



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6回 研究会 資料

2022年6月29日 (水)
13:30～17:10

ミーティングスペースAP日本橋 (東京)
(ハイブリッド形式で開催)

R022 量子構造生物学委員会 第6回研究会 プログラム

2022年6月29日（水）

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
(ハイブリッド形式で開催)

13:30 – 13:40

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）

13:40 – 14:40 (講演1)

除菌消臭剤 MA-T のメカニズム解明に基づく酸化制御技術の開発とその応用

大阪大学・大学院薬学研究科
井 上 豪

14:40 – 15:10 休憩

15:10 – 16:10 (講演2)

生命機能に迫る SPring-8 サイトの相関構造解析プラットフォーム

理化学研究所・放射光科学研究中心
山 本 雅 貴

16:10 – 17:10 (研究交流討論)

委員間の自由討論

除菌消臭剤 MA-T のメカニズム解明に基づく 酸化制御技術の開発とその応用

Development and Application of Oxidation Control Technology
Based on Mechanism Elucidation of the Disinfectant/Deodorant MA-T

大阪大学大学院薬学研究科

井 上 豪

Tsuyoshi Inoue

Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University

クライオ電子顕微鏡は、膜タンパク質や超分子複合体など良質の結晶が得られ難い標的に限らず、広く原子分解能で構造を決める際の第一選択として用いられるようになった。X線結晶構造解析ではどうしても結晶化を行う必要があり、高濃度の塩や生理条件とは異なるpHなど結晶化条件に縛られた構造しか得られないが、クライオ電顕では生理条件に近い状態で構造を観察することができる。また、解析に必要なサンプル量も大幅に抑えることができ、Protein Data Bankへの登録数も膜タンパク質に限ればクライオ電顕を用いて得られた構造の方が結晶構造解析で得られた数よりも上回っている。

しかし、結晶化が不要になったものの、標的タンパク質を単粒子の状態で分散させ、薄い氷の中で包埋するプロセスに時間を要する場合があり、これがボトルネックとなっている。単粒子状態で凍結する必要があることから先ず濃度調節から行うことが多いが、タンパク質によっては低濃度にした場合に全てのタンパク質粒子がカーボン膜に吸着されたり、気液界面に吸着されて優先配向の問題を生じたりすることがある。このため氷包埋のプロセスでは様々な条件で検討する必要があり、一部はロボット化され、加速されてはいるもののサンプル調製には未だ多くの時間と労力を必要とするのが現状である。

そこで我々は、除菌消臭剤 MA-T のメカニズム解明によって発見された新規化学反応を活用して金属グリッド上に貼り付けたアモルファスカーボンやグラフェン膜の表面に酸素官能基を導入し、化学修飾を行うことによって標的分子を固定化する新たなサンプル調製法の開発に取り組んだ。

MA-T は、"アルコール"などと同様、除菌・消臭剤のカテゴリー名称の 1 つであり、「要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (Matching Transformation System[®])」の略称である。必要な時に必要な量だけ活性種を生成する特性を有していることから命名された。日本の航空機のほぼ全てで採用されているほか、羽田国際線ターミナルの 100 カ所以上のトイレでも常時噴霧されている。高い安全性を保持しながらも、多くの細菌のほか、SARS、MERS、SARS-CoV-2 などのウイルスに対しても有効に働いて不活化することができる¹。吹田市保健局にも協力を頂いて行った市販のマウスウォッシュを用いた臨床実験でも含嗽すれば感染者の口腔内に存在するウイルスの感染力（ウイルス力価）が一時的にゼロになることも分かり、小澤征爾音楽塾の 3 年ぶりのオペラ開催にも大きく貢献した。

