



日本学術振興会・产学協力委員会

R022 **量子構造生物学委員会**

第16回 研究会 資料

2024年12月20日 (金)
13:30～17:00

ミーティングスペースAP東京八重洲（東京）

R022 量子構造生物学委員会 第 16 回研究会 プログラム

2024 年 12 月 20 日 (金)

会場：ミーティングスペース AP 東京八重洲
〒104-0031 東京都中央区京橋 1-10-7
KPP 八重洲ビル 12F

13:30 – 13:40

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

講 演

13:40 – 14:40 (講演 1)

司会：委員・吉川雅英（東京大学）

クライオ電子顕微鏡を基軸としたクロススケール計測で
医学・生命科学を解き明かす

神戸大学・大学院医学研究科

仁 田 亮

14:40 – 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）

北大クライオ電子顕微鏡体制とウイルス治療薬・ワクチン開発

北海道大学・大学院薬学研究院／九州大学・大学院薬学研究院

前 仲 勝 実

16:00 – 17:00 (研究交流討論)

委員・講師間の自由討論

クライオ電子顕微鏡を基軸としたクロススケール計測で 医学・生命科学を解き明かす

Unraveling Medical and Biological Questions through Cryo-EM-Based
Cross-Scale Measurements

神戸大学大学院医学研究科 生理学・細胞生物学講座 生体構造解剖学分野

仁 田 亮

Ryo Nitta

Division of Structural Medicine and Anatomy,
Department of Physiology and Cell Biology,
Kobe University Graduate School of Medicine

1. はじめに

分子生物学および構造生物学的解析手法の発展により、*in vitro* で生体分子の構造を原子レベルの分解能で明らかにすることが可能となっている。原子レベルの構造情報と生物物理学的解析および生化学的解析を組み合わせることで、その分子の構造と機能を精密に解明することができる。一方で、細胞生物学および生理学的手法の進展は、細胞内や生体組織内の分子の局在および動態の解析を可能とし、様々な分子が多様な局面で多くの分子と相互作用を行いながら、生体および細胞の営みが遂行されていることが明らかになっている。しかしながら、従来の構造生物学的手法の空間的スケール (0.1 nm～10 nm 程度) と細胞生物学的手法のスケール (500 nm 以上) との間には明白なギャップが存在している。このギャップ (20 nm～500 nm 程度) は、細胞内で分子同士が反応する場のスケールと一致している。そのため、細胞内局所において、生体分子同士がどのように相互作用して細胞の機能を創出し、さらに組織や臓器としての機能へと繋がっているのかを明らかにするための研究技術が長らく存在していなかった。

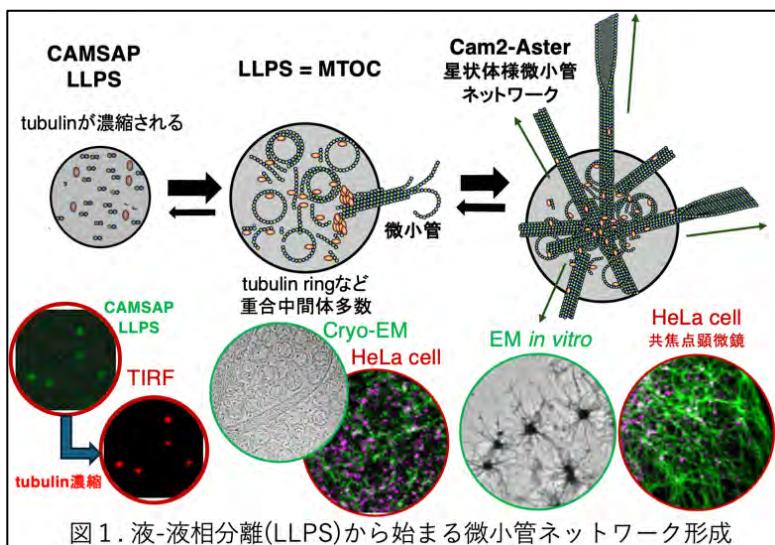
近年、クライオ電子線トモグラフィー、原子間力顕微鏡 AFM、NMR、超解像顕微鏡といった高分解能および高速イメージング技術の発展が著しい。そして、

