

構造ダイナミクス

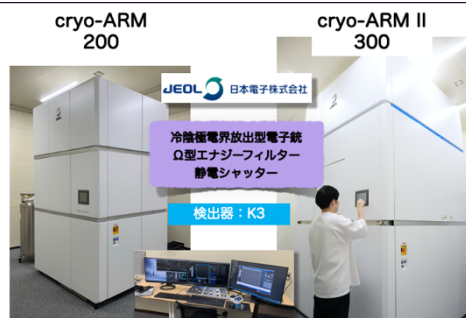
「原子から化学の目で生命を理解する」

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.



2022 (令和4) 年度メンバー



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
原田 彩佳
吉田 尚史

秘書
谷川 里子

技術補佐員
池田 文香
大和田 有華
関 美樹

化学学位プログラム

博士後期課程
岡 智将

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

博士前期課程1年次生

小淵里恵
川本江那
星 里和

化学類 4年次生

韓 叡佳
小松 諒
渋谷 綾音
鈴木 理恵
廣田 小太郎

研究概要

【創薬を目指した疾患関連分子の構造解析】

1. 滑膜肉腫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

背景

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。最も有力な説は SS18-SSX の C 末端領域 34 残基(SSXR D)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。

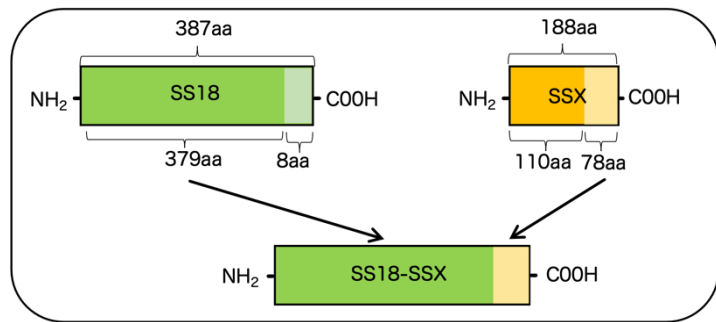


図 1.1 SS18-SSX 融合タンパク質の一次構造

1.1 GST-SSX1RD とヌクレオソーム複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析

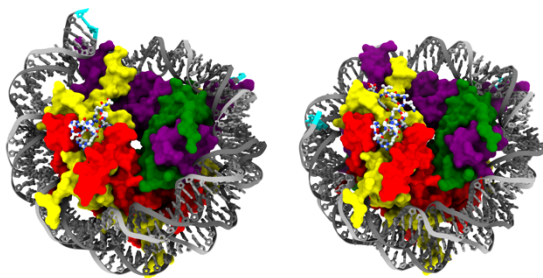


図 1.2 GST-SSX1RD とヌクレオソームとの複合体構造

2022 年度の成果として、まず SS18-SSX1 の C 末端 SSX1RD とヌクレオソームとの複合体の構造解析が第一に掲げられる。ハーバード大医学部のグループが、2020 年に報告した SSX1 の C 末端領域 SSX1RD とヌクレオソーム酸性パッチとの相互作用状態をクライオ電子顕微鏡単粒子解析法を使い、構造として捉えることに成功した(図 1.2)。

1.2 GST-SSX2RD とヌクレオソーム複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析

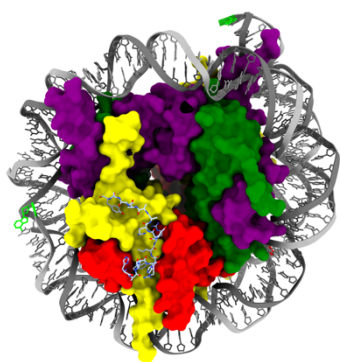


図 1.3 GST-SSX2RD とヌクレオソームとの複合

滑膜肉腫患者の 2/3 に SS18-SSX1 が、1/3 に SS18-SSX2 が RT-PCR で検出されたという報告がある。従って SSX2RD についても SSX1RD と同様のヌクレオソームとの相互作用があるかを調べた。SSX1RD よりもヌクレオソームとの親和性が弱い有意な相互作用があることを示すことができた。さらにクライオ電子顕微鏡単粒子解析によって、SSX2RD とヌクレオソームとの複合体を構造解析することに成功した(図 1.3)。

2. クライオ電子顕微鏡施設

2.1 共同利用運営について

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 2.1)。

2022 年度は筑波大学オープンファシリティー推進機構への登録を行うことで、共同利用施設としての性質を明確にするとともに、課金による運営を開始した。また、本格的な運営開始を機にク

