

Methanoplanus limicola S-Layer 당단백질 2차원 결정의 구조적 특성

정 강 원·곽 대 오*·주 우 홍**

Structural Character of Two-Dimensional Crystal of the S-Layer Glycoprotein from *Methanoplanus limicola*

Cheong, Gang-Won, Dae Oh Kwack* and Woo Hong Joo**

· · (Received December 22, 1993)

ABSTRACT

A thin section of the methanogenic archaeobacterium, *Methanoplanus limicola*, shows that the surface glycoprotein array (S-layer) is separated from plasma membrane by a distinct interspace, approximately 4.0-6.0nm wide. We report our structural study of the S-layer by electron crystallographic techniques. Image analysis and thin sections of the S-layer treated with and without triton disclosed that retention of the single layer crystal requires the presence of detergent to avoid hydrophobic bonding.

서 론

대부분의 고세균 세포 외막 (cell envelope)은 진정세균에 비해 비교적 단순한 구조를 가지고 있다. Plasma membrane과 단백질(또는 당단백질)로 형성된 층인 surface layer (S-layer)로 구성되어 있다. 특히 일부 gram 양성 고세균에서는 polysaccharide 또는 pseudomurin층을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다 (Sleytr and Messner, 1983; Konig, 1988; Baumeister *et al.*, 1989). 진정세균과 고세균의 S-layer(당)단백질의 primary amino acid sequence에 관한 연구와 (Lechner and Sumper, 1987; Tsuboi *et al.*, 1988;

Peters *et al.*, 1989) 생화학적 고찰이 (Baumeister *et al.*, 1982; Phipps *et al.*, 1983; Bingle *et al.*, 1986; Cheong *et al.*, 1991) 이루어져 있으나, S-layer의 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 최근 전자현미경을 이용한 3차원 구조의 재구성으로부터 molecular sieving, shape determination과 cell-cell 또는 cell-substrate간의 상호작용 등에 관한 기능이 제안되었다 (Baumeister and Hegerl, 1986; Messener *et al.*, 1986; Baumeister and Engelhart, 1987).

Wildgruber등(1982)은 중온성 메탄생성 고세균 *Methanoplanus limicola*를 나폴리 늪지대에서 분리하였다. 이것은 평면형태를 보여주는 경우가 많으나 경우에 따라 polymorphic를 가지고 있는 세균으로서, 대부

Max-Planck 생화학 연구소, *경상대학교 생물교육과, **창원대학교 생물학과
Max-Planck-Institute für Biochemie, Germany
*Department of Biology Education, Gyeongsang National University
**Department of Biology, Changwon National University

분의 고세균과 마찬가지로 규칙적인 배열을 가진 S-layer를 포함하고 있다. *M. limicola* S-layer의 분자량은 약 135kDa(deglycosylation후 약 115kDa)이고 mannose, galactose 및 glucose 등의 neutral sugar를 포함하고 있으며 총 neutral sugar의 양이 240mg/g polypeptide을 가지는 glycoprotein으로 밝혀져 있다 (Cheong et al., 1991). 전자현미경적 관찰, image analysis 및 deformation analysis을 이용하여 *M. limicola*로부터 분리한 S-layer glycoprotein의 2차원 결정 구조, 비틀림현상(distortion) 및 결정간의 결합에 관한 연구를 수행하였으며 그 결과를 보고코자 한다.

재료 및 방법

1. Surface glycoprotein layer의 분리

Wildgruber 등 (1982)의 방법으로 배양한 *M. limicola*를 5°C에서 4240xg로 15분간 원심분리하여 배양액을 제거하였다. 침전물을 20mM Na₂HPO₄ 완충용액 (pH 7.5, 1% NaCl)으로 두 번 씻고, DNase (Sigma, 1mg/100ml 완충용액)를 첨가하여 37°C에서 30분간 항온시켰다. Vibrogen cell mill (Buehln)에 옮기고 직경 0.1-0.11mm의 유리구 (glass bead; Braun)로 4°C에서 2.5-3.0분간 분쇄시켰다. 유리구를 제거하고, 원심분리하여 부서지지 않는 세균과 세포외막을 분리시켰다. Plasma membrane에서 S-layer를 분리시키기 위해서 세포외막을 4.0% Triton X-100 용액에서 50°C, 1시간 동안 항온시켰다. 10120xg로 20분간 원심분리하여, 침전물을 37°C, 0.2% Triton X-100 용액 속에서 1시간 동안 항온시킨 다음 0.1% Triton X-100 용액으로 두 번 씻고 20mM Tris/HCl 완충용액 (pH 7.0, 1% NaCl, 0.1% Triton, 3mM NaN₂)에 부유시켰다.