この MA-T は、2015 年、医薬品開発に応用したいという相談と共に大阪大学創薬サイエンス部門に持ち込まれた。当初、MA-T の成分は非開示だったものの、癌患者に対する医師主導治験の結果からラジカル活性種の存在を予想し、ラジカル研究の第一人者である福住俊一教授らに相談し、亜塩素酸イオンの水溶液中から極僅かに生成するラジカル活性種の存在が実証され、MA-T の反応メカニズムが解明された。大阪大学高等共創研究院の大久保敬教授らは、これにヒントを得て、MA-T の水層でラジカルを発生させ、フルオラス溶媒中で化学反応を行うという二層系の反応を構築し、超高難度と考えられてきたメタンの酸化に成功した。気体燃料であるメタンやエタンを、安価な試薬と可視光のみで常温・常圧下、ほぼ 100% の収率で液体燃料であるアルコールやカルボン酸に変換できることから²、北海道の興部町において 1,000L のバイオメタンガスの液化プラントも稼働し始めている。一方、高い毒性のため製造や輸送に厳格な規制のあるホスゲンを使用することなく、汎用性の有機溶媒であるクロロホルム溶媒中でこれを発生させ、医薬品の合成中間体として極めて重要なカルバモイルクロリドを容易に合成する反応も開発されている³。これらの反応は高分子材料の表面酸化修飾にも応用可能で、可視光で活性化させた二酸化塩素ガスを吹き付けるだけでポリプロピレンをはじめとした汎用性高分子の表面にヒドロキシ基やカルボキシ基を導入して親水性を付与できるほか、接着やメッキなど様々な物質を

結合させることも可能となった⁴。

そこで、クライオ電顕用のグリッドの支持膜に用いられるアモルファスカーボンやグラフェンに本反応を適用し、酸素官能基の導入と化学修飾によってタンパク質を固定化する方法を検討した。アモルファスカーボンに導入されたヒドロキシ基やカルボキシ基にはエピクロロヒドリンや N-ヒドロキシスクシニミド (NHS) を用いて化学修飾を行えば、それぞれタンパク質の Lys 残基や、カルボキシ基を有する Asp/Glu 残基と結合することで固定化が可能となり、バッファーで洗浄してもタンパク質が残存することが判った。しかし、アモルファスカーボンの蒸着で得られる支持膜は比較的厚いうえに、ムラも生じ易く、高分解能のデータを必要とするクライオ電顕の単粒子解析には不向きと考えられた。一方、グラフェンにはヒドロキシ基のみが導入されることが判り、生命機能研究科の難波啓一教授らと共同してグラフェン上にエポキシ基を導入したグリッド (Epoxidized Graphene Grid; EG-Grid) の開発に成功した⁵。

標準蛋白質である β -galactosidase、GroEL、GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)、apo ferritin に対して EG-Grid を試したところ氷包埋のプロセスはほぼ 1 回のトライアルでデータ収集を行うことができ、それぞれ 1.83 Å, 1.98 Å, 2.15 Å, 1.29 Å 分解能で構造解析に成功した。特に、優先配向の問題を抱える GroEL や GAPDH については 1 枚あたりの有効な粒子の数は飛躍的に増大し、撮影枚数も 10 分の 1 以下に抑えることができた (図)。これはグラフェンという sp2 炭素のみで構成された平面分子の上で標的のタンパク質粒子がランダムに結合して残り、気液界面に吸着された分子はろ紙で吸い取ることができたためと考えている。同様に、優先配向の問題を抱える V1ATPase も試したところ、従来法と比べて飛躍的に分解能が向上し、2.9 Å 分解能で解析することができた。

他に抗原-抗体複合体について試したが、SARS-CoV-2 の Spike Protein(欧州型 D714G)やこれを認識する 7 種類の機能性抗体との複合体の解析では少量のサンプルを氷上で混合するだけで全て凡そ 2~3 日のうちに構造解析に成功した^{6, 7}。

