

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できます。このような背景をもとに病気の原因となる、分子、ウイルス等の構造をクライオ電子顕微鏡、X 線結晶構造解析を行っています。

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.



2021(令和3)年度メンバー



(右上) 導入された最新鋭のハイエンドクライオ電子顕微鏡 2 台

プロジェクト
メンバー

教授

岩崎 憲治

助教

吉田 尚史

原田 彩佳

秘書

熊田 真弓

化学学位プログラム

博士前期課程 2 年次生

稲橋 敦俊

神谷 亮佑

鯉淵 航

博士前期課程

2 年次生

五間裕二

権藤花奈

高橋花南

吉永匡希

化学類

4 年次生

小淵里恵

川本江那

佐藤理央

星 里和

研究概要

【創薬を目指した疾患関連分子の構造解析】

1. 軟部腫瘍の原因となる融合タンパク質が転写調節に及ぼす作用機構の解明

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。希少がんでありながら、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。滑膜肉腫の確定診断には、融合遺伝子 *SS18-SSX1*、*SS18-SSX2*が使われている。これは滑膜肉腫の原因遺伝子とされており、18 番目の染色体と X 染色体との転座 $t(X;18)(p11.2;q11.2)$ によって生じる(図1.1)。その産物である融合タンパク質 SS18-SSX が、エピジェネティクス調節に異常をきたすことががん発症の原因となっていることはほぼ間違いない。そのメカニズムについては、3つの作業仮説が提唱されている(図1.2)。最も有力な説は SS18-SSX の C 末端領域 34 残基 (SSXRD)がクロマチンリモデリング因子と結合し、SMARCB1 を追い出すことが転写調節異常のトリガーになっているというメカニズムである。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、大阪国際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。

2018 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。加えてクロマチンリモデリング複合体との結合部位とされている C 末端領域のみの