2. Negative staining

분리된 S-layer 혼탁액을 탄소막을 입힌 구리 grid (400-600mesh)에 3분간 흡착시키고 여과지로 조심스럽게 상등액을 제거하였다. 흡착되지 않은 S-layer, detergent 및 완충용액 속에 있는 염을 제거하기 위해 증류수로 3-4회 씻은 다음 2% uranyl acetate (pH 4)로 착색시켰다.

3. Thin section

구조의 변형을 막기 위해서 고농도의 세균(또는 S-layer) 혼탁액을 cryojet (Balzers Union)으로 급속냉동시켰다 (Steinbrecht, 1980). 메탄올(또는 아세톤)에 glutaraldehyde (2%)와 uranyl acetate (0.5%)를 첨가하여 만든 치환용매를 세균(또는 S-layer)의 물분자와 저온에서 치환시키기 위하여 -90°C로 냉각된 치환용매에 급속 냉동된 세균(또는 S-layer)을 가하여 항온시킨 다음 -60°C 및 -50°C 순으로 각각 8시간씩 항온시켰다 (Humbel and Mueller, 1984). 이어 치환용매를 다시 매몰 수지 (resin)인 HM20 (Lowicryl)로 치환하기 위해 -50°C의 HM20/메탄올 (3:7) 용액에서 2시간, HM20/메탄올 (7:3)에서 2시간, 그리고 100% HM20에서 1시간 동안 항온시킨 다음 (Carlemalm et al., 1985; Acetarin et al., 1986) -50°C에서 UV (360nm)를 48시간 동안 간접 조사한 다음 실온에서 12-48시간 동안 직접 조사하여 고체화시켰다 (Carlemalm et al., 1982). 다이아몬드칼 (Diatome, Bienne)이 장치된 Ultramicrotome (Reichert-Jung)을 사용하여 약 40-70nm 두께의 초박절편을 만들었다. 이것을 탄소막을 입힌 구리 grid에 놓은 다음 포화 uranyl acetate 용액에서 10분, 납용액에서 3분 동안 착색시켰다 (Reynolds, 1963).

4. 전자 현미경 사진 촬영

Philips사 CM12 전자현미경으로 100kV에서 35000배, 'Low-Dose-System'을 사용하여 촬영하였다. Defocus는 약 400-600nm로 조절하였으며, Agfa Scientia 23D56 필름을 사용하였다. Optical diffractometer를 사용하여 인화된 전자현미경사진에 나타난 astigmatism (난시현상)과 drift 현상등을 관찰하였으며 image analysis와 processing을 위해 적절한 사진을 선택하였다.

5. Image analysis와 processing

전자현미경사진을 Eikonix Camera (Model 1412, Eikonix Corporatron)를 사용하여 1024×1024 pixel을 15μm pixel 크기 (실제 object에 대해 0.43nm)로 계수화 (digitalize)시켰다. Image analysis와 processing은 EM (Hegerl and Altbauer, 1982)과 SEMPER

system(Saxton *et al.*, 1979)을 이용하였다.

Correlation average(CAV)는 Saxton과 Baumeister(1982)의 방법에 따라 실시하였다. unit cell의 3-4 배 크기인 original image에 있는 임의의 한 위치를 CAV를 위한 referance로 정하였다. Fourier space에서 window filtering(window 크기=reciprocal lattice 크기의 1/8)한 reference image와 original image 간의 cross-correlation function(CCF)의 최대점을 unit cell의 중심으로 하였다. Average는 original image에서 CCF로 결정된 모든 위치에서 unit cell 크기로 절단한 후, 중첩하여 얻었다.

