

## クライオ電子顕微鏡による膜タンパク質高分解能構造解析の実例

東京大学・総合文化研究科・広域科学専攻

岸 孝一郎

### Model case of high-resolution structural analysis of membrane protein by cryo-electron microscopy

Graduate School of Arts and Science, The University of Tokyo  
Koichiro Kishi

(投稿日 2023/2/22、再投稿日 2023/6/5、受理日 2023/7/3)

キーワード：クライオ電子顕微鏡、単粒子構造解析、膜タンパク質、抗体、RELION

#### 概要

クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) による単粒子構造解析は、凍結サンプルの撮影から得られるタンパク質粒子画像を重ね合わせ、平均化することでタンパク質の立体構造を決定する手法である。正確なタンパク質立体構造のモデル構築のためには高分解能での構造解析が鍵となる。cryo-EM において分解能を決める要素は「サンプル調製」と「データ解析」である。本稿では、2.02 Å の高分解能で構造解析に成功した膜タンパク質の ChRmine (文献<sup>1</sup>) を例に、構造認識 Fab 断片抗体を用いたサンプル調製およびデータ解析の双方の視点から、膜タンパク質の cryo-EM を用いた単粒子高分解能構造解析に必要な要素や工夫点を紹介する。

#### 装置・器具・試薬

超高速液体クロマトグラフ Prominence UFLC システム

- ・システムコントローラ CBM-20A (島津製作所)
- ・オンラインデガッサ DGU-20A5R (島津製作所)
- ・送液ユニット LC-20AD (島津製作所)
- ・オートサンプラ SIL-20AC HT (島津製作所)
- ・カラムオープン CTO-20A (島津製作所)
- ・UV 検出器 SPD-20A (島津製作所)
- ・蛍光検出器 RF-10A (島津製作所)
- ・ENrich SEC 650 10×300 column (Bio-Rad)

クライオ電子顕微鏡装置一式 (東京大学)

- ・クライオ電子顕微鏡 Titan Krios G3i (ThermoFisher Scientific 社)
- ・直接電子検出器 K3 camera (Gatan 社)
- ・エネルギーフィルター BioQuantum energy filter (Gatan)

#### 計算機一式

- ・ CPU : Intel Xeon Gold 5218R Processor
- ・ GPU : Geforce RTX3090-24Gx4 (空冷 RC 仕様)
- ・ メモリ : DDR4-2666 192GB
- ・ OS : Cent OS7
- ・ ジョブ管理システム : OpenPBS

#### 材料

ChRmine 精製試料  
構造認識 Fab 断片抗体精製試料

#### 実験手順

- 1) 構造認識 Fab 断片抗体を用いたサンプル調製
- 2) RELION による単粒子構造解析

## 実験の詳細

### 1) 構造認識 Fab 断片抗体を用いたサンプル調製

#### 抗体調製と初期スクリーニング

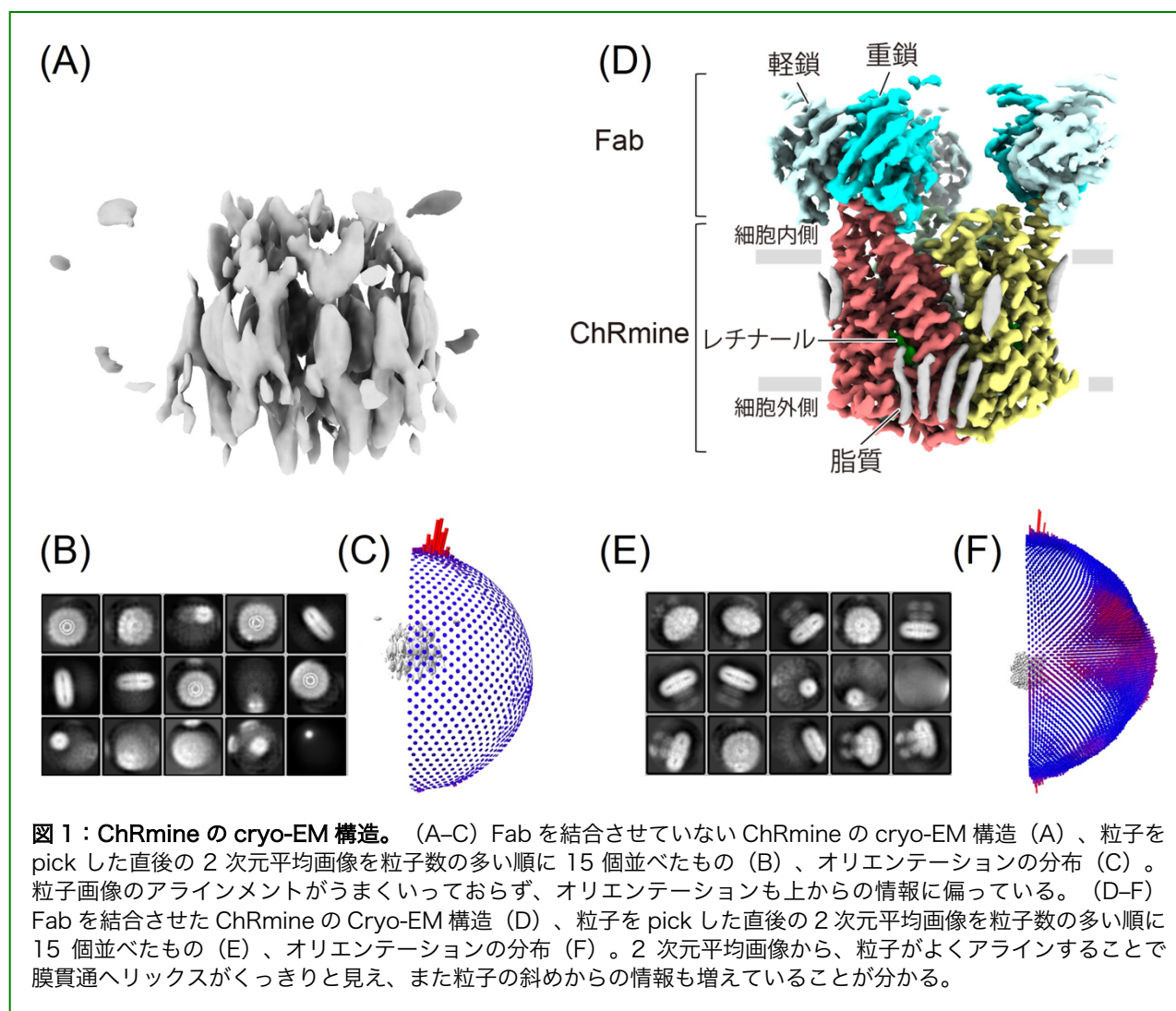
本研究で使用した抗 ChRmine Fab 断片抗体は、京都大学岩田想研究室にご調製いただいたものである。精製した ChRmine をリポソームに再構成し、それをマウスに免疫することで作成している。調製した抗体は未変性 ChRmine を用いた結合アッセイ（リポソーム ELISA）と変性 ChRmine を用いた結合アッセイ（ウエスタンブロットまたはドットブロット）を組み合わせることにより構造認識抗体を特異的に選択している。

