

# 用語解説(51)

## 『生体高分子の 電子線結晶構造解析』

井上 貴仁

電子技術総合研究所  
〒305 つくば市梅園 1-1-4

本特集で用いられた構造解析手法は、ほとんどが電子顕微鏡法である。これは、ナノメートルオーダーの厚さしかない蛋白質 2次元結晶の構造解析を行うには、物質との相互作用がX線に比べて約  $10^4$  倍も大きい電子線が有利との認識からである。ここでは、生体高分子の電子顕微鏡、特に透過型電子顕微鏡による結晶構造解析における問題点と手法に関する用語について解説する。

### 電子線損傷 (Electron Radiation Damage)

図1に試料への電子線の入射により引き起こされる基本的な現象を模式的に示した。試料に入射した電子線  $I_0$  は、そのまま入射方向に進む電子  $I_{in}$ 、弾性散乱される電子  $I_{el}$  と非弾性散乱される電子  $I_{un}$  に分離される。ここで、散乱の前後で電子の運動エネルギーが変わらない場合が弾性散乱 (elastic scattering) であり、入射電子によって試料中の分子が励起されたり、イオン化されることによって入射電子の運動エネルギーが保存されな

い過程が非弾性散乱 (inelastic scattering) である。電子線照射損傷の初期過程はこの非弾性散乱である。

この過程で失われたエネルギーは分子の振動や熱に転換され、さらには、結合の切断 (たとえば、水素の欠損、ラジカルの生成) を引き起こす。水素の欠損は、分子あるいは結晶構造そのものにはあまり影響を与えないが、生成されたラジカルによる分子鎖同士または側鎖の架橋反応が起こり、これによって、分子構造自体の変化と結晶構造の崩壊が始まり、同時に、原子や低分子量の分子 (水素など) の熱拡散や蒸発が起こる。

一般に、電子線損傷の測定は、試料に入射する電子線量と電子線回折斑の強度変化を記録することにより行われる。それによると、生体高分子結晶が、加速電圧 100 kV において完全に非晶質化してしまう入射電流密度  $q$  は、 $10^{-2} \sim 10^{-3} \text{ C} \cdot \text{cm}^{-2}$  のオーダーであり、他の有機物結晶 (たとえば、塩素化銅フタロシアニン結晶のそれは約  $20 \text{ C} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) と比較しても電子線による損傷が甚だしい。また、分子レベルの像を通常の電子顕微鏡用フィルムに記録するためには、最低 10 万倍が必要であるが、この倍率でフィルムの黒化度を十分確保するためには、試料に  $1 \sim 10^{-1} \text{ C} \cdot \text{cm}^{-2}$  の電子線を入射させなければならない。したがって、生体高分子の高分解能観察には、電子線損傷を最小限におさえる露光システムの採用や損傷による熱発生、分子振動を凍結する極低温観察、試料中の水分のグルコース置換と重イオンによる染色が必要不可欠である。

### 最小露光システム (Minimum Dose System)

生体分子の高分解能観察においては、視野の選択や焦点合せの間に受ける電子線損傷は極力避ける必要がある

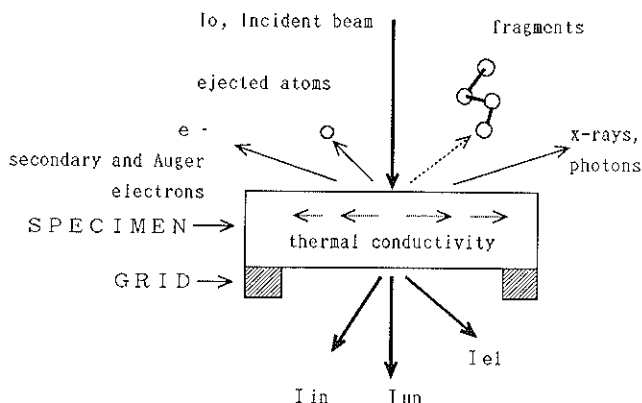


図1 電子線の試料への入射により引き起こされる現象

TECHNICAL TERMS (51)

る。そこで、撮影視野の近傍で焦点を合せ、電子線に曝されていない領域を撮影する方法—最小露光システム—が開発された。このシステムは基本的には、視野の選択、焦点合せ、撮影の3つのモードからなっており、コンピュータによりレンズ系のシーケンスが自動制御されている。

