

構造ダイナミクス

「原子から化学の目で生命を理解する」

生命は、タンパク質やDNA、RNA、脂質、ホルモンなど様々な分子から構成されています。タンパク質は、基本的にはわずか20種類のアミノ酸から構成されており、化学者にはまねのできない温和な条件で巧みな化学反応を行う酵素を作ります。この仕組みを理解するためには、生体分子の構造を原子の座標として理解することが必須になります。そうして初めて電子の状態から生命の仕組みを理解することができるようになるのです。また、生体分子の構造を明らかにすることで、薬の開発に役立てることが出来ます。このような背景のもと、病気の原因となる分子やウイルス等を対象に、クライオ電子顕微鏡、X線結晶構造解析による構造解明を進めています。

Living organisms are made up of such components as proteins, DNA, RNA, lipids, and hormones. Although proteins are essentially made from a maximum of only 20 amino acids, they form various kinds of enzymes that can catalyze a variety of chemical reactions under very subtle conditions that cannot always be imitated by chemists. To understand the functions of proteins, it is essential to determine their atomic coordinates. Once we know these coordinates we can understand and explain the mechanisms of proteins—their electronic states—from a chemist's perspective. Moreover, the structures of biological molecules are useful for drug discovery through the process of structure-based drug design (SBDD). From this perspective, we have been studying disease-causing molecules—including viruses—by using cryo-EM and x-ray crystallography.



2020（令和2）年度メンバー



（右上）クライオ電顕で明らかになった光センサータンパク質の構造

プロジェクトメンバー

教授
岩崎 憲治

助教
宮崎 直幸
堀越 直樹

秘書
宮本 真実

化学学位プログラム
博士前期課程1年次生
稲橋 敦俊
神谷 亮佑
鯉淵 航
山口 亮佑

化学類 4年次生
五間裕二
権藤花奈
高橋花南
吉永匡希

研究概要

【創薬を目指した疾患関連分子の構造解析】

1. 軟部肉腫の原因となる融合タンパク質の構造研究

1.1 SS18-SSX 全長の研究

悪性腫瘍である滑膜肉腫は、軟部肉腫の一つであり、全軟部肉腫の約 10%を占める。希少がんであり、製薬企業により遺伝子治療薬の開発も行われている一方でそのメカニズムは未解明のままである。SS18-SSX1, SS18-SSX2 は、滑膜肉腫の確定診断に使われている融合遺伝子である。18 番目の染色体と X 染色体との転座 $t(X;18)(p11.2;q11.2)$ によって生じ、滑膜肉腫のドライバー遺伝子であることが予測されている (図 1)。その産物である融合タンパク質については、クロマチンリモデリング因子と結合し、そのエピジェネティクス調節に異常をきたすことが報告されている。従って、本融合タンパク質をターゲットとして創薬研究を行う合理性があることから、2018 年度 10 月 1 日に着任後、研究室の主要な課題として掲げた。本研究は、大阪がんセンター整形外科 (骨軟部腫瘍科) 部長竹中聡博士との共同研究として開始した課題である。本年度の成果として、SS18-SSX の発現・精製系の構築に成功したことが、第一に掲げられる。非常に分解されやすく、精製プロトコルの確立に苦労した。構造予測では、その大部分が天然変性領域であることが予測されていたが、円偏光二色性 (CD) の測定においても矛盾のないスペクトルが観測された。

