



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17回 研究会 資料

2025年2月27日（木）
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 17 回研究会 プログラム

2025 年 2 月 27 日 (木)

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

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：運営委員・玉田太郎（量子科学技術研究開発機構）

膜タンパク質の構造ダイナミクスの解明に向けた複合的構造生物学

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科
禾 晃 和

14:35 – 15:00 休 憩

15:00 – 16:00 （講演 2）

司会：委員長・三木邦夫（京都大学）

放射光を利用したタンパク質の構造解析

大阪大学・蛋白質研究所
中 川 敦 史

16:00 – 16:10

おわりに

委員長・三木邦夫（京都大学）
副委員長・中川敦史（大阪大学）

16:10 – 17:00 （研究交流討論）

委員・講師間の自由討論

膜タンパク質の構造ダイナミクスの解明に向けた複合的構造生物学

Hybrid Structural Biology for the Elucidation of Structural Dynamics of Membrane Proteins

横浜市立大学大学院生命医科学研究科

禾 晃 和

Terukazu NOGI

Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University

1. はじめに

分子認識と構造変化は、タンパク質の機能調節において中心的な位置を占める。特にマルチドメインタンパク質は、ドメイン間の相対配置を大きく変えるようなコンフォメーション変化を起こすことで、基質やリガンドの認識モードを変化させて、酵素反応やシグナル伝達の効率を調節している。機械学習による構造予測の登場以降、タンパク質の三次構造を知ることは容易になった一方で、コンフォメーション変化の予測は未だ難しい。また、ドメインの配置を変化させるような大規模な構造変化は、マイクロ秒を超えるタイムスケールで起きる現象であるため、分子動力学計算によって再現することも容易ではない。したがって、コンフォメーション変化のモードを理解し、機能発現に重要な準安定状態の構造情報を得るためには、構造変化のスケールに適した実験手法による構造ダイナミクスの解析が必要不可欠である。本講演では、構造予測や分子動力学計算では追跡が困難なコンフォメーション変化によって機能調節を行うタンパク質を対象とした複合的アプローチによる構造生物学的研究の事例を紹介する。

2. 膜内切断プロテアーゼ RseP による基質選別と取り込みの分子機構

脂質二重層内部においてペプチド結合が加水分解を受ける「膜内タンパク質切断」を触媒する膜内切断プロテアーゼは、古細菌から細菌、真核生物に至るま

で広く生物界に存在する [1]。その中で、特に基質の膜貫通配列を切断するものは、触媒機構の違いによって Site-2 protease (S2P)、Presenilin/Signal peptide peptidase (SPP)、Rhomboid の 3 つファミリーに分類される。これらの膜内切断プロテアーゼの多くは、膜に繫留された転写因子や分泌タンパク質の前駆体を切断し活性化することから、膜内タンパク質切断はシグナル伝達の一形態であると考えられている。さらに、膜内切断プロテアーゼは、膜に蓄積する細胞にとって不要なポリペプチド鎖を切断・除去することで膜の恒常性の維持にも関わる。膜内タンパク質切断は、タンパク質分解システムとして出現した後、特定のタンパク質を制御のもとに切断する仕組みを獲得することで、シグナル伝達にも関わるようになったと考えられる。

