



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1回 研究会 資料

2020年12月14日（月）
13:30～16:00
オンライン開催

R022 量子構造生物学委員会 第1回研究会 プログラム

2020年12月14日（月）
オンライン開催

13:30 – 13:45

R022 量子構造生物学委員会の発足にあたって

委員長・三木邦夫（京都大学）

13:50 – 14:50 (講演1)

司会：副委員長・中川敦史（大阪大学）

クライオ電子顕微鏡による生体分子・細胞構造解析の現状

東京大学・大学院医学系研究科・生体構造学分野
吉川 雅英

14:50 – 15:00 休憩

15:00 – 16:00 (講演2)

司会：副委員長・斎藤純一（協和キリン株式会社）

GTP代謝研究

高エネルギー加速器研究機構
物質構造科学研究所 構造生物学研究センター
千田俊哉

クライオ電子顕微鏡による生体分子・細胞構造解析の現状

Current status of cryo-electron microscopy
for biological molecules and cellular structures

東京大学・大学院医学系研究科・生体構造学分野
吉川 雅英

Masahide Kikkawa
The University of Tokyo

2013年を境として、クライオ電子顕微鏡は、膜タンパク質とリボソームなどの大きな複合体を解析する手法として、X線結晶解析にとって代わり、標準的な方法となりつつある。生体分子構造のデータベースであるPDBに登録されるクライオ電顕によって解かれた構造は毎年1.5倍のペースで増え、4年後には、生体分子の構造解析法としてX線結晶解析に量においても追いつくことが予想される。

東京大学では、2017年度からはAMED創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業の構造解析部門として、日本全国の研究者・企業にクライオ電子顕微鏡による構造解析を提供している。また、2020年4月からは、東京大学内に構造生命科学研究機構が設立され、新たにTitan Krios G4iが導入された。この電顕では、apo ferritinの構造は1.6 Åから1.3 Å程度に改善された。また、図1にあるように、55 kDa程度の小さな分子についても、原子モデルを構築するのに十分な2.3 Åの解像度解析もできるようになった。これらを活用することで、我が国の優れたライフサイエンス研究の成果を医薬品等の実用化につなげることを目標としている。現在、50近くの課題を支援中であり、IgM抗体の構造[1]や、ミトコンドリア外膜タンパク質透過チャンネル[2]など、教科書を塗り替えるような結果が出てきている。企業も6社が利用し、東京大学との共同研究としての成果も出始めている[3]。

上記の結果は、主に、単粒子解析と呼ばれる試験管中の精製したタンパク質を観察する方法によって得られているが、細胞内の構造を観察するクライオ電子線トモグラフィー法の開発も活発に行われている。東京大学・吉川研究室でも、真核生物の鞭毛・纖毛を対象として、遺伝学とクライオ電子線トモグラフィー法を組み合わせて、纖毛の構築原理や動作原理を解明してきている [4, 5]。

本講演では、こうした最新の成果を紹介しながら、クライオ電子顕微鏡による生体分子の観察（単粒子解析）や、細胞観察（電子線トモグラフィー）、の日本の現状、そして未来に必要な事を議論させていただく予定である。

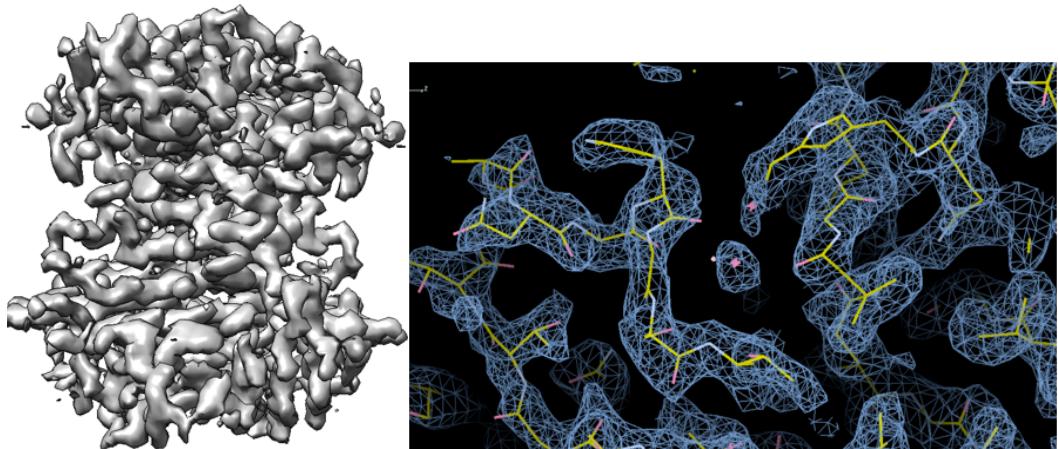


図 1. クライオ電子顕微鏡によって得られた streptavidin の構造
(解像度 : 2.3 Å)

-
1. Hiramoto, E., et al., *Sci. Adv.*, 4: eaau1199 (2018).
 2. Araiso, Y., et al., *Nature*, 575, 395-401 (2019).
 3. Hiraizumi, M., Yamashita, K., Nishizawa, T., Nureki, O., *Science*, 365, 1149-1155 (2019).
 4. Oda, T., Yanagisawa, H., Kamiya, R., Kikkawa, M., *Science*, 346, 857-860 (2014).
 5. Owa, M., et al., *Nat. Commun.*, 10, 1143 (2019).