発現・精製にも成功した。これらを用いて、CD スペクトル測定した結果、加えて大阪大学蛋白質研究所の宮ノ入洋

平准教授との共同研究による NMR 測定の結果、SSX 領域が溶液中で天然変性の状態であることを確かめた。さらに

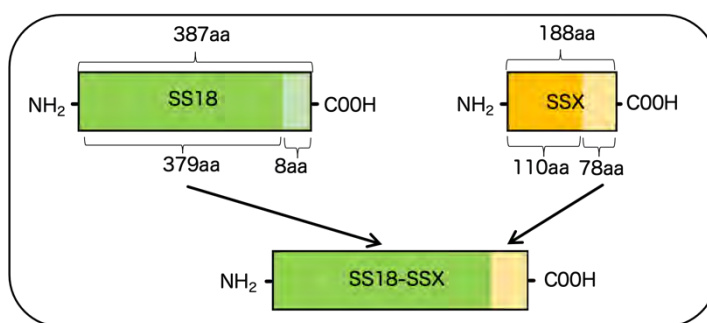


図 1.1 SS18-SSX 融合タンパク質の一次構造

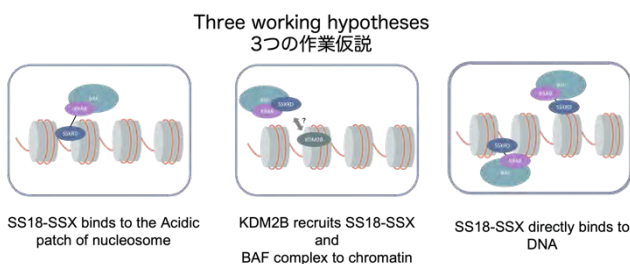


図 1.2 3つの作業仮説

SSX C 末端領域とヌクレオソームとの結合様式について東京大学胡桃坂仁志教授、堀越直樹准教授および三重大

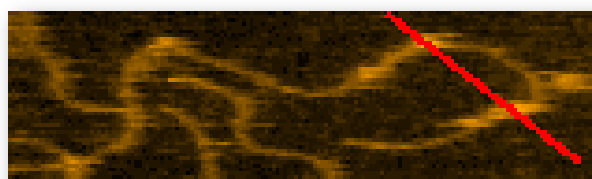


図 1.3 高速 AFM を用いた溶液中の SS18-SSX の観察

学谷一寿 教授との共同研究により、クライオ電子顕微鏡単粒子解析によりその解明に挑んだ。一方で、これまで一報しか報告のなかった別の作業仮説の検証に挑み、金沢大学古寺哲幸教授、東京大学胡桃坂仁志教授、堀越直樹准教授、大阪大学蛋白質研究所宮ノ入洋平准教授とその正しさを証明する詳細なデータを複数の実験で得ることに成功した(図 1.3)。

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。大阪大学蛋白質研究所廣瀬未果研究員の手によって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、同研究所(現京都大)杉田征彦博士によって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なほどの三次元再構成像が得られた(図 2.1)。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 2.2)。Focused classificationの技術を、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量体の安定化に関与していることが示唆された。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。

3. 単粒子解析用ソフトウェアの開発

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、

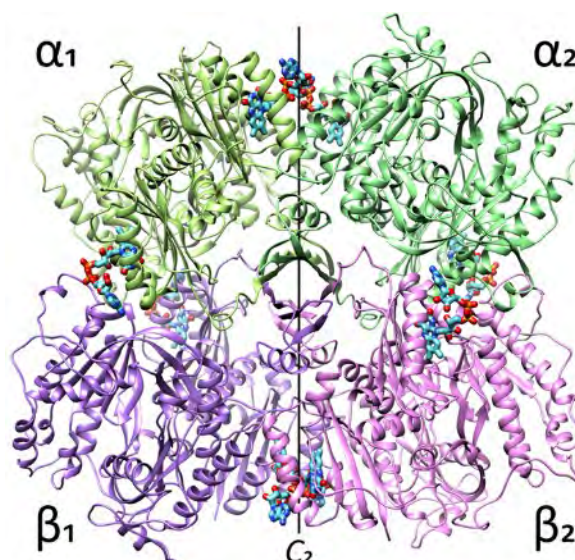


図 2.1 PAC の全体構造 α および β サブユニット 2 つずつからなるヘテロ 4 量体を形成する。水色分子は FAD であり、各サブユニットに 2 分子、全体で 8 分子を有する。

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、開発したプログラムの評価を行った。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、実データを使用している評価においても、有効であることが示唆されたので、本結果を学術論文として報告した(Ohashi, M. et al., **Acta Crystallogr. D.**, 2021)。また、本成果は商品化された。

4. X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡単粒子解析の比較

ビフィズス菌では、ホスホケラーゼ(PKT)が“ビフィドシヤント”と呼ばれるヘキソース発酵経路において重要な役割を担っている。今回、補酵素チアミン二リン酸(ThDpp)が結合したビフィズス菌 PKT の立体構造を、クライオ電子顕微鏡単粒子解析により 2.1Å 分解能で決定し、その原子モデルを構築した(図 4)。同じ酵素が、2.2Å 分解能で、以前 X 線結晶構造解析により決定されていた。2 つの構造を比較することで分子の動的な構造に言及することができた。大きな発見は、QN-loop と名付けた 4 アミノ酸から構成されるループの構造変化である。QN-loop は基質結合ポケットの入り口に位置している。クライオ電子顕微鏡では、QN-loop の 2 つのコンフォメーションを同時に捉えることに成功した。一つは、基質のない状態で報告された X 線結晶構造解析の結果と非常に似ていた。もう一つのコンフォメーションはクライオ電子顕微鏡で初めて捉えられたコンフォメーションである。興味深いことに、基質が結合した状態で構造解析された大腸菌のトランスケラーゼと、対応するループのコンフォメーションが酷似していた。MD シミュレーションによって、2 つのコンフォメーション間の構造変化が確かめられた。この変化が酵素の基質取り込みに関係していることが、強く示唆される結果だった。本研究では「開いた」状態で基質が触媒部位にアクセスできるようにしているコンフォメーションと、その逆の「閉じた」状態という 2 つの状態を捉えるのにクライオ電子顕微鏡単粒子解析が有効だったことが示された。いわゆるマルチコンフォマーの解析に成功したのである。クライオ電子顕微鏡が溶液中の分子のダイナミックな構造を解析するのにも強力なツールとなることは間違いない。本成果は、味の素株式会社との共同研究として学術論文として発表するとともにプレスリリースを行った(Nakata, K., et al., **J. Struct. Biol.**, 2022)。

