



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2回 研究会 資料

2021年3月19日（金）
13:30～15:45
オンライン開催

R022 量子構造生物学委員会 第2回研究会 プログラム

2021年3月19日（金）
オンライン開催

13:30 – 13:35

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

13:35 – 14:35 （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タンパク質構造解析の問題とさらなる高度化への試み

大阪大学・蛋白質研究所
加藤貴之

14:35 – 14:45 休憩

14:45 – 15:45 （講演2）

司会：副委員長・斎藤純一（協和キリン株式会社）

ヒト膜タンパク質の大量生産と構造解析

千葉大学・大学院理学研究院・化学研究部門
村田武士

クライオ電子顕微鏡によるタンパク質構造解析の問題と さらなる高度化への試み

Current problems in structural analysis by electron cryomicroscopy
and challenging for the advancement

大阪大学・蛋白質研究所

加 藤 貴 之

Takayuki Kato

Institute for Protein Research, Osaka University

我々の体には多くのタンパク質が存在し、その生命活動を支えている。タンパク質は非常に優れた機能を持つ分子機械で、その機能は立体構造と密接に関係しているため、タンパク質の立体構造を解析することは、その機能を知る上で非常に重要な情報を与える。特に病気の治療薬の開発にはそのターゲットとなるタンパク質と候補となる低分子との複合体の立体構造が必須となる。

それらタンパク質の構造解析には主に、X線結晶構造解析が使われてきた。現在でも PDB における原子モデルの登録件数は X 線結晶構造解析によるものが圧倒的に多く、その 9 割を占める。しかし 2013 年ごろから汎用的に使われるようになった電子直接検出型カメラの登場によってクライオ電子顕微鏡の分解能は飛躍的に向上し、原子モデルの構築が可能となった。そのため、クライオ電子顕微鏡による原子モデルの登録件数は指数関数的に増えており、数年以内にその構造解析の主役の座を奪うと考えられている。現在でも分子量 500kDa を超える分子に関してはすでに第一選択的に使われている。

このようにその利用が飛躍的に拡大しているのはクライオ電子顕微鏡が X 線結晶構造解析に比べて多くの利点を持つためである。クライオ電子顕微鏡の単粒子解析法は、タンパク質を非結晶の氷薄膜に閉じ込めて、その実像を撮影し、画像処理によって立体構造を解析する手法であり、X 線結晶構造解析と違って結晶を必要としないため、試料に対する制限が極めて緩い。これは X 線結晶構

造解析において最適な試料作成条件は結晶化にとって最適であって、そのタンパク質の機能状態にとって最適とは限らない。その反面、クライオ電子顕微鏡では完全に試料にとって最適な条件で解析ができるため、より生体中に近い構造を解析することが可能である。例えば、結晶化が困難な巨大な分子はもとより、温度に感受性のあるタンパク質ではその温度の違いによって生まれるコンフォーメーション変化の解析をすることが可能である [1] (図 1)。

また、単粒子解析法は多くの分子像をピックアップして、同じ方向とコンフォーメーションを持つ分子を抽出し、コンピューター上で平均化して構造解析を行うという手法である。そのため同じ処理を自然の力を使って行う結晶化と対比させ、*in silico crystallization*とも呼ばれている。しかし、結晶化と比較して *in silico crystallization* はコンピューター上での処理であるため、柔軟性や汎用性が高い。結晶化では高純度、高濃度の試料を調製し、様々な結晶化条件を試すということに多くの時間を費やすが、画像解析でそれを行う単粒子解析の場合、コンピューター上で分類可能なサイズや形が異なる分子のコンタミは構造解析に影響しない。最近では同じグリッド上で凍らせた複数のタンパク質を同時に解析することの成功した例もある。また、最近では構造解析の種々のプロセスで AI による処理が行われており、特に画像からの粒子の選択やノイズ除去では一般化されつつある [2,3]。それ以外にも、解析されたマップから運動性を予測することも可能となっている [4] (図 2)。

このように万能性の高いクライオ電子顕微鏡であるが、まだ多くの問題を抱えている。X 線結晶構造解析では結晶化のスクリーニングの評価には光学顕微鏡を用いるため、非常に高速に大量の条件を検討できるが、クライオ電子顕微鏡の場合、グリッドのスクリーニングにはクライオ電子顕微鏡を用いる必要があり時間的なコストが高い。それに加え、試料溶液の薄膜化にクライオ電子顕微鏡開発の初期から使われているろ紙という再現性の乏しい道具を用いているため、グリッド成功の可否にはある程度の偶然に頼らざるを得ず、時間的なコスト高に拍車をかけている。最近では氷包埋試料の氷の厚さをコントロールするために、スプレー方式、ペンプリンティング方式など新しいグリッド作成技術が開発されてい

