



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3回 研究会 資料

2021年7月6日（火）

13:30～15:45

オンライン開催

R022 量子構造生物学委員会
第3回研究会 プログラム

2021 年 7 月 6 日（火）
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）

講 演

司会：副委員長・中川敦史（大阪大学）

13:35 – 14:35 （講演 1）

クライオ電子顕微鏡の試料調製と構造研究

名古屋大学・細胞生理学研究センター／大学院創薬科学研究科
大 嶋 篤 典

14:35 – 14:45 休 憩

14:45 – 15:45 （講演 2）

生体高分子の小角 X 線散乱解析

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所
放射光実験施設／構造生物学研究センター
清 水 伸 隆

クライオ電子顕微鏡の試料調製と構造研究

Structure determination and sample preparation for cryo-electron microscopy

名古屋大学細胞生理学研究センター／大学院創薬科学研究科

大 嶋 篤 典

Atsunori Oshima

Cellular and Structural Physiology Institute (Cespi)

Department of Basic Medicinal Sciences,

Graduate School of Pharmaceutical Sciences

Nagoya University

細胞間連絡を担うギャップ結合チャネルは、隣接細胞間において細胞質同士を直接連絡するコミュニケーションチャネルである。脊椎動物が持つコネキシンは 12 量体で一つのチャネルを形成するが、無脊椎動物が持つイネキシンは 16 量体構造を作る [1]。これら二つの遺伝子ファミリーの間にはアミノ酸配列の相同性は見られないが、巨視的には似た構造体を形成する。これまでイネキシファミリーにおいては、我々が行ったクライオ電子顕微鏡を用いた研究によって、線虫の持つ innexin-6 (INX-6) が可溶化状態で高分解能解析され [2]、さらに最近ナノディスク再構成した状態で構造解析された [3]。膜タンパク質の場合は通常精製に界面活性剤を用いることから、可溶化状態で構造解析されることも多いが、本来細胞膜に埋まった状態で機能する膜タンパク質を脂質二重膜内で構造解析することは、その機能の本質的な理解にもつながる。本講演ではギャップ結合チャネルのクライオ電子顕微鏡による構造研究と、その試料作製に用いたナノディスク再構成について紹介する。

1. ナノディスクに再構成した INX-6 ギャップ結合ヘミチャネルの原子構造

線虫の INX-6 タンパク質をギャップ結合が外れたヘミチャネルの状態で精製し、可溶化状態のチャネルとナノディスクに再構成させた状態のチャネルにつ

いて、クライオ電子顕微鏡を用いて高分解能構造解析を行った。ナノディスクに再構成した野生型 INX-6 ヘミチャネルは、チャネル通路の内側に二層の密度を示し、それは脂質二重膜面に平行に配置してチャネル通路を塞いでいた。また N 末端と想定される密度はチャネル通路内の膜平面と細胞質ドメインの間に存在した。可溶化状態の INX-6 は GraDeR [4] を用いて調製し、こちらも高分解能構造を得たが、この N 末端はチャネル通路の中でファネルを形成し、オープン状態と解釈された。さらに N 末端領域 18 残基を欠失した変異体 (INX-6 Δ N) をナノディスクに再構成して得られた構造は、チャネル通路の内側に野生型/ナノディスクと同様の二重層が確認された。Xenopus oocyte を用いた機能解析と分子動力学シミュレーションを組み合わせるとこれらの結果を解釈すると、脂質二重膜に再構成することによって INX-6 チャネルの通路の内側に脂質が入り込み、それがチャネルの閉塞に関与している可能性がある。ギャップ結合タンパク質は生理的条件下において、ヘミチャネルの状態時に自由に開くと細胞にとって致命的となる。本研究で得られた構造は、INX-6 がギャップ結合を形成する前段階の閉鎖状態に脂質が寄与している可能性が考えられる。

