



日本学術振興会・産学協力委員会

R022 量子構造生物学委員会

第11回 研究会 資料

2023年9月22日（金）
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋（東京）

R022 量子構造生物学委員会
第 11 回研究会 プログラム

2023 年 9 月 22 日 (金)

会場：ミーティングスペース AP 日本橋
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2
日本橋フロント 6F
(現地会場で開催／オンライン接続はありません)

13:30 – 13:35

はじめに

委員長・三木邦夫 (京都大学)

講 演

13:35 – 14:35 (講演 1)

司会：委員・吉川雅英 (東京大学)

構造生命科学の基盤技術クライオ電子顕微鏡の進歩と将来展望

大阪大学・大学院生命機能研究科・日本電子 YOKOGUSHI 協働研究所
難 波 啓 一

14:35 – 15:00 休 憩

15:00 – 16:00 (講演 2)

司会：副委員長・中川敦史 (大阪大学)

シャペロンから解き明かすタンパク質フォールディングと集合の制御メカニズム

徳島大学・先端酵素学研究所・分子生命科学分野
齋 尾 智 英

16:00 – 17:00 (研究交流討論)

委員・講師間の自由討論

構造生命科学の基盤技術クライオ電子顕微鏡の進歩と将来展望

Progress and future perspective of electron cryomicroscopy for structural life sciences

大阪大学大学院生命機能研究科 日本電子 YOKOGUSHI 協働研究所

難 波 啓 一

Keiichi Namba

Graduate School of Frontier Biosciences,
JEOL YOKOGUSHI Research Alliance Laboratories,
Osaka University

タンパク質や核酸など生体高分子の立体構造は生命科学のみならず医学・創薬などに必須な基盤情報である。生命科学の大きな課題の一つは複雑な生体機能メカニズムを生体高分子の立体構造とそのダイナミクスや分子間相互作用に基づいて解明することであり、それには様々な生体機能に関わる数多くの生体高分子やそれらが形成する安定あるいは過渡的な複合体の立体構造を様々な状態で可視化することが必須である。そして可視化すべき立体構造の数は数億あるいはそれ以上に上る。この膨大かつ挑戦的な課題を解決することが構造生命科学および医学・創薬科学のもっとも大きな命題である。

長らく構造生物学の基盤技術であった X 線結晶構造解析法と NMR では、それぞれ試料の結晶化が必須あるいは解析可能な試料の分子量が 50 kDa 程度以下であるといった条件が大きな制約となっていた。クライオ電子顕微鏡法（クライオ電顕法）が構造解析技術としての地位を確立し注目されるのはわずか数 μg の水溶液試料でも原子分解能で構造解析が可能であるためである。結晶化の必要がなく試料のサイズに上限がほとんどない。

生体高分子や複合体の立体構造を維持する原子間結合の大部分は水素結合、塩橋、ファンデルワールス力による疎水性相互作用など弱い非共有結合であるため電子線照射に非常に敏感である。したがって本来の機能状態で大きな損傷なく高分解能電顕像を記録するには、その水溶液を急速凍結して非晶質氷薄膜に試料分子を包埋し、液体ヘリウムや液体窒素で 100 K 以下に冷却した状態でクライオ電顕像を記録する必要がある。温度が低いほど電子線照射損傷は少な

いが [1]、20 K 以下の温度では凍結試料グリッド上の氷や炭素の低い電子伝導性のためチャージアップ等によるイメージドリフトが発生しやすい [2]。またこのような低温でも構造に大きな損傷を与えず照射できる電子線量は $20\text{--}30\text{ e}^-/\text{\AA}^2$ が限界である。カメラの各画素で検出される電子の数が少ないために生じる固有の統計ノイズとカメラが検出する個々の電子の信号レベルの分布が大きいことから発生するランダムノイズのため、そもそもクライオ電顕像の画質は極めて悪い。しかもクライオ電顕像は氷薄膜に包埋された分子の 3 次元構造を様々な方向に 2 次元投影したものであるため 3 次元像を高分解能で再構成するには投影方向を均一にカバーする十分な数の分子像を集めることが必要である。そこで、単粒子像解析法ではできるだけ数多くの分子像を効率よく収集し、投影方向ごとに分類し、各分子像の位置と向きを揃えて各投影方向の平均像を得ることでノイズを減らしつつ信号レベルを上げ（2 次元クラス平均）、投影方向間の相対関係を求めて最終的に分子の立体像を再構成する（図 1）。高分解能での構造解析には高品質・高解像度のクライオ電顕像を効率的に収集できるクライオ電顕とカメラが必須である。同時に高精度な画像解析プログラムと高速コンピュータも必要である。