GTP 代謝研究

Study of GTP metabolism

高エネルギー加速器研究機構

物質構造科学研究所 構造生物学研究センター

千 田 俊 哉

Toshiya Senda

Structural Biology Research Center

Institute of Materials Structure Science

High Energy Accelerator Research Organization

GTP は細胞内のエネルギー分子である。細胞分裂時などに大量に必要とされ、その細胞内濃度は細胞増殖時やがん細胞などで高くなることが知られている。これまでに細胞内の GTP/GDP 濃度比は G-タンパク質によって検知され、細胞内シグナルに変換されることが知られていたが、GTP の濃度そのものを検知する GTP センサーがあるかどうかに関しては、GTP センサーが単離されたことはなく謎であった。我々のグループでは、細胞における GTP の機能を考えたとき、GTP の濃度を検知するセンサーがあるはずだという考えのもと、GTP センサーの探索を行ってきた。

GTP センサーを探すにあたり、センサーに必要とされる 3 つの条件 (GTP に結合すること、細胞内 GTP 濃度変化を検知できること、シグナルが送られるこ) を設定し、生化学、物理化学、細胞生物学、結晶構造解析などを組み合わせることで、脂質キナーゼである PI5P4K β が GTP センサーであることを明らかにした [1]。PI5P4K β は GTP をリン酸供与体として用いる、非常にユニークなキナーゼであった。GTP センサーであることの証明で最も重要な部分は、何らかのシグナルが発せられて細胞機能に影響を及ぼすかどうかである。我々の研究では、この部分に構造解析を利用した。具体的には、GTP センサータンパ

ク質の候補分子であった PI5P4K β に関して、ATP 結合型、GTP 結合型の結晶構造を結晶の質の改善を行うことで 3Å 以上の分解能で決定し [2]、それらの構造に基づき生化学的に GTP 依存的な活性のみを欠失した変異体を作成した。この変異体を用いて細胞生物学的な実験およびオミックス解析を行い、その結果 PI5P4K β が細胞内の GTP 濃度を検知し下流になんらかのシグナルが伝達されていると結論した [1,3]。さらに、この変異体 PI5P4K β を持つがん細胞を用いてマウスへの移植実験をおこなったところ、野生型の細胞はマウス上で増殖したにもかかわらず、GTP 依存的な活性を失った変異体に関してはマウス上で増殖を示さず、GTP の検知機能ががん細胞の増殖と何らかの形で関わっていることが示唆された [1]。

これらの実験から、PI5P4K β の阻害はがん治療に何らかの貢献ができるのではないかと考え、阻害剤の開発を開始した。阻害剤の開発は、NMR を用いたスクリーニングおよびインシリコスクリーニングを出発点とした。その後、有望な化合物に関しては結晶構造解析を行い、化合物を最適化するという標準的な手法で行った。最終的には 2 つの有望な化合物を取得し、それぞれに対して PI5P4K β との複合体結晶構造を決定した。その結果、その 2 つの化合物は異なる部位に結合すること、それでいて 2 つの化合物の各々のある共有結合が空間的に重なっている部分があることが結晶構造解析から明らかになり、阻害活性の向上を目指し 2 つの化合物をマージしたような化合物 (Link17) を取得した。その結果、Link17 は元となる化合物に比べて高い阻害活性を示すと共に、副作用の一つの指標ともなる KINOMEscan を用いたアッセイでも非常に優れた値を示した。また、生化学的な解析から、本化合物は isotype 選択性を示すことも分かった (ヒトの場合、 α 、 β 、 γ の 3 つの isotype が存在する)。現在この化合物に関して様々なアッセイを行っているところであるが、われわれはこの化合物を用いて PI5P4K β の下流のシグナル経路の探索を行なってきた。その結果、PI5P4K β の下流のシグナル経路と細胞機能との関係に関する知見が得られつつある (論文準備中)。この知見と、GTP 合成の鍵酵素である IMPDH2 との関係も極めて重要で、IMPDH2 に関する研究も進行しつつある [4, 5]。

