M. (1995). Methods in Cryogenic X-ray Protein Crystallography. *Nippon-Kesshou-Gakkai* **37**, 266-270.
- Nakasako, M., Kataoka, M., Amemiya, Y. & Tokunaga, F. (1991). Crystallographic characterization by X-ray diffraction of the M-intermediate from the photo-cycle of bacteriorhodopsin at room temperature. *FEBS letters* **292**(November), 73-73.
- Nakasako, M., Kataoka, M. & Tokunaga, F. (1989). Arginine remarkably prolongs the lifetime of the M-intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle at room temperature. *FEBS letters* **254**(August), 211-214.
- Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. (1998). Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**(8 January), 199-203.
- Nogales, E., Wolf, S. G., Zhang, S. X. & Downing, K. H. (1995). Preservation of 2-D Crystals of Tubulin for Electron Crystallography. *J. Struct. Biol.* **115**, 199-208.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1971). Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium. *Nature New Biology* **233**(29 September), 149-152.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1973). Functions of a New Photoreceptor Membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70** No.10(October), 2853-2857.
- Oesterhelt, D. & Stoekenius, W. (1974). Isolation of the Cell Membrane of Halobacterium halobium and Its Fractionation into Red and Purple Membrane. *Methods Enzymol.* **31**, 667-678.
- Otto, H. & Heyn, M. P. (1991). Between the ground- and M-state of bacteriorhodopsin the retinal transition dipole moment tilts out of the plane of the membrane by only 3°. *FEBS letters* **293** No.1,2(November), 111-114.
- Otto, H., Marti, T., Holz, M., Mogi, T., Lindau, M., Khorana, H. G. & Heyn, M. P. (1989). Aspartic acid-96 is the internal proton donor in the reprotonation of the Schiff base of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**(December), 9228-9232.
- Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P. & Landau, E. M. (1997). X-ray Structure of Bacteriorhodopsin at 2.5 Angstroms from Microcrystals Grown in Lipidic Cubic Phases. *Science* **277**(12 September), 1676-1681.
- Pfefferle, J.-M., Maeda, A., Sasaki, J. & Yoshizawa, T. (1991). Fourier Transform Infrared Study of the N Intermediate of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **30**, 6548-6556.
- Richter, H.-T., Brown, L. S., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1996). A Linkage of the pKa's of asp-85 and glu-204 Forms Part of the Reprotonation Switch of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **35**, 4054-4062.
- Rose, A. (1946). A unified approach to the performance of photographic film, television pickup tubes, and the human eye. *Journal of the society of motion picture engineers* **47**(October), 273-294.
- Roser, B. (1991a). Trehalose Drying: A Novel Replacement for Freeze-Drying. *BioPharm*(September), 47-53.
- Roser, B. (1991b). Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science & Technology*(July), 166-169.
- Rudolph, J., Tolliday, N., Schmitt, C., Schuster, S. C. & Oesterhelt, D. (1995). Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *The EMBO Journal* **14** No.17, 4249-4257.
- Sakata, K., Tahara, Y., Morikawa, K., Fujiyoshi, Y. & Kimura, Y. (1992). A method for observing cross-sectional views of biomembranes. *Ultramicroscopy* **45**, 253-261.

