

構造ダイナミクス

「原子から化学の目で生命を理解する」

DNA のわずか 2~3% が遺伝子とされていますが、その構造遺伝子がコードしているのが、タンパク質を作るアミノ酸の配列です。遺伝子の異常は、タンパク質の機能の異常につながることがあります。タンパク質の機能の異常は、病気を引き起こすことがあります。がんはその代表格でしょう。構造ダイナミクス研究室では、このタンパク質の機能異常を構造をベースに調べ、病気を引き起こすメカニズムを解明します。そして、ターゲットとなる病気に対する創薬を試みます。そのような構造解析のための世界最先端のクライオ電子顕微鏡を 2 台保有しているのは大きな研究室の特徴でしょう。しかし、研究の手法は構造解析だけではありません。ターゲットが相互作用する分子を特定したり、それらの分子間の相互作用を調べたり、生化学、細胞生物学などを駆使して研究します

Only about 2-3% of DNA is considered to be genes, and those genes encode the sequences of amino acids that constitute proteins. Mutations in genes can lead to abnormalities in protein function. This can cause various diseases. Cancer is a representative example of such diseases. In the Structural Dynamics Laboratory, we investigate the functional abnormalities of target proteins based on their structures to elucidate the mechanisms causing diseases. In addition, we challenge ourselves to develop drugs for the targeted diseases. A key feature of our laboratory is that we possess a pair of the world's cutting-edge cryo-electron microscopes for molecular structural analysis. However, our research methods are not limited to structural analysis. We identify the molecules that interact with our targets and study the interactions between these molecules, utilizing biochemistry, cell biology, and other related fields in our research.



2023（令和 5）年度メンバー

プロジェクトメンバー

教授
岩崎 憲治

准教授
安達 成彦

助教
吉田 尚史
原田 彩佳
加藤 かざし
藤木 涼

研究員
石場 智彬

技術職員
池田 文香

秘書
谷川 里子

化学学位プログラム
博士後期課程 2 年次生

岡 智将

博士前期課程 2 年次生

星 里和
小淵 里恵
川本 江那

博士前期課程 1 年次生

韓 叡佳
小松 諒
渋谷 綾音
鈴木 理恵
廣田 小太郎

化学類 4 年次生

岩切 陸
大月 滉登
松澤 里純
松本 夏弥
林 征宗

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(図 1.2)。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。

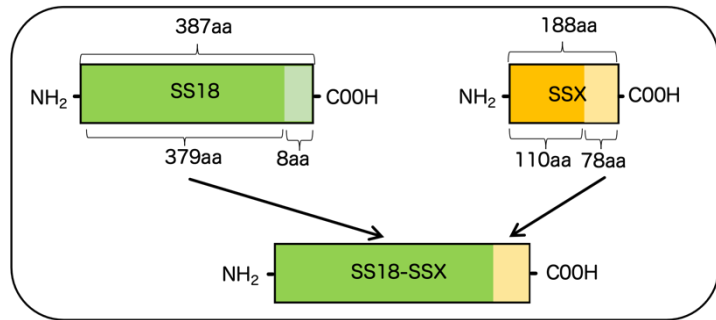


図 1.1 SS18-SSX 融合タンパク質の一次構造

結果

SSX1RD, SSX2RD および SMARCB1 とヌクレオソーム複合体の分子動力学計算

これまでの 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、SSX2RD とヌクレオソームとの複合体の構造解析の成果に続き、これらの結合親和性の評価を試みた。目的

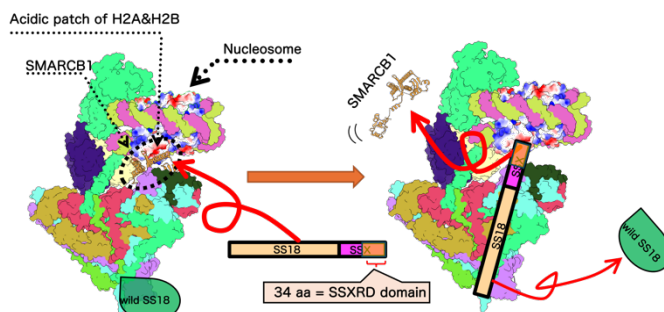


図 1.2 Eviction model(追い出しモデル)の模式図

は、本来の酸性パッチ結合 BAF 複合体サブユニット SMARCB1 よりも大きな親和性を示すかどうかを調べるためである。実測する手段はいずれも信頼できる値を得るのが難しかったため、PBSA と GBSA を計算化学研究センターの Kowit Hengphasatporn 博士に行って頂いた。以上の成果を論文投稿準備中である。