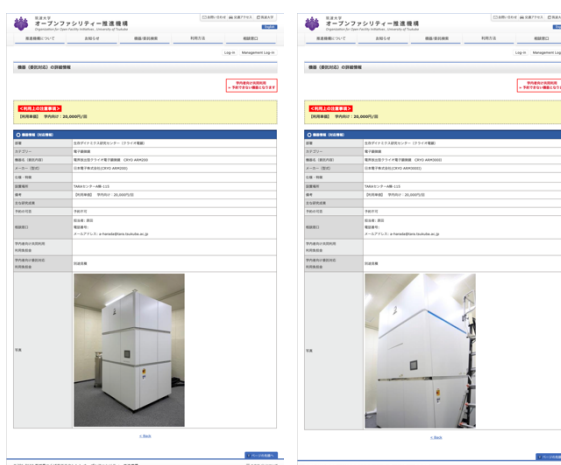


図 2.1 オープンファシリティー推進機構に登録された 2 台のクライオ電子顕微鏡

ライオ電子顕

微鏡についての理解を広めるために日本電子株式会社および AMED と共催で CRYO ARM 講座をシリーズとして始めた。(図 2.2)。

運営実績としては 4 件の支援課題を獲得しており、初年度から支援については順調なスタートを切っている。特に、膜タンパク質で 2.17 Å 分解能の結果を得ることができ、そこから被支援者の希望する構造データが得られた。一方で、日本電子製 CRYO-ARM が、氷のコンタミネーションが起きるとい



図 2.2 シリーズ CRYO ARM 講座



図 2.3 筑波大学クライオ電子顕微鏡ホームページ

り、施設間でも本問題を共有している。本問題を解決しなければ、Thermo Fischer Scientific社による支援に匹敵するような事業は行えないと危惧する事態に陥った。しかし、その後日本電子株式会社側の本問題に関する調査対応が行われ、次年度は第二四半期にはほぼ問題なく稼働できる見通しがついた。また、開かれた運用を行うために専用のホームページを立ち上げ、これをアウトリーチの一貫とした (図 2.3)。

2.2 成果

2.2.1 利用内訳

民間企業 10 社
 アcademia他機関 5 機関
 学内 2 研究室

2.2.2 解析結果

当施設を使用して得たデータの結果を表 1 に示す

表 1 CRYO ARM300II のデータで解析された成果一覧

	対称性	分子量[kDa]	分解能[Å]
可溶性タンパク質			
2 - 3 Å	C1	4500	2.7
	C1	700	2.9
	C1	520	2.6
3 - 4 Å	C1	205	3.3
	C1	100	3.5
	C1	440	3.4
	C1	92	3.4
	D4	320	3.5
	C1	210	4.2
	C1	350	4.5
5 - 10 Å	C1	210	8.9
	C1	350	9.5
膜タンパク質			
2 - 3 Å	C1	400	2.17

2022 年度研究業績

原著論文（査読あり）

1. Ryoji Suno, Yukihiko Sugita, Kazushi Morimoto, Hiroko Takazaki, Hirokazu Tsujimoto, Mika Hirose, Chiyo Suno-Ikeda, Norimichi Nomura, Tomoya Hino, Asuka Inoue, Kenji Iwasaki, Takayuki Kato, So Iwata, Takuya Kobayashi. Structural insights into the G protein selectivity revealed by the human EP3-G signaling complex. *Cell reports.*, 40(11):111323. Sep 13, 2022.
doi:10.1016/j.celrep.2022.111323.
2. Yuki Imaizumi, Kazunori Takanuki, Takuya Miyake, Mizuki Takemoto, Kunio Hirata, Mika Hirose, Rika Oi, Tatsuya Kobayashi, Kenichi Miyoshi, Rie Aruga, Tatsuhiko Yokoyama, Shizuka Katagiri, Hiroaki Mitsuura, Kenji Iwasaki, Takayuki Kato, Mika K. Kneko, Yukinari Kato, Michiko Tajiri, Satoko Akashi, Osamu Nureki, Yohei Hizukuri, Yoshinori Akiyama, Terukazu Nogi. Mechanistic insights into intramembrane proteolysis by E. coli site-2 protease homolog RseP. *Science Advances.*, 8(34):eabp9011. Aug 26, 2022.
doi:10.1126/sciadv.abp9011.
3. 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. Jun 1, 2022.
doi: 10.1016/j.jsb.2022.107842. Online ahead of print.
4. Naoyuki Miyazaki, Chihong Song, Tomoichiro Oka, Motohiro Miki, Kosuke Murakami, Kenji Iwasaki, Kazuhiko Katayama, Kazuyoshi Murata. Atomic Structure of the Human Sapovirus Capsid Reveals a Unique Capsid Protein Conformation in Caliciviruses. *Journal of Virology.*, 96(9) May 5, 2022.
doi:10.1128/jvi.00298-22.
5. 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. Apr 11, 2022.
doi: 10.3389/fmicb.2022.839718.