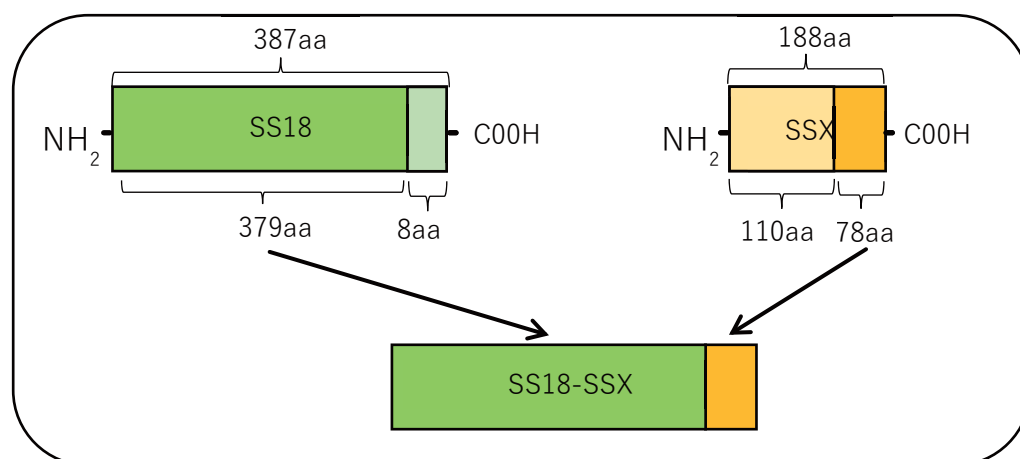


図 1 SS18-SSX 融合タンパク質は転座 $t(X;18)$ によって生じる

1.2 SS18-SSX フラグメントの研究

本年度秋に SS18-SSX の C 末端が、ヒストンと相互作用していることがハーバード大学のグループより報告されたため、C 末端 34 アミノ酸領域 (SSXRD) の発現・精製系の確立を目指

した。特に滑膜肉腫において検出される2種のサブタイプ SSX1 と SSX2 について計画し、最終的に高い精製度の SSXRD を得ることに成功した。しかし、凝集しやすく扱いに困難を極め、工夫を要した。これらを大阪大学蛋白質研究所の宮ノ入洋平准教授に 950MHz 溶液 NMR にて測定して頂いたところ、SSX2 について 1H-15N HSQC のスペクトルを数残基帰属することができた。大部分がランダムコイルに近い構造であることを示唆するチャートであった。しかし、完全ではないが α -ヘリックス様構造を示唆するピークも存在した。

2. ミドリムシ光センサー-PFB の光応答のメカニズム解明

ミドリムシの光応答に関しては1世紀以上研究されてきた。そのうちのステップアップ光驚動反応と呼ばれる現象を担っている分子が、2002年に日本人の手によって PFB と呼ばれる細胞小器官から単離され生化学的に明らかにされた。

PAC と名付けられたこの光センサー分子は、青色光に反応して、アデニル酸シクラーゼ活性を上昇させる。しかし、その三次元構造は未だ不明であった。1Lで培養した野生型ミドリムシから3 μ g精製できるまでに培養法および精製法を改良し、クライオ電子顕微鏡解析によって分子全体の原子モデル構築が可能ほどの三次元再構成像が得られた(図2)。一方で、各サブユニットN末端が会合しているヘテロ4量体の中心領域は、明

らかに分解能の低い構造を示していた。そこで、宮崎助教、化学学位プログラム博士前期課程1年次生の稲橋を中心に、ヘテロ4量体中心領域の再構成像改善に挑んだ(図3)。結果的にFSC分解能の値は大きくなってしまったが、中心領域の等値面表示による形状の視認性が改善し、各サブユニットN末端の主鎖を見出すことに成功した。この領域で異種サブユニット間に β シートを形成し、ヘテロ4量体の安定化に寄与していることが示唆された(図4)。中心領域の構造を明らかにしたことで、ヘテロ4量体における4サブユニットの会合様式を明らかにすることができた。

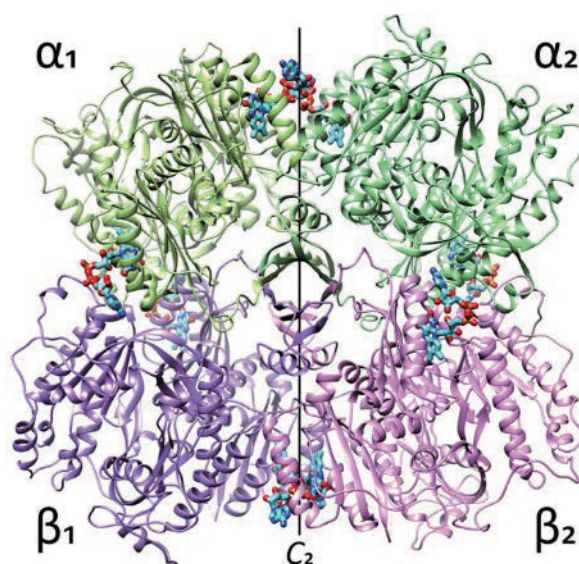


図2 PACの全体構造 α および β サブユニット2つずつからなるヘテロ4量体を形成する。水色分子はFADであり、各サブユニットに2分子、全体で8分子を有する。