より詳細な方法については、抗体の作製からスクリーニングまでが詳細にまとめられた総説<sup>2</sup>が存在するため、そちらを参照されたい。

#### cryo-EM における抗体結合の意義

cryo-EM を用いた単粒子構造解析は原理上、「得られた粒子画像が目的タンパク質のどの方向からの投影像なのかを決める精度（アラインメントの精度）」と、「粒子画像の方向の分布（オリエンテーション分布）」の2点が極めて重要であり、構造解析の成否を大きく左右する。そのため、方向を決定する際の目印になるような構造的な特徴（情報）が少ない小さなタンパク質や、界面活性剤ミセルによって膜貫通領域が隠れてしまう膜タンパク質のようなアラインメントが難しいターゲットや、オリエンテーション分布に偏り（オリエンテーションバイアス）が生じているサンプルは一般に構造解析が困難である。

本稿で取り上げる ChRmine はホモ 3 量体で分子量 105 kDa の小さな膜タンパク質であり、界面活性剤ミセルの外側の構造的な特徴も乏しい。このように ChRmine は、目的粒子のアラインメント精度が低くなることで cryo-EM 構造解析が困難な膜タンパク質の典型例であると言えるだろう。実際、ChRmine は高純度で精製することには成功したものの、この ChRmine 単体の精製サンプルをそのまま cryo-EM によって解析するだけでは高分解能構造に至らなかった（図 1A）。そこで筆者らは ChRmine に特異的に結合する構造認識 Fab 断片抗体（以下 Fab）を用いて構造的な特徴を付与することでアラインメントの精度の問題を解決した。さらに、先述の ChRmine 単体の cryo-EM 解析結果からは、アラインメント精度が低いことに加えてオリエンテーションバイアスの問題が存在することが判明していたが（図 1B, C）、Fab との複合体で cryo-EM 解析を行うことで、幸運にもこのオリエンテーションバイアスの問題も解消され、最終的に 2.02 Å という高分解能で ChRmine の構造解析に成功した（図 1D - F）。



cryo-EM 解析で使用した Fab は、5 種の Fab (A – E) の中から cryo-EM に最も適した Fab を蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー法 (FSEC 法) によるスクリーニング結果を踏まえて選択した。

### 蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー法 (FSEC 法)

蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー法 (FSEC 法) とは蛍光検出器を組み合わせたゲルろ過クロマトグラフィー法であり、目的タンパク質に GFP などの蛍光タンパク質を融合させることで、細胞ライセートのような純度の低いサンプルでも目的タンパク質の性状を特異的にかつ簡便に判断できる実験手法である (文献<sup>3</sup>)。当研究室では、新規にクローニングしたタンパク質の発現確認のみならず、各精製ステップでの性状確認、タグ切断反応の終結確認、最終精製サンプルの性状確認、そして抗体結合実験と多用途に用いており、ほぼ毎日稼働している。

FSEC 法に関する詳細は、服部素之博士の詳細なプロトコルが蛋白質科学会アーカイブに寄稿されているので、タンパク質精製に携わる皆様には是非とも参照されたい (文献<sup>4</sup>)。

### FSEC を用いた抗体スクリーニング

ChRmine と各種 Fab (A – E) の精製サンプルを用いて、ChRmine に対する Fab の結合性を評価した。用いた ChRmine の濃度は 1.0 mg/mL、各種 Fab の濃度は 10 mg/mL である。

(1) ChRmine : 4  $\mu$ L と各種 Fab : 1  $\mu$ L をそれぞれ混合し、4°C で 12 時間反応させる。(モル当量では Fab は ChRmine の約 16 倍の大過剰加えている。) なお本検討では Fab 結合の反応時間を 12 時間と長時間設けているが、これは反応を最大限に進行させるためであり、ターゲットとするタンパク質が経時的に不安定な場合はより短時間での反応を検討すべきである。