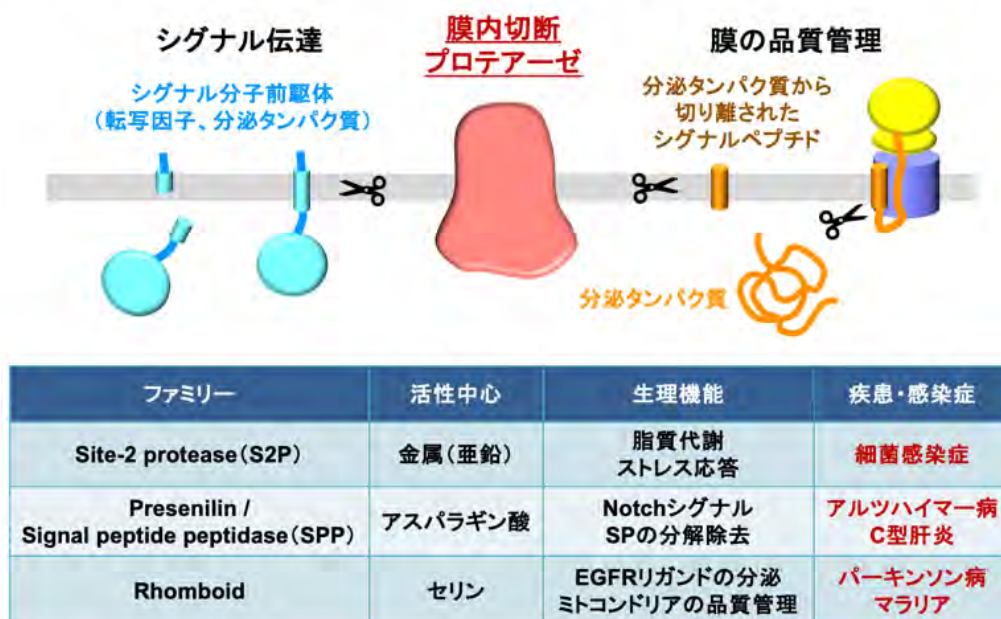


図 1. 膜内切断プロテアーゼの生理機能と疾患・感染症との関連

膜内切断プロテアーゼは、医学的観点からも重要な研究対象であり、アルツハイマー病やパーキンソン病等の疾患に関わるだけでなく、細菌、ウイルス、原虫など、多種多様な病原体による感染症の鍵分子でもある (図 1)。特に、S2P のホモログは、病原性細菌において感染の成立や薬剤耐性の獲得に関わることが報告されている [2]。したがって、膜内切断プロテアーゼの阻害剤は感染症治療

への応用が期待されてきたが、臨床応用可能な阻害剤を開発するには活性阻害の選択性の問題を解決しなければならない。病原性細菌 S2P の阻害剤を医薬品として用いるには、病原体酵素のみ阻害し宿主酵素は阻害しない、生物種選択性が必要とされる。そのような選択性の高い阻害剤を設計していく上では、細菌由来 S2P 特有の基質選別や切断制御の分子機構を理解することが重要となる。

以上の背景のもと、我々は、膜内切断プロテアーゼの中でも最も系統的に生化学的機能解析が行われてきた細菌由来の RseP に着目して構造解析に取り組んできた [3]。S2P ファミリーに属する RseP は、大腸菌における細胞表層ストレス応答のシグナル伝達で同定された膜内金属プロテアーゼである。RseP には多数の生理的基質が同定されており、鉄代謝を制御する転写因子調節タンパク質や、分泌タンパク質から切り離されたシグナルペプチドも切断される。さらに、大腸菌の内在性毒素 HokB を切断することで細胞毒性を抑制することも示され、HokB が誘導するパーシスターからの覚醒に関与することも示唆されている。

我々は、RseP の構造機能解析を展開してきた中で、競合阻害剤である Batimastat と結合した大腸菌 RseP (*EcRseP*) と海洋性細菌 *Kangiella koreensis* の RseP オルソログ (*KkRseP*) の X 線結晶構造を決定した [4]。*EcRseP* と *KkRseP* はいずれも 4 回膜貫通型タンパク質であり、TM1 から TM3 が亜鉛結合配列を有する触媒コアを形成している。また、ペリプラズム側には 2 つの PDZ ドメインが連なった PDZ タンデムに加え、膜表在性ヘリックスからなる PCT 領域がある。細胞質側には、細胞内膜のタンパク質としては珍しく、膜に埋もれた β -シート (MRE β -シート) がある。*EcRseP* と *KkRseP* のドメイン構成は同じで、個々のドメインの構造はよく一致していたが、それらの配置は大きく異なっていた。*EcRseP* では活性中心が PCT 領域と TM4 によって取り囲まれていた一方で、*KkRseP* では配置が変化して活性中心が露出していた。我々は、化学修飾実験や架橋実験による検証を行うことで、PCT 領域と TM4 が基質取り込みの過程で構造変化するゲートとして機能するというモデルを提唱した。また、構造決定以前に行われた生化学的解析から、基質の切断部位がストランドを形成して MRE β シートと主鎖間で相互作用するというモデルが提唱されていたが、ペ