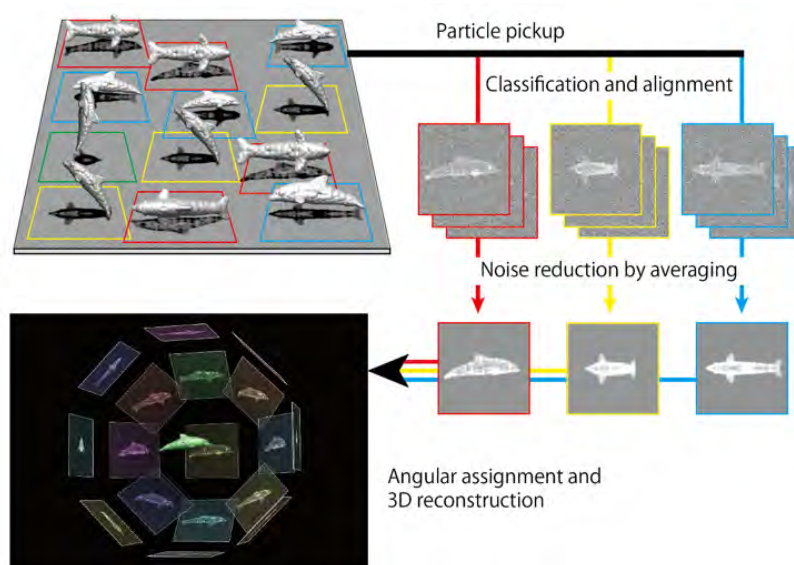


図 1 単粒子像解析のプロセスを説明する模式図。イルカはアモルファス氷薄膜に様々な向きで包埋された生体高分子を表す。クライオ電顕像はその 2 次元投影像に相当し、低電子線量照射での撮影によりノイズレベルが高い。2 次元投影像の分類と平均化により S/N を大幅に向上させた後、逆投影により 3 次元像を再構成することができる [2]。

クライオ電子顕微鏡法の技術開発は 1980 年代に始まったが、2000 年代まで画像検出器が銀塩フィルムや CCD などフレームレートが秒レベルの低速蓄積型であったため画像ブレを補正できず、一部の例外 [3]を除いて分解能は概ね nm レベルで分子形状が可視化できる程度であった。しかし、2013 年に CMOS ベースの電子直接検出型カメラが登場し、その 400 フレーム/秒の高速撮影速度による単電子検出と動画撮影による画像ブレ補正が可能となり、クライオ電顕構造解析の分解能は主鎖側鎖を解像できるまで劇的に向上した [4,5]。クライオ電子顕微鏡法はこのような最近の技術進歩により、長く構造生物学の主たる基盤技術であった X 線結晶解析法や NMR を補足する役割を超え、高分解能構造解析法として極めて強力なツールとなった。安定性と制御性の高い電子光学系、冷陰極電界放出型電子銃、エネルギーフィルター、高フレームレートで高感度の CMOS 型直接電子検出カメラ等を装備したクライオ電子顕微鏡や高速コンピューターと画像解析ソフトなどのハード・ソフトの開発により、クライオ電子顕微鏡法はわずか数 μg の水溶液試料から生体高分子の立体構造を数日で決定することを可能にした。分子モデル構築に必要な原子レベル分解能の構造解析に要する数千枚の電子顕微鏡像の自動撮影に以前は数日を要したが、最近の技術進歩により数時間、試料によっては 1 時間以内に完了するまでに高速化した（図 2、3）。個々の原子を解像する原子分解能での解析も容易になった（図 4、5）。こうして数億にも上る可視化すべき生体分子および複合体の立体構造とそのさまざまなコンフォメーションを実際に解析できる基盤ができつつある [6, 7]。