- Santarsiero, B. D. & James, M. N. G. (1990). Crystal Structure of N-Methyl-N-phenylretinal Iminium Perchlorate: A Structural Model for the Bacteriorhodopsin Chromophore. *Journal of American Chemical Society* **112**, 9416-9418.
- Sasaki, J., Brown, L. S., Chon, Y.-S., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R. & Lanyi, J. K. (1995). Conversion of Bacteriorhodopsin into a Chloride Ion Pump. *Science* **269**(7 July), 73-75.
- Sasaki, J., Shichida, Y., Lanyi, J. K. & Maeda, A. (1992). Protein Changes Associated with Reprotonation of the Schiff Base in the Photocycle of Asp96 → Asn Bacteriorhodopsin The Mn Intermediate with unprotonated schiff base but N-like protein structure. *The Journal of Biological Chemistry* **267**(15 October), 20782-20786.
- Saxton, W. O. (1980). Correction of Artefacts in Linear and Nonlinear High Resolution Electron Micrographs. *J. Microsc. Spectrosc. Electron.* **5**, 661-670.
- Saxton, W. O. (1985). The Determination of Atomic Positions in High-Resolution Electron Micrographs. *Ultramicroscopy* **18**, 39-48.
- Saxton, W. O. (1986a). *XIth Int. Cong. on Electron Microscopy, Kyoto.*
- Saxton, W. O. (1986b). *44th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America.*
- Saxton, W. O. & Baumeister, W. (1982). The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *Journal of Microscopy* **127**(August), 127-138.
- Saxton, W. O. & Baumeister, W. (1984). Three-Dimensional Reconstruction of Imperfect Two-Dimensional Crystals. *Ultramicroscopy* **13**, 57-70.
- Saxton, W. O. & Koch, T. L. (1982). Interactive image processing with an off-line minicomputer: organization, performance and applications. *Journal of Microscopy* **127**(July), 69-83.
- Saxton, W. O. & O'Keefe, M. A. (1981). High resolution - in spite of misalignment? *Electron Microscopy and Analysis*, 343-346.
- Saxton, W. O., Smith, D. J. & Erasmus, S. J. (1983). Procedures for focusing, stigmating and alignment in high resolution electron microscopy. *Journal of Microscopy* **130**(May), 187-201.
- Schertler, G. F. X., Lozier, R., Michel, H. & Oesterhelt, D. (1991). Chromophore motion during the bacteriorhodopsin photocycle: polarized absorption spectroscopy of bacteriorhodopsin and its M-state in bacteriorhodopsin crystals. *The EMBO Journal* **10** No.9, 2353-2361.
- Schertler, G. F. X., Villa, C. & Henderson, R. (1993). Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362**(22 April), 770-773.
- Schmidt-Krey, I., Murata, K., Hirai, T., Mitsuoka, K., Cheng, Y., Morgenstern, R., Fujiyoshi, Y. & Hebert, H. (1999). The Projection Structure of the Membrane Protein Microsomal Glutathione Transferase at 3 Å Resolution as Determined from Two-dimensional Hexagonal Crystals. *J. Mol. Biol.* **288**, 243-253.
- Shaw, P. J. & Hills, G. J. (1981). Tilted Specimen in the Electron Microscope: A Simple Specimen Holder and the Calculation of Tilt Angles for Crystalline Specimens. *Micron* **12** No.3, 279-282.
- Smith, D. J., Camps, R. A., Freeman, L. A., O'Keefe, M. A. & Saxton, W. O. (1985a). Approaching Atomic-Resolution Electron Microscopy. *Ultramicroscopy* **18**, 63-76.
- Smith, d. J., Saxton, W. O., O'keefe, M. A., Wood, G. J. & Stobbs, W. M. (1983). The Importance of Beam Alignment and Crystal Tilt in High Resolution Electron Microscopy. *Ultramicroscopy* **11**, 263-282.
- Smith, S. O., Lugtenburg, J. & Mathies, R. A. (1985b). Determination of Retinal Chromophore Structure in Bacteriorhodopsin with Resonance Raman Spectroscopy. *J. Membrane Biol.* **85**, 95-109.
- Song, L., El-Sayed, M. A. & Lanyi, J. K. (1993). Protein Catalysis of the Retinal Subpicosecond Photoisomerization in the Primary Process of Bacteriorhodopsin Photosynthesis. *Science* **261**(13 August), 891-894.
- Spudich, J. L. (1994). Protein-Protein Interaction Converts a Proton Pump into a Sensory Receptor. *Cell* **79**, 747-750.
- Spudich, J. L. (1998). Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Molecular Microbiology* **28** No.6, 1051-1058.
- Spudich, J. L. & Bogomolni, R. A. (1984). Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature* **312**(6 December), 509-513.
- Spudich, J. L. & Bogomolni, R. A. (1988). Sensory Rhodopsins of Halobacteria. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 193-215.
- Steinhoff, H.-J., Mollaaghababa, R., Altenbach, C., Hideg, K., Krebs, M., Khorana, H. G. & Hubbell, W. L. (1994). Time-Resolved Detection of Structural Changes During the Photocycle of Spin-Labeled Bacteriorhodopsin. *Science* **266**(7 October), 105-107.