これらの技術を組み合わせたクロススケール計測により、従来の技術的限界が打破されつつあり、細胞内の反応の場における構造動態を解明し、新たな細胞生物学的フレームワークを創出する可能性が示され始めている。本講演では、クライオ電子顕微鏡を中心としたクロススケール計測を利用した生物・医学的課題の実例を紹介する。

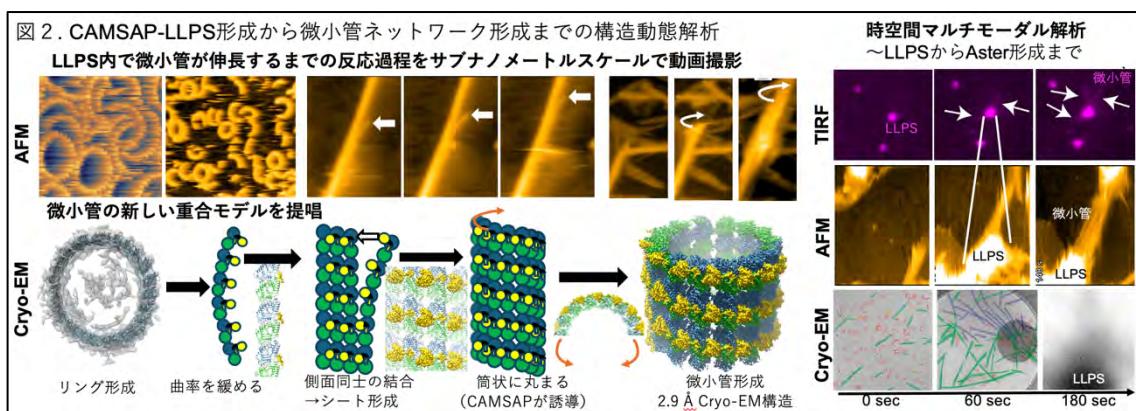
2. CAMSAP タンパク質による微小管ネットワーク形成・細胞極性形成機構

微小管ネットワーク形成は、細胞の形態や極性形成を制御する重要な仕組みである。微小管は、特定の条件下 (tubulin 濃度が臨界濃度 ($25 \mu M$) 以上かつ $37^\circ C$) で自然に重合するが、細胞内では tubulin 濃度が臨界濃度より低いため、自然重合はほとんど起こらない。これには、微小管を形成する初期段階での「核形成」が効率的に進まないことが関係している。細胞内では、この核形成を助ける仕組みとして中心体がよく知られており、 γ -tubulin 複合体が微小管の鋸型となって伸長を誘導している。このような微小管形成の場を「微小管形成中心 (MTOC)」と呼ぶ。しかし、神経細胞、筋細胞、上皮細胞といった極性の高い細胞では、中心体に依存しない非中心体性微小管ネットワークが形成されることが明らかになっている。

非中心体性微小管は、微小管結合タンパク質である CAMSAPs (Calmodulin-Regulated Spectrin Associated Proteins) によって安定化されることが、竹市雅俊博士らによって報告された [1]。そして我々は、CAMSAPs が非中心体性微小管の MTOC として機能することを解明した (図1) [2]。具体的には、CAMSAPs が単独で液一液相分離