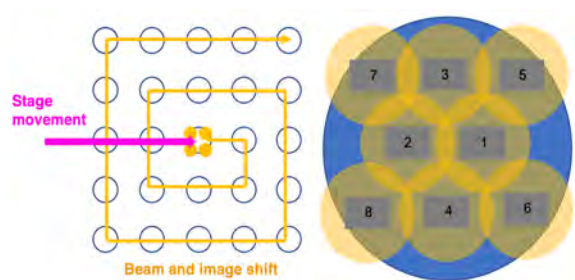


図 2 ビーム傾斜とイメージシフトによるマルチホール/マルチショット撮影の模式図。

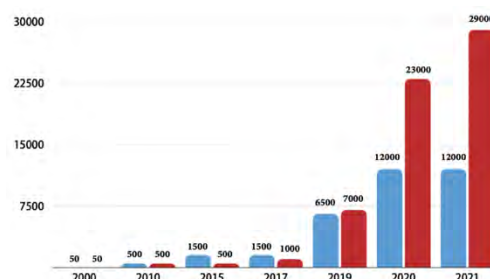


図 3 撮影速度高速化の変遷
青: TFS; 赤: JEOL

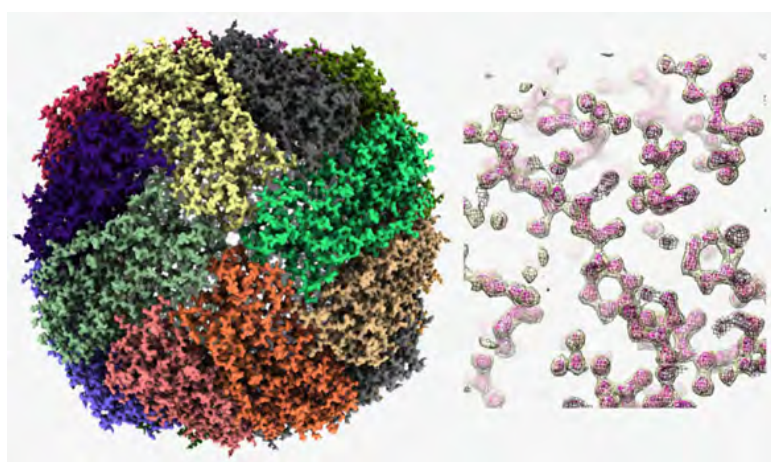


図4 アポフェリチンのクライオ電顕構造 1.29 Å 分解能

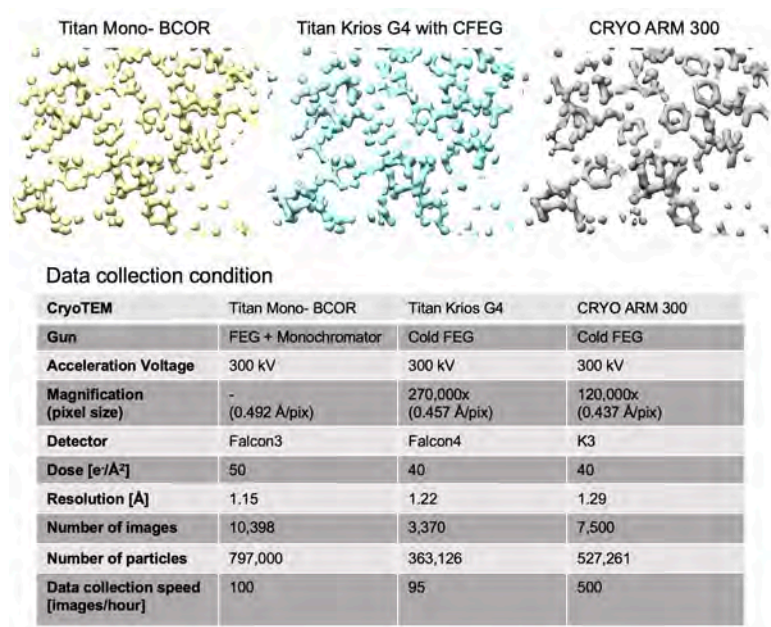


図5 アポフェリチンの構造解析で原子分解能を達成した3つの異なるクライオ電顕の比較。上図は3次元密度マップの一部、下表はクライオ電顕の名称とデータ収集条件。

1. Fujiyoshi, Y., Uyeda, N., Morikawa, K. and Yamagishi H. *J. Mol. Biol.* **172**, 347-354 (1984)
2. Namba, K. and Kato, T. *JEOL News* **53**, 18-24 (2018)
3. Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. and Namba, K. *Nature* **424**, 643-650 (2003)
4. Liao, M., Cao, E., Julius, D. and Cheng, Y. *Nature* **504**, 107-112 (2013)
5. Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. and Julius, D. *Nature* **504**, 113-118 (2013)
6. Namba, K and Makino, F. *Microsc.* **71**(S1), i3-i14 (2022)
7. 牧野文信, 藤田純三, 難波啓一 *顕微鏡* **57**, 101-107 (2022)