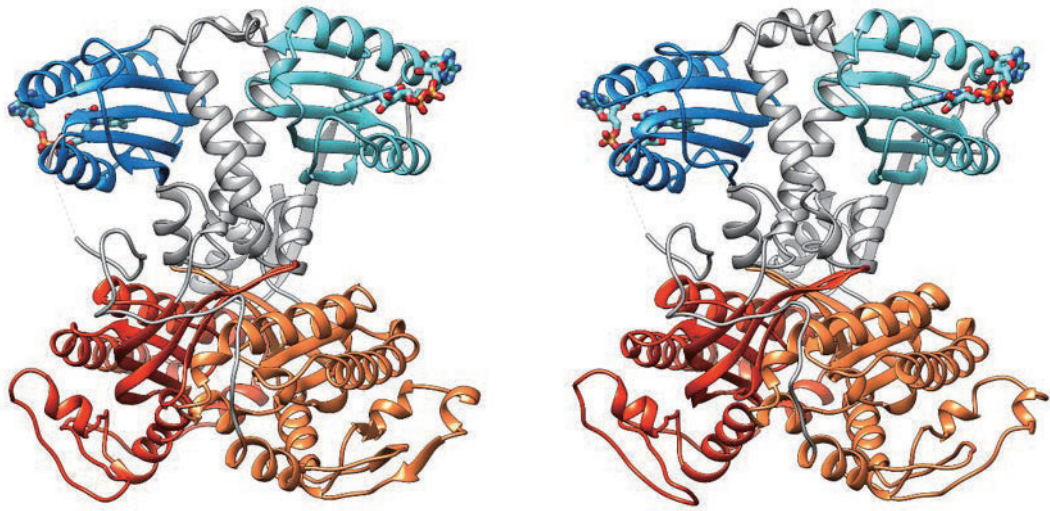


図3 α サブユニット (左) および β サブユニット (右) の構造 水色および青色で示した2つのフラビン結合ドメインと、橙色および赤色で示した2つのアデニル酸シクロラーゼドメインを有する。

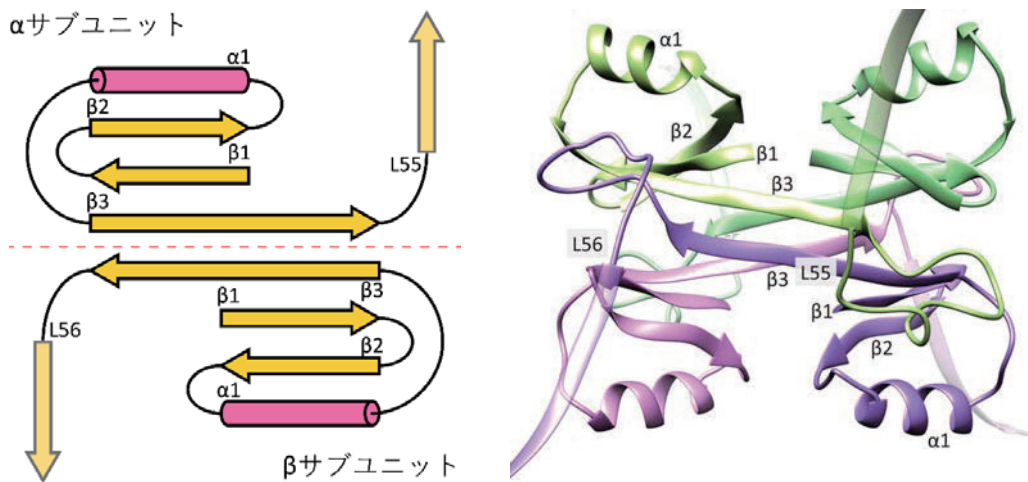


図4 中心領域のトポロジー図 (左) および構造 (右)