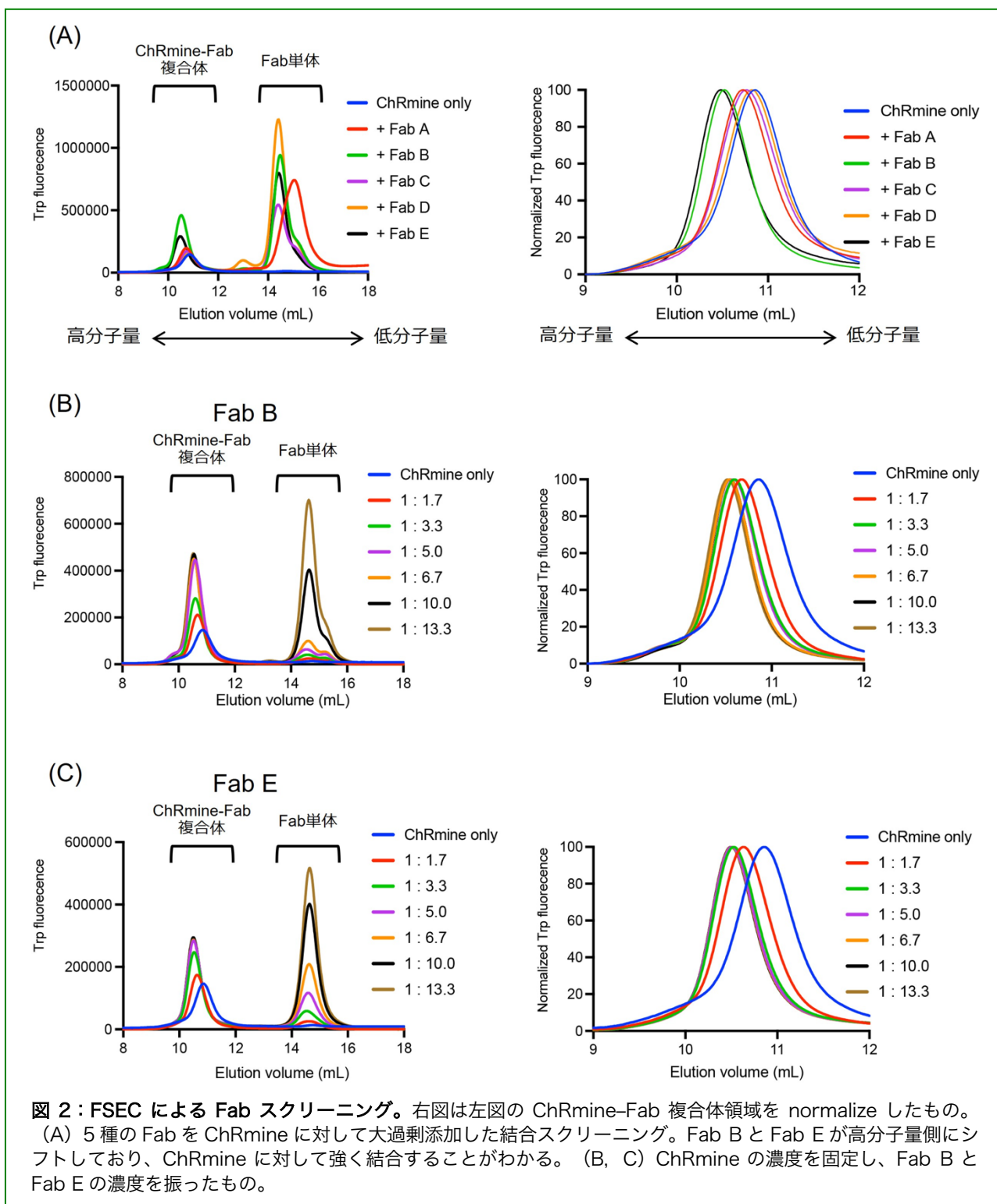
(2) バッファー (20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.03% GDN, 0.003% CHS) を 100  $\mu$ L 添加する。

(3) FSEC 法 (励起波長 280 nm, 蛍光波長 350 nm) によってその分子サイズを評価する。

なお条件は以下の通りである。

- ・展開バッファー: 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.03% DDM, 0.006% CHS
- ・展開カラム: ENrich SEC 650 10 $\times$ 300 column
- ・サンプル量: 50  $\mu$ L

FSEC 法により得られたクロマトグラムから、Fab B と Fab E が高分子量側にシフトしており、これら 2 つの Fab が ChRmine に対して強く結合していることが示唆された (図 2)。



### 工夫とコツ

ここまで ChRmine を例に目的タンパク質に強固に結合する抗体を FSEC 法によってスクリーニングする方法を記したが、cryo-EM 構造解析に向けたサンプル調製にはその他いくつかの注意点があるので、簡単に紹介したい。

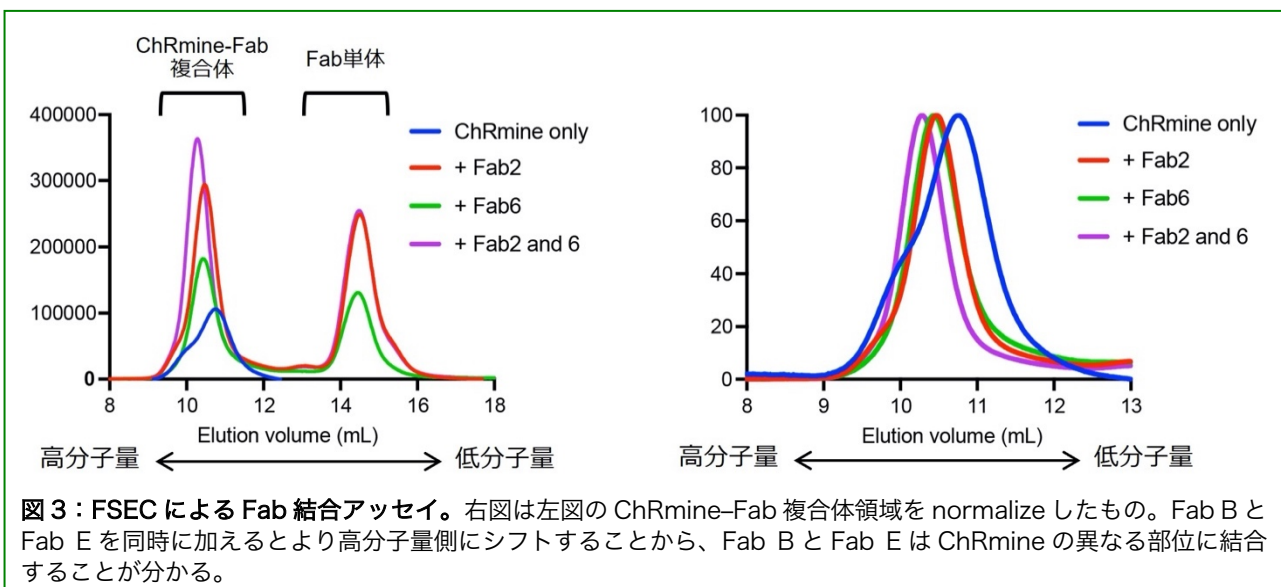
- cryo-EM での高分解能構造解析を阻む要因として、大きく以下の 2 点の可能性がある。
- (1) グリッド調製の際の急速凍結によって、抗体が解離してしまう場合。
  - (2) 抗体が目的タンパク質の構造的に柔軟な部位に結合してしまう場合。

(1) に関して、急速凍結によって抗体が解離する詳細なメカニズムは不明だが、微量の界面活性剤を加えることで解決することがある（文献<sup>5</sup>）。筆者がサンプルを調製する際は、0.08% Fluorinated Fos-Choline-8, 0.01% Fluorinated Octyl Maltoside, 0.05% Octyl Maltoside, 0.05% CHAPSO をそれぞれ加えたサンプルを同時に調製し、500 枚ほど撮影した small data set で解析することで、条件を比較検討している。