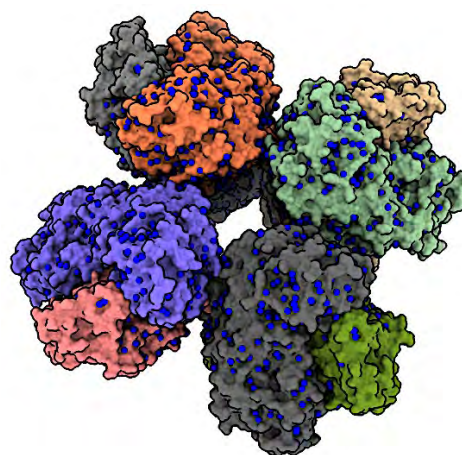


図 4 クライオ電子顕微鏡単粒子解析で得られた PKT の構造。

5. クライオ電子顕微鏡施設の運営

2021年度に日本医療研究開発機構 (AMED)が行っている創薬等先端技術支援プラットフォーム(BINDS)事業の行うクライオ電子顕微鏡設置に関する公募に採択され、国産の最先端のクライオ電子顕微鏡が2台生存ダイナミクス研究センターA棟に設置された(図5.1)。設置室の工事から始まり、納品は12月末であった。その後、P2申請のための部屋工事、流しや安全キャビネットの設置を行い、11月にクライオ電子顕微鏡のトレーニングを一ヶ月受けた原田彩佳助教を中心に3月に支援を開始した。地震直後にもか



図 5.1 生存ダイナミクス研究センターA棟 1Fに導入された2台のクライオ電子顕微鏡。



図 5.2 オープニングセレモニー。

かわらず、2.9Å分解能のデータ取得に成功し、性能面では問題ないことが示唆された。一方で、本クライオ電子顕微鏡の公募要件は、設置後、民間企業利用率50%を目指して課金による支援を行い、それによって、高価な保守費を維持するというものだった。早速民間企業への支援を3月16日に開始し、運営面においても問題のないスタートをきることに成功した。3月16日には、当該施設のオープニングセレモニーをハイブリッド形式で行った。登録者数は175名にのぼり、現地施設の見学者も多数にのぼった(図5.2)。