2. 新規抗 His タグ抗体 HisMab-1 の抗原認識機構の解明に基づいた新規ツールとしての提案

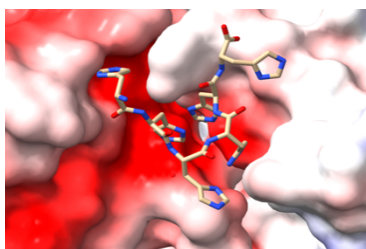


図 2.1 解明された HisMab-1 抗原認識部位の分子表面上にモデリングされた 6xHis

東北大学大学院医学系研究科の加藤幸成教授が開発した抗 His タグ抗体 HisMab-1 抗体の Fab フラグメントについて、アポ体の構造を X 線結晶構造解析により明らかにした(図 2.1)。その結果から、HisMab-1 は、タンデムに並んだヒスチジン (タンデム His) のループ状の構造を認識していることが示唆された。つまり、立体構造認識抗体である可能性が非常に高いことがわかった。タンデム His は、標的とする分子の全体構造を変形させことなく、ループ状の立体構造として分子の内部に挿入することができるはずである。

よって、タグとして一般的に

使われる標的分子の C 末端あるいは N 末端への融合だけではなく、機能と相関のある位置など、任意の位置への挿入し、それを HisMab-1 で認識させ、クライオ電子顕微鏡単粒子解析などでその空間座標を明らかにするツールとしての応用が期待できることが分かった。実際に Maltose Binding Protein (MBP) の内部に 6 個連続にヒスチジンの配列を挿入した変異 MBP を作製し、免疫沈降法で HisMab-1 によって認識できるか試した。(図 2.2)ゲルろ過クロマトグラフィーと SDS-PAGE によって、非常に明瞭に HisMab-1-変異体 MBP 複合体を形成していることが示された。

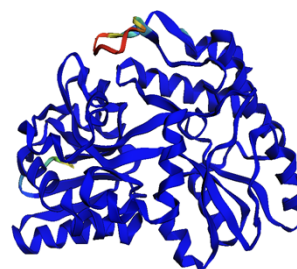


図 2.2 6xHis(レインボーカラー)を挿入した変異体 MBP の予測構造。

3. 抗ボツリヌス毒素中和抗体の構造解析

Clostridium botulinum が産生するボツリヌス神経毒 (BoNT) により発症するボツリヌス症は、弛緩性麻痺を症状とする致死性の重篤な疾患である。その治療には、ポリクローナルなウマ抗毒素抗体が用いられるが、異種動物の血清投与にはアナフィラキシーショックなどの重篤な副作用が起こる可能性がある。そこで、現行のウマ抗毒素に代わる治療薬として、E 型菌標準株 BoNT/E サブタイプ 1 (BoNT/E1) に対するヒト化モノクローナル抗体 hmE9-4 が大阪公立大学の幸田知子講師らにより開発された。大阪公立大学の片平じゅん准教授、幸田知子講師との共同研究を通じて、hmE9-4 の Fv フラグメント領域と抗原との複合体を X 線結晶構造解析により解明することに成功した。本構造解析には、Fv-clasp の技術を用いた。

4. クライオ電子顕微鏡施設

4.1 利用状況

2023 年度は、CRYO ARM300II を用いた単粒子解析の研究支援を主軸に、アカデミア 6 グループ、企業 2 社の合計 8 課題を行った。また、支援用に合計 132 日マシンタイムを確保し、アカデミアに 32 日、企業に 72 日、内部利用に 29 日使用した。