통계적으로 서로 독립된 average의 짝(even and odd of peaks)으로 계산된 radial-correlation function(RCF)은 resolution(분해능)과 signal-to-noise 비율을 계산하는데 이용하였다.

모든 unit cell을 multivariate statistical 분석법을 이용하여 비교함으로써 유사한 형태별로 분류하였다. 이 분석법은 correspondences analysis와 유사하며, CAV로부터 결정되어진 real unit cell의 위치에서 original image를 unit cell의 크기로 lattice base vector에 따라 절단한 다음 재정렬(alignment)하였다. 여기서 얻은 covariance 행렬의 eigenvector와 eigenvalue(van Heel and Frank, 1981)를 이용하여 unit cell을 유사한 형태별로 분류하였다.

일반적으로 생물학적 이차원 결정의 real unit cell의 위치는 이상적(또는 이론적) lattice line에서 벗어난다. 이와같은 편차는 결정의 결정성을 측정할 수 있는 양이기도 하다. Displacement map에 근거를 둔 deformation analysis(Duerr, 1991; Saxton *et al.*, 1992)을 이용하여 lattice distortion을 정량적으로 분석함으로써 각각 unit cell에서 국소적인 변형의 크기, 한쪽방향으로 인장 및 회전 등을 알 수 있었다.

결과 및 고찰

세포를 구성하고 있는 막(또는 층)들의 존재와 상호간의 간격등은 일반적으로 thin section과 freeze-etching 등의 방법으로 관찰할 수 있다. *M. limicola*의 thin section(Fig. 1a)에서 세포외각은 S-layer와 plasma membrane으로 구성되어 있으며, *M. limicola*와 유사한 종인 *Halbacterium volcanii*(Kessel *et al.*, 1988)에

서 S-layer와 plasma membrane간의 간격은 약 6.5 nm이고, *Sulfolobus*는 약 18nm, *Thermoproteus*는 약 25nm의 간격으로 떨어져 있다(Baumeister *et al.*, 1989). *M. limicola*의 간격은 4.0-6.0nm으로서 위의 군에 비해 비교적 작다.

Plasma membrane에서 분리한 2차원 결정인 S-layer glycoprotein을 Triton X-100(0.1%)을 포함하고 있거나 포함하지 않은 Tris/HCl 완충용액(pH 7.0, 1% NaCl 포함)에 각각 혼탁시킨 후 2% uranyl acetate로 착색시켜 관찰한 전자현미경사진을 Fig. 2에 나타내었다. 두 결정에 대해 각각의 correlation average를 같은 그림(c)와(d)에 나타내었다. 이 두 경우를 비교하여 보면, 전자현미경사진과 결정의 power spectrum간의 차이는 없으나, correlation average는 현저한 차이를 보여주고 있다. Triton을 포함하지 않은 Tris/HCl 완충용액에 혼탁시킨 결정의 경우(Fig. 2, d)는 일그러진 3대칭 구조를 보여주는 반면, Triton을 포함한 완충용액에 혼탁시킨 경우(Fig. 2, c)는 6대칭 구조로 Saxton과 Baumeister(1986)의 분류에 따르면 M_6C_3 의 분류에 속한다. 또 각각의 unit cell 중심-중심간의 거리(lattice constant)는 각각 15.3nm(d)와 16.0nm(c)이고, radial-correlation function에 의해 계산된 분해능(resolution)은 각각 1.5, 1.7nm로 나타났다.

S-layer 결정을 Triton을 포함하고 있거나 포함하지 않은 Tris/HCl 완충용액에 혼탁시켰을 때 뚜렷하게 나타나는 구조의 차이를 multivariate statistical 분석과 thin section 등으로 분석하였다.

CCF를 이용하여 결정한 위치에서 분리 절단한 모든 unit cell을 4개의 eigenvector를 이용하는 multivariate statistical 분석을 통해 4 class의 유사한 형태로 분류하였다. 보다 많은 class로 분류하여 보았으나, 더 이상의 새로운 정보는 얻어지지 않았다. Triton을 포함하지 않은 완충 용액에 S-layer 결정을 혼탁시켰을 때 multivariate statistical 분석으로부터 얻어진 각 class의 average와 element cell의 위치는 Fig. 3과 같으며, Triton을 포함한 완충용액에 혼탁시킨 경우는 Fig. 4와 같다.