著書・総説

1. 原田彩佳, 岩崎憲治. 「クライオ電子顕微鏡ハンドブック」(難波啓一, 加藤貴之, 牧野文信 監修「参考資料 3 筑波大学におけるクライオ電子顕微鏡支援」執筆担当), 株式会社エヌ・ティー・エス, 2023年1月20日.
2. 岩崎憲治. 「クライオ電顕の原理と日本の現状」, 医学のあゆみ「特集クライオ電顕が解き明かす神経変性疾患のメカニズム」, 医歯薬出版, 2022年12月24日, 283巻13号, pp.1111-1114.

学会発表等 (国際学会*, 招待講演**)

1. ○渋谷綾音, 高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 吉永匡希, 吉田尚史, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「滑膜肉腫関連タンパク質 SS18-SSX2 C 末端領域の機能構造解析」, 日本薬学会第143年会, 北海道大学, 札幌, Mar 25-28, 2023. (口頭発表) (BINDS 岩崎のみ) (学生優秀発表賞)
2. ○岩崎憲治. 「天然変性タンパク質 (ドライバー遺伝子 SS18-SSX1 が引き起こす滑膜肉腫の新たな発症機構~HS-AFM, NMR, cryo-EM を使って~)」, 中性子構造生物学研究会、生物・生体材料研究会、CBI 研究機構 量子構造生命科学研究所合同シンポジウム, オンライン開催, Mar 22, 2023. (招待講演)
3. ○岩崎憲治. 「天然変性タンパク質が引き起こす滑膜肉腫の発症機構」, 基礎から学ぶ最新 NMR 解析法-第6回ワークショップ-統合型構造生物学研究-, 大阪大学蛋白質研究所, 大阪, Mar 16-17, 2023. (招待講演)
4. ○岡智将, 尾林栄治, 朴三用, 岩崎憲治, 吉田尚史. 「ヘム鉄による Heme Regulated Inhibitor 制御機構の構造学的な解析」日本農芸化学会 2023 年度大会, オンライン開催, Mar 14-17, 2023. (口頭発表)
5. ○渋谷綾音, 谷一寿, 高橋花南, 堀越直樹, 宮ノ入洋平, 吉永匡希, 吉田尚史, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「天然変性領域 SSX1RD と SSX2RD のヌクレオソーム結合様式の比較」第12回日本生物物理学会関東支部会, 東京農工大学, 東京, Mar6-7, 2023. (口頭発表)
6. ○鈴木理恵, 高橋花南, 堀越直樹, 権藤花奈, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「ヌクレオソーム酸性パッチと SSX1 または SSX2 の相互作用力解析に向けた定性測定」第12回日本生物物理学会関東支部会, 東京農工大学, 東京, Mar6-7, 2023. (口頭発表)
7. ○韓叡佳, 高橋花南, 吉永匡希, 堀越直樹, 竹中聡, 岩崎憲治. 「SSX タンパク質における DNA との相互作用に支配的なアミノ酸残基の特定」第12回日本生物物理学会関東支部会, 東京農工大学, 東京, Mar6-7, 2023. (口頭発表)
8. ○権藤花奈, 広川貴次, 吉田将人, 平尾匠, 木越英夫, 竹中聡, 岩崎憲治. 「滑膜肉腫治療のための HDAC2 阻害剤研究」, 第96回日本薬理学会年会, パシフィコ横浜, 横浜, Nov 30-Dec 3, 2022.