- Storey, K. B. (1990). Life in a frozen state: adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles. *American Physiological Society*, R559-R568.
- Storey, K. B. & Storey, J. M. (1990). Frozen and Alive. *Scientific American*(December), 92-97.
- Stowell, M. H. B., Miyazawa, A. & Unwin, N. (1998). Macromolecular structure determination by electron microscopy: new advances and recent results. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 595-600.
- Subramaniam, S., Gerstein, M., Oesterhelt, D. & Henderson, R. (1993). Electron diffraction analysis of structural changes in the photocycle of bacteriorhodopsin. *The EMBO Journal* **12** No.1, 1-8.
- Subramaniam, S., Lindahl, M., Bullough, P., Faruqi, A. R., Tittor, J., Oesterhelt, D., Brown, L., Lanyi, J. & Henderson, R. (1999). Protein Conformational Changes in the Bacteriorhodopsin Photocycle. *J. Mol. Biol.* **287**, 145-161.
- Szaraz, S., Oesterhelt, D. & Ormos, P. (1994). pH-Induced Structural Changes in Bacteriorhodopsin Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biophysical Journal* **67**(October), 1706-1712.
- Takeda, K., Sato, H., Hino, T., Kono, M., Fukuda, K., Sakurai, I., Okada, T. & Kouyama, T. (1998). A Novel Three-dimensional Crystal of Bacteriorhodopsin Obtained by Successive Fusion of the Vesicular Assemblies. *J. Mol. Biol.* **283**, 463-474.
- Taylor, K. A. & Glaeser, R. M. (1974). Electron Diffraction of Frozen, Hydrated Protein Crystals. *Science* **186**(13 December), 1036-1037.
- Taylor, W. R., Jones, D. T. & Green, N. M. (1994). A Method for α -Helical Integral Membrane Protein Fold Prediction. *PROTEINS* **18**, 281-294.
- Thorgeirsson, T. E., Xiao, W., Brown, L. S., Needleman, R., Lanyi, J. K. & Shin, Y.-K. (1997). Transient Channel-opening in Bacteriorhodopsin: an EPR Study. *J. Mol. Biol.* **273**, 951-957.
- Tittor, J., Soell, C., Oesterhelt, D., Butt, H.-J. & Bamberg, E. (1989). A defective proton pump, point-mutated bacteriorhodopsin Asp96 → Asn is fully reactivated by azide. *The EMBO Journal* **8** No.11, 3477-3482.
- Toyoshima, C. (1990). Ice Embedding Method. *Jikken-Igaku* **8** No.5, 49(433)-57(441).
- Toyoshima, C. (1991). Cryo-electron microscopy of biological macromolecules. *Seitai-no-Kagaku* **42** No.6, 625-630.
- Toyoshima, C. (1993). Three-dimensional Electron Microscopy of Membrane Proteins. *Tanpakushitsu Kakusan Kousei* **38** No.7, 1276-1286.
- Toyoshima, C. & Unwin, N. (1988). Contrast Transfer for Frozen-Hydrated Specimens: Determination from Pairs of Defocused Images. *Ultramicroscopy* **25**, 279-292.
- Toyoshima, C. & Unwin, N. (1990). Three-dimensional Structure of the Acetylcholine Receptor by Cryoelectron Microscopy and Helical Image Reconstruction. *The Journal of Cell Biology* **111**(December), 2623-2635.
- Toyoshima, C., Yonekura, K. & Sasabe, H. (1993). Contrast transfer for frozen-hydrated specimens II. Amplitude contrast at very low frequencies. *Ultramicroscopy* **48**, 165-176.
- Unger, V. M. & Schertler, G. F. X. (1995). Low Resolution Structure of Bovine Rhodopsin Determined by Electron Cryo-Microscopy. *Biophysical Journal* **68**(May), 1776-1786.
- Unwin, P. N. T. & Henderson, R. (1975). Molecular Structure Determination by Electron Microscopy of Unstained Crystalline Specimens. *J. Mol. Biol.* **94**, 425-440.
- Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Henderson, R. (1994). Analysis of Electron Microscope Images and Electron Diffraction Patterns of Thin Crystals of 029 Connectors in Ice. *J. Mol. Biol.* **240**, 281-287.
- Varo, G. & Lanyi, J. K. (1991). Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration. *Biophys. J.* **59**(February), 313-322.
- vonHeijne, G. (1991). Proline Kinks in Transmembrane α -Helices. *J. Mol. Biol.* **218**, 499-503.
- vonHeijne, G. (1992). Membrane Protein Structure Prediction Hydrophobicity Analysis and the Positive-inside Rule. *J. Mol. Biol.* **225**, 487-494.
- Walz, T. & Grigorieff, N. (1998). Electron Crystallography of Two-Dimensional Crystals of Membrane Proteins. *J. Struct. Biol.* **121**, 142-161.
- Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Smith, B. L., Heymann, J. B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Agre, P. & Engel, A. (1997). The three-dimensional structure of Aquaporin-1. *Nature* **387**(5 June), 624-627.