プチド様の骨格をもつ Bastimastat の結合様式は、このモデルと合致するものであった。さらに、ホモログ間で高度に保存された TM3 上の Asn 残基が、MRE β の反対側からクランプのように Batimastat を固定していることも分かった。この Asn 残基への変異は、基質の切断効率を大きく低下させたことから、基質も同様に Asn 残基によって固定されて切断を受けることが示唆された。

さらに、我々は、クライオ電子顕微鏡単粒子解析にも着手し、超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来のオルソログ (*AaRseP*) について、基質結合状態の立体構造を報告した [5]。この構造では、基質膜タンパク質は、ゲートとしてはたらく PCT 領域によって脂質二重層から隔離された空洞に取り込まれていた。脂質二重層を貫通し、側方拡散によって RseP に近づく基質が、どうやってこの隔離された空洞に入り込むのかは不明であるが、基質の解離を抑制し、切断を促進するという観点では合理的な基質結合状態であると言える。

本講演では、これまでの構造解析の試行錯誤について紹介するとともに、切断制御モデルの詳細について解説する (図 2)。さらに、基質取り込みゲートを標的とした選択的阻害剤の設計の可能性についても議論する。

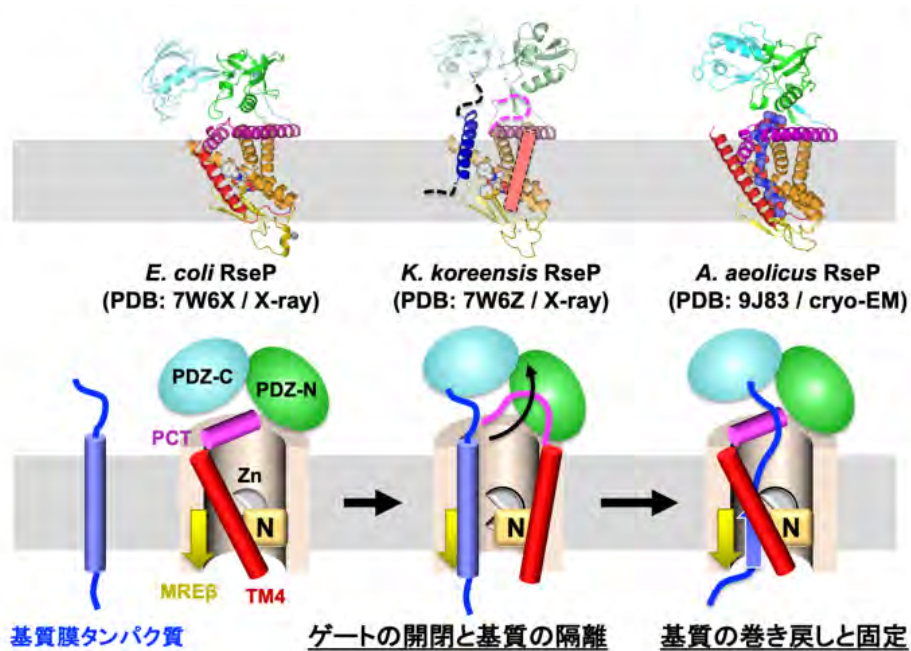


図 2. 実験構造に基づく RseP による基質取り込みと切断のモデル

3. LDL 受容体とリガンドの pH 依存的な結合と解離の分子機構

肝臓等で作られるコレステロールは、リン脂質などともにアポリポタンパク質 B-100 (Apolipoprotein B-100: ApoB-100) に取り囲まれて低密度リポタンパク質 (Low-density lipoprotein: LDL) を形成し、血液中を運搬される。末梢組織へと輸送された LDL 粒子は、細胞表面に発現する LDL 受容体 (LDLR) と複合体を形成し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。エンドソームに運ばれた LDLR は、LDL と解離して細胞表面へと戻される一方、LDL はリソソームへと運ばれて分解される。LDLR による LDL の細胞内への取り込みが正常に行われることは血中コレステロール濃度の維持に重要であり、遺伝的に LDLR や関連因子に異常がある家族性高コレステロール血症 (Familial hypercholesterolemia: FH) では、若年時からコレステロール濃度が高い値を示し、動脈硬化などの循環器疾患が引き起こされる [6]。