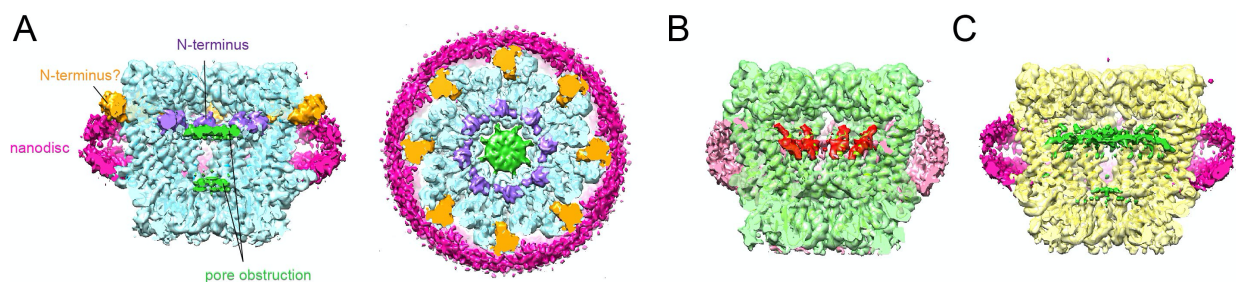


図 1. INX-6 ギャップ結合ヘミチャネルのクライオ電子顕微鏡マップ [3]
(A) ナノディスクに再構成された INX-6 ヘミチャネル。ナノディスク(マゼンタ)とチャネル通路を閉塞する密度(緑)が確認される。
(B) GraDeR を利用した可溶化状態の INX-6 ギャップ結合ヘミチャネルの構造。N 末端領域(赤)がファネルを形成。
(C) N 末端欠失変異体 INX-6 Δ N をナノディスク再構成して得られた構造。

2. INX-6 チャンネルのナノディスク再構成法

ナノディスク再構成法 [5] は膜タンパク質を脂質二重膜に再構成できるだけでなく、界面活性剤フリーの溶媒で安定であることから、クライオ電子顕微鏡の試料作製に適した調製法の一つと言える。手法自体はすでに広く知られているが、INX-6 をナノディスク再構成させるときに注意した点とともにその手順を紹介し、今後新規にナノディスク再構成を行う際の参考にしていただければ幸いである。

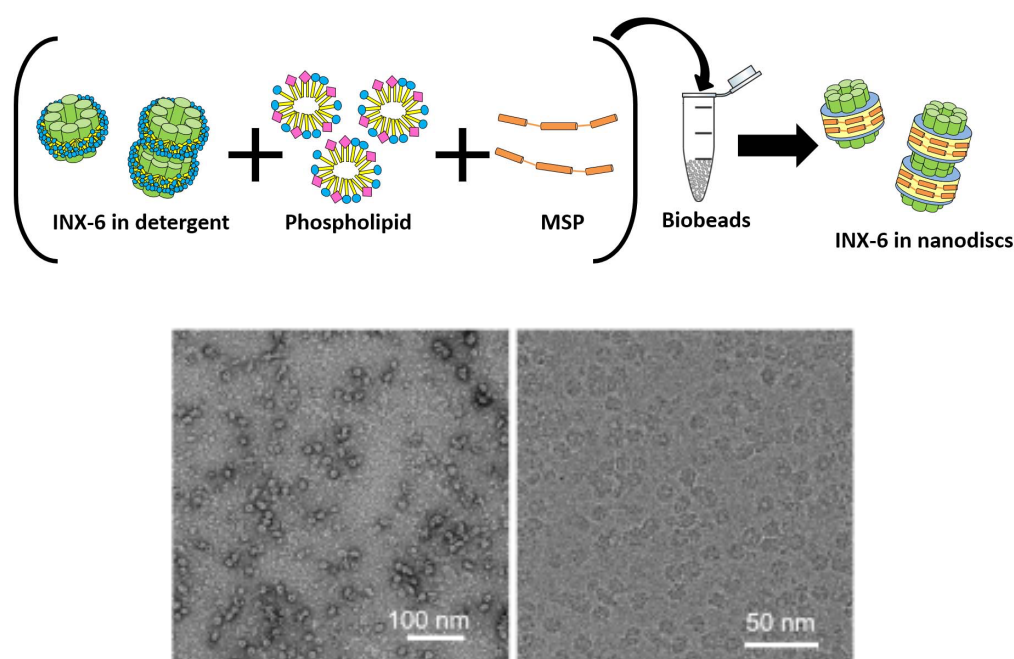


図 2. (上段) INX-6 のナノディスク再構成の流れ。精製した INX-6 に脂質と MSP を混合してバイオビーズで界面活性剤を除去する。
(下段) 作製した INX-6/ナノディスクの負染色電子顕微鏡像とクライオ電子顕微鏡像 [3]。

1. Oshima *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 428, 1227-1236 (2016).
2. Oshima *et al.*, *Nat. Commun.*, 7, 13681 (2016).
3. Burendei *et al.*, *Sci. Adv.*, 7, eaax3157 (2020).
4. Hauer *et al.*, *Structure*, 23, 1769-1775 (2015).
5. Denisov and Sligar, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 23, 481-486 (2016).