る。また、現在の構造解析計算では GPU を用いたプログラムによって高速に処理が可能となっているが、それでも数日から 1 週間ほどの時間が必要となる。撮影初期にはどれくらいの分解能で解析が可能かがわからないため、どれくらいの画像を撮影するべきか、すなわちどれくらいのマシンタイムを予約すればいいのかわからない。そのため、時には一度撮影に使ったグリッドを再度凍結保存して後日追加で画像撮影する必要がある。これを解決する一つの手法として、最近ではリアルタイムでの画像処理を行うことで分子の分散状態や方位の確認することで、グリッドの良し悪しを判断できるようになりつつある [5,6]。

本講演では、クライオ電子顕微鏡の利点と特徴について、実例を交えながら紹介し、今でも解決できていない問題について議論させていただく予定である。

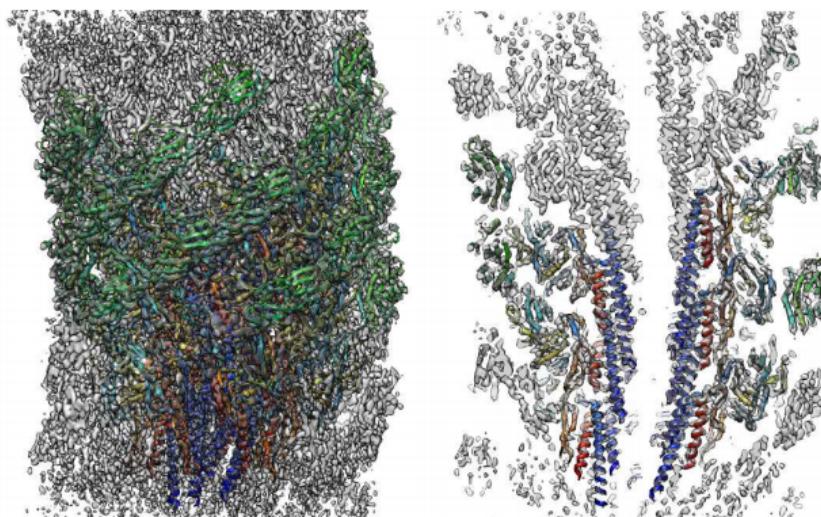


図 1. 曲がったままのべん毛フックの構造解析



図 2. 電顕マップから運動性を予測する AI プログラム DEFmap

1. Kato, T., et al., *Nature Commun.*, 10(1), 5295(2019).
2. Palovcak, E., et al., *IUCrJ*, 7, 1142 (2020).
3. Bepler, T., et al., *Nature Methods*, 16, 1153 (2019).
4. Matsumoto, S., et al., *Nature Mach. Intell.*, 3, 153 (2021).
5. Tegunov, D., *Nature Methods*, 16, 1146 (2019).
6. <https://cryosparc.com/live>

ヒト膜タンパク質の大量生産と構造解析

Large-scale purification and structural analysis
of human membrane proteins

千葉大学・大学院理学研究院・化学研究部門

村 田 武 士

Takeshi Murata

Graduate School of Science, Chiba University

膜タンパク質は、ゲノムにコードされる全タンパク質の 30%を占め、物質輸送、シグナル伝達、生体エネルギー產生・変換などの細胞機能において重要な役割を果たしている。また、医薬品の作用点は膜受容体、膜チャネル、膜輸送体といったヒト膜タンパク質であることが大半である（図 1）。しかし、ヒト膜タンパク質の多くは安定性が低いためその取扱が難しく、mg オーダーで大量精