年度途中に、CRYO ARM300II において、氷のコンタミネーションが起きるという不具合が発生し、保守整備等において 6 ヶ月のデッドタイムを生じた。しかし、それらの問題や頻発していた CRYO ARM のハードウェアの問題も解決し、安定稼働にこぎ着けた。実際の支援依頼試料で global FSC 分解能で 2Å 台の単粒子解析が安定して得られるようになった。結果、筑波大クライオ電顕施設の運営を開始した 2 年目である 2023 年度中に、論文 1 報を発表することができた。

4.2 LH1-RC 複合体の構造解析

光合成細菌が太陽光エネルギーを集め、光から電子へ変換する役割は、コア光捕集反応中心複合体 (LH1-RC) が担っている。その中でも硫黄代謝をもつ紅色硫黄細菌の多くは、温泉・海中といったカルシウムが豊富な環境に棲息し、これまで報告されている LH1-RC の立体構造は、光捕集に特化したアンテナタンパク質である LH1 にカルシウムが結合していた。しかし、カルシウム含量の少ない軟水や欠乏状態の水中でも増殖できる常温菌のモデル種アロクロマチウム・ビノサムでは、これまでの長年の実験結果から光合成にカルシウムは関与していないと考えられており、そのメカニズムは謎にまつまっていた。

今回、CRYO ARM300II を用いて、常温菌 *Allochromatium vinosum* (アロクロマチウム・ビノサム) の LH1-RC の立体構造を分解能 2.2Å で決定した (図 4.2)。今までに報告された生育時にカルシウムが必要な種の立体構造と異なり、一部にのみカルシウムイオンが結合できることがわかった。この結合位置は、タンパク質精製時のカルシウムイオン濃度に影響されないことから、生育時に取り込まれたものと考えられ、かつ結合位置も一定していることもわかった。類縁種で温泉に棲息するサーモクロマチウム・テピダムでは、16 個ある LH1 サブユニットのすべてにカルシウムが結合しているが、本種では 16 個ある LH1 サブユニットのうち 6 個にまで減少していた (図 4.2)。また、カルシウムイオン結合位置付近のアミノ酸配列には複数のパターンがあり、この配列バリエーションに応じてカルシウムイオンが結合できるかどうかが決まっていることを明らかにした。

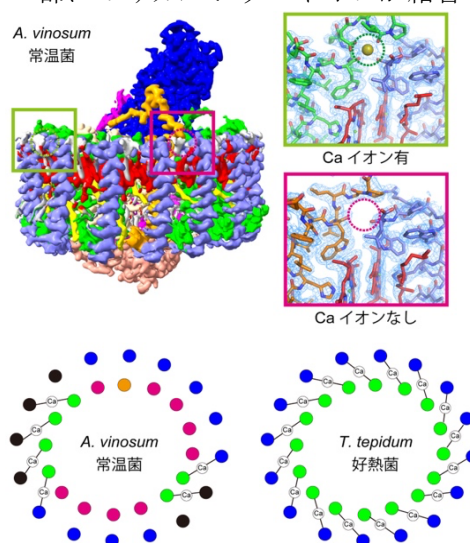


図 4.2 LH1-RC の全体構造と LH1 サブユニットに結合する Ca イオン位置の多様性

今回得られた立体構造や生化学的実験から、淡水に棲息するタイプの紅色硫黄細菌の光捕集複合体の進化的な謎であったカルシウム結合は起きていることが示され、保存されたアミノ酸配列のパターンも見つけることができた。これらの特徴をうまく取り入れることで、ミネラルの少ない軟水でも効率的に生き残れる進化上の戦略を取っていることがわかった。本研究の成果は、2024年2月12日付でCommunications Biologyに掲載された。