またさらに厄介なのが (2) の場合であり、こちらはサンプルにもよるが、数千枚のデータセットを取得し解析を進めてみるまでわからない問題であり、判断に時間がかかってしまう。もし抗体の柔軟性が高いことで高分解能構造に至らないのであれば、サンプル調製の観点からの解決策は、異なる部位に結合する抗体を用いてサンプル調製し直すことしかない。そのため目的タンパク質に強固に結合する有用な抗体はなるべく多く、そして異なる部位に結合するものを用意できるのが望ましい。本検討で IgG 抗体ではなく Fab 断片化したものを用いているのも同様の理由であり、抗体自身が持つ柔軟性を抑えるためである。

ChRmine の例に戻ると、Fab B と Fab E が ChRmine に強く結合する Fab であったが、ChRmine と Fab B、Fab E の 3 者を同時に加えると、FSEC のクロマトグラムがより高分子量側へシフトすることから、Fab B と Fab E は ChRmine の異なる部位に結合することが示唆されていた（図 3）。このように仮にある特定の手法（この場合は Fab B との複合体）での構造解析が困難であったとしても、なんらかのバックアッププラン（この場合は例えば Fab E との複合体の構造解析）を持っているような状況が理想的である。

本研究では抗体を結合させる戦略が成功したが、cryo-EM 構造解析の一般には、ターゲットタンパク質ごとに最適化した良質な cryo-EM サンプル（グリッド）を作成することが重要である。良質なグリッド作成に関しては、平泉将浩博士の詳細なプロトコルが蛋白質科学会アーカイブに寄稿されているので、こちらについてもぜひ一読いた



だきたい (文献<sup>6</sup>)。

小さな膜タンパク質に抗体を結合させるというストラテジーは cryo-EM 構造解析において非常に強力な手法である一方、やってみないとわからない不確定要素が数多くあり厄介な面もある。しかしそれは同時に実験そのものの醍醐味でもあると思うので、泥臭い検討を楽しんで挑戦してみたい。

## 2) RELION による単粒子構造解析

ここからは cryo-EM 単粒子構造解析ソフト RELION-3.1 (文献<sup>7</sup>) を用いた解析について、2.02 Å 分解能での解析に成功した ChRmine を例に具体的な解析の流れを記す。本稿では単粒子構造解析ソフトとして RELION を用いたデータ処理を解説するが、現在の研究現場では RELION だけでなく、CryoSPARC (文献<sup>8</sup>) も多く用いられている。CryoSPARC は GUI が見やすく直感的に操作できる上、使用しているアルゴリズムの違いから計算速度が Relion に比べて早いということから、近年の研究現場では Relion よりも使用している研究室が多くなってきている印象であり、実際現在の我々の研究室のメインの解析ソフトも CryoSPARC である。

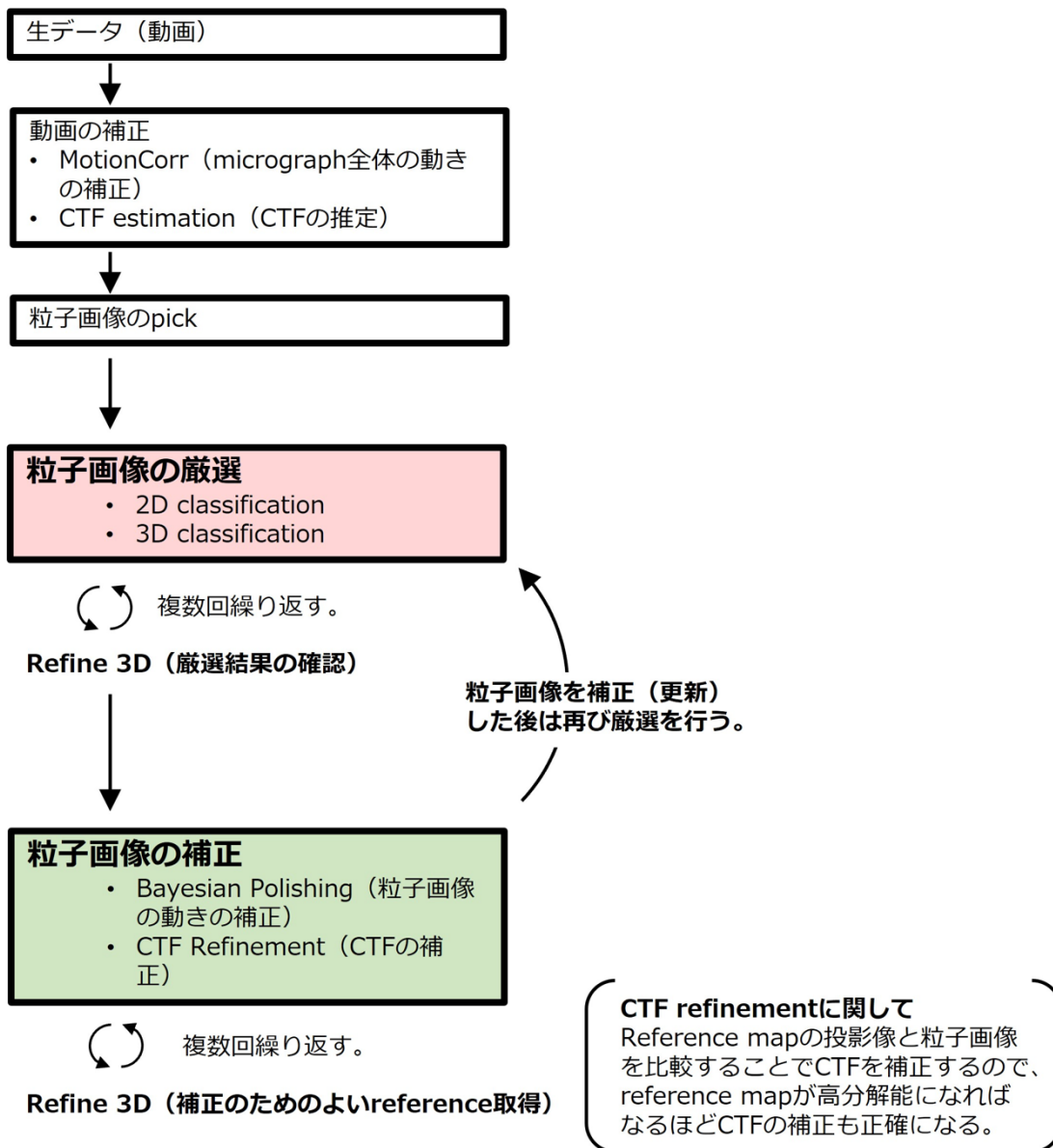
両者のソフト間で内部のプログラムや具体的に指定できるパラメータの種類に一部異なる点があるものの、データ処理の際に考えるべき大枠の考え方は共通している。そこでここではユーザーの立場から「どのようなことを考えながら」、「どのようにパラメータを振ればよいのか」という大局的な点に重きを置いてまとめたい。