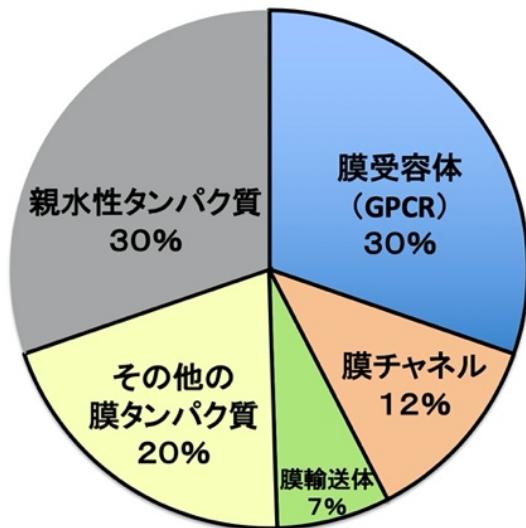


図1. 創薬標的タンパク質の内訳

製されたものは 1 割に満たない。このことがヒト膜タンパク質を標的とした医薬品開発のボトルネックの一つになっていた。我々は、長年にわたりヒト膜タンパク質に焦点を当てた研究基盤技術（Key 1-5）を開発し、大量精製が可能となった標的膜タンパク質の立体構造解析を進めてきた。開発した技術は AMED BINDS を通して、アカデミアや企業に対して研究支援を行なっている。競争領域研究への支援については、個別（当研究室一企業）で共同研究を行なってきたが、来年度からは千葉大学内に「膜タンパク質研究支援センター」を構築し、研究支援を行う体制を構築する（図 2）。



図2. 膜タンパク質研究支援センター

以下に開発した Key1-5 についての説明を記載した。

Key1 膜タンパク質の耐熱化変異体予測法

我々が開発したヒト膜受容体に対する耐熱化予測法 (Key 1) とは、1つのアミノ酸置換に伴う生体膜のエントロピーの利得（損失）を液体の統計力学理論と形態計測学的手法を統合した独自の方法論により計算し、耐熱化する1アミノ酸変異体を選別する方法である（特許第6359656号；PCT/JP2015/068277）（図3）[1-3]。この方法を用いて現在までに12種類のヒト膜受容体の耐熱化に成功している。得られた耐熱化精製サンプルを用いることにより、薬剤探索や機能解析が可能になるばかりでなく、耐熱化により分子揺らぎが低下することにより構造研究に有利となる。現在、ヒト膜輸送体やヒト膜チャネルに対して、本技術を適応させるべく解析方法の最適化を進めている。

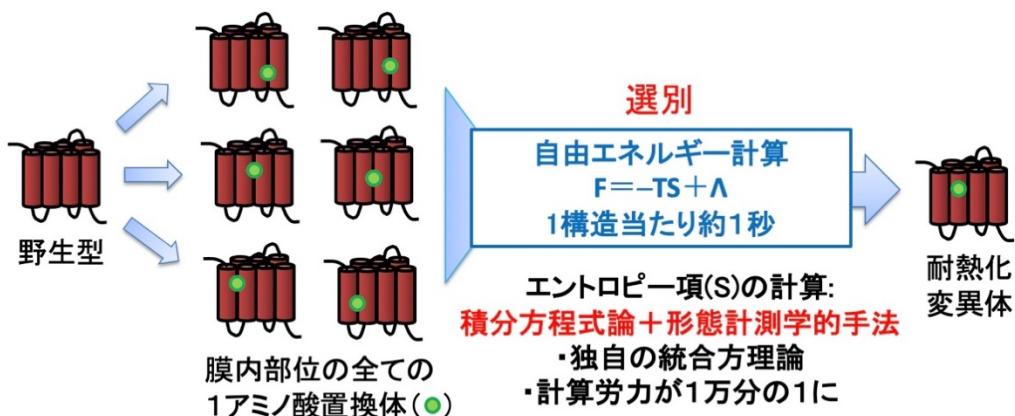


図3. 耐熱化予測法(Key 1)の概略図

Key2 His タグ抗体を用いた膜タンパク質の簡易精製法

His タグはヒスチジンが 6-10 残基連なったタグシステムであり、タンパク質の精製目的で最も汎用されている。ニッケルやコバルトといった金属の配位したカラムによりアフィニティ精製が可能であるが、発現宿主由来のタンパク質を非特異的に吸着してしまうことや、目的タンパク質の機能的構造を破壊してしまう場合もある。特にヒト膜タンパク質は非常に不安定であり影響を受けやすい。我々はこれまでに、His タグに対するモノクローナル抗体を複数作製してきた。その中で iHis8 抗体は、8 つ連続したヒスチジンに対して高い結合親和性と特異性をもつ。8xHis のような配列は自然界に存在しないため、発現宿主に由来するタンパク質の非特異的吸着がほとんどない。抗体は安定なタンパク質であることから、抗体カラムの耐久性が高く再生が容易であること、金属アフィニティカラムのように、重金属を使用しないことから地球環境にもやさしい。我々は iHis8 抗体カラムを用いてワンステップでヒト膜タンパク質を高純度に精製できるシステムを構築した。さらに、iHis8 抗体カラム中でナノディスクに再構成する手法も開発した。以下にその概略図を示す（図 4）。