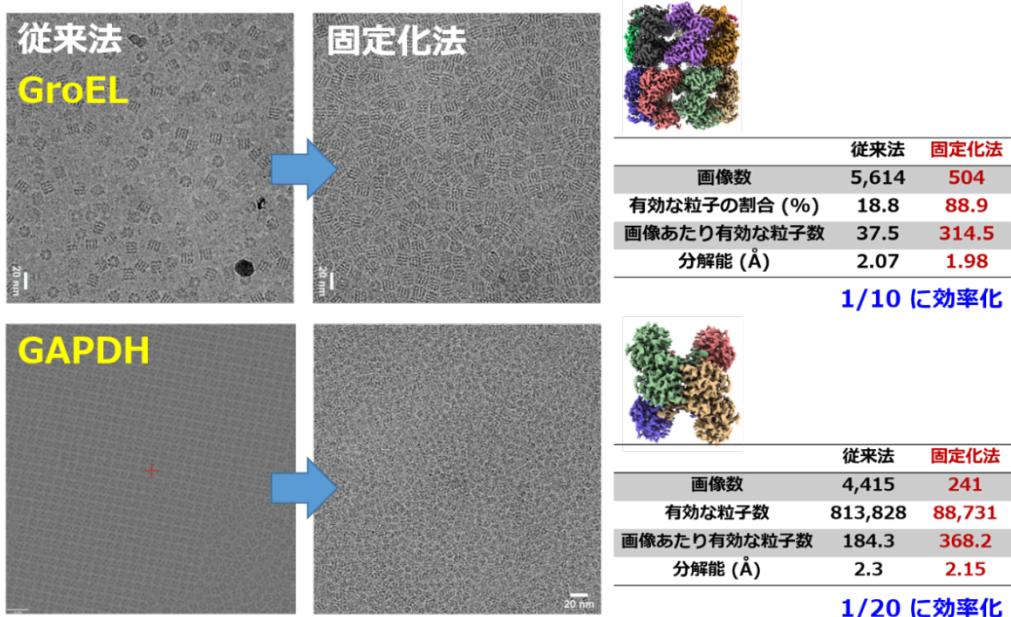


図. 従来法と EG-Grid を用いた場合のデータ収集の比較

本講演では MA-T に関する広範な応用化研究の中でも、クライオ電顕用のツールとして開発した EG-Grid の応用例について紹介する。

最後に、本研究にあたり淺原時泰准教授、森口舞子特任助教、大久保敬教授、安達宏昭特任教授、堀江智絵氏、元山朋子氏らに材料開発を、藤田純三特任助教、牧野文信招聘准教授、難波啓一特任教授らに EG-Grid の開発とクライオ電顕の利用で終始適切に指導を頂いた。また、装置の使用に際しては日本電子株式会社に多大な協力を頂いた。この場をお借りして深謝の意を表する。

-
1. Shibata, T.; Urakawa, R.; Ono, C.; Akeda, Y.; Sakai, T.; Hamaguchi, S.; Takamori, K.; Inoue, T.; Tomono, K.; Konishi, K.; Matsuura, Y., Verification of MA-T Safety and Efficacy Against Pathogens Including SARS-CoV-2. *BPB Reports* **2021**, 4 (3), 78-84.
 2. Ohkubo, K.; Hirose, K., Light-Driven C – H Oxygenation of Methane into Methanol and Formic Acid by Molecular Oxygen Using a Perfluorinated Solvent. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, 57 (8), 2126-2129.
 3. Asahara, H.; Takao, N.; Moriguchi, M.; Inoue, T.; Ohkubo, K., Visible-light-induced phosgenation of amines by chloroform oxygenation using chlorine dioxide. *Chemical Communications* **2022**, 58 (42), 6176-6179.

4. Ohkubo, K.; Asahara, H.; Inoue, T., Photochemical C–H oxygenation of side-chain methyl groups in polypropylene with chlorine dioxide. *Chemical Communications* **2019**, *55* (32), 4723-4726.
5. Fujita, J.; Makino, F.; Asahara, H.; Moriguchi, M.; Kumano, S.; Anzai, I.; Kishikawa, J.-i.; Matsuura, Y.; Kato, T.; Namba, K.; Inoue, T., Epoxidized graphene grid for high-throughput high-resolution cryoEM structural analysis. *bioRxiv* **2021**, 2021.11.17.468963.
6. Maeda, R.; Fujita, J.; Konishi, Y.; Kazuma, Y.; Yamazaki, H.; Anzai, I.; Yamaguchi, K.; Kasai, K.; Nagata, K.; Yamaoka, Y.; Miyakawa, K.; Ryo, A.; Shirakawa, K.; Makino, F.; Matsuura, Y.; Inoue, T.; Imura, A.; Namba, K.; Takaori-Kondo, A., Nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants. *bioRxiv* **2021**, 2021.10.25.465714.
7. Maeda, R. F., J.; Konishi, Y.; Kazuma, Y.; Yamazaki, H.; Anzai, I.; Yamaguchi, K.; Kasai, K.; Nagata, K.; Yamaoka, Y.; Miyakawa, K.; Ryo, A.; Shirakawa, K.; Makino, F.; Matsuura, Y.; Inoue, T.; Imura, A.; Namba, K.; Takaori-Kondo,, A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron. *Commun. Biol., in press.*

生命機能に迫る SPring-8 サイトの相関構造解析プラットフォーム

Correlation Structure Analysis Platform for SPring-8 Sites
Approaching Biological Functions