- Wang, D. N. & Kühlbrandt, W. (1991). High-resolution Electron Crystallography of Light-harvesting Chlorophyll a/b-Protein Complex in Three Different Media. *J. Mol. Biol.* **217**, 691-699.
- Williams, R. C. & Fisher, H. W. (1970). Electron Microscopy of Tobacco Mosaic Virus under Conditions of Minimal Beam Exposure. *J. Mol. Biol.* **52**, 121-123.
- Yamazaki, Y., Kandori, H., Needleman, R., Lanyi, J. K. & Maeda, A. (1998). Interaction of the Protonated Schiff Base with the Peptide Backbone of Valine 49 and the Intervening Water Molecule in the N Photointermediate of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **37**, 1559-1564.
- Zemlin, E., Weiss, K., Schiske, P., Kunath, W. & Herrmann, K.-H. (1978). Coma-Free Alignment of High Resolution Electron Microscopes with the Aid of Optical Diffractograms. *Ultramicroscopy* **3**, 49-60.

7. 付録 A 材料と方法

7.1.2次元結晶

レチナール欠損株の *Halobacterium salinarium* JW5 を 1974 年の Oesterhelt らの方法により培養した。全トランス型のレチナールを暗中でログフェーズ中に培養液中に加えた。紫膜は 1974 年の Oesterhelt らの方法に従い精製した。さらに中性界面活性剤であるオクチルグルコシド (octyl glucoside ; OG) と少量の陽イオン性界面活性剤であるドデシルトリアンモニウムクロライド (dodecyl triammonium chloride ; DTAC) の存在下で膜を融合させ (Baldwin *et al.*, 1984)、直径が数 μm の融合された 2 次元結晶を作製した。

7.2. 試料作製

特別に表面をきれいに加工したモリブデングリッドを使用し試料吸着時の歪みを最小化した。99.9999%以上の純度のカーボンロッド(日立化学)を使用し、新しく切開されたマイカ表面に蒸着されて作成されたカーボン支持膜を使用した。カーボン支持膜は水中でマイカから剥離されマイカ側だった面からグリッドですくいとった。0.4M citric acid-Na₂HPO₄ バッファ pH5.5 と 3%トレハロースを含む紫膜の懸濁液 (2.5 μl) がカーボン支持膜へグリッド側よりアブライされた。大部分の懸濁液はろ紙に 10 から 30 秒つけて吸収除去した。グリッドは液体エタン中へ急速凍結された。液体エタンは Leica 製 KF80 急速凍結機により 110K に保たれた。

7.3. 回折像および実像の撮影条件

急速凍結されたグリッドは液体窒素温度で JEOL4000SFX(400KV) または JEM3000SFF(300KV)電子顕微鏡(日本電子)のクライオステージへ移動され、さらに 4.2K まで冷却された。露出時間は回折像および実像でそれぞれ 15 秒または 2 秒で低照射装置を使用して全照射量は各試料において $10\text{e}^-/\text{\AA}^2$ より低く保たれた。実像の記録には 5 万倍または 6 万倍の倍率でコダックの SO-163 に記録した。回折像はフィルム、1Kx1K または 2Kx2K のスロースキヤン CCD カメラ (Gatan 米国) を使用して記録した。

8. 付録 B 像形成

8.1. 試料面

試料面ではポテンシャルのビーム方向(z 軸方向)への投影によって入射して来た平面波の位相が偏移される。試料のポテンシャルを Φ_{3D} とするとその投影である Φ は次の式で計算される。

$$\phi(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \phi_{3D}(x, y, z) dz$$

位相の偏移は透過関数(transmission function) $e^{i\sigma\phi}$ で表される。ポテンシャルの投影と位相の偏移量とを関係付ける定数 σ は相互作用係数(interaction parameter)と呼ばれ次の式で求められる。ここで λ は波長、 E は加速電圧、 $\beta = v/c$ 、 v は電子の速度、 c は光速である。

$$\sigma = \frac{2\pi}{\lambda E(1 + \sqrt{1 - \beta^2})}$$

位相偏移が大変小さいと仮定できる場合(弱位相物体近似; weak phase object approximation)では試料面における波動関数(wave function) ψ_o は下の式のように1次までの展開式で近似できる。第一項は非散乱波、第二項は1次の散乱波に対応していると解釈できる。ここで ψ_{in} は入射波である。

$$\begin{aligned} \psi_o(x_o, y_o) &= \psi_{in} e^{i\sigma\phi(x_o, y_o)} \\ &\cong \psi_{in} (1 + i\sigma\phi(x_o, y_o)) \end{aligned}$$

8.2. 回折面

回折面では上記 $\psi_o(x_o, y_o)$ のフーリエ変換が作られさらにそれに対し位相偏移 $e^{i\chi}$ が加わる形になる。ここでの位相偏移はデフォーカスや球面収差の影響を反映したものである。上記 $\psi_o(x_o, y_o)$ の近似式より回折面(back focal plane)での波動関数 $\Psi_{bf}(x_{bf}, y_{bf})$ は下記のように示せる。

$$\begin{aligned} \Psi_{bf}(x_{bf}, y_{bf}) &= F(\psi_o(x_o, y_o)) e^{i\chi} \\ &\cong \delta(0,0) - \sigma\Phi(x_{bf}, y_{bf}) \sin \chi + i\sigma\Phi(x_{bf}, y_{bf}) \cos \chi \end{aligned}$$