LDLR の細胞外領域は、リガンド結合ドメイン (LBD) と EGF 前駆体様ドメイン (EGFPHD) から構成される。LDLR 細胞外領域の全長構造は X 線結晶解析によって複数の条件で決定されており、それらの構造比較から、LDLR 細胞外領域は、pH 依存的にコンフォメーション変化することで、LDL との結合と解離を調節するというモデルが提唱された。pH が中性条件で調節因子と共結晶化された LDLR は、分子全体が伸びて LBD が露出した (Extended-open) コンフォメーションをとっていた一方 [7]、酸性条件下で結晶化された LDLR は、分子全体が縮んだ構造をとり、LBD が EGFPHD と分子内で相互作用して閉じた (Contracted-closed) コンフォメーションをとっていた [8]。これにより、中性環境の細胞表面では LDL と結合が可能となる一方、酸性環境のエンドソームでは LDL が解離するというモデルが立てられた。その後、我々は、LDLR のホモログであるアポリポタンパク質 E 受容体 2 (Apolipoprotein E receptor 2: ApoER2) について、リガンド複合体の X 線結晶構造を決定した [9]。この複合体構造では、ApoER2 が縮んではいるが LBD が露出した (Contracted-open) コンフォメーションでリガンドと結合していた。さらにごく最近、LDLR と LDL の複合体のクライオ電顕構造も報告され、LDLR が伸びて開いた (Extended-

open) コンフォメーションで LDL と結合することが示された [10]。これらの新たに決定された立体構造を考慮すると、細胞表面において伸び縮みしながらリガンドを捕捉する LDLR や ApoER2 は、エンドソームでは縮んで閉じた構造に変化してリガンドを解離すると考えられるが (図 3)、pH 依存的なコンフォメーション変化が起きることを構造生物学手法によって観測した研究例はなかった。そこで、我々は、分子の形状と動きをリアルタイムで計測することができる高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)を用いた動的構造解析に取り組んだ。

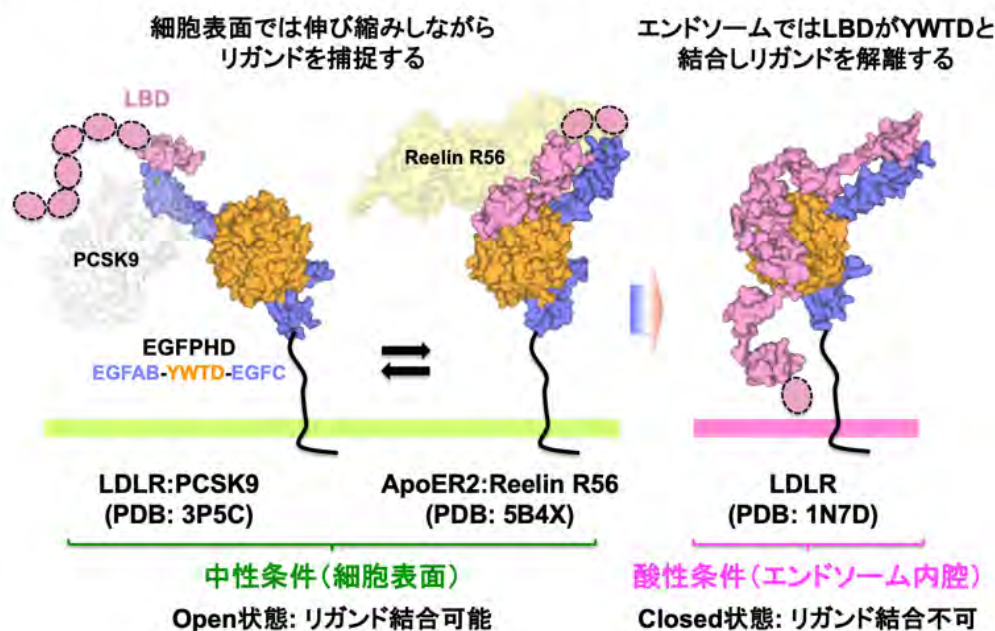


図 3. LDLR ファミリーにおける pH 依存的なリガンド結合と解離の調節

我々は、LDLR の動的性質や構造変化を定性的かつ定量的に解析するため、HS-AFM 測定において、試料の表面の凹凸情報からリアルタイムで構造情報を取得する「イメージングモード」と、分子と探針の間にかかる力を測定する「Force map 解析モード」(図 4) の 2 つの手法を用いた。その結果、中性条件では大きく広がって高い運動性を示す LDLR が、酸性条件ではコンパクトにまとまり運動性も低下することがイメージングによって明らかになった。さらに、Force map 解析を行ったところ、中性条件と酸性条件に間で分子構造が壊れる