単粒子構造解析の高分解能化において基本となる考え方は、一言で言えば、「良い粒子を厳選」し、Particle Polish (1 粒子画像ごとの動きの補正) および CTF Refine (コントラスト伝達関数の補正) によって「粒子画像の補正を重ねていく」ということである。

以下に ChRmine の解析の流れを模式的に表す。重要なパラメータの情報はなるべくすべて記載するようにしている (デフォルト値で指定しているパラメータについては省略している場合もある)。



### 単粒子解析の大まかな流れと考え方



#### 高分解能解析を目指すためのTips

- 粒子画像の厳選は単粒子解析の出来を最も左右する処理であり、最も時間をかけて検討すべきポイントである。特に3D classificationではクラス数、T値、選ぶクラスを検討し、Refine 3Dで分解能の最も高い粒子画像セットを選択する。
- 粒子画像の補正はよいmapが得られる度に、そのmapをreferenceとして補正していく（特にCTF refinement）。言い換えれば、Refine 3Dを行って分解能が向上するたびに画像の補正を行う。
- 画像を補正した後はさらに画像の厳選を繰り返す。
- **画像の厳選と補正、mapの更新を繰り返していく（今回の例では11回）**ことがChRmineの高分解能構造解析の決め手となった。

図 4：単粒子解析の大まかな流れと考え方

## ChRmineの実際の処理

### 1. Motion correction (MotionCor2)

↓

### 2. CTF estimation (CTFFIND-4.1.13)

↓

### 3. Subset selection

504 mics ×7に分割

↓

### 4. Auto-picking

504 micsから201590 particles  
Use Laplacian-of-Gaussian?: Yes  
Min. diameter: 150 Å  
Max. diameter: 210 Å  
Picking threshold: 0.05

↓

### 5. Particle extraction

Particle box size: 240  
Diameter background circle: 216  
Re-scaled size: 56

3.55 Å/pix

↓

### 6. 2D classification

Mask: 180 Å, iter: 25, T: 2  
201590 particles  
Particle pickのためのtemplate作成

↓

### 7. Subset selection

Templateの選択

↓

### 8. Auto-picking

3528 micsから2958159 particles

↓

### 9. Particle extraction

3.55 Å/pix

↓

### 10. Subset selection

500000 particlesごとにsplit

↓

### 11. 2D classification ×6 (splitしたそれぞれ)

Mask: 180 Å, iter: 25, T: 2  
2958159 -> 1671626 particles

↓

### 12. Join star files

Splitした全てのclassをmerge

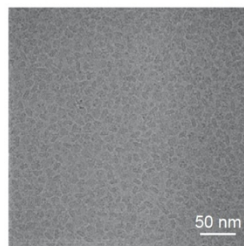
↓

### 13. 3D initial model

Mask diameter: 190 Å  
Symmetry: C1  
Initial angular sampling: 15 degree

↓

### 3. 代表的なmacrograph



粒子が凝集することなく均一に分布しており、理想的なmacrograph。

- 3,528 movies
- pixel size: 0.83 Å
- total dose: 46 e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>
- defocus range: 0.8 – 1.6 μm
- エナジーフィルター幅: 25 eV
- サンプリングモード: CDSモード

### 5. Particle extraction

- 粒子数が多い解析の初期はピクセルサイズを大きめに切り出すことで計算コストを小さくする。
- Pix sizeを先に決める (最初は3.5 Å程度)
- circular maskのサイズは粒子のサイズの一番大きい部分の長さ (粒子が完全に収まる大きさ) にする。
- Particle box sizeはmask + 20 Å

### 13. 3D initial model

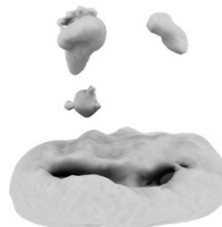


図5 : MotionCorrection から 3D initial model まで

**14. 3D classification**

Mask: 190 Å, iter: 50, T: 10,  
low pass: 40 Å, class: 8  
1671626 -> 555801 particles  
7.37 Å

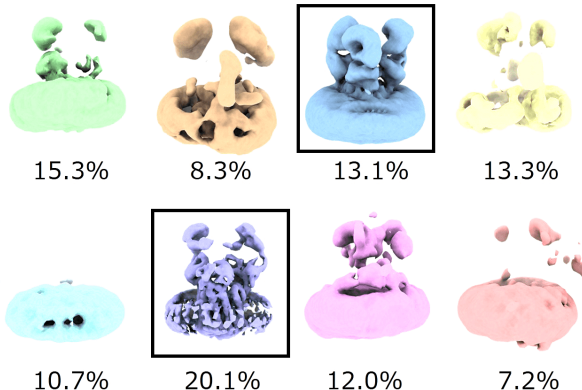


**15. Particle extraction**

Particle box size: 300  
Diameter background circle: 216  
Re-scaled size: 178  
1.40 Å/pix



**14. 3D classification**



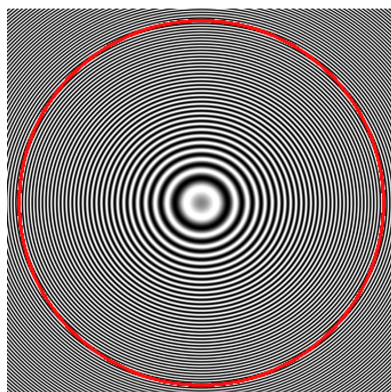
- ・黒枠で囲ったクラスをselectした。
- ・どのクラスを選ぶかはそれぞれRefine3Dを行い判断した。
- ・筆者はTパラメータを4~256の値でふり、精度よくアラインされる「良いクラス」と、ノイズが大きい「悪いクラス」がよく分かれる値を採用している。

**15. Particle extraction**

- ・処理が進み、分解能が高くなればなるほど、pixel sizeは小さくするべきであり、それに伴ってbox sizeは大きくするべきである。
- ・これは画像のコントラスト伝達関数 (CTF) がpixel sizeとbox sizeに依存して変形するからである。
- ・実際にどのくらいの大きさに切り出すかは中根崇智博士が作成されたCTF calculator (<https://3dem.github.io/relicon/ctf.html>) を用いて判断する。