シャペロンから解き明かすタンパク質フォールディングと集合の制御メカニズム

Unraveling the regulatory mechanism of protein folding and assembly
by molecular chaperones

徳島大学 先端酵素学研究所 分子生命科学分野

齋 尾 智 英

Tomohide Saio

Division of Molecular Life Science, Institute of Advanced Medical Sciences,
Tokushima University

本研究では、シャペロンについての構造解析、生化学解析などから、シャペロンが機能する普遍原理を解明することを目指している。本発表では、シャペロンによるタンパク質フォールディング制御と、液-液相分離などの分子集合の制御のメカニズム解明を目指した研究について紹介する。また、シャペロンの機能的本質として見出されつつある「遅延制御」についても、そのコンセプトを含めて紹介する。

1. 研究背景

生体内タンパク質の恒常性を保つ上で、シャペロンは様々な場面で機能している（図 1）。シャペロンの機能として最もよく知られたものの一つとして、タンパク質フォールディング制御が挙げられる。フォールディング途上のタンパ

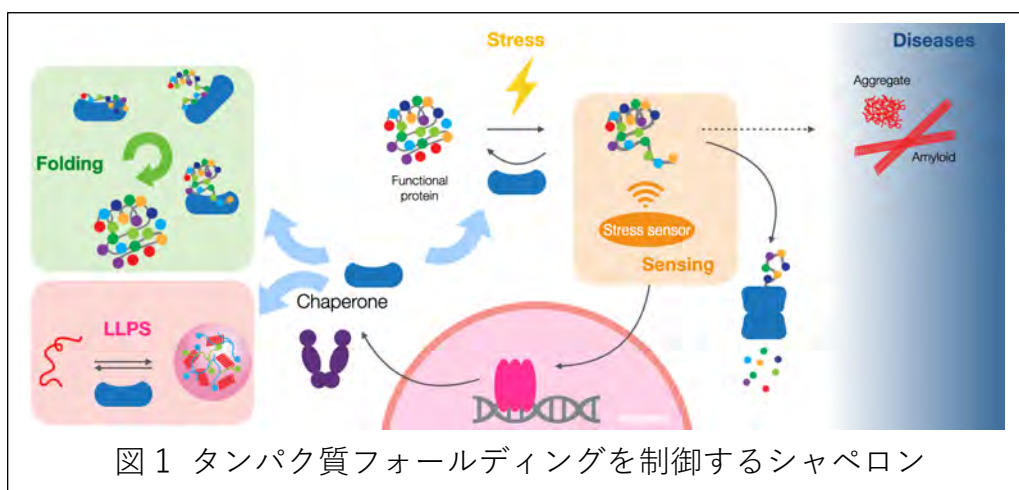
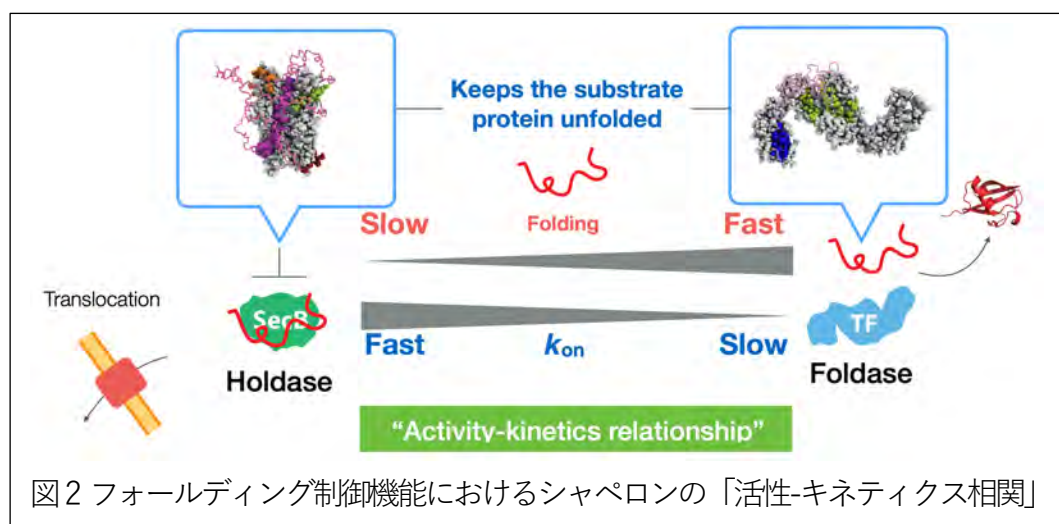