Breakthrough event が起きる頻度に有意な差が見られた。変異体を用いた測定によって、分子内相互作用の形成と Breakthrough event の出現に相関が見られたことから、Breakthrough event の頻度を計測することで、“閉じたコンフォメーション”の形成を評価できる可能性が示された。本講演では、特に Force map 解析による構造変化の検証の詳細について解説する。

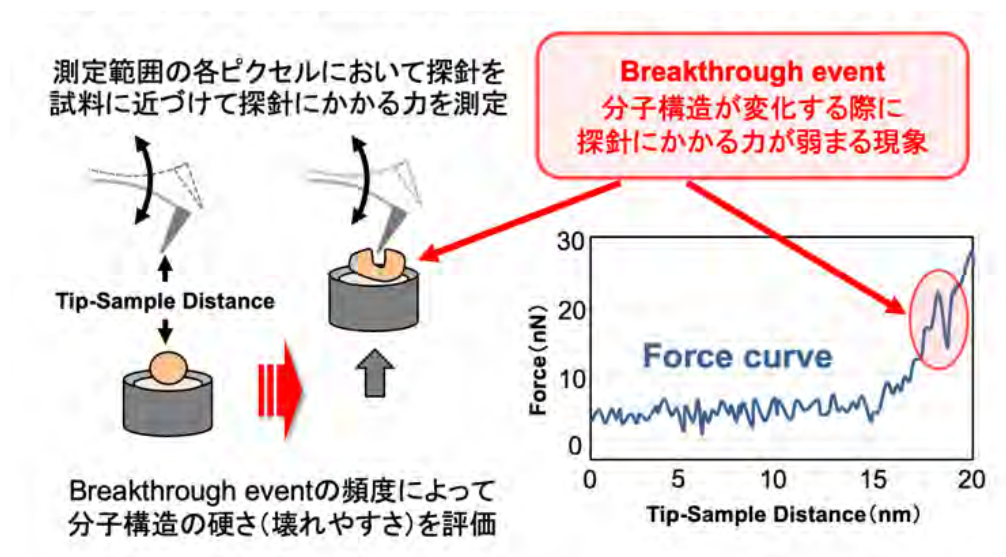


図4. 高速 AFM を用いた Force map 解析による力学的性質の評価

-
1. Brown *et al.*, *Cell*, **100**(4): 391-398 (2000).
 2. Kristensen *et al.*, *MicroLife*, **4**: uqad025 (2023).
 3. Hizukuri *et al.*, *Methods Enzymol*, **584**: 1-33 (2017).
 4. Imaizumi *et al.*, *Sci Adv*, **8**(34): eabp9011 (2022).
 5. Asahi *et al.*, *Sci Adv*, **11**(9): eadu0925 (2025).
 6. Brown *et al.*, *Science*, **232**(4746): 34-47 (1986).
 7. Lo Surdo *et al.*, *EMBO rep*, **12**(12): 1300-1305 (2011).
 8. Rudenko *et al.*, *Science*, **298**(5602): 2353-2358 (2002).
 9. Hirai *et al.*, *EMBO rep*, **18**(6): 982-999 (2017).
 10. Reimund *et al.*, *Nature*, doi: 10.1038/s41586-024-08223-0.

放射光を利用したタンパク質の構造解析

Structure Determination of Proteins Using Synchrotron Radiation

大阪大学 蛋白質研究所

中 川 敦 史

Atsushi NAKAGAWA

Institute for Protein Research, Osaka University

1. はじめに

放射光は発散角が小さく輝度の高い白色光源である。この性質を利用して、微小な結晶からの回折強度データを高精度かつ短時間で測定することを可能とし、また異常分散効果を有効に利用できることから、現在のタンパク質 X 線結晶構造解析において放射光の利用は不可欠なものとなっている。