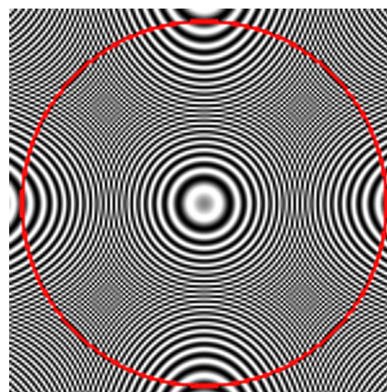
例1

Box size (in pix): 340  
Pixel size (in Å / pix): 0.94  
Defocus (in Å): 15000



例2

Box size (in pix): 150  
Pixel size (in Å / pix): 0.94  
Defocus (in Å): 15000



- ・例1ではCTFが同心円状 (トーンリングと呼ばれる。) に広がっている。これが適切な形である。
- ・box sizeが小さい例2はCTFの端にトーンリング以外の模様が見え、変形していることがわかる。(差が明確になるようにおおよさな値で計算している。)
- ・CTFが変形していると後のCTF refinementでCTFを正確に補正できなくなってしまう。
- ・赤のリングは2 Å分解能を表す。

**\*注意**

- ・CTFの歪みは粒子の大きさではなく、box sizeの大きさに依存するので、扱っているタンパク質が小さくても大きく切り出す必要がある。

図 6 : 3D classification①と particle extraction

### 16. Mask creation

Lowpass: 15  
Initial binarization threshold: 0.03  
Extend binary map this many pixels: 6  
Add a soft-edge of this many pixels: 6

### 17. Refine3D (2.82 Å)

Initial lowpass: 20  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Use solvent-flattened FSCs?: Yes  
(16.で作成したmaskを用いた。)  
Initial angular sampling: 7.5 degrees  
Initial offset range: 5 pix  
Initial offset step: 1 pix  
Local searches from auto-sampling: 1.8 degrees

### 18. Post-processing

### 19. Particle extraction

Particle box size: 340  
Diameter background circle: 216  
Re-scaled size: 300  
0.940 Å/pix

### 20. Refine3D (2.76 Å)

Initial lowpass: 20  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Use solvent-flattened FSCs?: Yes  
Initial angular sampling: 7.5 degrees  
Initial offset range: 5 pix  
Initial offset step: 1 pix  
Local searches from auto-sampling: 1.8 degrees

### 21. Post-processing

### 16. Mask creation



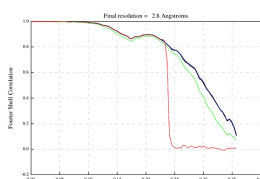
- ・ Extendは膜貫通領域のようなアラインすべき領域が入るような値にする。
- ・ Chimeraで断面を確認し、空洞がないことを確認する。
- ・ Soft-edgeは大きめの値を入れる方がよい。筆者は6~24くらいの値をふっている。
- ・ maskの良し悪しは後述のPost-Processingでチェックする。

### 17. Refine 3D (2.82 Å)



- ・ Pixel sizeによって分解能の制限がかかる、いわゆるナイキスト限界によって分解能（の評価）が頭打ちになっている。
- ・ pixel sizeの2倍が分解能の限界値となる。
- ・ Use solvent-flattened FSCs? はmaskを使う場合は常にYesにする。
- ・ またここから3回回転対称（C3）を考慮して3次元再構成を行っている。C1とC3でそれぞれRefine3Dを行い、得られたマップからモノマー間の非対称な構造変化がないことを確認した上で、C3の方が分解能が伸びた場合にC3を入れて処理を進める判断をしている。
- ・ C3を入れる場合はmapの軸を対称軸にそろえる必要がある。

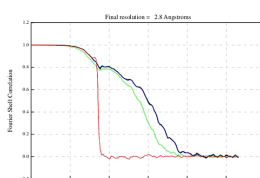
### 18. Post-processing



Nyquist周波数律速によってFSCが0に落ち切っておらず、分解能の推定が不十分である。

- ・ half map同士の相関（Fourier shell correlation, FSC）を見るjobで通常ここでmaskの評価を行う。
- ・ 赤：位相をランダム化したものにmaskをかけたhalf map同士のFSC。
- ・ 緑：maskなしのhalf map同士のFSC。
- ・ 青：maskありのhalf map同士のFSC。

### 21. Post-processing



FSCが0に落ち切っており、見かけ上分解能も向上する。

- ・ 黒：maskによるアーティファクトを除いたFSCで、分解能の評価に用いられる。
- ・ 赤のFSCが位相ランダム化によって急激に0に向かうとき、よいmaskが作れたと判断できる。
- ・ 逆に赤のFSCが高分解能shellまで0に達していないとき、maskによる相関（アーティファクト）があるため、maskを作り直してPost-processingをやり直す。

図7：Refine3Dとpost-processing

## 22. CTF refinement

Estimate (anisotropic) magnification?: No  
Perform CTF parameter fitting?: Yes  
Fit defocus?: per-particle  
Fit astigmatism?: per-micrograph  
Fit B-factor?: No  
Fit phase-shift?: No  
Estimate beamtilt?: Yes  
Also estimate trefoil?: No  
Estimate 4<sup>th</sup> order aberrations?: No

↓

## 23. Subset selection

Remove duplicate  
(Removed 5 duplicate)

↓

## 24. Bayesian polishing (train)

Polish train  
Fraction of fourier pixels for testing: 0.5  
Use this many particles: 10000

↓

## 25. Bayesian polishing

Extraction size: -1  
Re-scaled size: -1  
First movie frame: 1  
Last movie frame: -1

↓

## 26. Mask creation

Lowpass: 15  
Initial binarization threshold: 0.01  
Extend binary map this many pixels: 8  
Add a soft-edge of this many pixels: 8

↓

## 27. Refine3D (2.61 Å)

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Use solvent-flattened FSCs?: Yes  
Initial angular sampling: 7.5 degrees  
Initial offset range: 5 pix  
Initial offset step: 1 pix  
Local searches from auto-sampling: 1.8

↓

## 28. CTF refinement

Estimate (anisotropic) magnification?: No  
Perform CTF parameter fitting?: Yes  
Fit defocus?: per-particle  
Fit astigmatism?: per-micrograph  
Fit B-factor?: No  
Fit phase-shift?: No  
Estimate beamtilt?: Yes  
Also estimate trefoil?: Yes  
Estimate 4<sup>th</sup> order aberrations?: Yes