5. microED 実験について

クライオ電子顕微鏡（以下、クライオ電顕）を用いて電子線結晶解析を行う microED は、放射光 X 線では測定困難な数 μm 以下のサイズの微結晶からも回折データを得ることができる実験手法である。「新規物質の結晶や新しいパッキング状態の結晶を得たものの、結晶が大きく成長せず、放射光 X 線で測定するにはサイズが足りない」といった悩みを抱える研究者は多く、microED の潜在的な需要は極めて大きい。しかし、未だ技術的に困難な点が多数あり、多くの研究者が容易に利用できる状態にはなっていない。

microED 実験には (i) Grid 作製、(ii) データ測定、(iii) データ解析の 3 段階があり、それぞれの段階に困難な点がある。当グループでは筑波大・TARA センターに設置されたクライオ電顕 (CRYO ARM200) を 2023 年 1 月より microED 専用機として立ち上げ、その運用を通して困難の克服に取り組んできた。具体的には、(i) Grid 作製に関しては「サンプルによって最適な Grid 作製の方法が異なる」という点が難しい点であるが、多数のユーザーのサンプルを受け入れることでケーススタディを蓄積し、得られた情報をユーザーに還元することで様々な性状のサンプルに対応しうる体制を整えてきた。(ii) データ測定に関しては「クライオ電顕の操作が難しい」といった点が難しい点であるが、クライオ電顕のキャリブレーション法の確立・シンプルなデータ測定手順の確立・マニュアルの作成・ハンズオン講習会の開催などを行い、ユーザー利用における技術的なハードルを下げてきた。(iii) データ解析に関して、一般的に、結晶構造解析には広い角度範囲から集めた回折データが必要となるが、電子顕微鏡にはステージの傾斜角度に制限があり、1 つの結晶から集められるデータの角度範囲が狭い。そのため、複数の結晶を測定してデータを重ね合わせる必要がある。また、一般的に微結晶は質が悪いことが多く、筑波大での microED 実験の経験から、「数百個の結晶を測定した中から、数十個の質の良いデータを選抜する」といったアプローチが必須であることが分かってきた。そのため、データ解析においては「数百データを自動測定/自動処理する仕組みが必要である」という点が難しい点となってくるが、これまでに over night で 250 コの結晶を自動測定/自動処理できるシステムを立ち上げてきた。結果として筑波大 CRYO ARM200 は年間約 20 グループの学内外ユーザーが利用する装置となり、既に 19 種類の新規結晶構造の決定に成功している。利用ユーザー数は今後も拡大傾向にある。

2023 年度研究業績

原著論文（査読あり）

1. Hideaki Matsui, Shinji Ito, Hideki Matsui, Junko Ito, Ramil Gabdulkhaev, Mika Hirose, Tomoyuki Yamanaka, Akihide Koyama, Taisuke Kato, Maiko Tanaka, Nroihito Uemura, Noriko Mtasui, Sachiko Hirokawa, Maki Yoshihama, Aki Shimozaawa, Shin-ichiro Kubo, Kenji Iwasaki, Masato Hasegawa, Ryosuke Takahashi, Keisuke Hirai, Akiyoshi Kakita and Osamu Onodera. Phosphorylation of α -synuclein at T64 results in distinct oligomers and exerts toxicity in models of Parkinson's disease. *PNAS*, 120(23)e2214652120. May 30, 2023.
doi:10.1073/pnas.2214652120.
2. Hui-Ju Huang, Sen-Lin Tnag, Yuan-Chin Chang, Hao-Ching Wang, Tze Hann Ng, Rees F. Garman, Yu-Wen Chen, Jiun-Yan Huang, Rmya Kumar, Sheng-Hsiung Chang, Shang-Rung Wu, Chih-Yu Chao, Kyoko Matoba, Iwasaki Kenji, William M. Gelbart, Tzu-Ping Ko, Hwei-Jiung(Andrew)Wang, Chu-Fang Lo, Li-Li Chen and Han-Ching Wang. Multiple Nucleocapsid Structural Forms of Shrimp White Spot Syndrome Virus Suggests a Novel Viral Morphogenetic Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, **24**(8), 7525; <https://doi.org/10.3390/ijms24087525>.
3. Jiang, X., Ogawa, T., Yonezawa, K., Shimizu, N., Ichinose, S., Uchihashi, T., Nagaike, W., Moriya, T., Adachi, N., Kawasaki, M., Dohmae, N., Senda, T., Hirokawa, N. The two-step cargo recognition mechanism of heterotrimeric kinesin. *EMBO Rep.* 24, e56864 (2023). doi: 10.15252/embr.202356864.
4. Tsunekawa, E., Otsubo, Y., Yamada, Y., Ikeda, A., Adachi, N., Kawasaki, M., Takasu, A., Aramaki, S., Senda, T., Sato, S., Yoshida, S., Fujita, M., Sawada, T. X-ray and electron diffraction observations of steric zipper interactions in metal-induced peptide cross- β nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* 145, 16160-16165 (2023). doi: 10.1021/jacs.3c04710.
5. Linh, T.N., Arimura, T., Tominaga, K., Isoda, H., Kawasaki, M., Adachi, N. Effect of alkali metal cations on the unilamellar vesicle of a squalene bearing 18-crown-6. *ACS Omega* 8, 11583-11587 (2023). doi: 10.1021/acsomega.3c00744.
6. Kosugi, M., Kawasaki, M., Shibata, Y., Hara, K., Takaichi, S., Moriya, T., Adachi, N., Kamei, Y., Kashino, Y., Kudoh, S., Koike, H., Senda, T. Uphill energy transfer mechanism for photosynthesis in an Antarctic alga. *Nature Commun.* 14, 730 (2023). doi: 10.1038/s41467-023-36245-1.
7. Tani, K., Kanno, R., Harada, A., Kobayashi, Y., Minamino, A., Takenaka, S., Nakamura, N., Ji, X.-C., Purba, E. R., Hall, M., Yu, L.-J., Madigan, M. T., Mizoguchi, A., Iwasaki, K., Humbel, B. M., Kimura, Y., & Wang-Otomo, Z.-Y. (2024). High-resolution structure and biochemical