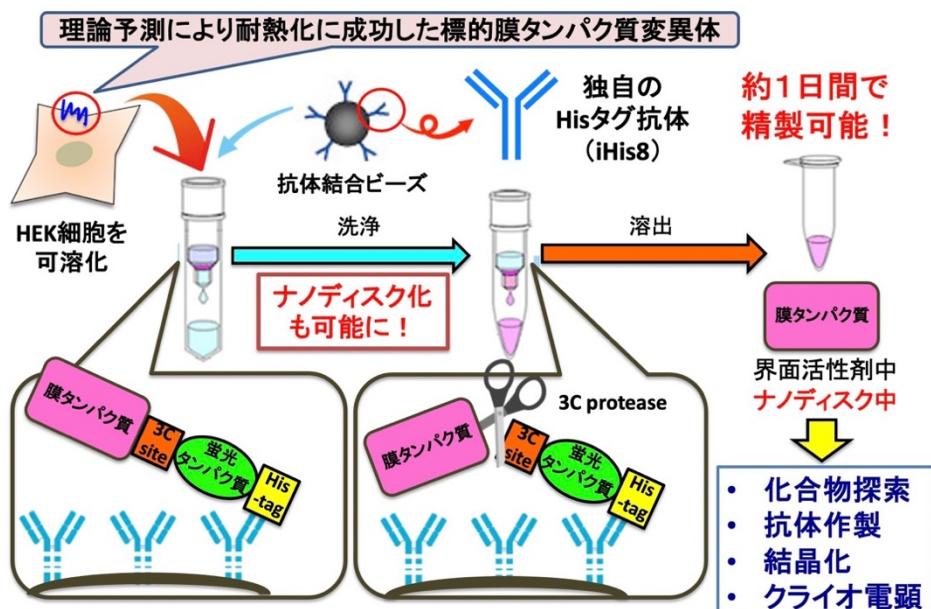


図4. Hisタグ抗体を用いた簡易精製法(Key 2)の概略図

Key3 膜タンパク質の機能性抗体作製法

我々は ERATO 岩田ヒト膜受容体構造プロジェクトの一環として、ヒト膜タンパク質に対する構造認識（機能性）抗体作製技術（特許第 5526448 号）を開発した。本手法により得られた抗体フラグメントを用いることで、ヒトアデノシン A2a 受容体 [4]、ラット糖輸送体 [5]、ヒトバンド 3 [6]、ヒトアディポネクチン受容体 [7]など様々な創薬標的膜タンパク質の結晶構造解析に成功した。以下に本技術の概略図を示す（図 5）。

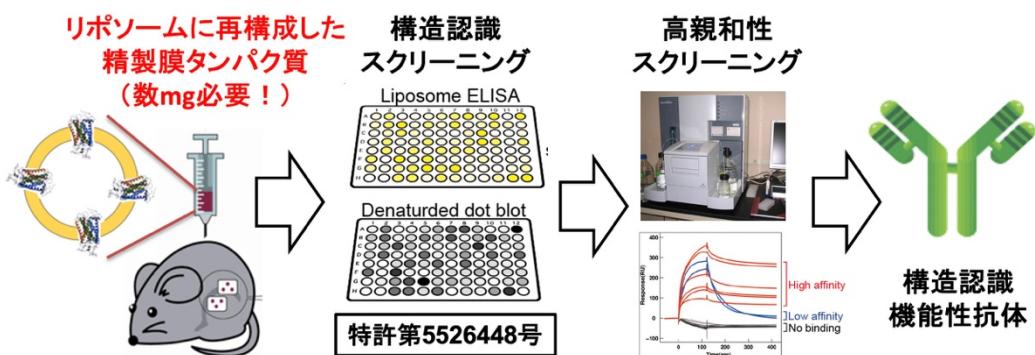


図5. 構造認識機能性抗体作製技術の概略図

Key4 精製膜タンパク質に対する結合化合物の探索システム

Biacore は表面プラスモン共鳴法を用いて分子間相互作用をリアルタイムに検出する装置である。相互作用解析する試料をセンサチップ表面に固定化し、リガンドの溶液をセンサチップ表面に流すことで幅広い親和性の（解離定数で mM～nM オーダー）相互作用を解析することができる。ビオチン化ナノディスクに再構成されたヒト膜タンパク質を用いて、Biacore の SA（ストレプトアビジン固定）チップに固定化し、結合する化合物のスクリーニングが可能であることが報告されている。しかし、この方法では固定化したヒト膜タンパク質を解離・再吸着することができないため、1000 化合物を超える大規模スクリーニングは難しい。