ここで

$$\Phi(x_{bf}, y_{bf}) = F(\phi(x_o, y_o))$$

8.3. 像面

像面ではさらに $\Psi_{bf}(h, k)$ のフーリエ変換である $\psi_i(x_i, y_i)$ が波動関数となる。対物絞りの効果は対物絞り関数 $A(h, k)$ で示せる。実際に記録される場合はその強度である $|\psi_i(x_i, y_i)|^2$ が観測され $\sigma\Phi(h, k)$ が充分小さい場合は強度分布を示す像のフーリエ変換は $-2\sin\chi$ を補正すれば以下のよう試料のポテンシャルの投影と直線的な関係で示される。

$$\psi_i(x_i, y_i) = F^{-1}\{F\{\psi_o(x_o, y_o)\}A(x_{bf}, y_{bf})e^{i\chi}\}$$

$$\begin{aligned} A(x_{bf}, y_{bf}) &= 1, \sqrt{x_{bf}^2 + y_{bf}^2} \leq r \\ &= 0, \sqrt{x_{bf}^2 + y_{bf}^2} > r \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} I(x_i, y_i) &= \psi_i(x_i, y_i)\psi_i^*(x_i, y_i) \\ &\cong \delta(0,0) - 2\sigma\Phi(x_{bf}, y_{bf}) \sin \chi \end{aligned}$$

ここで $-2\sin \chi$ が位相コントラスト伝達関数である。

9. 付録 C フーリエ変換の像解析への応用

9.1. フィルタリング (filtering)

フーリエ空間におけるマスクングと実空間における平均化の関係を数学的に 1 次元で考えて見る。f(t)を像、F(f)をそのフーリエ像とする。また記号 \Leftrightarrow はお互いがフーリエ変換の関係にあることを示すことにする。

$$f(t) \Leftrightarrow F(f)$$

III(t)は原点を中心に 1 の間隔で δ 関数が無限に並んだ櫛形関数を表すものとする。 δ 関数は原点での積分が 1 でそれ以外では値が 0 の関数である。櫛形関数のフーリエ変換は $1/l$ 、振幅は 1 やはり櫛形関数になる。

$$III(t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(t-n)$$

$$III(t) \Leftrightarrow III(f)$$

また $\Pi(f)$ をやはり原点を中心として幅 $1(-1/2 < f < 1/2)$ において値が 1 それ以外での値が 0 の箱型の関数とする。箱型関数のフーリエ変換は次の式で定義される sinc 関数になる。

$$\text{sinc}(x) \equiv \frac{\sin \pi x}{\pi x}$$

$$\begin{aligned} \Pi(t) &= 1 \quad (|t| < 1/2) \\ &= 0 \quad (|t| > 1/2) \end{aligned}$$

$$\Pi(t) \Leftrightarrow \text{sinc}(f)$$

ここでフーリエ変換 $F(f)$ に周期 l 、マスクサイズ $n(l > n)$ のマスクをかけるということは間隔 l の櫛形関数 $III(f/l)$ と幅 n の箱型の関数 $\Pi(f/n)$ との畳み込み積分を $F(f)$ に掛け合わせることになる。そしてそのフーリエ逆変換は畳み込み定理よりそれぞれの関数のフーリエ変換である幅 $1/n$ の sinc 関数と間隔 $1/l$ の櫛形関数との積を $f(t)$ に畳み込むことになる。

$$F(f) \cdot (III(f/l) * \Pi(f/n)) \Leftrightarrow f(t) * (III(lt) \cdot n \text{sinc}(nt))$$

マスクサイズ n を大きくする程 sinc 関数が中心からみてはじめに 0 になるまでの距離が短くなる。つまり sinc 関数の中心の正の領域が狭くなり局所的な平均化となる。例えばマスクサイズ n が

1だと全領域を平均化する。nが10だとおおよそ全領域の1/10の範囲を平均化する。n=1はマスクをかけないことになり平均化は行われない。

9.2. 畳み込み定理 (convolution theorem)

2つの任意の関数 $g(t)$ と $h(t)$ の畳み込み操作 (convolution) は次のように定義される。

$$g(t) * h(t) \equiv \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau) h(t - \tau) d\tau$$

この時 $g(t)$ と $h(t)$ の畳み込みのフーリエ変換は $g(t), h(t)$ それぞれのフーリエ変換 $G(f), H(f)$ を掛け合わせたものになる。つまり、

$$g(t) \Leftrightarrow G(f)$$

$$h(t) \Leftrightarrow H(f)$$

とすると

$$g(t) * h(t) \Leftrightarrow G(f) \cdot H(f)$$

9.3. 相関定理 (correlation theorem)