理化学研究所・放射光科学研究センター
山 本 雅 貴

Masaki Yamamoto
RIKEN SPring-8 Center

1. はじめに

あらゆる生命の仕組みはタンパク質や核酸など生体分子の原子レベルの立体構造とその分子間の相互作用を基に組み立てられており、その立体構造情報は現代の生命科学研究にとって最も重要な情報である。生体高分子の構造研究では、今までX線結晶構造解析がその中心的な役割を担ってきた。1997年に供用開始した SPring-8 でも 6 本のタンパク質結晶構造解析用ビームラインが稼働中である。そこでは膜タンパク質など高難度解析試料に向けた高度化に取組み、高輝度マイクロビームは微小結晶からの構造解析の扉を開き¹⁾、また測定精度の飛躍的な向上はサブ Å 分解能という原子レベルでの構造機能解析を可能にした。さらに、2012年に供用開始した XFEL 施設/SACLA²⁾の登場により結晶構造解析は大きな転換期を迎える。XFEL のフェムト秒大強度 X 線パルスは放射線損傷の克服や構造ダイナミックス研究など新たな構造解析を開拓にしつつある。しかし、機能発現が生体高分子の構造変化や生体高分子同士の弱い相互作用による超分子複合体の結晶化は極めて難しく、結晶に適らない構造解析手法の実現が大きな課題であった。近年、クライオ電子顕微鏡（以下、クライオ電顕）の単粒子像解析法が目覚ましい進歩を遂げ、試料を結晶化することなくわずかな水溶液試料から近原子分解能の構造解析が可能となりつつある³⁾。また、動的な構造多型を含む超分子複合体のアンサンブル構造解析も可能なため、今後の生命科学研究の発展には欠かすことのできない重要な基盤技術として注目されている。そこで、SPring-8 サイトでも結晶構造解析と相補的なクライオ電顕を導入して、それぞれの解析手法の利点を活かして生体高分子の機能発現機構に迫る「相関構造解析」に力を入れている。

2. マイクロビームによる高難度試料の構造解析

創薬ターゲットをはじめとした高難度解析試料の微小結晶では、結晶以外にも X 線が照射される数十ミクロン以上の X 線ビームでは、高い寄生散乱により微弱な結晶からの回折シグナルの大幅な S/N 低下により高精度高分解能回折データ収集が困難である。理研ターゲットタンパク BL (BL32XU) では、集光ビームサイズ $1\mu\text{m}$ という世界最小かつ最高光子密度を誇るマイクロビームを実現して、膜タンパク質等の微小結晶からでも高分解能の回折イメージ取得を可能にした⁴⁾。BL32XU の高輝度微小ビームの利用は微小結晶からの高 S/N 測定を可能にした反面、単位時間あたりの照射 X 線量増加による放射線損傷により、一つの結晶から高分解能かつ完全な回折強度データ収集は困難である。そこで、放射線損傷を考慮したデータ収集条件を最適化するプログラム KUMA を開発した。また、膜タンパク質の脂質メソフェーズ法で得られた微小結晶（以下 LCP 結晶）では、可視光の望遠鏡では LCP 結晶の確認が困難であった。そこで、高速ピクセルアレイ型検出器を利用し X 線マイクロビームをプローブとしたクライオループを自動 2 次元走査する高速ラスタースキャンシステム INOCC と 2 次元走査で得られた大量の回折イメージから回折点の有無で結晶位置を識別するプログラム SHIKA を開発した。これにより、ループ内の結晶の位置の検出を高速化・自動化して KUMA と組み合わせることで大量の微小結晶から回折データの全自动測定を可能にした。さらに、大量の結晶から得られる多くのデータから結晶の同型性を考慮したクラスタリング処理によるデータ統合を含めたデータ処理システム KAMO⁵⁾を開発して、全自动データ収集システム ZOO⁶⁾が完成した（図 1）。そこでは、クライオループ上にのった数十個の微小結晶から部分的な（例えば 10 度分）データ収集を行い、それらをマージして構造解析に