これらの細胞生物学的な解析に加え、GTP センサーがどのようにして進化してきたかについても研究を進めている。これまでの分子進化学的な解析から、PI5P4K は、PI4P5K から進化してきたことがわかっている。しかし、PI4P5K は ATP 依存的な一般的な脂質キナーゼであり、このキナーゼがどのようにして GTP 依存的な活性を持つに至ったかについて研究を進めてきた。これまでに明らかになった興味深い点としては、PI5P4K は単細胞生物には存在せず多細胞生物にしか存在しないこと、多細胞生物になって現れた PI5P4K は、最初は ATP 依存的な活性しか持たなかったものの、脊椎動物の出現と共に GTP 依存的な活性を取得し、生物的な機能を獲得してきたらしいことがわかってきた。この進化の様子を探るために、多細胞生物のモデルとなっている生物種に関して PI5P4K の結晶構造解析を行っている（線虫、ショウジョウバエ、ナメクジウオ、サメ、シーラカンスなど）。これらの構造と生化学活性（ATP 依存活性と GTP 依存活性の割合など）との間には興味深い相関がみられており、これらに関しても触れたい。これに加え、タンパク質と ATP および GTP との結合の様式を PDB にエントリーされている構造を利用して網羅的に調べあげ、ATP および GTP の認識ルールを調べるとともに、どのように ATP 型のキナーゼが GTP 型に変換して行ったかに関して知見を得た（論文投稿中）。更に、GTP の検知機構を獲得してからは negative selection が効いているらしいこと、ATP 型から GTP 型への変換に関しては、最低限必要な変異は少数であるが、徐々に GTP に対する活性が上がるというより、突然に GTP に対する活性が出現していること、GTP 依存的な活性は基質特異性を犠牲にすることで（=広い基質特異性を得ることで）獲得しており、付随的に生じている ITP や XTP に対する活性はこれらの細胞内濃度が低いことから生物学的には意味を持ち得ないというような事情があるようと思えた（論文投稿中）。今後、構造解析や生化学を併用した研究を進めることで、さらなる知見が得られると考えている。

ここに上げたのは、我々の GTP に関する研究の一部である。当然のことながらこれらの研究は構造生物学のみで推進できるようなものではない。約 10 年に及ぶ広範かつ継続的な共同研究（議論）の結果である。具体的には細胞生物学

(佐々木敦朗 (シンシナティ大、慶應大))、構造生物学 (NMR : 竹内恒 (産総研)、X 線 : 千田俊哉 (KEK)) を中心に、進化生物学 (中川草 (東海大)) バイオインフォマティクス (河口理沙 (CSHL)) など多くの人との共同作業の結果である。我々の共同研究チームの特徴としては、SLACK などのコンピュータツールを利用した継続的な議論、全てのデータをシェアしての全員での議論 (場所が離れているので、コロナの前から Zoom 会議を行なってきている。年 1 回は対面の会議など)、大学院生の相互訪問などが挙げられる。また、SLACK 上では仮想的な研究室が構成されるにまで至っており、講演ではこのような共同研究体制に關しても触れたい。

-
1. Sumita, K., Lo, Y.-H., Takeuchi, K., Senda, M., Kofuji, S., Ikeda, Y., Terakawa, J., Sasaki, M., Yoshino, H., Majd, N., Zheng, Y., Kahoud, E. R., Yokota, T., Emerling, B. M., Asara, J. M., Ishida, T., Locasale, J. W., Daikoku, T., Anastasiou, D., Senda, T. and Sasaki, A.T. The lipid kinase PI5P4K β is an intracellular GTP sensor for metabolism and tumorigenesis. *Mol. Cell*, 61, 187-198 (2016).
 2. Senda, M., Hayashi, T., Hatakeyama, M., Takeuchi, T., Sasaki, A.T. and Senda, T. Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality from protein crystals. *Cryst. Growth Des.*, 16, 1565-1571 (2016).
 3. Takeuchi, K., Senda, M., Lo, Y-H., Kofuji, S., Ikeda Y., Sasaki, A.T. and Senda, T. Structural reverse genetics study of PI5P4 β -nucleotide complexes reveals the presence of the GTP bioenergetics system in mammalian cells. *FEBS J.*, 283, 3556-3562 (2016).
 4. Naffouje, R., Grover, P., Yu, H., Sendilnathan A., Wolfe, K., Majd, N., Smith, E.P., Takeuchi, K., Senda, T., Kofuji, S. and Sasaki, A.T. Anti-Tumor Potential of IMP Dehydrogenase Inhibitors: A Century-Long Story. *Cancers*, 11, 1346; doi:10.3390/cancers11091346 (2019)
 5. Kofuji, S. *et al.* and Sasaki, A.T. *Nat. Cell Biol.*, 21(8), 1003-1014 (2019).