$Corr(t)$ を相関積分 (correlation integral) とすると

$$Corr(t) \equiv \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau) h(t + \tau) d\tau$$

そのフーリエ変換は

$$g(t) \Leftrightarrow G(f)$$

$$h(t) \Leftrightarrow H(f)$$

として

$$Corr(t) = \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau) h(t + \tau) d\tau \Leftrightarrow G(f) H^*(f)$$

9.4. 回折点の形状

結晶が完全に像が正方形の測定領域全体に一様に広がっているとするとその測定領域の端で矩形に途切れているためそのフーリエ変換は単位格子のフーリエ変換に対して有限の格子に

よる2次元のラウエ関数(回折点を示す δ 関数の集まりに2次元のsinc関数が畳み込まれたもの)を掛け合わせたものになる。

$$\text{sinc}(x) \equiv \frac{\sin \pi x}{\pi x}$$

$$f(t) \Leftrightarrow F(f)$$

$$III(lt) \Leftrightarrow III(f/l)$$

$$\Pi(t/n) \Leftrightarrow \text{sinc}(nf)$$

$$f(t) * (III(lt) \cdot \Pi(t/n)) \Leftrightarrow F(f) \cdot (III(f/l) * \text{sinc}(nf))$$

フーリエ変換像が通常のサンプリングとして元の実像と同じサイズに作られている場合にはこのsinc関数はフーリエ空間の1ステップでちょうど0になる。そのため中心の極大ピークはフーリエ空間の1点または2点、4点にまたがることになる。この回折点の形状は2次元結晶が完全な場合に当てはまる。実際は分子や格子の位置や方向、統計的な不規則さのために形状も変化する。たとえば結晶学的な欠陥、ずれや点欠陥がある。格子に曲がりや伸張があり平面な結晶も曲がったり皺になったりする。実際の結晶では格子が曲がっていることが格子点を引き伸ばし位相を不正確にする。結晶を改善するか計算に使用する領域を狭い範囲に限る必要がでてくる。Sinc関数の形状は結晶性が高い部分が中心の狭い範囲に限られる場合はゆっくり落ち込むことになりすなわち回折点が広がる。またはっきりした折り返しもあらわれない。低分解能に対応する回折点ほど理想的なsinc関数に近いことが多い。

10. 付録D 回折像解析グラフィカルシステム (XDP) 使用手順概説

10.1. 回折像の登録

CCD で撮影された回折像を<ファイル名>.img という名前で用意する。サイズは 1K x 1K または 2K x 2K を使用。ここでのデータ形式は Gatan のヘッダ情報なしの形式。

padd コマンドを使用するとディレクトリ中の未登録のオリジナル回折像を見つけると登録をするか否かを確認し露光時間等の情報を入力する。このコマンドにより回折像に付随して 1 つのパラメータファイルが作成され以降の処理に関するパラメータは全てここに保存される。

pdir コマンドにより現在登録されている回折像の一覧が表示される。現在どこまで処理されたかも分かる。

10.2. データ変換

メニューより c3 コマンドを実行する。c3 とは convert, compress, cut の意味でデータを MRC 形式に変換しまた表示用に 2K x 2K のデータを 1K x 1K に圧縮しさらに 800x800 の領域のみを切り出す。これは XDP の標準の画像表示領域が 800x800 ピクセルであるためである。スクロール機能を利用することにより 1Kx1K をそのまま表示するバージョンも用意してある。

10.3. 処理領域の選択

前のステップの c3 で作成された cut ファイルを display cut file コマンドで表示する。画像を表示が見にくい時は set tone 機能により表示の濃淡を調節する。

ビームストップにより使用できない領域を box コマンドにより処理領域から除外 (box out) する。これは標準の MRC パッケージでは等方的に中心から最大最小の半径を指定して処理領域を指定するがこれを補完するものである。選択領域を保存後 box コマンドを実行することにより MRC データ中の除外選択領域に特殊な値が保存され以降のプログラムでは使用しないようにされる。

10.4. 指数付け

afs コマンドにより 4 つの象限から 1 点ずつ選択し指数を与える (afs というコマンド名は参考にした EMBL 研究所でつかわれていたソフトウェアの名前に由来する)。この時 H または K の合計が 0 にならないように 4 点を選ぶ。display lattice コマンドにより格子を表示し指数付けが正しいことを確認する。傾斜データの場合は表示される傾斜角と傾斜軸も妥当なものか確認する。