まず、低倍での非常に少ない電子線量で視野選択をし、電子線回折で結晶の方位を定めた後、偏向コイルにより電子線を曲げ、撮影領域の近傍に電子線を集光して高倍率で正確に焦点合せと非点補正を行う。そして、試料微動の安定化とレンズ系のヒステリシスを取った後、視野選択モードで選んだ領域の高倍率像を露光する。以上のように、この方法では、撮影時以外は試料に無駄な電子線を照射しないため、通常の観察法に比較して1/3～1/10程度の電子線量で最終的な結像が可能である。

染色法 (Staining Method)

一般に、軽元素からなる生体試料は、電子線に対する散乱能が非常に小さいため、電顕像のコントラストは低く、また、電子線による損傷が甚だしいため、観察中に構造が変化してしまうという難点がある。そこで、像のコントラストを向上させ、電子線に弱い生体試料を生で見のではなく、ラベルされた重原子を観察する、電子染色法が一般に用いられる。これは、酢酸ウラニルのような電子散乱能の非常に大きな重金属を含んだ染色液に試料を浸し、化学的または物理的に重金属を試料に付着させ観察する方法である。

このようにして作製された試料を観察すると、重金属によって電子線は散乱され、像のコントラストが増加し、試料の存在や形状を知ることができる。ただし、これらの観察法はあくまで間接的である。また、空間分解能としては、1～2 nm が限界であり、分子オーダーの情報を得ることは不可能である。さらに、試料染色中に条件によっては染色むらや染色剤の結晶化などのアーティファクトが入る可能性もあり、像の解釈には注意を要する。

光濾過法 (Optical Filtration Method)

電子線は量子であるので、フィルムに到達する粒子の平均個数を  $n$  とすると、 $\sqrt{n}$  の統計的変動—量子ノイズ—が常に存在する。また、電子線により露光されたフィルムには、試料そのものの構造だけでなく、支持膜や

コンタミネーション、さらには、試料の電子線損傷などによるノイズが重なり合わさって記録される。

これら電顕像のバックグラウンドにあるノイズを消去し、周期構造のみを取り出し再構成する最も簡単な方法が光濾過法である。通常は、まず、高分解能像の撮影されたネガフィルムに干渉性の良いレーザーなどの可視光線を照射し、試料からの光回折 (optical diffraction) 像を得る。そして、この像を適当なフィルター (原像に含まれる周期構造により回折された光だけを取り出す) を通して光学レンズで逆フーリエ変換することによって、ノイズの少ない再構成像を得ることができる。この方法では、フィルターの穴の大きさは処理に影響を及ぼし、たとえば、本来の目的である SN 比の向上ばかりでなく、像の平均化や擬似格子像出現の可能性もある。

3次元再構成 (Three-Dimensional Reconstruction)

電子顕微鏡像は、ある一方向からの投影像であり、蛋白質の構造解析を行うためには、立体構造の再構成が必要である。そこで、試料を鏡筒内で連続的に傾斜させて種々の方向からの投影像を撮影し、一連の像を解析手法を用いて3次元モデルを構築する、いわゆる、3次元再構成が行われる。具体的な構造解析の手順は以下のとおりである。試料を電子顕微鏡内で一定の角度間隔で傾斜させて、顕微鏡像と電子線回折像を撮影する。そして、顕微鏡像をデジタル信号として計算機に取り込みフーリエ変換およびフィルター処理を行う。逆格子空間に3次元的に分布する回折点の振幅と電子顕微鏡像から得られた位相を用いて逆フーリエ変換によって、立体構造を計算する。X線構造解析では、重原子法あるいは直接法を適用し位相が決定されるのに対し、電子顕微鏡では、像が直接得られるため位相を求めることが可能である。

文 献

- L. Reimer: Springer Series in Optical Sciences 36 "Transmission Electron Microscopy" (Springer-Verlag, 1984).
- L. A. Amos, R. Henderson and P. N. T. Unwin: Prog. Biophys. Mol. Biol. **39**, 183 (1982).
- R. M. Glaeser: Ann. Rev. Phys. Chem. **36**, 243 (1985).
- 藤吉好則: 蛋白質核酸酵素臨時増刊 **37**, 560 (1992).