2024 年に PDB で公開された X 線結晶構造解析による構造のうち、放射光を利用したものは約 93%、実験室系の X 線回折装置を使ったものが 6%、X 線自由電子レーザーを利用したものが 1%であった。R022 量子構造生物学委員会には SPring-8, Photon Factory (PF) という我が国における 2 つの放射光施設のタンパク質結晶構造解析ビームラインを牽引しているメンバーが参画しており、また本委員会が主催するこれまでの研究会の講演でも放射光を使った構造生物学研究が数多く紹介されてきた。

2. 高精度データ収集

修士課程の学生として大阪大学蛋白質研究所で安岡則武先生の指導の下でタンパク質結晶学を学びはじめた当時は、タンパク質の構造解析には 1mm^3 くらいの大さの結晶が必要だと言われ、強力な X 線発生装置と言われていたリガク RU-300 X 線発生装置と四軸自動回折計 AFC-5 を利用して 1 つのデータセットを収集するのに数日間（ほぼ 1 週間）を要していた。その後 PF において坂部

知平先生のグループで渡邊信久さんらと共に BL-6A, BL-18B に立ち上げた巨大分子用ワイセンベルグカメラとイメージングプレート (IP) を組み合わせたデータ収集システムでは、1 日に 10 セット程度のデータセットを収集することが可能となった [1,2]. このシステムは、IP の交換は人手で、読み取りはオフラインの IP 読み取り装置 (FUJI FILM 社 BA100/BAS2000, 後期はリガク社 IPR4080) で行うものであり、IP の読み取り時間は律速にならないが、(場合によっては徹夜で) 数分おきに IP の交換作業を行わなければならないため、負担は大きかった。しかし当時としては放射光の特長を最大限に活かすことができるということで、国内のみならず多くの海外ユーザーによって利用された。

その後、BL-6B にマックサイエンス社によるオンライン式 IP 検出器 Galaxy が設置されユーザーの負担は大きく軽減したが、この 20 数年の間に CCD さらにはピクセルアレイ検出器が登場し、読み取り時間、検出感度、精度などが飛躍的に向上し、現在では IP を利用することはなくなった。ワイセンベルグ法の特長は完全反射の割合を増やすことで、誤差の出やすい部分反射を無視することができるようになることであるが、一方でバックグラウンドが高くなるというデメリットがある。リアルタイムでの読み出しも可能な二次元検出器の利用とともに、機械精度、検出器の感度・精度、反射強度の見積もり法の改良等により、現在では Fine Slice 法が主流となっている。



図 1. PF に設置された巨大分子用ワイセンベルグカメラと
イメージプレート読み取り装置

電子直接検出器の登場と画像再構成法の開発・高度化によるクライオ電子顕微鏡による単粒子解析法の高分解能化（いわゆる Resolution Revolution）以前は、X線結晶構造解析が原子レベルでの構造決定を直接的に行える唯一の方法であった。蛋白質研究所では、月原富武先生の尽力により SPring-8 に専用ビームライン（BL44XU）が設置され、ウイルスなどの巨大な生体超分子複合体結晶や回折強度の弱い膜タンパク質結晶などからの回折強度データを高い精度で測定することを目指し、いろいろな外部資金による援助を受けながら、維持・高度化を続けている [3-6] (図 2)。現在のシステムでは、計算上はボタン 1 つで格子定数 2000Å の結晶の 3.5Å 分解能のデータを収集することが可能であり、格子定数が 600Å を越える結晶からのデータ収集も行われている [7]。

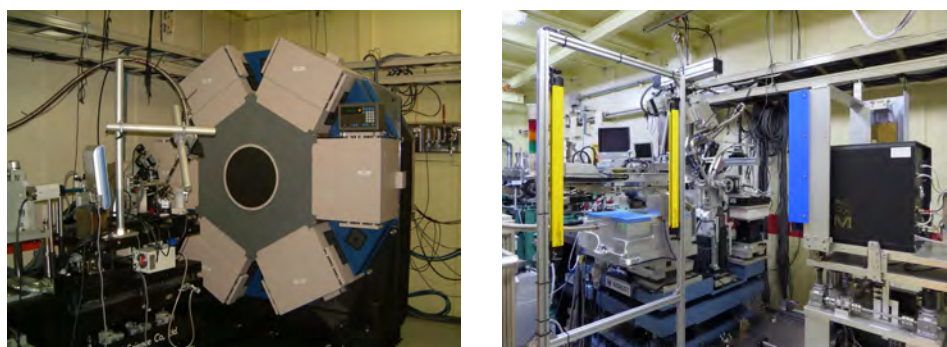


図 2. SPring-8 の蛋白研ビームライン (BL44XU)
(左: DIP6040, 右: 現在のシステム)