(LLPS) を形成し、その内部に tubulin を効率よく取り込み濃縮する。この過程で微小管の重合核が形成され、LLPS から放射状に微小管が伸長する。この構造は、中心体の星状構造に類似しており、「Cam2-Aster」と命名した。さらに、微小管の重合から Cam2-Aster の形成に至る構造動態をクロススケール計測によって明らかにした（図 2）（投稿準備中）。CAMSAP2 が作る LLPS の内部では、まず tubulin が一列に結合してリング状のオリゴマーを形成する。続いて、CAMSAP2 はリングの曲率を緩めてリング同士を相互作用させ、シート状構造を生成する。さらに、CAMSAP2 はシートを管状に丸める働きも持ち、十分に成長すると微小管を形成する。このプロセスによって、LLPS を中心に多数の微小管が放射状に形成される。

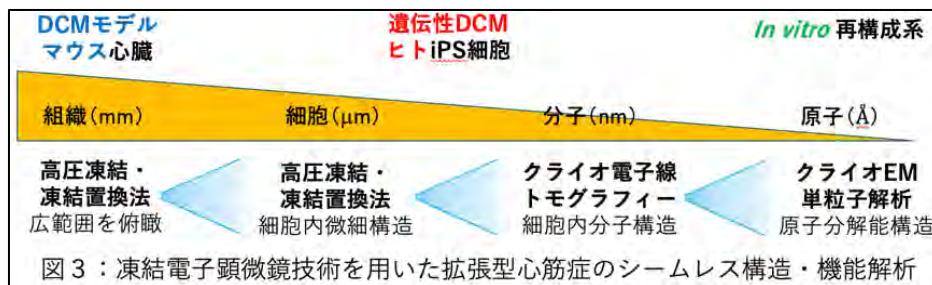


この CAMSAP2 による Aster ネットワーク形成は、HeLa 細胞内でも確認されている（図 1）。また CAMSAP には 1-3 のサブタイプが存在し、それぞれが胎生期からさまざまな臓器で特徴的な微小管ネットワークの形成や細胞の形態・極性形成に中心的な役割を果たしている。特に、心筋細胞の形態形成において、細胞レベルから個体レベルに至る興味深い知見が得られつつあり、その一部も紹介する予定である。

3. 遺伝性拡張型心筋症の分子病理機構の解明

クロススケール技術の医学応用について、遺伝性拡張型心筋症（DCM）の病態解明を目指す研究を紹介する。医学応用のため、①個体・臓器レベルから分子レベルまで、継ぎ目なく構造情報を得ること、また②ヒト試料を用いた解析が必

要となること、の 2 点を念頭に置き、構造解析スキームを構築した（図 3）。試料は、DCM モデルマウスとヒト DCM 患者由来 iPS 心筋細胞を用い、マウス心臓の心筋組織、心筋細胞、細胞内小器官の構造観察は「高圧凍結・凍結置換法」を、ヒト患者由来 iPS 心筋細胞の細胞内小器官、超分子複合体の構造観察は「高圧凍結・凍結置換法」および「クライオ電子線トモグラフィー法」を併用することとした。マウス心臓とヒト iPS 細胞で同様の手法を用いることで、手技的なバリデーションを取ることも企図した構成である。そして、最終的には、異常分子複合体を *in vitro* で再構成し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いて原子分解能で構造解析を行い、創薬開発にもつなげたい。



DCM は、日本の重症心不全による心臓移植症例の半数を占める原因疾患である。特発性および遺伝性に大別されるが、タイチンおよびラミン A/C 遺伝子の変異が、遺伝性 DCM 症例の半数近くを占める。その中でラミン A/C 遺伝子の変異が予後不良であることから、同遺伝子変異による DCM の病態解明に向けたクロススケール構造解析を行った [3]。

ラミン A/C 変異 (Q353R) を導入したヘテロノックインマウス（胎生 17.5 日齢）を用い、拡張型心筋症 (DCM) と同様の病態が再現されることを確認した。その心筋組織を高圧凍結・凍結置換法で電子顕微鏡観察した結果、野生型では整然とした層構造が確認されたのに対し、DCM マウスでは層構造がほとんど見られず、細胞の配列や形態も乱れていた（図 4）。また、野生型ではサルコメアや細胞内小器官が規則正しく配置されていたのに対し、DCM マウスではサルコメアが未熟化し数が減少、小器官は核周囲に偏在していた。さらに、シングルセル RNA シークエンス解析により、心筋細胞の成熟に必要な遺伝子の発現が低下し