Triton을 포함하지 않은 완충용액에 S-layer 결정을 혼탁시켰을 때 얻어지는 class 1(Fig. 3, a)은 540의 element cell을 가지고 있다. Average는 전체 unit cell에 대한 average와 유사한 형태로서 한쪽 방향으로 일

그러진 3대칭 구조를 보여주며, S-layer 결정의 한쪽 부분에 분포되어 있다. Class 2(Fig. 3, b)는 490의 element cell을 가지고 있다. 이것은 결정의 다른 한쪽 부분에 분포되어 있고, average는 뚜렷한 handedness를 가진 3대칭 구조를 보여준다. 이 두 class average간의 현저한 차이는 각 class의 element cell의 위치가 뚜렷한 경계로서 구별되어 있으므로 착색물질의 분포에 따른 공간적인 차이로만 설명할 수 없다. Class 3(Fig. 3, c)과 class 4(Fig. 3, d)의 element cell은 S-layer 결정의 외각에 분포되어 있기 때문에 stain effect로써 설명할 수 있다. Triton을 포함한 완충용액에 S-layer 결정을 혼탁시킨 경우의 multivariate statistical 분석의 결과를(Fig. 4) 보면, class 1과 class 2의 average간의 차이는 매우 적으며 class average는 전체 unit cell의 average와 유사한 구조를 보여준다. 또 각 class의 element cell의 위치는 S-layer 결정에 고르게 분포되어 있음을 보여준다.

M. limicola S-layer glycoprotein은 비교적 많은 양(30%)의 소수성 아미노산을 가지고 있다(Cheong et al., 1991). 이 소수성 아미노산이 S-layer glycoprotein 결정의 한쪽면에 비교적 높은 비율로 분포되어 있고, 소수성 결합을 막아주는 물질이 없는 경우, S-layer 결정간에 결합이 형성될 것이다. S-layer 결정간의 결합을 분석하기 위해 세균으로부터 분리한 S-layer 결정을 Triton이 포함된 완충용액과 포함되지 않은 완충용액에 각각 혼탁시킨 다음 thin section을 하였다.

S-layer 결정을 Triton이 포함되지 않은 완충용액에 혼탁시켰을 경우의 thin section 전자현미경사진을 Fig. 1, b에 나타내었다. 이 전자현미경사진에서 두 single layer가 일정한 간격으로 결합된 double layer 결정을 관찰할 수 있다. Triton을 포함한 경우의 thin section 전자현미경사진(Fig. 1, c)에서는 single layer 결정을 관찰할 수 있다. 이 결과로부터 소수성 결합을 막아주는 물질이 없을 때 S-layer 결정은 single layer 결정들간에 결합이 이루어짐을 알 수 있다. Double layer 결정 외각의 미세 single layer 영역(Fig. 2 화살표)에 있는 S-layer 결정의 바깥쪽면의(외부로 향한 쪽, freeze-etching의 결과와 비교, Cheong et al., 1991) 관찰로 결정의 바깥쪽 면 사이에서 결합이 형성됨을 보여준다.

Double layer 결정에 대한 구조의 연구는 *Clos-*

*tridium thermohydrosulfuricum*의 S-layer에 대해서는 Cejka 등(1986), *Aeromonas salmonicida*의 S-layer에 대해서는 Dooly 등(1989)에 의해 tilt series로 3차원 구조의 재구성이 보고된 바 있다. 첫번째의 경우는 두 single layer 결정의 unit cell의 중심이 서로 엇갈리게 놓여져, fourier space에서 각각의 single layer의 reflex가 분리(Moiré-형태의 결정)되므로 각각의 single layer를 분리 재구성할 수 있다. 두번째의 경우는 single layer 결정간에 서로 거울대칭적 형태로 포개어져(unit cell의 중심-중심간의 결합) fourier space에서 reflex는 마치 single layer 결정과 같고, average에서 handedness를 관찰할 수 없고, 3차원 구조로 재구성할 때 두 결정간의 결합을 확인할 수 있음을 보고하였다.