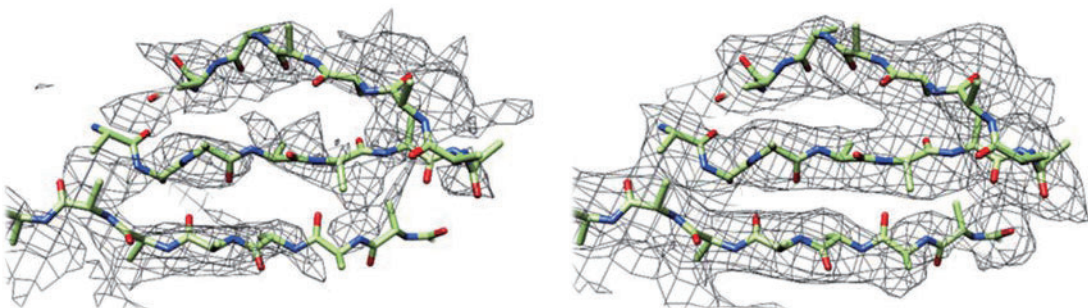


図5 中心領域の密度図と原子モデルの重ね合わせ 左は初期の三次元再構成像、右は改善された三次元再構成像。

3. バクテリオファージの感染・増殖機構の解明

3.1 黄色ブドウ球菌ファージの構造解析

細菌感染症では、抗菌薬（抗生物質）の過剰投与による薬剤耐性菌の蔓延が医療および畜産分野において問題となっている。特に、黄色ブドウ球菌では、日本の入院患者から分離される50～70%が多剤耐性のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）であると報告され、日本国内だけでも毎年約1000人がMRSAにより死亡している。その上、新規の抗菌薬を開発しても、すぐにその耐性菌が出現するために、抗菌薬による治療は困難に直面している。それゆえ、抗菌薬に依存しない治療法が強く望まれており、その代替療法として最も有望視されているものが、細菌に感染するウイルス（バクテリオファージ）の溶菌活性を利用するファージ療法である。溶菌性ファージは、特定の宿主細菌に感染し、細菌内部で増殖した後に、細菌を死滅させながら、細胞外へ放出され、次の感染に移行する。このファージの感染・増殖のサイクルは、宿主となる病原体が存在する限り続き、患者の体内から病原細菌を消滅させることができる。このファージの作用機序は、既存の抗菌薬とは全く異なるので、薬剤耐性菌においても作用する。しかし、ファージの感染機構・増殖機構に対する知識の欠如により、ファージ療法は、未だ実用化に至っていない。そのため、我々は黄色ブドウ球菌ファージの宿主認識・感染機構を明らかにするために、主にクライオ電子顕微鏡を用いた構造生物学的手法を用いて研究を行っている。これまでの研究において、収縮性の尾部をもつ全長400 nmに及ぶ巨大ファージS6の構造解析を行い、収縮前後における尾部構成タンパク質の原子モデリング構築に成功し、ファージゲノム放出の際の構造変化に関する知見を得ることに成功した。