図 1 タンパク質フォールディングを制御するシャペロン

ク質は、疎水性アミノ酸を露出し、凝集リスクの高い状態として存在するが、シャペロンによって疎水性部位が保護され、凝集が抑制されるとともにフォールディングが促進される。また、構造が崩れた変性タンパク質の再生や分解、さらに最近では、機能的集合である液-液相分離においても、シャペロンによる制御が重要であることが明らかになりつつある。このようなシャペロンの機能的な重要性にもかかわらず、シャペロンによる多様な機能についての分子メカニズムは、ほとんど明らかにされていない。シャペロンは多種の基質タンパク質を認識する「プロミスカス結合」を通して機能し、また、その結合は弱く動的である。このようなシャペロンの性質は、基質との複合体についての構造生物学研究を困難にし、メカニズムの理解を妨げてきた。本研究では、溶液中での弱く動的な複合体の解析に優れる溶液 NMR 法を主体とした研究戦略によって、シャペロンの基質認識についての理解を深め、メカニズムを探究してきた。

2. シャペロンによるタンパク質フォールディング制御における「構造-キネティクス相関」

シャペロンはフォールディング途上の変性タンパク質を認識し、そのフォールディングを制御する。フォールディングにおけるシャペロンの機能特性は多様であり、フォールディングを促進する「Foldase シャペロン」もあれば、反対にフォールディングを遅延させる「Holdase シャペロン」もあることが知られている。このような機能的特性がどのようにして発揮されるのかを明らかにするために、変性タンパク質とシャペロンの複合体についての相互作用解析・構造解析を行なった [1, 2]。Foldase シャペロンとして Trigger Factor (TF) シ



シャペロン, Holdase シャペロンとして SecB シャペロンを対象とし, 変性状態の基質として PhoA タンパク質を用いた. 解析の結果, TF, SecB いずれのシャペロンも PhoA の同様の部位を認識し, PhoA を変性状態の伸びた状態に保持することが明らかになった. 一方で, シャペロン-基質複合体は, 常に結合-解離の交換状態にある動的な性質を持つことも明らかになり, このような動的な性質がシャペロンにおける機能特性を理解する鍵であると考えられた. そこで, シャペロン-基質タンパク質間の結合・解離速度を計測すると, holdase である SecB は, foldase である TF と比較して, 基質タンパク質との結合速度が速いことが明らかになった [2, 3]. シャペロンは基質を伸ばした状態で結合する一方, 放出・再結合を繰り返し, 放出された時に基質タンパク質は自発的なフォールディングを進行する機会を当てられると考えられるが, ここで結合速度が速いシャペロンが存在する場合, 放出されてもすぐに再結合してしまうためにフォールディングが進行しない, と説明できる. このように, シャペロンは数多くの基質タンパク質を対象として機能する必要があるために, 基質の認識特性は低く設計されているが, その中でも機能的特性を発揮するために, 結合キネティクスの側面での特徴付けがなされているのではないかと考えられる.

3. シャペロンによる液-液相分離制御と制御破綻の分子メカニズム

天然変性領域を持つ多くのタンパク質について, 弱く動的な相互作用を介した集合による液-液相分離 (相分離) 液滴の形成が発見され, その機能的重要性に注目が集まっている. 多くの相分離液滴は, 刺激に応答して一過的に形成され, 刺激の消失や周囲環境の変化によって解消する [4]. この可逆性を保つ上で, 「相分離シャペロン」が機能していることが次々に明らかにされている (図 3) [5]. 一方