生体高分子の小角 X 線散乱解析

Small-angle X-ray scattering for biological macromolecules

高エネルギー加速器研究機構

物質構造科学研究所 放射光実験施設／構造生物学研究センター

清水 伸 隆

Nobutaka Shimizu

Photon Factory / Structural Biology Research Center

Institute of Materials Structure Science

High Energy Accelerator Research Organization (KEK)

小角 X 線散乱 (Small-Angle X-ray Scattering=SAXS) は、生体高分子を含むソフトマターからハードマターまで、幅広い研究分野において非晶質試料を対象とした構造科学研究、構造物性相関研究に広く活用されている。特に高分子を始めとする材料科学研究においては、物質中の分子が 3 次元に結晶化することが基本無いため、SAXS は構造解析の中核的手法として、基礎から産業応用まで、物質内の基本分子形状や周期構造、階層構造間相互作用の解析に利用されている。試料形態に関しては X 線吸収量を考慮する以外は特に制限はなく、液体（粘度に関係なく）から固形、粉末、繊維まで、試料物質の素の状態を計測することができる。また、加熱冷却、光照射、伸縮、圧力/湿潤/pH の変化など様々な外部変調に伴う構造変化解析も標準的に実施されている。一方で、生体高分子溶液試料の SAXS 解析は、近年、他の SAXS の試料分野と比較して高度な解析レベルに発展を遂げたことから、BioSAXS (Biological SAXS) と区別して呼ばれるようになり、統合構造生物学を推進する手法の一角として認知されている [1]。本稿ではその発展の経緯に触れながら、手法の現状を紹介したい。

生体高分子溶液による SAXS 研究は放射光の発展と密接に関係しており、共同利用が始まった 1980 年代前半からの、第 2 世代大強度放射光施設の発展と共に活発に利用されるようになった。特に、タンパク質の折畳み反応や外部変調に伴う構造変化の解析等、溶液中での解析が必須な研究に関して威力を発揮し、多くの生物物理学的研究が行なわれた。一方で、溶液構造解析として SAXS を考

えた場合、試料に対するハードルは結晶化を行なう場合と同等で、すなわち標的分子が溶液中で単分散（均一孤立系）であることが必須である。先に示した折畳みや構造変化の解析の対象となったのは、折畳み反応研究に適した（いわゆる）モデルタンパク質や安定構造を持つタンパク質が中心であり、解析の適用範囲は限定的だったと言える。また、解析に関してもやや難があり、分解能としては結晶構造解析に及ばないのはもちろんだが、分子のサイズ（慣性半径 = R_g ）や分子量、折畳み状態の推定、形状予測（球状か棒状かなど）が主であり、一部の専門家が高度な形状解析を行っていたものの [2]、それは限定的で広く一般に活用されるような状況ではなかった。

流れが変わったのは、欧州分子生物学研究所（EMBL）の Dmitri Svergun らが開発した SAXS 解析用のソフトウェア群の公開である。1995 年に PDB 座標から理論 SAXS 曲線を計算するソフトウェア *CRYSQL* [3] が公開され、計測した溶液構造を結晶構造と直接比較できるようになった。また、1999 年には焼なまし法による Ab initio モデリングによって、SAXS 実験曲線から分子形状をビーズの集合体（ダミーアトムモデル）として導出可能なソフトウェア *DAMMIN* [4] が公開され、溶液中の分子形状解析を誰でも簡便に実施できるようになった。Svergun らはその後も多種多様な小角散乱の解析ツールを開発し、現在ではそれら 60 以上のソフトウェアを統合した ATSAS プログラムパッケージとして配布している [5]。2000 年代に入って世界的な構造ゲノミクスの広がりに伴い結晶構造解析はさらなる発展を遂げたが、SAXS に関しても ATSAS を活用して、結晶化が難しい不安定タンパク質やタンパク質複合体の解析に適用される例が徐々に増え、世界においては 2000 年代後半にかけて構造生物学を専門とする新規ユーザーが多数 SAXS に参入した。これらのユーザーに対応するため、溶液サンプルチェンジャーなどの自動測定装置の開発等も進み、測定のスループットの向上に伴い解析適用例も増加した。