properties of the LH1–RC photocomplex from the model purple sulfur bacterium, *Allochromatium vinosum*. *Communications Biology*, 7(1), 176. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-05863-w>

学会発表等（国際学会＊, 招待講演＊＊）

1. ○韓叡佳, 高橋花南, 吉永匡希, 堀越直樹, 胡桃坂仁志, 竹中聡, 岩崎憲治. 「滑膜肉腫原因タンパク質における天然変性領域 SSX と DNA の相互作用様式を決定づけているアミノ酸残基」, 2023 年度日本生化学会関東支部例会, 山梨大学, 山梨, Jun 10, 2023. (ポスター発表)
2. ○星里和, 人見菜月, 金子美華, 加藤幸成, 岩崎憲治, 有森貴夫, 原田彩佳. 「新規抗 His タグ抗体 HisMab-1 の結合親和性評価とウエスタンブロット法への適用」, 2023 年度日本生化学会関東支部例会, 山梨大学, 山梨, Jun 10, 2023. (口頭発表)
3. ○渋谷綾音, 谷一寿, 高橋花南, 堀越直樹, 宮ノ入洋平, 吉永匡希, 小淵里恵, 原田彩佳, 吉田尚史, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「cryo-EM SPA による Induced folding 構造の解析」, 日本顕微鏡学会 第 79 回学術講演会, くにびきメッセ, 島根, JUN 26-28, 2023. (ポスター発表)
4. ○内山淳平, 神谷亮佑, 宮崎直幸, 村田和義, 岩崎憲治, 松崎茂展. 「ピロリ菌ファージの発見から構造決定まで」, 第 29 回日本ヘリコバクター学会学術集会, 日本教育会館, 東京, Jun 30-Jul 2, 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, 小淵里恵, 原田彩佳, 吉田尚史, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「クライオ電子顕微鏡単粒子解析法による天然変性領域 SSX2RD とヌクレオソーム複合体の機能・構造解析」, 第 23 回日本蛋白質科学会, 名古屋国際会議場, 名古屋, JUL 5-7, 2023. (ポスター発表)
6. ○鈴木理恵, 高橋花南, 堀越直樹, 小淵里恵, 重田育照, Kowit Hengphasatporn, 権藤花奈, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治. 「天然変性領域 SSX と SMARCB1 c 末端 α -ヘリックスによる競合的なヌクレオソーム酸性パッチターゲティング」, 第 23 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 愛知, Jul 5-7, 2023. (ポスター発表)
7. ○韓叡佳, 高橋花南, 吉永匡希, 堀越直樹, 胡桃坂仁志, 竹中聡, 岩崎憲治. 「天然性変性領域 SSX と DNA の相互作用様式を決定づけているアミノ酸残基」, 第 23 回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 愛知, Jul 5-7, 2023. (ポスター発表)
8. ○韓叡佳, 堀越直樹, 高橋花南, 谷一寿, 宮ノ入洋平, 中本佳歩, 古寺哲幸, Kowit