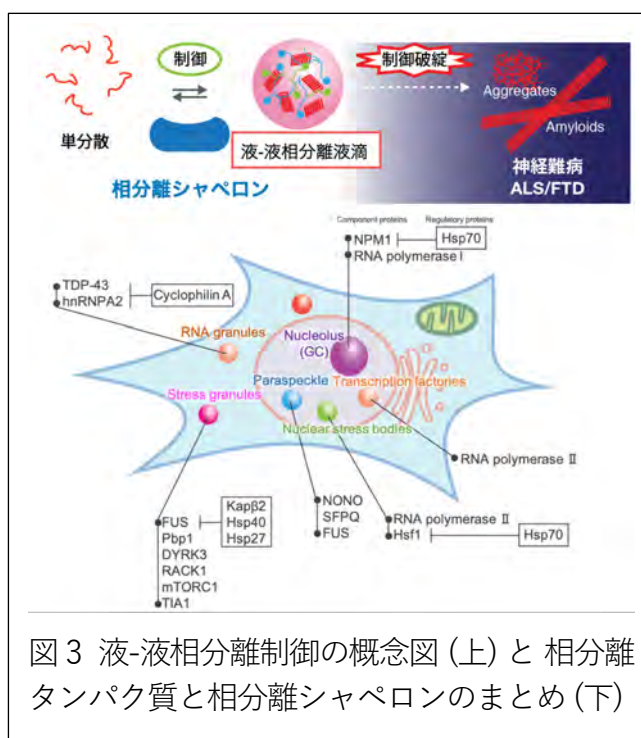
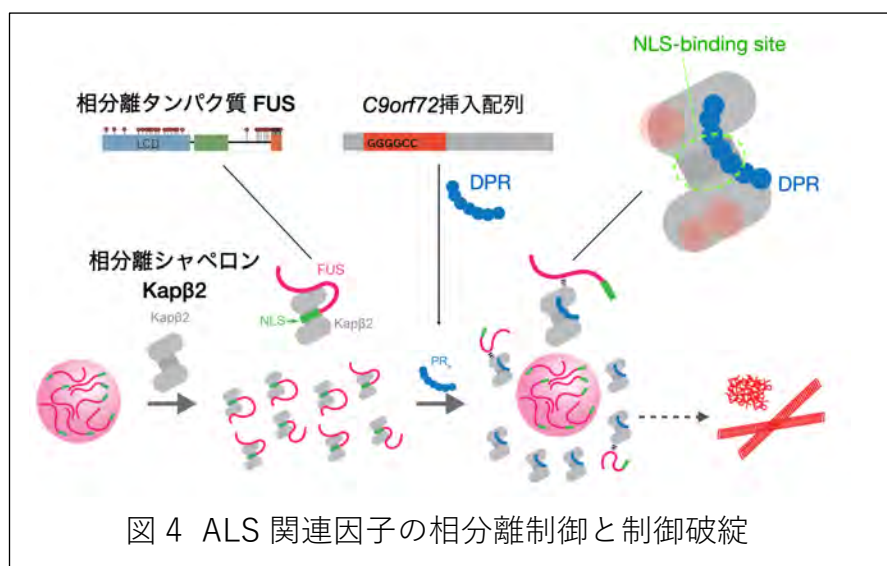


図3 液-液相分離制御の概念図 (上) と 相分離タンパク質と相分離シャペロンのまとめ (下)

で、相分離制御の破綻がタンパク質凝集体やアミロイドの発生源となることが示唆されており、また、神経変性疾患の関連変異が相分離タンパク質の物性を変えることから、相分離制御と制御破綻は、神経変性疾患の分子メカニズム解明の鍵を握るイベントとしても注目されている。

本研究では、ALS 関連の相分離シャペロンである $\text{Kap}\beta 2$ が、ALS 関連変異から産生されるジペプチドリピート (DPR) によって機能不全に陥ることを見出し、そのメカニズム解明に取り組んだ。NMR 相互作用解析や MD シミュレーションによって、DPR が結合する $\text{Kap}\beta 2$ 上の領域を特定し、その情報から、 $\text{Kap}\beta 2$ の相分離シャペロンとしての機能が DPR によってどのように阻害されるのか、という点について明らかにした (図 4) [6]。



1. Structural basis for protein antiaggregation activity of the trigger factor chaperone. Saio T, Guan X, Rossi P, Economou A, Kalodimos CG. *Science* **344** (6184):1250494, 2014.
2. Structural basis for the antifolding activity of a molecular chaperone. Huang C, Rossi P, Saio T, Kalodimos CG. *Nature*, **537** (7619):202-206, 2016.
3. Oligomerization of a molecular chaperone modulates its activity. Saio T, Kawagoe S, Ishimori K, Kalodimos CG. *Elife*, **7**: e35731, 2018.
4. Heat-Induced Conformational Transition Mechanism of Heat Shock Factor 1 Investigated by Tryptophan Probe. Kawagoe S, Kumashiro M, Mabuchi T, Kumeta H, Ishimori K, Saio T. *Biochemistry*. **61**, 2897-2908, 2022.
5. Regulation of Liquid-Liquid Phase Separation by Molecular Chaperones. Kawagoe S, Mori E, Saio T. *Therm. Med.* **37**, 31-44, 2021