9. ○高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 古寺哲幸, 西村正宏, 加藤広介, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「天然変性タンパク質 SSX1 の新規機能が引き起こすクロマチンリモデリング異常のメカニズム」, 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張メッセ, 幕張, Nov 30-Dec 2, 2022. (ワークショップ口頭発表, ポスター発表)
10. ○原田彩佳, 岩崎憲治. 「筑波大学クライオ電子顕微鏡施設紹介」, 第 45 回日本分子生物学会年会, 幕張メッセ, 幕張, Nov 30-Dec 2, 2022. (ポスター発表)
11. ○星里和, 金子美華, 加藤幸成, 岩崎憲治, 原田彩佳. 「新規抗 His タグ抗体 HisMab-1 の構造と His タグに対する親和性」, 第 95 回生化学大会, 名古屋国際会議場, 名古屋, Nov 9-11, 2022. (口頭発表, ポスター発表)
12. ○高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 古寺哲幸, 西村正宏, 加藤広介, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「天然変性タンパク質 SSX1 の新規機能が引き起こす滑膜肉腫発生メカニズム」, 第 95 回生化学大会, 名古屋国際会議場, 名古屋, Nov 9-11, 2022. (口頭発表, ポスター発表)
13. ○高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 古寺哲幸, 西村正宏, 加藤広介, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「天然変性タンパク質が引き起こす滑膜肉腫発生の新規メカニズム」, 第 60 回生物物理学会年会, 函館アリーナ・函館市民会館, 函館, Sep 28-30, 2022. (ポスター発表), **学生発表賞受賞**.
14. ○岩崎憲治. 「生体内光センサー蛋白質のクライオ電顕単粒子解析」, 東京大学物性研短期研究会「理論タンパク質物性科学の最前線: 理論と実験との密な協働」, 東京大学柏キャンパス, 柏, Jul 26-27, 2022. (**招待講演**)
15. ○岩崎憲治. 「病因となる天然変性タンパク質への構造生物化学的アプローチ」, 第 464 回つくば分子生命科学セミナー, 筑波大学, つくば, Jul 14, 2022. (**招待講演**)
16. ○高橋花南, 堀越直樹, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 古寺哲幸, 西村正宏, 加藤広介, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「天然変性領域で構成される SSX1 の新規機能から明らかになった滑膜肉腫発生のメカニズム」, 第 48 回生体分子科学討論会, とりぎん文化会館, 鳥取, Jun 30-Jul 1, 2022. (ポスター), **優秀ポスター受賞**.
17. ○原田彩佳, 千田俊哉, 岩崎憲治. 「筑波大学クライオ電子顕微鏡施設紹介」, 第 22 回日本蛋白質科学学会年会, つくば国際会議場, つくば, Jun7-9, 2022.
18. ○小淵里恵, 堀越直樹, 谷一寿, 吉永匡希, 吉田尚史, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「腫瘍性融合タンパク質 SS18-SSX1 における C 末端領域のヌクレオソームへの結合様式」, 第 22 回日本蛋白質科学学会年会, つくば国際会議場, つくば, Jun7-9, 2022.
19. ○高橋花南, 古寺哲幸, 宮ノ入洋平, 加藤広介, 西村正宏, 堀越直樹, 胡桃坂仁志, 竹中聡, 岩崎憲治. 「SSX1 に示唆される新規の DNA 結合ドメインとその溶液中構造解析」, 第 22 回日本蛋白質科学学会年会, つくば国際会議場, つくば, Jun7-9, 2022.
20. ○岩崎憲治. 「クライオ電子顕微鏡単粒子解析効を奏するとき」, 高エネルギー加速器研究機構 第 1 回 2022 年度物構研コロキウム, オンライン開催, Apr 18, 2022.

受賞

- 学生 渋谷綾音 日本薬学会第 143 年会 学生優秀発表賞
学生 高橋花南 第 60 回生物物理学会年会 学生発表賞受賞
学生 高橋花南 第 48 回生体分子科学討論会 優秀ポスター賞受賞

学会および社会的活動

1. 日本顕微鏡学会第 65 回シンポジウム 実行委員 (プログラム担当) , Nov 5~6, 2022.
2. 岩崎憲治. 「新世代のクライオ電子顕微鏡解析~クライオ電子顕微鏡による生体分子の構造解析~」, 2022 年度生理研研究会, Nov 1, 2022.(主催)
3. 顕微鏡学会 代議員
4. 顕微鏡学会 関東支部 評議議員

科学研究費補助金・外部資金獲得状況

岩崎憲治

1. 最先端測定技術による Ewing 肉腫の原因となる融合タンパク質の構造化学 (2022~2023 年度), 代表, 挑戦的研究(萌芽)
2. 構造生物化学と定量解析を駆使した滑膜肉腫発生機構の解明と創薬 (2022 年度~2024 年度), 代表, 科学研究費補助金基盤研究(B)
3. 最適化氷包埋試料作製のための試料調製支援 (2022~2026 年度), 分担(代表:山本雅貴), AMED, BINDS 事業
4. SS18-SSX の詳細構造の同定 (2022~2024 年度), 分担(代表:高橋智), AMED, BINDS 事業内 FAST TRACK
5. 変異型 FBN1 の構造解析 (2021~2023 年度), 分担(代表:柳沢裕美), AMED, 難治性疾患実用化研究事業
6. 液体セル電子顕微鏡法のソフトマテリアル研究への応用探索, TIA 連携プログラム調査研究課題, 分担(代表:竹口雅樹)

産学共同研究

日本電子
JT 医薬