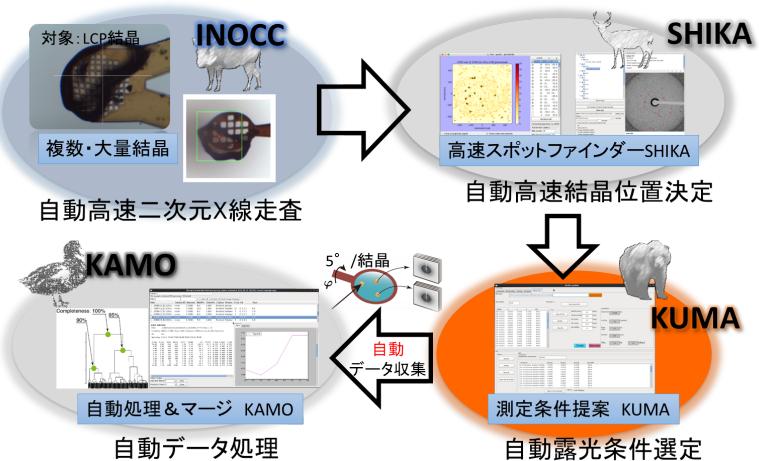


図 1 全自動データ収集システム ZOO のデータ収集の流れ

必要な一つのデータセットを完成させる Small wedge serial crystallography (SWSX) の利用を進めた。複数の結晶を収め凍結したクライオループを多数用意するだけで、全自動で高精度回折強度データを入手できる。すでに膜タンパク質を含む多数の構造解析に成功している^{7,8,9)}。ZOO システムに特化した自動データ収集ビームライン BL45XU を建設し、新しい放射光利用体系の確立を進めている。

3. High data-rate MX (HDRMX)による構造ダイナミクス研究

検出器やサンプル交換ロボットの高性能化や ZOO システムをはじめとした自動データシステムの一般化に伴い、データ収集の高速化や自動化が進みビームラインから得られる測定データ量は増加の一途をたどり、世界的に放射光施設では High data-rate MX (HDRMX) とよばれる大量データからの結晶構造解析が重要になっている¹⁰⁾。ZOO システムの SWSX 法では、大量の回折データから KAMO の階層的クラスタリングにより同型データのみを選別することで、大量の微小結晶から満足な強度統計値を示すクラスタノード（データセット）を選択し良質な回折データセットを取得している。ところが大量の結晶データがクラスタリングにより、複数の良質データセットにクラス分けされ、それら異なるデータセットの解析結果が異なる構造を示すケースもある。この解析結果は、結晶間の多型構造を回折データのみから分類できる可能性を示している。現在、結晶間や結晶内の場所によって違った構造が含まれる場合に、それらを適切に分類して構造多型を抽出す