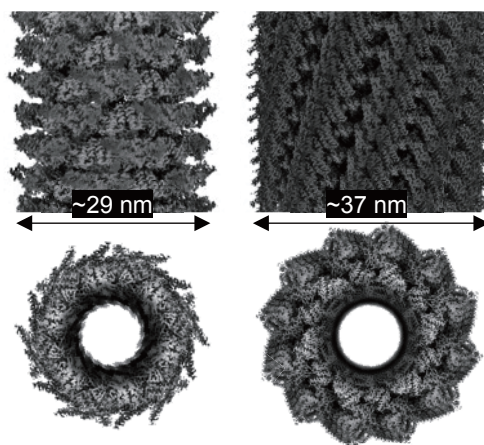


図6 S6の収縮前後での尾部構造

3.2 ピロリ菌ファージの構造解析

ピロリ菌の除菌には、抗菌薬が用いられているが、薬剤耐性菌の出現により近年除菌効率が低下の傾向にある。そのため、我々はピロリ菌の治療法として、薬剤耐性菌にも効果のあるファージ療法に注目している。ピロリ菌ファージ KHP30 及び KHP40 は近縁のファージであり、ピロリ菌感染者から単離されたピロリ菌株から発見された新規のピロリ菌ファージである。これらのファージは、ゲノムDNAを収納する直径約700 Åの正二十面体対称の頭部と宿主への感染を担う非収縮性の短い尾部で構成されている。我々は、これらファージの宿主認識・感染機構や粒子安定化機構を調べるために、クライオ電子顕微鏡による構造解析に取り組んでいる。これまでに、最先端クライオ電子顕微鏡を用いて、ファージ粒子の画像を取得し、それを解析することにより、KHP30に関して頭部および尾部をそれぞれ0.27、

0.36 nm、KHP40 に関しては頭部を 0.30 nm 分解能で決定する事に成功した。ゲノムを収納する頭部キャプシドは、正二十面体対称をもち、主要キャプシドタンパク質および補強タンパク質のそれぞれ 540 サブユニットから構成されていた。そして、決定した原子モデルに基づいて、頭部キャプシドの強酸性下での安定化に寄与すると考えられる構造的特徴を明らかにした。さらに、キャプシド補強タンパク質の構造が他のファージとは異なるなど、ピロリ菌ファージは強酸性下の胃中という特殊な環境で、独自の進化をしてきたことが示唆された。一方、尾部は宿主の認識や DNA の放出に関わる分子装置である。3 種類の尾部タンパク質が 12 サブユニットから成る環状構造をそれぞれ形成し、それらが縦にスタックすることで、全体として筒状の形状をもつ尾部が形成されていた。尾部においても、他のファージではみられない新規の構造的特徴が見られた。今後は、これら構造解析から得られた情報を基にファージの宿主認識・感染機構の解明をおこなう予定である。

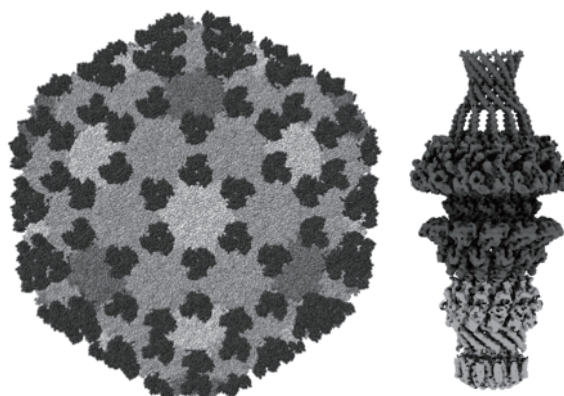


図 7 KHP30 の頭部(左)及び尾部(右)全体構造

4. 企業との共同研究 単粒子解析におけるマイナー粒子ピ ックアッププログラムの開発

現在、自動化が進んでいるクライオ電子顕微鏡単粒子解析の技術であるが、自動撮影による画像データ数の増加と統計・推定を駆使した解析の発達において最初のステップである粒子自動ピックアップの精度改善は課題となっている。特に深層学習の適応が直接改善につながることは明確で、報告も複数あるが、実績を見る限り普及には至っていない。このようなアプローチとは一線を画すアイデアをもって（バイオネット特許取得済）、(株)バイオネットとともに自動粒子ピックアッププログラムの開発を完了し、本年度はそのアルゴリズムの評価を行った。クライオ電子顕微鏡画像を水分子を考慮に入れてシミュレート可能な唯一のソフトウェア elbis ((株)バイオネット) を使用して様々なデフォーカス値のクライオ電子顕微鏡画像を作製し、評価を行った。クライオ電子顕微鏡単粒子解析の最大の弱点であり、現在課題となっている粒子の配向指向性による、角度分布におけるバイアスの問題を解決するため、RELION の自動ピックアップで取り逃した粒子を精度良くピックアップし直す本プログラムが、有効であることを示唆する結果が得られた。また、実データを使用した評価においても、本年度改善したプログラムは、有効であることが示唆された。