ていることが示唆された。

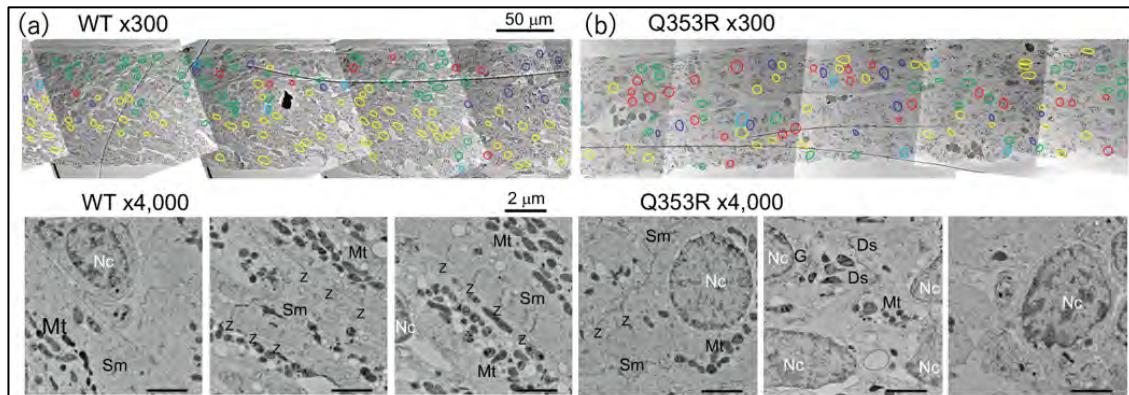


図4：DCMモデルマウス心筋組織の電子顕微鏡像。(a) 野生型マウス。(b) DCMモデルマウス (Q353R 変異)。上段：心筋細胞の配向ごとに色分けしている。野生型では明確な層構造が見られるのに対し、Q353Rでは細胞の向きがバラバラで層構造を認めない。Fb：纖維芽細胞、Ec：血管内皮細胞、Nc：核、Mt：ミトコンドリア、Sm：サルコメア、G：ゴルジ装置、Z：サルコメアのZ帯、Ds：デスマゾーム。

ヒト DCM 患者由来の iPS 心筋細胞でも同様に、高压凍結法による観察を行った結果、核の球形化、サルコメアの減少、小器官配置異常といったマウスモデルでの表現型が再現された（図5）。また、DCM 患者由来 iPS 心筋細胞では、核膜の歪みやヘテロクロマチンの異常集積が確認された。このことから、ラミン A/C 変異がクロマチンリモーリングを引き起こし、遺伝子発現の変化を介して心筋細胞の未熟化を誘導していると考えている。