3. 異常分散の利用

異常分散効果を位相決定に適用するということは古くから提案されて来ており [8,9], また, 特性 X 線を利用した位相決定も報告されてはいたが [10,11], 1980 年代に入り, PF などの第 2 世代放射光施設において波長選択性のある放射光の利用が汎用的に利用できるようになってタンパク質の構造解析に広く利用されるようになった。

私も, PF 着任後に, 修士課程のテーマとしていた硫酸還元菌の代謝系で働く電子伝達タンパク質シトクロム *c*-553 の構造解析を引き続いて進めさせて頂くことができたので, ヘム鉄の異常分散を利用した多波長異常分散法による構造

解析を博士論文のテーマとして、業務としては巨大分子用ワイセンベルグカメラと IP を利用した高精度なデータ収集系の構築と多波長異常分散法(MAD 法)のための波長選択システムの立ち上げを進めた。シトクロム *c*-553 の構造解析については、Basic Blue Copper Protein [12], Ribonuclease H [13] に続く多波長異常分散法の新規のタンパク質の構造解析への適用例の 3 例目として報告することができた [14] (図 3)。

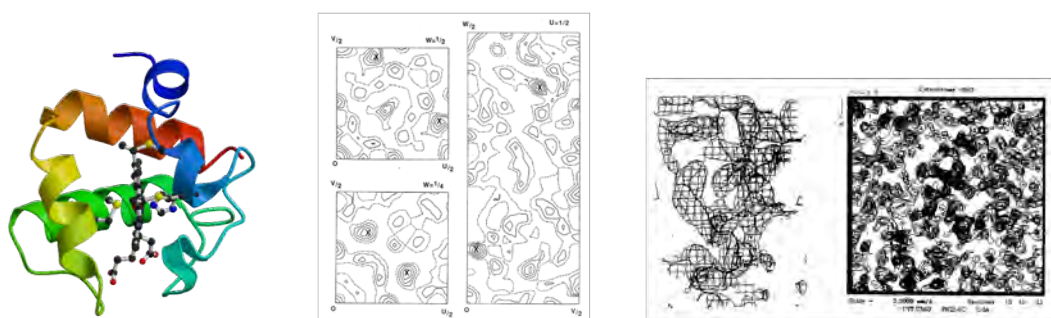


図 3. 硫酸還元菌シトクロム *c*-553 の構造解析
(左：構造，中央：Bijvoet difference Patterson map (1.04Å)，右：電子密度図)

その後、北海道大学の田中勲教授のグループとセレノメチオニンを導入した組換えタンパク質の多波長異常分散法 (Se-MAD 法) による構造解析による共同研究を開始した。一方、1994 年から 1 年間、日本学術振興会特定国派遣研究者として英国 MRC 分子生物学研究所において Philip R. Evans 博士のグループで結晶学を学ぶ機会を得ることができ、MIR/MAD 法と multiple crystal symmetry averaging による位相改良法を組み合わせることで methylmalonyl-coenzyme A mutase の構造解析に協力することができた [15]。1995 年に帰国後に、北大・田中研に異動し、鈴木守博士らが作製した結晶を用い、国内としては初めての Se-MAD 法による構造解析に成功した [16]。北大・田中研在任中には、リボソームタンパク質 S7 [17], L2 [18], MRP8 [19], 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase [20] などを MAD 法で構造決定することができた。

4. 生体超分子複合体の構造解析

1999 年に蛋白質研究所に戻り, 山本雅貴さんを始めとする多くの SPring-8 関係者の方の協力を得ながら山下栄樹さんが立ち上げを進めていた SPring-8 の蛋白研ビームラインの建設・管理運営に携わりながら, イネ萎縮ウイルス [21-24] や超好熱菌由来ウイルス様粒子 PfV [25] を始めとした生体超分子複合体の X 線結晶構造解析を行った. 現在であればクライオ電子顕微鏡による単粒子解析でこれらの構造解析も短時間に行うことができるが, 当時は限られた計算資源を有効に利用しながら, 多くの時間をかけて構造解析を進めなければならなかった.