る自動構造解析

パイプライン

NABE の開発を

進めている（図

2)。微小ビーム

を利用した

HDRMX、さら

に階層的クラス

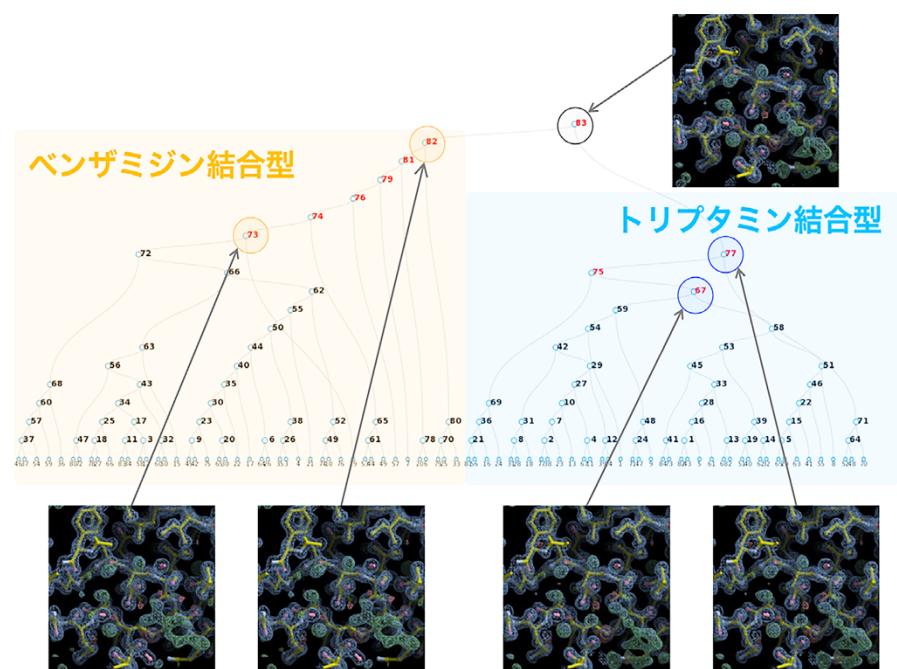


図2 NABE クラスター解析によるトリプシン化合物複合体の解析例

タリングは構造ダイナミクス解析に繋がる有力な候補であり、自動測定による桁違いな測定データの有効活用が期待できる。

4. X線自由電子レーザーSACLAでの構造生命科学研究

2012年からXFEL施設として一般供用を開始したSACLAは、超高輝度かつ100兆分の1秒(10フェムト秒)という極短パルス光として位相のそろったX線を創り出す。フェムト秒の大強度X線パルスは、放射線損傷の克服や時分割ダイナミクス研究など新たなタンパク質構造解析ツールとして大いに期待されている。現在、微小結晶から室温での測定を可能にするSFX(Serial Femtosecond Crystallography)¹¹⁾や大型結晶を使った高分解能での無損傷結晶構造解析¹²⁾などで革新的な成果が創出されている。特にXFELのフェムト秒X線レーザーは、フェムト秒からピコ秒といった高い時間分解能でタンパク質の反応過程に迫る時分割実験が可能である(図3)。バクテリオロドプシンをはじめとした光励起によるタンパク質の反応過程^{13,14)}を明らかにするなど、様々なタンパク質における構造変化や化学反応を原子分解能で捉えることに成功している。現在は酵素など

のナノ秒オーダーの反応を原子分解能で追跡するため、サブミリ秒から秒オーダーにまで反応追跡の適用範囲を広げる二液混合による反応制御測定技術に取組んでいる。

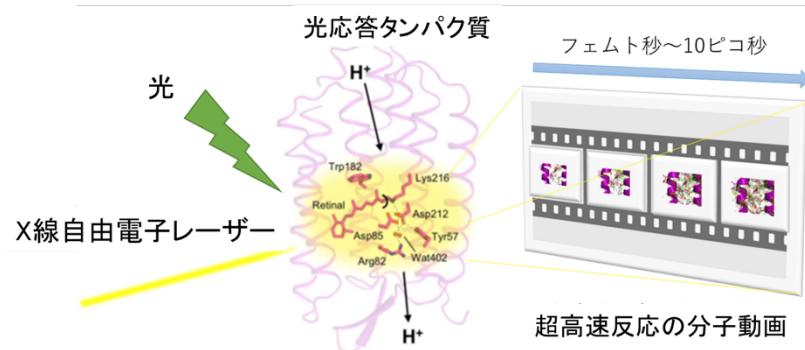


図3 XFELによる光励起による時分割構造解析の概念

5. 生命機能に迫る相関構造解析

創薬研究をはじめとする最先端の生命科学研究では、各々の生命機能にかかわるタンパク質の正確かつ高分解能での静的構造情報に加え、それらのタンパク質がどの様に構造を変化させ、また相互作用して生命機能を実現するのか、その反応過程のダイナミクス解明も重要な課題となる。近年のクライオ電子顕微鏡の急速な技術革新は近原子分解能でのタンパク質の単粒子解析を可能にし、2017年ノーベル化学賞が授与さ

れている。クライオ電子顕微鏡の単粒子解析は溶液状態での構造解析が可能で天然状態に近いタンパク質の構造多様性を含む動的な構造に迫れると期待されている。SPring-8 サイトにも 2020 年度「先端研究設備整備補助事業」により、共用を目的としたハイエンドクライオ電顕が導入された。SPring-8 では、これまでに培った SPring-8/SACLA の共用実績をもとに、2021 年度後半よりクライオ電顕を共用に供している。大量の電顕イメージのクラスタリング解析により多型構造を分類し、構造ダイナミクスを解明した事例^{15,16)}も報告されている。高分解能での静的構造情報に加え動的構造情報は生命機能を理解するうえで欠くことのできない情報となっており、単独の解析手法による個別構造情報だけではなく、様々な時空間階層での生体高分子の構造情報の解析を進めるため、結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡等からの様々な構造解析情報を計算機の力を借りて有機的に組み合わせた「相関構造解析」(図 4) の推進が重要で、Toll 様受容体 TLR7 の阻害機構の研究などで成果¹⁷⁾が出始めている。2022 年度から「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業」を引き継ぐ「生命科学・創薬研究支援基盤事業 (AMED/BINDS)」(<https://www.binds.jp/>) が開始される。新 BINDS プロジェクトの解析支援でも「相関構造解析」による空間的かつ時間的な構造ダイナミクス情報による生命機能発現メカニズム解明に取組んでいく。