一方で、開発されたソフトウェア群によって誰でも簡便に溶液構造解析を行える状況となった結果、SAXS の基礎理論に基づいた基礎的実験技術を理解しないまま実行された解析が横行し、手法としての信頼が損なわれる事態となった。

そこで、国際結晶学会の小角散乱部会が小角散乱データからのタンパク質構造モデリングに関する出版ガイドラインを 2012 年に発表し [6]、2017 年にも更新された [7]。また、論文で使用されたデータを誰でも検証可能とするために、X 線、中性子の小角散乱データと測定・解析に関する情報を登録するサイト SASBDB の運用が 2014 年より開始され [8]、論文投稿時の登録が推奨されている。出版ガイドラインには様々な実験上、解析上の注意事項が記載されているが、最も重要な事項は（繰返しになるが）解析対象の単分散性の担保である。結晶化に適用可能なレベルまで精製された状態であっても、溶液状態では標的分子が測定まで必ず安定であるとは言えず、アーティファクトな会合状態や凝集が生じる可能性もある。この問題を打破するために 2004 年に提案されたのがゲル濾過クロマトグラフィーと組み合わせた SEC-SAXS (Size-Exclusion Chromatography & SAXS) 法である [9]。SEC-SAXS では、測定直前にゲル濾過で標的分子を単離しながら連続的に SAXS 測定を実施するため、標的の単分散度は格段に向上する。2010 年頃から、世界中の放射光施設の SAXS ビームラインでシステム整備が進められ、現在では BioSAXS における標準測定法となっている。

日本国内においては、2012 年より開始された創薬等支援技術基盤プラットフォーム (PDIS) に BioSAXS が参画し、手法の基盤整備や高度化と共に研究支援活動を開始した。Photon Factory (PF) においては、2014 年頃に実施した SAXS ビームラインの高度化（既存ビームラインのスクラップアンドビルド、高輝度ビームラインの新設、検出器の高度化等）に加えて、PDIS によって BioSAXS に特化した装置の開発導入、すなわち溶液サンプルチェンジャーの開発、SEC-SAXS システム整備、また SEC-SAXS 解析と相補的に利用する SEC-

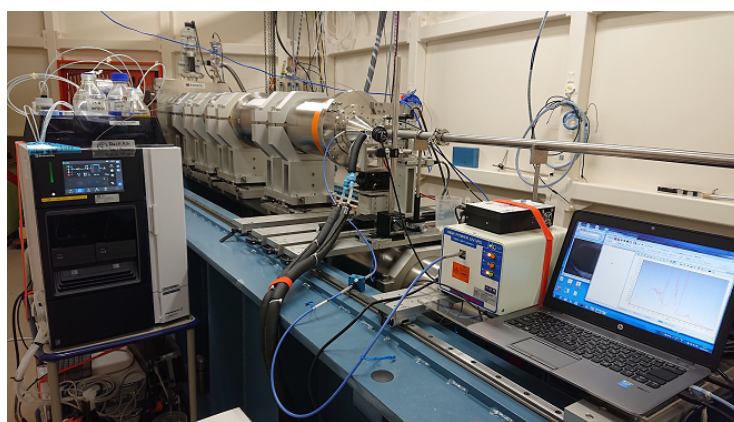


図 1. PF SAXS ビームライン BL-15A2 の SEC-SAXS/UV-vis. spectroscopy 同時測定システム

MALS（多角度静的光散乱装置）装置の導入等を進めた [10]。さらには、初心者ユーザーからでも簡便に利用可能で、出版ガイドラインにも準拠した初期解析ソフトウェア *SAnghler* [11] を開発した。その結果、世界基準の BioSAXS 測定解析環境を構築し、後継プラットフォーム事業の BINDS（創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム）においても引き続き支援と高度化を進めている。BINDS においては統合構造生物学を推進する相関構造解析支援を行なうために、「溶液中での性状・構造解析」という特長を活かして、計算科学の手法も活用しながら結晶構造解析はもちろん、クライオ電顕解析との連携支援を行なっている。上述の通り、BioSAXS はそれだけで確定的な高分解能構造情報が得られる手法では無いが、結晶構造解析、クライオ電顕解析を目指す試料の溶液中の性状・構造状態の確認から、溶液中の構造状態推定まで幅広く活用されており、相関構造解析を実現するハブの役割を担っている。BINDS が開始された 2017 年からの 4 年強で合計 35 件の支援を行なっており、そのほとんどが結晶構造解析を専門とする研究者に対する支援であり、さらにはクライオ電顕と合わせた 3 手法での連携支援も増えてきている。