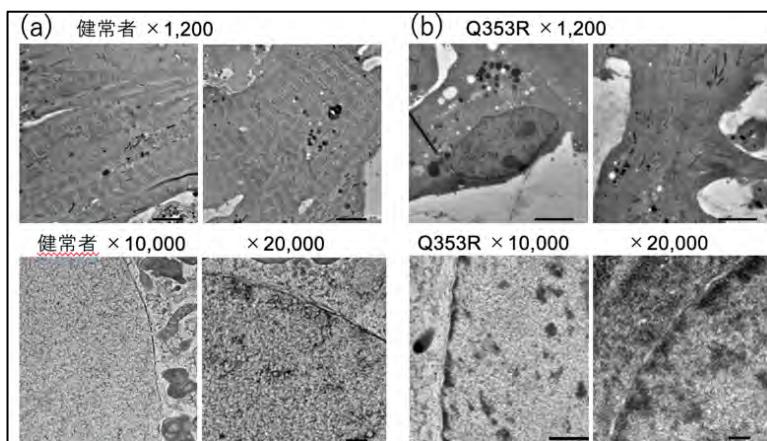


図5：iPS心筋細胞の電子顕微鏡像。
(a) 健常者iPS心筋細胞。 (b) DCM患者由来iPS心筋細胞。

これらの結果より、ラミン A/C 変異による DCM では、心筋細胞の層構造不全や配列異常、未熟化が細胞の収縮力低下と力発生の不整合を引き起こし、心筋

全体の収縮不全に繋がっていることが明らかになった。現在、クライオ電子線トモグラフィー法や *in vitro* 原子分解能構造解析を進め、分子機構の解明および治療薬開発を目指した研究が加速している。

4. おわりに

クロススケール計測技術の 2 つの生物学・医学応用例を紹介した。1 つ目は、中心分子の精細な構造・動態を *in vitro* で解明した後、それを基に細胞内の構造・動態へと繋げる「ボトムアップ」アプローチである。2 つ目は、疾患の表現型を臓器レベルや細胞レベルで再現し、そこから疾患原因に関連する細胞内構造・動態および分子構造異常を調べる「トップダウン」アプローチである。いずれも現在、クライオ電子線トモグラフィー法による細胞内分子構造解析を行っている。クライオ電子線トモグラフィー法は、技術的にはユーザーレベルで可能になってきているものの、スループットの向上、内在性分子を簡便に標識する技術の開発、立体構造を構築した後の画像解釈の最適化など、今後のさらなら技術改良が期待される。また、培養細胞と臓器レベルの細胞を比較してバリデーションを取るだけでなく、個体の中の注目部位における高分解能構造を取得するための新たな技術開発も重要である。

-
1. Meng W, Takeichi* M *et al.*, *Cell* **135**(5):948-59 (2008).
 2. Imasaki T, Nitta R* *et al.*, *eLife* **11**: e77365. doi: 10.7554/eLife.77365 (2022).
 3. Yamada S, Nitta R* *et al.*, *Sci. Adv.* **9**: eade7047. doi: 10.1126/sciadv.ade7047 (2023).

北大クライオ電子顕微鏡体制とウイルス治療薬・ワクチン開発

Hokkaido University Cryo-Electron Microscopy Facility and
Development of Viral Therapeutics and Vaccines

北海道大学 大学院薬学研究院
九州大学 大学院薬学研究院

前 仲 勝 実

Katsumi Maenaka

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 は、全世界で深刻な脅威となった新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を引き起こしました。これに対応するため、世界各国で驚異的なスピードでワクチンや治療薬の開発が進められてきました。有効な中和抗体が開発されてきましたが、オミクロン株、さらにその亜種が次々と出現し、多くの中和抗体がウイルスの侵入を抑えることができなくなっています。そこで、変異ウイルスの構造的特徴を理解するために、大きな役割を果たしているのがクライオ電子顕微鏡です。北海道大学薬学研究院創薬科学研究教育センターでは、クライオ電顕解析を基盤とする統合的な創薬開発体制を構築してきました。本センターでは、G2P Japan (東京大学・佐藤佳教授を中心とする SARS-CoV-2 研究のコンソーシアム) および JX-Vir (京都大学橋口隆生教授、野田岳志教授、前仲のウイルス構造解析のコンソーシアム) のメンバーとしてオールジャパンの連携体制の中で、すでに複数のオミクロン亜種のスパイクタンパク質の構造を迅速に決定して来ています [1, 2, 3]。さらに、国立感染症研究所、京都大学、および富山大学と連携し、オミクロン亜種を含めた変異ウイルスに対しても有効な中和抗体の構造解析にも成功しています [4, 5, 6]。SARS-CoV-2 中和抗体は、ウイルス表面にあるスパイク蛋白質を認識し、ウイルスの細胞侵入を抑えます。中和抗体の認識部位を構造の観点から解明することは抗