M. limicola S-layer를 Triton이 포함하지 않은 완충용액에 혼탁시켰을 때(double layer 결정) 전체 average(Fig. 2, d)와 class average(Fig. 3)에서 handedness를 관찰할 수 있고, 결정의 power spectrum은 single layer와 같이 reflex가 분리(Moiré-형태의 결정)되지 않음을 보여준다. 이것은 앞의 두 예의 어느 경우와도 일치하지 않는다. Multivariate statistical 분석으로 얻은 class average에서 관찰할 수 있는 handedness와 일그러진 구조 등 뚜렷한 차이를 두 결정간의 결합으로 분석하였다. Power spectrum과 앞부분에서 토론한 결정간의 결합으로부터 이 결정은 두 single layer 결정 바깥쪽 면을 서로 마주보며 엇갈리지 않게 놓여져 있음을 알 수 있다. 한쪽 방향으로 일그러진 구조인 class 1은 single layer 결정의 한 부분이 같은 방향과 크기로 이동한 다음 일그러진 형태로 결정간의 결합이 형성된 것으로 생각할 수 있다. 3대칭 구조를 보여주는 class 2는 두 결정간에 거울대칭적 형태인 unit cell의 중심-중심간의 결합을 이루고 있음을 알 수 있다. Class average의 handedness는 결합된 두 single layer 결정에 착색물질이 고르게 분포되지 않은 결과로 설명될 수 있다.

일반적으로 2차원(또는 얇은 3차원) 단백질 결정은 완벽한(이상적인) 결정이 아니다. 여러 형태의 공간변형은 결정의 유연성 부분에 기인된 것으로 생각할 수 있다. 이와같은 변형을 deformation analysis를(재료 및 방법 참조) 이용하여 각 unit cell의 변형크기, 방향 및 한쪽방향으로의 인장 등을 정량적으로 분석하였다. 또 이와같은 인자로 결정의 결정성을 알아보았다. Fig. 5에

서 Triton을 포함하지 않은 완충용액에 혼탁시킨 S-layer 결정에 대한 deformation 분석의 결과를 나타내었다. Fig. 5, a에서는 모든 인자를 30배로 크게하여 나타내었으며, Fig. 5, b에서는 모든 unit cell의 회전인자만을 표시하였으며, 방위각 변화(change of orientation)는 약 -1.32° 에서 1.66° 로 나타났고, 표준편차(standard deviation)는 0.27° 이다. Fig. 5의 deformation 분석으로부터 비교적 잘 정렬된 결정임을 알 수 있고, 또 결정외각의 unit cell이 대체로 많이 변형되어 있음을 알 수 있다. 단백질 2차원 결정이 마치 고무공 조각처럼 grid에 흡착한다면, 결정의 한부분이 이동하여 각각의 unit cell 점들에서 변형의 크기, 방향을 달리할 수 있으며, 결정의 외각은 가운데보다 큰 변형을 일으킬 수 있다는 사실로 설명할 수 있다. Multivariate statistical 분석의 결과로 얻은 class의 element cell 위치와 변형된 unit cell간의 관계를 보면, 결정외각에 분포된 class 3, 4는 잘 설명되어질 수 있다. Deformation 분석에서는 class 1과 2의 경계가 나타나지 않음을 보여 주고, 한 결정이 같은 방향과 거리만큼 평행이동한 다음 결합된 부분(class 1)에서는 평행이동 없이 중심-중심간의 결합으로 이루어진 부분(class 2)보다 더 많이 변형된 unit cell을 관찰할 수 있다.

결 론

메탄생성 고세균인 *Methanoplanus limicola*의 thin section 전자현미경사진에서 plasma membrane으로부터 4.0-6.0nm의 일정한 간격으로 떨어져 있는 glycoprotein으로 구성된 surface layer(S-layer)을 관찰할 수 있었다. electron crystallographic technique으로 S-layer glycoprotein의 구조에 대해 고찰했다. Triton이 포함되어 있거나 포함되지 않은 완충용액에 혼탁시킨 S-layer 결정에 대해 image analysis와 thin section을 하였다. 이 결과로부터 S-layer가 single layer 결정으로 유지되기 위해서는 소수성결합을 막아 주는 detergent가 필요함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구에 대해 토론한 Dr. Typke와 Dr. Hegerl (Max-Planck-Institute für Biochemie, Martinsried)

에게 깊은 감사를 드린다.