- Hengphasatporn, 鈴木理恵, 渋谷綾音, 竹中聡, 重田育照, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治.「天然変性タンパク質が滑膜肉腫発生の原因となる仕組み」, 第 96 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場・マリネッセ福岡 B 館, 福岡, Oct31-Nov2, 2023. (ポスター発表)
9. ○星里和, 人見菜月, 金子美華, 加藤幸成, 岩崎憲治, 有森貴夫, 原田彩佳.「新規抗 His タグ抗体 HisMab-1 の抗体技術への応用」, 第 96 回日本生化学会大会, マリネッセ福岡, 福岡, Oct-Nov 31-2,2023. (ポスター発表)
10. ○岩崎憲治.「産業利用に向けた国産クライオ電子顕微鏡施設の立ち上げと創薬研究」, BINDS シンポジウム, よみうり大手町ホール, 東京, Nov 16 2023. (招待講演)
11. ○松澤里純, 原田彩佳, 石場智彬, 廣田小太郎, 岩崎憲治.「新規 LDH 阻害剤の開発を目指して」, 生理研研究会 2023 年度大会, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, Nov 28-29, 2023. (ポスター発表)
12. ○松本夏弥, 原田彩佳, 石場智彬, 廣田小太郎, 岩崎憲治.「クライオ電顕による小分子酵素の構造解析を目指して」, 生理研研究会 2023 年度大会, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, Nov 28-29, 2023. (ポスター発表)
13. ○渋谷綾音, 谷一寿, 高橋花南, 堀越直樹, 宮ノ入洋平, 吉永匡希, 小淵里恵, 原田彩佳, 吉田尚史, 竹中聡, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治.「天然変性タンパク質の部分構造解析」, 生理研研究会 2023 年度大会, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, Nov 28-29, 2023. (ポスター発表)
14. ○小淵里恵, 段炼, Kowit Hengphasatporn, 重田育照, 谷一寿, 鈴木理恵, 渋谷綾音, 竹中聡, 堀越直樹, 胡桃坂仁志, 岩崎憲治.「分子動力学シミュレーションによるがん原因融合タンパク質 SS18-SSX の C 末端結合領域とヌクレオソームの相互作用解析」, 第 46 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 兵庫, Dec 6-8, 2023. (ポスター発表, 口頭発表)
15. ○岩崎憲治.「創薬を目指した病因性天然変性タンパク質の解析」, 顕微鏡学会九州支部会, 九州工業大学, 福岡, Dec 9, 2023. (招待講演)
16. ○岩崎憲治.「核内天然変性タンパク質に対する構造ベース創薬」, 第 97 回日本薬理学会シンポジウム, De 口頭. (招待講演)
17. ○廣田小太郎, 原田彩佳, 片平じゅん, 幸田知子, 岩崎憲治.「抗ボツリヌス毒素中和抗体の毒素中和機構解明に向けた結晶構造解析」, 2023 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 水戸市民会館, 水戸, Mar 5-7, 2023. (ポスター発表)

受賞

- 学生 渋谷綾音 生理研研究会 2023 年度大会 特別賞
学生 渋谷綾音 第 79 回学術講演会 優秀ポスター賞

学会および社会的活動

1. 顕微鏡学会 代議員 2023 年 4 月～2024 年 3 月
2. 顕微鏡学会 理事 2023 年 8 月～2025 年 6 月
3. 生化学会 評議員 2023 年 4 月～

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