体の変異ウイルスに対する有効性や臨床応用への判断基準に重要な指針を与えます。以下に我々が取り組んできた3つの抗体シリーズに関して詳細を取り上げます。

最初は、国立感染研・高橋グループと京大・橋口グループと連携して解析を進めた抗体 NT-193 を紹介します。NT-193 は SARS-CoV-2 ancestral に対する高い中和活性を持ち、SARS-CoV との交差反応性も示します。NT-193 の Fab とスパイク蛋白質の受容体結合ドメインとの複合体の X 線結晶構造解析の結果から、NT-193 の軽鎖は受容体 ACE2 と似た様式で結合し、重鎖は、保存性の高い3量体界面の領域を認識していることがわかりました [4]。次に、富山大学の小澤グループが開発した UT28K 抗体の X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡解析の結果を取り上げます [5]。オミクロン BA.1 まで中和活性を有する UT28K 抗体は、486 番近傍の保存度の高いスーパー部位を認識することで、広く変異ウイルスにも有効であることがわかりました。さらに、国立感染症研・高橋グループが開発した NIV-13 抗体ではオミクロン株 BA.2 にも有効であり、その立体構造は UK28K 抗体と同様にスーパー部位のさらに狭い部分を認識していました [6]。しかし、486 番に変異が入った BA.5 には有効ではなくなりました。他方、BA.5 にも有効な NIV-10 抗体は、スーパー部位を含むより広い範囲を認識し、486 部位を緩やかに認識し、変異を許容できることがわかりました。これらの結果から広域中和抗体の開発にはウイルス感染の脆弱性部位をエピトープとして狙うことが重要である一方で、その限界があることが明白となりました。今後の広域中和抗体の開発に必要なポイントを整理しながら、その展望を議論したいと思います。

次に、人獣共通感染症国際共同研究所と連携して、AMED-BINDS 事業の支援を受け、ハイエンドの BSL3 (バイオセイフティーレベル3) クライオ電子顕微鏡を導入しました。SARS-CoV-2 に対するワクチン設計・中和抗体の合理的開発のため、実際に活性のある状態でウイルスを観察する必要があるためです。ハイエンド BSL3 クライオ電子顕微鏡を立ち上げ、世界初の活性のある状態の SARS-CoV-2 の観察に取り組んでいます [7]。観察された動きのある構造は

BA.2.86 のスパイク蛋白質のクライオ電顕解析からもサポートするデータがで
きています [8]。

以上のように、本講演では、北海道大学大学院薬学研究院創薬科学研究教育セ
ンターでのクライオ電子顕微鏡を利用した感染症研究の実施体制を紹介し、
SARS-CoV-2 を含む広域感染症治療薬候補の同定 [9, 10] にも触れながら、将来
起こりうるパンデミックを見据えた、今後の構造解析を基盤とする感染症治療
薬開発の展望について考えたいと思います。

-
1. Saito *et al.*, *Cell Host Microbe*, **30**(11):1540-1555.e15. (2022).
 2. Tamura *et al.*, *Nat. Commun.*, **14**(1):2800 (2023).
 3. Tamura *et al.*, *Nat. Commun.*, **15**(1):1176 (2024).
 4. T Onodera *et al.*, *Immunity*, **54**, 2385-2398 (2021).
 5. Ozawa *et al.*, *MAbs*, **14**(1):2072455 (2022).
 6. Moriyama *et al.*, *Nat. Commun.*, **14**(1):4198 (2023).
 7. Fukuhara *et al.*, *bioRxiv* (2023). doi.org/10.1101/2023.10.10.561643.
 8. Yajima *et al.*, *Nat. Commun.*, **15**(1):8574 (2024).
 9. Uemura *et al.*, *iScience*, **24**, 103120 (2021).
 10. Uemura *et al.*, *PNAS*, **120**(42): e2304139120 (2023).