我々は抗体作製技術（Key3）を使って、ナノディスクに特異的に結合するモノクローナル抗体を作製した。現在、Biacore チップとして最も安価な CM

チップにこの抗体をトラップし、その後再構成ナノディスクを結合させることにより、再生可能な化合物のスクリーニングシステムを構築している（図6）。また、ナノディスク抗体のレジンを用いることで、再構成ナノディスクを効率的に回収することが可能であるため、各種スクリーニング法(ASMSやDELなど)への適応と最適化を進めている。

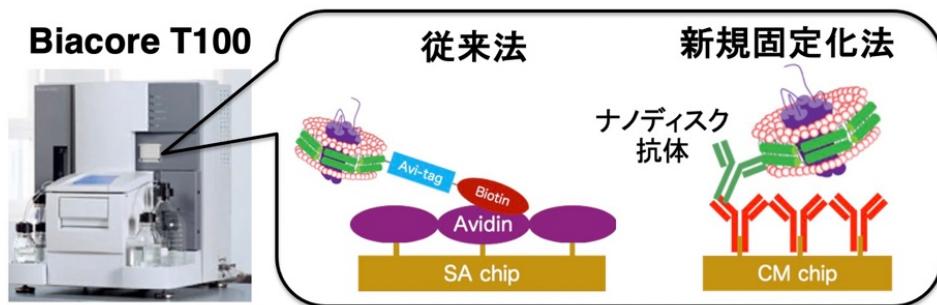


図6. Biacoreを用いた化合物探索システム

Key5 抗体を用いた膜タンパク質の立体構造解析

世界ではクライオ電子顕微鏡単粒子解析技術に革命が起こり、精製に成功したヒト膜タンパク質に関するこの手法を用いて原子分解能の立体構造が報告されている。我々は電子顕微鏡の専門家ではなく、電子顕微鏡を自ら使用できる環境にはなかったが、AMED-BINDS プログラムの中で KEK の千田グループにクライオ電子顕微鏡が導入（図7）され、当研究室でもそれを使用することが可能となった。すでにクライオ電子顕微鏡解析を進めており、解析用プログラムを含め、すべてのシステムを導入することができている。最近、Key2 を用いて精製した電位依存性 K⁺チャネル (hERG) のクライオ電子顕微鏡単粒子解析にも成功した [8]。



図7. クライオ電子顕微鏡

電顕構造は単粒子の平均構造であるため、標的分子のゆらぎが大きい場合は分解能が向上しない。Key1 により得られた耐熱化変異体は揺らぎが抑えら

れることにより安定性が向上している場合が多い。このことは、結晶構造解析ばかりでなく電顕単粒子解析にも有利であると期待できる。また、Key3により得られた構造認識機能性抗体も揺らぎを抑えることが期待できる。電顕解析では 100 kDa 以上の大好きなタンパク質が有利であるが、膜受容体や膜輸送体は 40-60 kDa 程度の比較的小さなタンパク質である。45 kDa の抗体フラグメントを結合させることにより、全体の大きさを拡張できることも、抗体を用いるメリットである。

1. Yasuda, S., et al., Identification of Thermostabilizing Mutations for Membrane Proteins: Rapid Method Based on Statistical Thermodynamics, *J. Phys. Chem. B*, 120, 3833-3843 (2016).
2. Yasuda, S., et al., Hot-Spot Residues to be Mutated Common in G Protein-Coupled Receptors of Class A: Identification of Thermostabilizing Mutations Followed by Determination of Three-Dimensional Structures for Two Example Receptors, *J. Phys. Chem. B*, 121, 6341-6350 (2017).
3. Yasuda, S., et al., Methodology for Further Thermostabilization of an Intrinsically Thermostable Membrane Protein Using Amino Acid Mutations with Its Original Function Being Retained; *J. Chem. Inf. Model.*, 60, 1709-1716 (2020).
4. Hino, T., et al., G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody, *Nature*, 482, 237-240 (2012).
5. Nomura, N., et al., Structure and transport mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5, *Nature*, 526, 397-401 (2015).
6. Arakawa, T., et al., Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte Band 3, *Science*, 350, 680-684 (2015).
7. Tanabe, H., et al., Crystal structures of the human adiponectin receptors, *Nature*, 520, 312-316 (2015).
8. Asai, T., et al., Cryo-EM structure of K⁺-bound hERG channel complexed with the blocker astemizole, *Structure*, in press