2020 年度研究業績

原著論文（全て査読あり）

1. Kouta Mayanagi, Keisuke Oki, Naoyuki Miyazaki, Sonoko Ishino, Takeshi Yamagami, Kosuke Morikawa, Kenji Iwasaki, Daisuke Kohda, Tsuyoshi Shirai, Yoshizumi Ishino. Two conformations of DNA polymerase D-PCNA-DNA, an archaeal replisome complex, revealed by cryo-electron microscopy. *BMC Biology*, 18(1), 152, Oct, 2020. doi: 10.1186/s12915-020-00889-y.
2. Kenta Okamoto, Ricardo J. Ferreira, Daniel S. D. Larsson, Filipe R. N. C. Maia, Haruhiko Isawa, Kyoko Sawabe, Kazuyoshi Murata, Janos Hajdu, Kenji Iwasaki, Peter M. Kasson, Naoyuki Miyazaki. Acquired Functional Capsid Structures in Metazoan Totivirus-like dsRNA Virus. *Structure*, 28(8), 888-896.e3, Aug, 2020. doi:10.1016/j.str.2020.04.016.
3. Chihong Song, Reiko Takai-Todaka, Motohiro Miki, Kei Haga, Akira Fujimoto, Ryoka Ishiyama, Kazuki Oikawa, Masaru Yokoyama, Naoyuki Miyazaki, Kenji Iwasaki, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama, Kazuyoshi Murata. Dynamic rotation of the protruding domain enhances the infectivity of norovirus. *PLoS Pathogens*, 16(7), e1008619, Jul, 2020. doi:10.137/journal.ppat.1008619.
4. Masafumi Tanaka, Hisayasu Miyake, Satoko Oka, Shintaro Maeda, Kenji Iwasaki, Takahiro Mukai. Effects of charged lipids on the physicochemical and biological properties of lipid–styrene maleic acid copolymer discoidal particles. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, 1862(5),183209, May, 2020. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183209.

知的財産権

井上豪，浅原時泰，大久保敬，岩崎憲治，宮崎直幸，廣瀬未果，中川敦史，高木淳一，土井健史，安達宏昭.

特許 特願 2019-061938 『炭素同素体表面が改質された物質の製造方法，炭素同素体表面に官能基が導入された物質の製造方法，クライオ電子顕微鏡用グリッドの製造方法，有機物質，クライオ電子顕微鏡用グリッド』（2020/03/27 出願）

学会発表等（国際学会*，招待講演**）

1. 有賀理江，田村梨沙子，浴本亨，廣瀬未果，大井里香，金子美華，加藤幸成，岩崎憲治，池口満徳，禾晃和. 「NZ-1 ラベリングによる立体構造解析の一般化に向けた PA タグ挿入方法の最適化」，日本結晶学会 令和 2 年度(2020 年)度年会および会員総会（70 周年記念大会），オンライン開催，Nov 27-28，2020.（口頭発表）