6. その他

プロテイン・データ・バンクの2022年カレンダーに当研究室の成果が採用された(図6)。

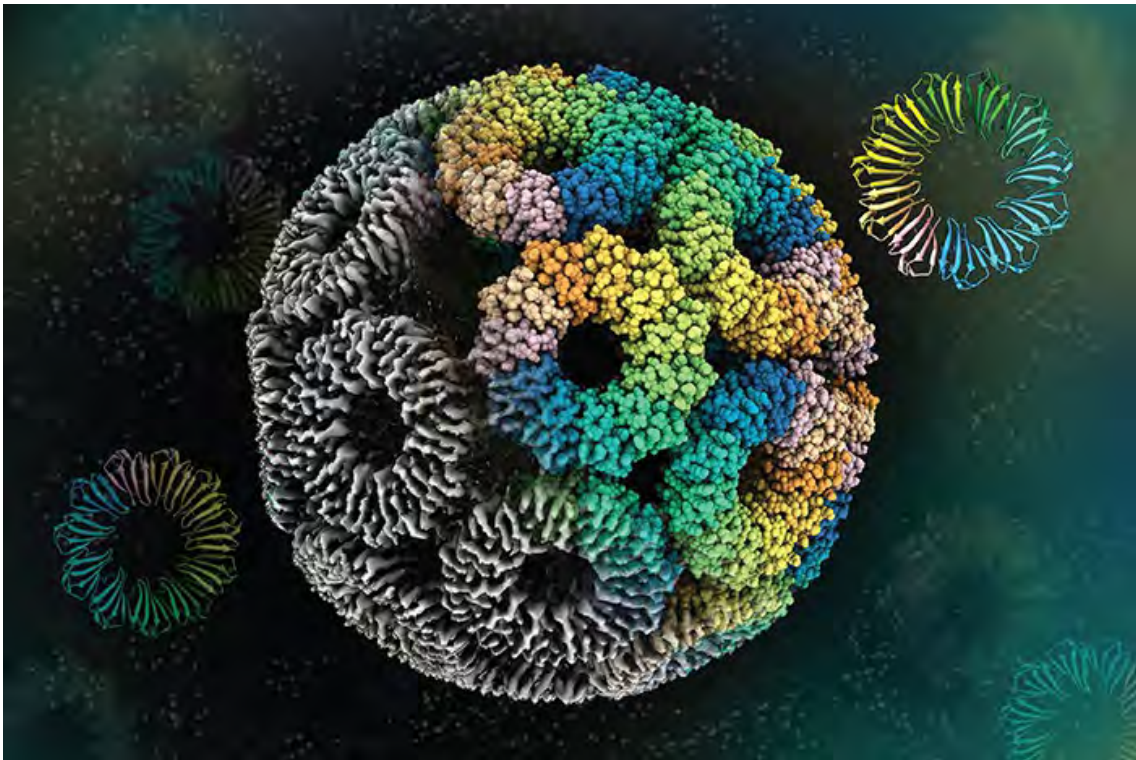


図 6 変異体 TRAP で作製したナノケージ. 2019 年度の成果が RCSB PDB101 の 2022 Calender に採用された。

<https://pdb101.rcsb.org/learn/flyers-posters-and-calendars/calendar/2022-calendar-revolutionizing-structural-biology-with-3dem>

2021 年度研究業績

原著論文(全て査読あり)

Mitsuko Hayashi-Nishino, Kota Aoki, Akihiro Kishimoto, Yuna Takeuchi, Aiko Fukushima, Kazushi Uchida, Tomio Echigo, Yasushi Yagi, Mika Hirose, Kenji Iwasaki, Eitaro Shin'ya, Takashi Washio, Chikara Furusawa, Kunihiko Nishino. Identification of Bacterial Drug-Resistant Cells by the Convolutional Neural Network in Transmission Electron Microscope Images. *Front. Microbiol.*, 13:839718. Mar 15, 2022. doi: 10.3389/fmicb.2022.839718.

Kunio Nakata, Naoyuki Miyazaki, Hiroki Yamaguchi, Mika Hirose, Tatsuki Kashiwagi, Nidamarthi H V Kutumbarao, Osamu Miyashita, Florence Tama, Hiroshi Miyano, Toshimi Mizukoshi, Kenji Iwasaki. High-resolution structure of phosphoketolase from *Bifidobacterium longum* determined by cryo-EM single-particle analysis. *J. Struct. Biol.*, 214(2):107842. Feb 15, 2022. doi: 10.1016/j.jsb.2022.107842. Online ahead of print. (BINDS)

Ryosuke Kamiya, Jumpei Uchiyama, Shigenobu Matsuzaki, Kazuyoshi Murata, Kenji Iwasaki and Naoyuki Miyazaki. Acid-stable capsid structure of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30 by single-particle cryoelectron microscopy. *Structure*, S0969-2126(21)00329-4, Sep 27, 2021. doi: 10.1016/j.str.2021.09.001.(BINDS)