この部分に関しては更新された MRC パッケージで使用している自動指数付け機能を今後利用できるようにする予定である。

10.5. 格子ベクタの精密化

`diffint` コマンドにより格子ベクタの精密化を行なう。マスクのサイズはあらかじめ `edit parafile` コマンドにより調節しておく。マスクのサイズを小さくしすぎるとはじめの 4 点による粗い格子ベクタの見積もりからはずれは点が精密化に使用されず精密化の効果が出ない。マスクサイズを大きく取り過ぎるとノイズをピークとして拾ったりピークを落としたりしてしまう可能性が多くなる。また同様に `rin`, `rout` も調整しておく。これは精密化に使用するピークの最小最大の分解能を中心からの半径 (ピクセル数) で示すもので、内側はビームストップに影響されないぎりぎりのところに設定し外側は精密化に使用できそうなピークが見られるところまでにする。あまり `rout` を小さくとり過ぎると精密化にしようされるピークが少なくなりまたより精度がでる高分解能のピークが使用できないが逆に大きくとり過ぎると不確かなピークを精密化に使用する可能性が増え好ましくない。確認できる実際にどういったマスクが精密化に使用されたかは `diffint` 実行後に `display mask used for diffint` コマンドを実行して確認する。精密化された格子情報は `tomx` コマンドにより MRC ファイル中のヘッダ情報にも書き込んでおく。(`tomx` というコマンド名はこのコマンドを作成した人の名前に由来する)。

10.6. バックグラウンドの計算

`back` コマンドによりバックグラウンドを計算する。MRC パッケージでははじめに回転対称を仮定したバックグラウンドを大局的に引いて透過電子による強いバックグラウンドを引いたあとにピークの積分値を計算する時にピークの周辺の局所的なバックグラウンドを引く。本研究でバックグラウンドを計算する時には回転対称を仮定したバックグラウンドを引いた後に回転対称を仮定しない面フィットした曲面のバックグラウンドを引くようにした。これにより特に傾斜した回折像で顕著な異方的なバックグラウンドを取り除くことができるようになった。このフィットした曲面はピークの周辺に取られたバックグラウンド値計算用のボックスからバックグラウンド値を計算し 2 次元スプライン関数を全面に適用して得る。この `surface fitting` のオプションは `edit parafile` コマンドにより自由に有効/無効を切り替えられる。また `npc` という変数がありこの値が大きい程より大局的なフィッティングとなる。この値が大きすぎると実際のバックグラウンドをうまく近似できないが、逆にフィットした曲面が不必要に乱れるような場合はこの値を少し大きくする。

10.7. 強度の積分

`pick` コマンドにより各格子点における積分強度を求める。まずバックグラウンドを差し引いた回折像を表示するために `display cmpct` を行なう。この回折像の各ピークの大きさを確認しピーク用とバックグラウンド用のマスクサイズをそれぞれ決定する。またバックグラウンドのマスクを置く位置も 3 通り (`ntype=0,1,2`) の中から選べるべくピークや他のバックグラウンドのマスクに重複しないで大きく取れる位置を選択する。ピーク用マスクサイズ (`nxm`, `nym`)、バックグラウンド用マスクサイズ (`nxb`, `nxy`) とともに長方形にとることも可能で `x`, `y` の幅を独立に指定できる。特に傾斜データの時はさらに傾斜軸からの距離に比例してマスクサイズを漸近的に大きくすることも可能である。この時は傾斜軸からもっとも離れた位置のマスクサイズ (`nxmt`, `nymt`, `nxbt`, `nybt`) を標準のサイ

ズ (`nxm`, `nym`, `nxb`, `nxy`) よりも少し大きくとる。`pick` コマンドでも格子ベクタの最適化も行われる。この時格子ベクタを計算する時は各格子点における強度分布の重心が使用される。この格子ベクタの精密化はマスクサイズにも影響されるのではじめは繰り返し回数 (`ncyc`) を小さくしておき最適なマスクサイズが決まってから大きく (最大 100) して収束させる。マスクサイズは 1 つの候補の前後を自動的に試みる (マスクサイズを中心に `count` 数だけ候補が作られるように `step` 分をもとのマスクサイズに増減していく) 機能もある。

10.8. 結果のグラフ表示

XDP にはいくつかのグラフ表示機能がある。これは `edit graphpara` コマンドにより `x` 軸、`y` 軸を選択後に `display int` または `display int vs int` コマンドを使用することにより表示できる。`wilson plot` も表示できる。

10.9. その他

XDP にはその他画像表示やグラフ表示をプリンタに出力する機能もある。

11. 付録 E 実像解析インターフェース ツール使用手順概説

11.1. データ変換

leafscan でデジタル化したデータは tiff 形式で保存されている。leafcon コマンドにより MRC 形式のデータに変換する。この時、読み取り値は od 値に変換される。