5. ○岩崎憲治. 「クライオ電子顕微鏡の特性を活かした構造解析」, 第8回筑波大学・東京理科大学合同リトリート～若手研究者が生み出す大学間 Synergy～, ハイブリッド開催, Nov 14, 2020. (招待講演)
6. ○Junpei Yamaguchi, Masataka Ohashi, Fumio Hosokawa, Takao Shinkawa, Kenji Iwasaki. 「A brand-new particle-picking program: GRIPS」, 第20回日本蛋白質科学会年会, 紙上開催, July 6-9, 2020. (ポスター)
7. ○Wataru Koibuchi, Jumpei Uchiyama, Shigenobu Matsuzaki, Kazuyoshi Murata, Kenji Iwasaki, Naoyuki Miyazaki. 「The tail tube structure of the jumbo Staphylococcus phage S6 by cryo-EM」, 第20回日本蛋白質科学会年会, 紙上開催, July 6-9, 2020. (ポスター)
8. ○Ryosuke Kamiya, Jumpei Uchiyama, Shigenobu Matsuzaki, Kazuyoshi Murata, Kenji Iwasaki, Naoyuki Miyazaki. 「Capsid stabilization mechanisms of Helicobacter pylori bacteriophage KHP30」, 第20回日本蛋白質科学会年会, 紙上開催, July 6-9, 2020. (ポスター)
9. ○神谷亮佑, 内山淳平, 松崎茂展, 村田和義, 岩崎憲治, 宮崎直幸. 「ピロリ菌ファージ KHP30 のクライオ電子顕微鏡構造解析」, 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会, 紙上開催, May 25-27, 2020. (ポスター)
10. ○大橋正隆, 細川史生, 新川隆郎, 岩崎憲治. 「高精度 TEM シミュレーションによる cryo-EM 自動 Picking 法の評価」, 日本顕微鏡学会 第76回学術講演会, 紙上開催, May 25-27, 2020.

学外講義

東京大学大学院, 集中講義「生体触媒分子論」, オンライン, May 13, 2020.

特記すべき事項

【受賞】

2020 Best Faculty Member

学会および社会的活動

1. 日本顕微鏡学会第77回顕微鏡学会学術講演会 実行委員・医学・生物系プログラム委員長, Apr 2020～Jun 2021.

2. 顕微鏡学会 代議員 (H25 年 4 月 1 日～H27 年 3 月 31 日, H29 年 4 月 1 日～H30 年 3 月 31 日, R01 年 4 月 1 日～R03 年 3 月 31 日)
3. 顕微鏡学会 関東支部 評議議員 (H25 年 4 月 1 日～H27 年 3 月 31 日, H29 年 4 月 1 日～H30 年 3 月 31 日, R01 年 4 月 1 日～R03 年 3 月 31 日)
4. 特別研究員等審査会専門委員及び国際事業委員会書面審査員・書面評価員 (R01 年 7 月 1 日～R03 年 6 月 30 日)

科学研究費補助金・外部資金獲得状況

岩崎憲治

1. 滑膜肉腫の原因となる SS18-SSX 相互転座融合遺伝子翻訳産物の創薬構造解析 (2020～2021 年度), 代表, 挑戦的研究(萌芽)
2. 天然 3D 結晶型光センサーオルガネラのアーキテクチャー (2019 年度～2021 年度), 代表, 科学研究費補助金基盤研究(B)
3. シグナル伝達の制御に向けた膜内タンパク質切断における基質特異性決定因子の探索 (2019 年度～2021 年度), 分担(代表: 禾晃和), 科学研究費補助金基盤研究(B)
4. 最適化氷包埋試料作製のための試料調製支援 (2019～2021 年度), 分担(代表: 千田俊哉), AMED, BINDS 事業
5. 品種改良を加速する植物遺伝子編集技術のための ナノピッケルの開発 (2020 年度), 分担(代表: 篠田 晃), 2020 年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」

宮崎直幸

1. 原子構造に基づく黄色ブドウ球菌ファージ S13' の感染マシナリーの解明 (2018 年度～2020 年度), 代表, 科学研究費補助金基盤研究(C)
2. 着せ替え可能なオンデマンド多機能ウイルス様ナノ粒子の開発 (2019 年度～2021 年度), 分担(代表: 中道優介), 科学研究費補助金基盤研究(C)
3. クライオ電子顕微鏡を用いた光化学系 II 複合体の反応中間体の構造解析 (2019 年度～2020 年度), 分担(代表: 秋田総理), 科学研究費補助金挑戦的研究(萌芽)

堀越直樹

1. 溶血性貧血の原因となる代謝疾患 G6PD 欠乏症の構造基盤 (2019 年度～2020 年度), 代表, 研究活動スタート支援
2. 溶血性貧血の原因となる代謝疾患 G6PD 欠乏症における酵素活性化と活性化機構の解明 (2020 年度～2021 年度), 代表, 若手研究