↓

## 23. Subset selection

- ・ particle pickでは同じ粒子を拾ってしまうことがある。
- ・ 粒子画像のアラインメントが終わり画像中心を特定した後に重複して拾ってしまった粒子を除く必要がある。

## 24. Bayesian polishing

- ・ 少数の粒子画像でパラメータの最適地を探索するtrainを行った後に、そのパラメータを用いた動きの補正を全粒子に対して行う。

図 8 : CTF refinement①と Bayesian polishing①

### 29. Refine3D (2.59 Å)

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Use solvent-flattened FSCs?: Yes  
Initial angular sampling: 7.5 degrees  
Initial offset range: 5 pix  
Initial offset step: 1 pix  
Local searches from auto-sampling: 1.8 degrees

### 30. Bayesian polishing

Extraction size: 500 pix  
Re-scaled size: 440 pix  
First movie frame: 2  
Last movie frame: -1

### 31. Refine3D (2.58 Å) J158

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 7.5 degrees

### 32. CTF refinement (anisotropic)

Estimate (anisotropic) magnification?: Yes  
Minimum resolution for fits: 30 Å

### 33. CTF refinement (higher order aberration)

Estimate (anisotropic) magnification?: No  
Perform CTF parameter fitting?: No  
Estimate beamtilt?: Yes  
Also estimate trefoil?: Yes  
Estimate 4<sup>th</sup> order aberrations?: Yes

### 34. CTF refinement (defocus)

Estimate (anisotropic) magnification?: No  
Perform CTF parameter fitting?: Yes  
Fit defocus?: per-particle  
Fit astigmatism?: per-micrograph  
Fit B-factor?: No  
Fit phase-shift?: No  
Estimate beamtilt?: No  
Estimate 4<sup>th</sup> order aberrations?: No

### 35. Refine3D (2.58 Å) J164

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 7.5 degrees

### 36. Particle subtraction

del halfFab

### 30. Bayesian polishing

ここでは動きの補正の目的ではなく、CTF refinementに向けて切り出しサイズを大きくしている。

### 32. CTF refinement

以下の手順で走らせる。  
・ anisotropic magnificationをYesにし、outputが0.5%以下ならその結果は無視して、higher order aberration → per-particle defocusの順に走らせる。  
・ anisotropic magnificationが0.5%以上（今回は1.5%程度だった）ならその結果を引き継ぎ、higher order aberration → per-particle defocusの順に走らせる。

#### \*注意

・ Beam tilt, trefoil, 4<sup>th</sup> order aberrationなどのhigher order aberration（高次の収差）の補正はオーバーフィットを防ぐためにデータセット（optics group）ごとに行う。  
・ defocusは低次の収差で、粒子ごとに異なる値を取るなので、per-particleで行う。  
・ 今回は行っていないが、b-factorはper-micrographとper-particleの2つの条件を検討してもよい。

### 36. Particle subtraction

・ 粒子画像からミセルとFabの半分のシグナルを除く。  
・ RELIONの場合は、Refine3DでmapからミセルとFabをmask outするよりもparticle subtractionした方が分解能が伸びる傾向にある。  
・ Fabの半分を残したのは、そちらの方が分解能がのびたため。（halfFabでもアラインメントに寄与しているのかもしれない。）

#### \*注意

micelleや抗体の情報を削った（subtractした）画像では、3次元再構成の難易度が上がるため、前のRefine3Dのアラインメント結果を一部利用するlocal searchで行う。



Particle subtractionに使用したmask

図9 : CTF refinement②と Bayesian polishing②

**37. 3D classification**

555801 -> 185895 particles  
Mask: 190 Å, iter: 50, T: 256,  
low pass: 40 Å, class: 4  
Perform image alignment?: No

↓

**38. Subset selection**

↓

**39. Refine3D (2.18 Å) J239**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 1.8 degrees  
Local searches from, auto-sampling: 1.8 degrees  
Maskは34.のparticle subtractionに用いたものと同様

↓

**40. CTF refinement (anisotropic)**

32-34と同様に  
Anisotropic magnification  
higher order aberration  
Defocus  
の順に補正

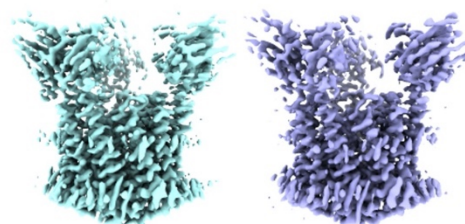
↓

**41. Refine3D (2.13 Å) J270**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 1.8 degrees

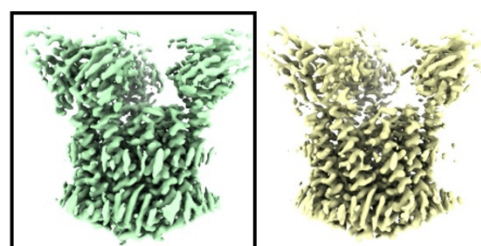
↓

**37. 3D classification**



29.0%

13.6%



33.4%

24.0%

- ・クラス分けの際に粒子のアラインメントを行わない、いわゆる**no-align 3D classification**。
- ・主にparticle subtract後の粒子画像のように、それだけでは方位のアラインメントができないような粒子画像を用いてクラス分けしたい場合や、タンパク質の一部の領域だけでクラス分けしたい場合に、これまでのアラインメントの情報を保持した状態で行う3D classification。今回は前者の場合である。
- ・このclassificationの目的は、すでに厳選されている粒子をさらに細かい違い（高分解能情報）によって厳選することである。そのためTパラメータは大きめの値を設定している。

**注意**

- ・no-align 3D classificationでは、粒子が十分にアラインされていることが重要であるため、アラインが不十分な低分解能な時点ではノイズによってクラス分けされるだけで意味がない点に注意である。

**39. Refine 3D (2.18 Å)**

- ・initial angular samplingとlocal searches from auto-samplingを同じ値にすると、これまでのアラインメント情報を引き継ぎ、local searchから始まる。

図 10 : 3D classification②と CTF refinement③

**42. Refine3D (2.075 Å)**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 1.8degrees



**43. CTF refinement (anisotropic)**

32-34と同様に  
Anisotropic magnification  
higher order aberration  
Defocus  
の順に補正



**44. Refine3D (2.054 Å)**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 1.8 degrees  
Local searches from auto-sampling: 1.8 degrees



**45. Particle subtraction (Revert)**

Revert to original particles?: Yes



**46. Bayesian polishing**

Extraction size: 500 pix  
Re-scale size: 440 pix  
First movie frame: 2  
Last movie frame: -1