11.2. フーリエ変換

負染色などで結晶性の良否を判断できる程に充分コントラストがある場合は、フーリエ変換前に結晶性の良い領域のみを切り出しておく(ccut コマンド)。

fftimg コマンドによりフーリエ変換像を計算する。fftimg コマンドは次に自動的に peaksearch コマンドを起動する。peaksearch コマンドはフーリエ変換像から S/N 比のいいピークを自動的に選択し次の指数付けで利用できるようにする。

11.3. 指数付け

peaksearch コマンドの出力を利用して同じラインに載らない 2 つのピークを選択し指数を与える。pindex コマンドにより残りのピークにも指数が与えられる。emref コマンドを使用し現在の指数付けから倍率や傾斜角、傾斜軸を確認し指数付けが妥当かを調べる。

11.4. マスク用格子点の選択

dsplatpnt コマンドにより格子点を拡大出力する。重心位置が格子点位置より何ピクセルも離れておらずまたピーク形状がはっきりしたものを選択する。目安として iq3 以上のものは大部分含め iq4 のものからは数%程度含める。iq5 以上のものは使わない。また radlim コマンドを使用しマスク用に選択したピークの分布を確認する。1 つや 2 つのみのピークが高分解能の場所にある場合はノイズを拾っている可能性があるので再度確認する。ピークの分布が傾斜角や傾斜軸から予想されるパターンから大きくはずれる場合も見直す。特にあまりピークの分布が異方的なのは歪み補正などの効果も異方的になってしまい好ましくない。latref コマンドにより選択したピークを利用し格子ベクタの精密化も行なっておく。この格子ベクタは pangle コマンドによりパラメータファイルに書き込んでおく。

11.5. フィルター像と相関図の作成

joba コマンドを実行する。選択したマスクを使用しフィルタ像を計算する。この時マスクサイズ(マスクの半径)も指定するがピークの形状が充分に入る大きさにする。また結晶性のよい数単位ユニット分の領域を参照領域として選択する。これをもとに相関図および自己相関図が計算される。joba からは自動的に quadserch コマンドが実行される。自己相関関数の形状は楕円で近似

されるが `quadserch` コマンドではそのプロファイルをもとに相関図に対してプロファイルフィッティングを行い相関変位ベクトル図および相関強度分布図を作成する。

11.6. 歪み補整用範囲の選択

`quadserch` コマンドで作成された相関変位ベクトル図および相関強度分布図を `boxccplot` で画面上に表示し歪み補整を行なう領域を多角形で切り出す。相関強度分布図では相関が強い方から弱い方へ #、X、+、-、:、. という記号で示されているが、1 回目の切り出しではおおよそ-のところまでを含むように切り出す。相関強度がある程度強くても変位ベクトル図で領域が連続でないように判断される場合は含めないようにする。切り出しは `view1`、`view2` コマンドにより、相関変位ベクトル図および相関強度分布図を交互に参照しながら行なう。参照領域は解析する像の中心部分にしか選択できない。もし結晶性が高い領域が中心部分はずれていると判断される場合は切り出しを行なう前に中心をずらして解析する範囲を変更する必要がある。これは `ccut` コマンドで行なう。

11.7. 歪みの補正

`boxccplot` により歪み補整を行なう領域を決定したら `ccuc` コマンドを実行する。`ccuc` コマンドは相関変位ベクトル図をもとに像の歪みを補整するが補整に際しては相関変位ベクトル図をスプライン関数でスムージングしたものを使用する。`ccuc` コマンドは歪みが補整された後の相関変位ベクトル図を確認のために出力するのでそれで歪み補整がうまく行われたかを確認する。

11.8. コントラスト伝達関数の見積もり

`defocus` 値を見積もる。特に傾斜像に関してはこの時点で `defocus` 値を見積もる必要がある。`ctfg` コマンドで像から `defocus` 値が異なる 2 つの帯状の領域を切り出しその領域の強度の周波数分布より `defocus` 値を見積もる。`ttrefine` コマンドでこの `defocus` 値を精密化する。はじめの `defocus` 値の見積もりが正しくないとうまく収束しないので分かる。最終的には 3 次元セットにうまくマージできるかどうかで判断する。`defocus` の値が決まると格子ベクタを再び精密化する。これは `ctf` の影響を取り除いたあとに格子ベクタを精密化するためである。`pangle` コマンドでこれを保存した後再び `defocus` 値の精密化を行なう。

11.9. 評価

`mmm` の結果により IQ 毎のピーク数を調べられる。傾斜の場合は傾斜軸よりか傾斜軸から遠いのかの区別をして分解能の範囲毎に IQ 数を集計できる。