Masataka Ohashi, Fumio Hosokawa, Takao Shinkawa and Kenji Iwasaki. Evaluation of automated particle picking for cryogenic electron microscopy using high-precision transmission electron microscope simulation based on a multi-slice method. *Acta Crystallogr. D*, 77(Pt 7), 966-979, July, 2021. doi: 10.1107/S2059798321005106. (BINDS)

Risako Tamura-Sakaguchi, Rie Aruga, Mika Hirose, Toru Ekimoto, Takuya Miyake, Yohei Hizukuri, Rika Oi, Mika K Kaneko, Yukinari Kato, Yoshinori Akiyama, Mitsunori Ikeguchi, Kenji Iwasaki, Terukazu Nogi. Moving toward generalizable NZ-1 labeling for 3D structure determination with optimized epitope-tag insertion. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, 77(Pt 5), 645-662, May, 2021. doi: 10.1107/S2059798321002527. (BINDS)

学会発表等 (国際学会*,招待講演**)

岩崎憲治. 「クライオ電子顕微鏡の利点を活かした構造解析」,第21回 多元物質科学研究所研究発表会プログラム, 東北大学さくらホール2F, Dec 9-10, 2021.8 (招待講演)

高橋花南, 古寺哲幸, 宮ノ入洋平, 千田美紀, 加藤広介, 堀越直樹, 竹中聡, 岩崎憲治. 「SSX1に示唆される新規のDNA結合ドメインのその溶液中構造解析」, 第59回日本生物物理学会年会, オンライン開催, Nov 25-27, 2021. (ポスター発表)

千田俊哉, 村田武士, 岩崎憲治. 「Cryo-EMネットワークと産学連携」, 第59回日本生物物理学会年会, オンライン開催, Nov 25-27, 2021. (口頭発表)

高橋花南, 古寺哲幸, 宮ノ入洋平, 加藤広介, 堀越直樹, 竹中聡, 岩崎憲治. 「SSX1に示唆される新規のDNA結合ドメインのその溶液中構造解析」, 第94回日本生化学会大会, オンライン開催, Nov 3-5, 2021. (ポスター発表)

岩崎憲治. つくばデジタルバイオ国際拠点 (招待講演)

高橋花南, 堀越直樹, 古寺哲幸, 竹中聡, 岩崎憲治. 「異常リモデリング複合体形成機構解明に向けた主要因子SS18-SSX1の性状解析」, 日本生化学会関東支部例会, Jun 19, 2021. (ポスター/誌上開催)

岩崎憲治. 「構造生物化学のこれからの課題」, 東工大セミナー, May 21, 2021. (招待講演)

著書

岩崎憲治, 大橋正隆, 廣瀬未果, 禾晃和. 「創薬研究のための相互作用解析パーフェクト (津本浩平, 前仲勝美/編「2 クライオ電子顕微鏡で弱い相互作用の複合体構造を解析するための戦略」執筆担当)」, 実験医学別冊, 2021年12月7日, 羊土社, pp.296-302.

岩崎憲治 (編). 「構造生命科学による創薬への挑戦」, 医学のあゆみ, 医歯薬出版, 2021年8月7日, 278巻6号.

学外講義

東京工業大学「ライフエンジニアリング特別講義第三」R03年5月17日

学会および社会的活動

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.

顕微鏡学会 代議員 (H25 年 4 月 1 日～H27 年 3 月 31, H29 年 4 月 1 日～H30 年 3 月 31 日, R01 年 4 月 1 日～R03 年 3 月 31 日)

顕微鏡学会 関東支部 評議議員 (H25 年 4 月 1 日～H27 年 3 月 31, H29 年 4 月 1 日～H30 年 3 月 31 日, R01 年 4 月 1 日～R03 年 3 月 31 日)

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

宮崎直幸

1. 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)

堀越直樹

1. 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