一方、SEC-SAXS はこの 10 年で BioSAXS の標準測定法として確立したが、解析上で解決すべき問題点も幾つか浮き彫りになって来た [12]。HPLC を使って溶液を流しながら数百から数千のデータを計測し、得られた溶出ピーク領域から適切なデータ範囲を選んで解析する必要があるなど、BioSAXS エキスパートでもスムーズに解析を進めるには障壁がある。そこで、線形代数学に基づく手法を適用し、解析上の問題を解決しながら初心者でも利用可能な SEC-SAXS データの全自動解析ソフトウェア *MOLASS* [13] を開発し、公開している。本講演では、PF の SAXS ビームラインにおける高度化・開発を中心とした活動の状況とともに、BioSAXS を中心とした実際の解析例なども示しながら紹介したい。

1. Rout, M. P. and Sali, A. Principles for Integrative Structural Biology Studies. *Cell*, 177, 1384–1403 (2019).
2. Harada, M., Ito, Y., Sato, M., Aono, O., Ohta, S. and Kagawa, Y. Small-angle X-ray Scattering Studies of Mg • AT(D)P-induced Hexamer to Dimer

- Dissociation in the Reconstituted $\alpha_3\beta_3$ Complex of ATP Synthase from Thermophilic Bacterium PS3. *J. Biol. Chem.*, 266, 11455-11460 (1991).
3. Svergun, D. I., Barberato, C. and Koch, M. H. J. CRY SOL - a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J. Appl. Cryst.*, 28, 768-773 (1995).
 4. Svergun, D. I. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. *Biophys J.*, 76, 2879-2886 (1999).
 5. Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., Panjkovich, A., Mertens, H. D. T., Gruzinov, A., Borges, C., Jeffries, C. M., Svergun, D. I. and Franke, D. ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis *J. Appl. Cryst.*, 54, 343-355 (2021).
 6. Jacques, D. A., Guss, J. M., Svergun, D. I. and Trewthella, J. Publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution. *Acta Cryst.*, D68, 620-626 (2012).
 7. Trewthella, J., Duff, A. P., Durand, D., Gabel, F., Guss, J. M., Hendrickson, W. A., Hura, G. L., Jacques, D. A., Kirby, N. M., Kwan, A. H., Pérez, J., Pollack, L., Ryan, T. M., Sali, A., Schenidman-Duhovny, D., Schwede, T., Svergun, D. I., Sugiyama, M., Tainer, J. A., Vachette, P., Westbrook, J. and Whitten, A. F. 2017 publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution: an update. *Acta Cryst.*, D73, 710-728 (2017).
 8. Kikhney, A. G., Borges, C. R., Molodenskiy, D. S., Jeffries, C. M. and Svergun, D. I. SASBDB: Towards an automatically curated and validated repository for biological scattering data. *Protein Sci.*, 29, 66-75 (2020).
 9. Mathew, E., Mirza, A. and Menhart, N. Liquid-chromatography-coupled SAXS for accurate sizing of aggregating proteins. *J. Synchrotron Radiat.*, 11, 314-318 (2004).
 10. Bernadó, P., Shimizu, N., Zaccai, G., Kamikubo, H. and Sugiyama, M. Solution scattering approaches to dynamical ordering in biomolecular systems. *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Sub.*, 1862, 253-274 (2018).
 11. Shimizu, N., Yatabe, K., Nagatani, Y., Saijyo, S., Kosuge, T. and Igarashi, N. Software Development for Analysis of Small-angle X-ray Scattering Data. *AIP Conf. Proc.*, 1741, 050017 (2016).
 12. 米澤健人, 清水伸隆. ゲル濾過クロマトグラフィーと組み合わせたタンパク質 X 線溶液散乱解析技術. *生物物理*, 60, 180-184 (2020).
 13. <http://pfwww.kek.jp/saxs/MOLASS.html>