5. 電位依存性ホスファターゼ VSP (in progress)

現在のメインテーマの 1 つとして, 電位依存性ホスファターゼ VSP の構造生物学研究を進めている. 電位依存性ホスファターゼ VSP は, N 末端側に電位センサー領域を, C 末端側に酵素領域を持ち, 膜電位に応答して脱リン酸化活性が制御される膜タンパク質であり, 膜電位という電気信号を酵素活性の制御という化学信号に変える, 生物における電気信号の新たな役割を示す重要な分子である [26]. この VSP の電位依存的な構造変化を捉え, VSP が電気信号を化学信号に変える動作機構の理解を目指す研究を進めている. また, VSP の酵素領域はガン抑制遺伝子 PTEN と高い相同性を有しており, VSP の基質認識機構・反応機構を参考にすることで, 未だに基質複合体の構造決定がなされていない PTEN の基質認識機構や代謝物との相互作用機構を理解し, ガン進展のメカニズムの原子レベルでの理解や, これまでにないガン治療法の開発など, 新たな研究の発展の基礎データを得る事も期待できると考えている.

1. N. Sakabe, K. Sakabe, T. Higashi *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **A49**, 12 (1993).
2. N. Sakabe, S. Ikemizu, K. Sakabe *et al.*, *Rev. Sci. Instrum.*, **66**, 1276 (1995).
3. E. Yamashita, M. Yamamoto, A. Nakagawa *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **A58**, C288 (2002).

4. M. Yoshimura, E. Yamashita, M. Suzuki *et al.*, *AIP Conf. Proc.*, **879**, 1916 (2007).
5. A. Higashiura, E. Yamashita, M. Yoshimura *et al.*, *AIP Conf. Proc.*, **1741**, 0030028 (2016).
6. E. Yamashita, A. Nakagawa, *Biophys. Rev.*, **11**, 521 (2019).
7. H. Tanaka, K. Kato, E. Yamashita *et al.*, *Science*, **323**, 384 (2009).
8. J. M. Bijvoet, *Proc. Acad. Sci. Amst.*, **B52**, 313 (1949).
9. Y. Okaya, R. Pepinsky, *Phys. Rev.*, **103**, 1645 (1956).
10. W. A. Hendrickson, M. M. Teeter, *Nature*, **290**, 107 (1981).
11. K. Fukuyama, Y. Nagahara, T. Tsukihara *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **199**, 183 (1988).
12. J. M. Guss, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley *et al.*, *Science*, **241**, 806 (1988).
13. W. Yang, W. A. Hendrickson, R. J. Crouch *et al.*, *Science*, **249**, 1398 (1990).
14. A. Nakagawa, Y. Higuchi, N. Yasuoka *et al.*, *J. Biochem.*, **108**, 701 (1990).
15. F. Mancia, N. H. Keep, A. Nakagawa *et al.*, *Structure*, **4**, 339 (1996).
16. M. Suzuki, H. Sugimoto, A. Nakagawa *et al.*, *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 259 (1996).
17. H. Hosaka, A. Nakagawa, I. Tanaka *et al.*, *Structure*, **5**, 1199 (1997).
18. A. Nakagawa, T. Nakashima, M. Taniguchi *et al.*, *EMBO J.*, **18**, 1459 (1999).
19. K. Ishikawa, A. Nakagawa, I. Tanaka *et al.*, *Acta Crystallogr.*, **D56**, 559 (2000).
20. M. Yao, T. Ose, H. Sugimoto *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 34557 (2000).
21. A. Nakagawa, N. Miyazaki, J. Taka *et al.*, *Structure*, **11**, 1227 (2003).
22. F. Akita, A. Higashiura, T. Shimizu *et al.*, *J. Virol.*, **86**, 746 (2012).
23. A. Nakagawa, N. Miyazaki, A. Higashiura, *Biophys. Rev.*, **10**, 659 (2018).
24. Y. Nakamichi, N. Miyazaki, K. Tsutsumi *et al.*, *Structure*, **27**, 439 (2019).
25. F. Akita, K. T. Chong, H. Tanaka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **368**, 1469 (2007).
26. Y. Murata, H. Iwasaki, M. Sasaki *et al.*, *Nature*, **435**, 1239 (2005).