**47. Refine3D (2.139 Å)**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 7.5 degrees



**48. CTF refinement (anisotropic)**

32-34と同様に  
Anisotropic magnification  
higher order aberration  
Defocus  
の順に補正



**49. Refine3D (2.128 Å)**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 1.8 degrees



**50. Particle subtraction**

delFab



**51. Refine3D (2.044 Å)**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 1.8 degrees



**45. Particle subtraction (Revert)**

・ Particle subtractionで粒子画像から取り除いていたミセルとFabの半分のシグナルを元に戻している。

・ このタイミングで元に戻したのはpolishをもう一度行うため。

**46. Bayesian polishing**

・ 前回のpolish時 (25. Bayesian polishing) と比較して分解能が2.76 Åから2.05 Åまで向上したため、この時点でももう一度polishを行った。

・ 一般的な手法ではないが、本処理の工夫ポイントの一つ。

**50. Particle subtraction**

・ ミセルとFab全体のシグナルを粒子画像から除く。



Particle subtractionに使用したmask

図 11 : CTF refinement④



**52. CTF refinement (anisotropic)**

32-34と同様に  
Anisotropic magnification  
higher order aberration  
Defocus  
の順に補正



**53. Refine3D (2.034 Å)**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 1.8 degrees



**54. CTF refinement (anisotropic)**

32-34と同様に  
Anisotropic magnification  
higher order aberration  
Defocus  
の順に補正



**55. Refine3D (2.024 Å)**

Initial lowpass: 15  
Symmetry: C3  
Mask diameter: 190  
Initial angular sampling: 1.8 degrees  
Additional arguments: `-external_reconstruct`

**55. Refine3D (2.024 Å)**

- SIDESPLITTER  
(<https://github.com/StructuralBiology-ICLMedicine/SIDESPLITTER>) を走らせている。
- SIDESPLITTERとは領域ごとに反映させるmapの分解能を変えてRefineする方法。分解能の良い部分はより良く、悪い部分はより悪くなる傾向にある。
- SIDESPLITTERを走らせるときは、計算機にダウンロードした上で、上記GitHub中の"sidesplitter\_wrapper.sh"を環境変数RELION\_EXTERNAL\_RECONSTRUCT\_EXECUTABLEに設定し、RunningタブからAdditional argumentsで"`-external_reconstruct`"などとコードを指定する。

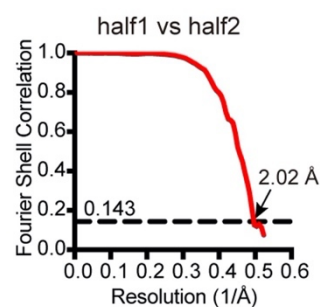
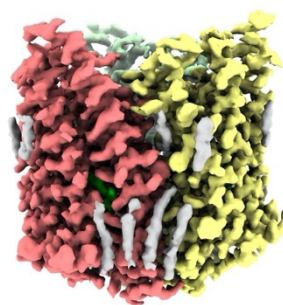


図 12 : CTF refinement⑤と final Refine3D

## 最後に

ここまで ChRmine をモデルケースとして、小さな膜タンパク質の cryo-EM 単粒子構造解析に向けたサンプル調製、データ解析についてまとめてきた。

ChRmine が 2.02 Å という高分解能に達することができた理由として、高純度かつ均一なサンプルを精製できたこと、Fab を結合させることで画像のアラインメント問題を解決したこと、オリエンテーションバイアスが少なかったこと、構造に柔軟な領域が少なかったこと、分子内3回対称軸を持つことなど、サンプルの性状の良さという幸運に恵まれたところも大きい。そのためもちろんすべての小さな膜タンパク質が今回紹介した手法によって高分解能構造解析に成功できるというわけではないが、基本的なエッセンスは他のタンパク質に対しても応用可能である。

またデータ解析に関しては、本稿の読者が解析の大枠をつかみ、工夫、検討を重ねながら分解能をのぼしていく過程を追体験できるように作成している。ChRmine の生データは EMDB (Electron Microscopy Data Bank; <https://www.ebi.ac.uk/emdb/>) に登録しており (EMPAIR-10926)、容量も 850 GB と比較的小さいので、初学者の方々には発展的な解析のチュートリアルとして、上級者の方々には分解能チャレンジとして、是非ともダウンロードして解析にトライしていただきたい。

このプロトコルが少しでも読者の皆様の役に立つことを願っている。もしこのプロトコルを読んで少しでも分解能をのぼすことができた方がいたら、これ以上の喜びはない。

## 文献

- 1) Kishi, K. E. *et al.*, Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine. *Cell*, **185**, 672–689.e23 (2022)
- 2) Hino, T., Iwata, S. & Murata, T., Generation of functional antibodies for mammalian membrane protein crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **23**, 563–568 (2013)
- 3) Kawate, T. & Gouaux, E., Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography for Precrystallization Screening of Integral Membrane Proteins. *Structure*, **14**, 673–681 (2006)
- 4) 服部素之, GFP タグを利用した原核生物由来膜タンパク質の発現系評価, 蛋白質科学会アーカイブ **3**, e057 (2010)
- 5) Kampjut, D., Steiner, J. & Sazanov, L. A., Cryo-EM grid optimization for membrane proteins. *iScience*, **24**, 102139 (2021)
- 6) 将浩平泉, クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析に向けた試料凍結スクリーニングと実践~Streptavidin (52 kDa) と P4-ATPase を例に~, 蛋白質科学会アーカイブ **14**, e099 (2021)
- 7) Zivanov, J. *et al.*, New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *Elife*, **7**, (2018)
- 8) Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A., cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods*, **14**, 290–296 (2017)

## 謝辞

本研究は東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻加藤英明研究室の加藤英明准教授、福田昌弘特任助教の指導のもと実施したものであり日々のご指導に厚く御礼申し上げます。またクライオ電子顕微鏡の操作、RELIONでの単粒子構造解析、そして本稿の執筆については東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻濡木理研究室の草木迫司助教に多大なるご助言、ご指導いただきました。厚く御礼申し上げます。また本研究で使用した抗体を調製いただいた京都大学大学院医学研究科岩田想研究室の野村紀通准教授、植村智子研究員、劉紅研究員に御礼申し上げます。



このコンテンツはクリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0 国際 ライセンスの下に提供されています。

© 日本蛋白質科学会 2023 Licensed under クリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0 国際 ライセンス