참 고 문 헌

- Acetarin, J.D., E. Carlemalm and W. Villiger, 1986. Developments of new Lowicryl resins for embedding biological specimens at even low temperatures. *J. Microscopy*, 143, 81-88.
- Baumeister, W. and R. Hegerl, 1986. Can S-layers make bacterial connexons? *FEMS Microbiol. Lett.*, 36, 119-125.
- Baumeister, W. and H. Engelhart, 1987. Three-dimensional structure of bacterial surface layers. In: R. Harris and R.W. Horne (ed.), *Electron microscopy of proteins: membrane structures*, pp. 109-154. Academic Press, Inc., New York.
- Baumeister, W., I. Wildhaber and B.M. Phipps, 1989. Principles of organization in eubacterial and archaeobacterial surface proteins. *Can. J. Microbiol.*, 35, 215-227.
- Baumeister, W., F. Karrenberg, R. Rachel, A. Engel, B.T. Hegglar and W.O. Saxton, 1982. The major cell envelope protein of *Micrococcus radiodurans* (R1): structural and chemical characterization. *Eur. J. Biochem.*, 125, 535-544.
- Bingle, W.H., J.L. Doran and W.J. Page, 1986. Characterization of the surface layer protein from *Azobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.*, 32, 112-120.
- Carlemalm, E., R.M. Garavito and W. Villiger, 1982. Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J. Microscopy*, 126, 123-143.
- Carlemalm, E., W. Villiger, J.A. Hobot, J.D. Acetarin and E. Kellenberger, 1985. Low temperature embedding with Lowicryl resins: two new formulations and some applications. *J. Microscopy*, 140, 55-63.
- Cejka, Z., R. Hegerl and W. Baumeister, 1986. Three-dimensional structure of the surface layer of *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Ultrastruct.*

- Mol. Struct. Res.*, 96, 1-11.
- Cheong, G.W., Z. Cejka, J. Peters, K.O. Stetter and W. Baumeister, 1991. The surface protein layer of *Methanoplanus limicola*: three-dimensional structure and chemical characterization. *System. Appl. Microbiol.*, 14, 209-217.
- Dooly, J.S.G., H. Engelhart, W. Baumeister, W.W. Kay and T.J. Turst, 1989. Three-dimensional structure of an open form of the surface layer from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.*, 171, 190-197.
- Duerr, R, 1991. Displacement field analysis: calculation of distortion measures from displacement maps. *Ultramicroscopy*, 38, 135-141.
- Hegerl, R. and A. Altbauer, 1982. The "EM" program system. *Ultramicroscopy*, 9, 109-116.
- Humbel, B. and Mueller, 1984. Freeze-substitution and low temperature embedding. Proc. 8th Eur. Congr. Electron Microscopy, vol. 3, pp. 1789-1798. Budapest.
- Kessel, M., I. Wildhaber, S. Cohen and W. Baumeister, 1989. Three-dimensional structure of the regular surface glycoprotein layer of *Halobacterium volcanii* from the Dead Sea. *EMBO J.*, 7, 1549-1554.
- Koenig, H, 1988. Archaeobacterial cell envelopes. *Can. J. Microbiol.*, 34, 395-406.
- Lechner, J. and M. Sumper, 1987. The primary structure of a procaryotic glycoprotein/cloning and sequencing of the cell surface glycoprotein gene of Halobacteria. *J. Biol. Chem.*, 262, 9724-9729.
- Messenr, P., D. Pum, M. Sara, K.O. Stetter and U.B. Sleytr, 1986. Ultrastructure of the cell envelope of the archaeobacteria *Thermoproteus tenax* and *Thermoproteus neutrophilus*. *J. Bacteriol.*, 116, 1046-1054.
- Peters, J., M. Peters, F. Lottspeich and W. Baumeister, 1989. S-layer protein gene of *Acetogenium kivui*: cloning and experssion in *Escherichia coli* and determination of the nucleotide sequence. *J. Bacteriol.*, 171, 6307-6315.
- Phipps, B.M., T.J. Turst, E.E. Ishiguro and W.W. Kay, 1983. Purification and characterization of the cell surface virulence A-protein from *Aeromonas salmonicida*. *Biochemistry*, 22, 2934-2939.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-213.
- Saxton, W.O., T.J. Pitt and M. Horner, 1979. Digital image processing: the SEMPER system. *Ultramicroscopy*, 4, 343-354.
- Saxton, W.O. and W. Baumeister, 1982. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *J. Microscopy*, 127, 127-138.
- Saxton, W.O. and W. Baumeister, 1986. Principles of organization in S-layers. *J. Mol. Biol.*, 189, 251-253.
- Saxton, W.O., R. Duerr and W. Baumeister, 1992. From lattice distortion to molecular distortion: characterizing and exploiting crystal deformation. *Ultramicroscopy*, 46, 287-306.
- Sleytr, U.B. and P. Messner, 1983. Crystalline surface layers on bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 311-399.
- Steinbrecht, R.A., 1980. Cryofixation without cryoprotectants. Freeze substitution and freeze etching of an insect olfactory receptor. *Tissue & Cell*, 12, 73-100.
- Tsuboi, A., R. Uchihi, R. Adachi, T. Sasaki, S. Hayakawa, H. Yamagata, N. Tsukagoshi and S. Udaka, 1988. Characterization of the genes for the hexagonally arranged surface layer proteins in protein-producing *Bacillus brevis* 47: complete nucleotide sequence of the middle wall protein gene. *J. Bacteriol.*, 170, 935-945.
- van Hell, M. and J. Frank, 1981. Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy*, 6, 187-194.
- Wildgruber, G., M. Thomm, H. Koenig, K. Ober, T. Ricchiuto and K.O. Stetter, 1982. *Methanoplanus limicola*, a plate-shaped methanogen representing a novel family, the Methanoplanaceae. *Arch.*

Microbiol., 32, 31-36.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Electron micrographs of thin sections. Cells and S-layer pellet were cryo-fixed and embedded in Lowicryl resin HM20 after freeze-substitution with organic solvents at low temperature. Thin section of a *Methanoplanus limicola* cell (a) shows that the S-layer is separated from the plasma membrane by an approx. 4.0-6.0 nm wide interspace of constant width. Thin sections through the S-layer pellet treated with and without Triton X-100 show that the S-layer crystal is present as single layer fragments in the presence of the detergent (c), while it forms double layered crystals without the detergent (b). Where the layer was sectioned nearly tangentially the hexagonal lattice can be seen quite clearly (e.g. see the area marked by an asterisk).
- Fig. 2.** Electron micrographs (a, b) and correlation averages (c, d: no symmetry imposed) of negatively stained S-layer with (a, c) and without (b, d) Triton X-100, the insert shows the computed power spectrum of the crystal fragment.
- Fig. 3.** Result of multivariate statistical analysis for the preparation without Triton. (a-d); Class averages based on the classification from multivariate statistical analysis for a crystal fragment shown in Fig. 2(b). a: class 1, b: class 2, c: class 3, d: class 4. (e); Distribution of the peaks of four classes in the CCF. □: class 1(540 element cells), ◇: class 2(490 element cells), X: class 3(164 element cells), +: class 4(140 element cells).
- Fig. 4.** Results of multivariate statistical analysis for the preparation with Triton. (a-d); Class averages based on the classification from multivariate statistical analysis for a crystal fragment shown in Fig. 2(a). a: class 1, b: class 2, c: class 3, d: class 4. (e); Distribution of the peaks of the four classes in CCF. □: class 1(599 element cells), ◇: class 2(295 element cells), X: class 3(67 element cells), +: class 4(58 element cells).
- Fig. 5.** Crystal distortion of S-layer fragment shown in Fig. 2(b). (a) shows the deformation map derived from the displacement map obtained in the course of the correlation analysis. The size and shapes of the rectangular boxes represent local deformation states such as unit cell rotation, deformations etc. (b); Distribution of the rotation angles of unit cells as calculated by deformation analysis. The range runs from ca. -1.3° to $+1.7^\circ$ and a standard deviation of 0.27.