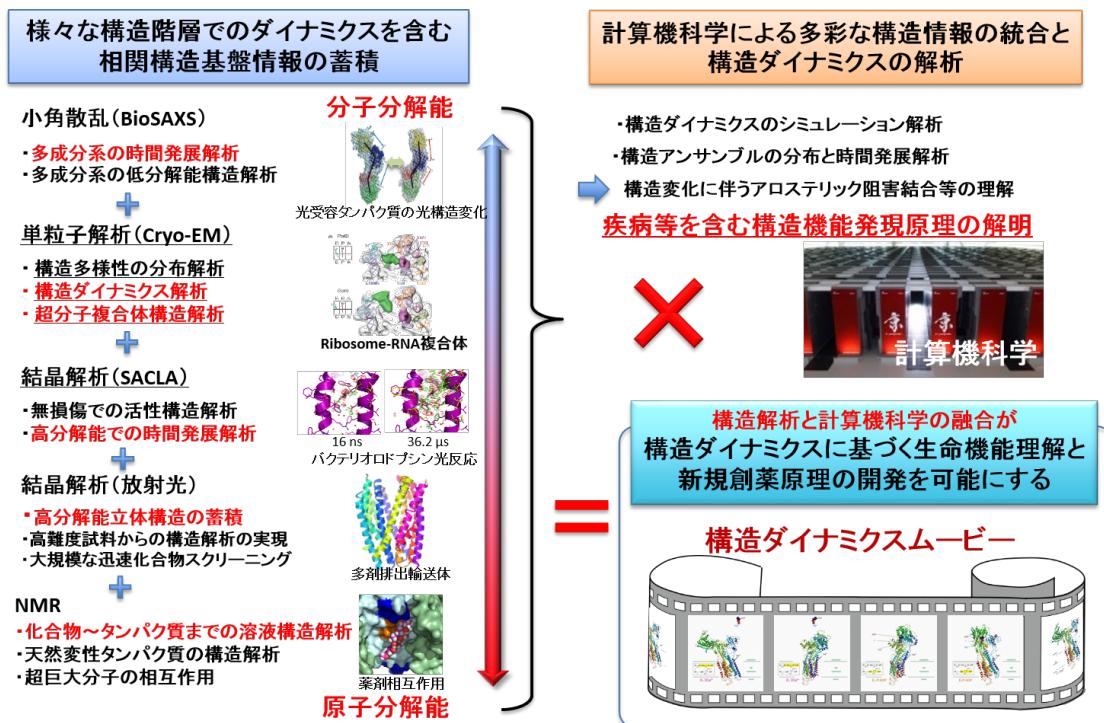


図 4 様々な構造解析技術を組み合わせた「相関構造解析」の概要

6. おわりに

放射光は、タンパク質結晶構造解析に測定データ精度の大幅向上や新規位相決定法の開発など飛躍的な進歩をもたらし、現代の構造生命科学研究の発展にとって欠かすことの出来ないものとなった。また、XFELの登場は、放射線損傷の影響を全く受けていない原子レベルでの高分解能構造や反応過程を解析できる超高速時分割結晶構造解析など、新しいタンパク質結晶構造解析の扉を開いた。それらの最先端の結晶構造解析に新たにクライオ電顕を加えた「相関構造解析」は新しい構造生命科学研究の到来を期待させる。本講演では、SPring-8 サイトの最新の結晶構造解析と相関構造解析への取り組みを紹介する。

-
1. M. Yamamoto, *et al.* *IUCrJ* **4**, 529 (2017).
 2. T. Ishikawa, *et al.* *Nat. photonics* **6**, 540 (2012).
 3. W. Kuhlbrandt, *Science* **343**, 1443 (2014).
 4. K. Hirata, *et al.* *AIP conference proceedings* **1234**, 901-904 (2010).
 5. K. Yamashita, *et al.* *Acta Cryst. D* **74**, 441 (2018).
 6. K. Hirata, *et al.* *Acta Cryst. D* **75**, 138 (2019).
 7. K. Kumazaki, *et al.* *Nature* **509**, 516 (2014).
 8. W. Shihoya, *et al.* *Nat. Commun.* **9**, 4711 (2018).
 9. R. Suno, *et al.* *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 1150 (2018).
 10. H. J. Bernstein, *et al.* *Struct. Dyn.* **7**, 014302 (2020).
 11. H. N. Chapman, *et al.* *Nature* **470**, 73 (2011).
 12. K. Hirata, *et al.* *Nat. Methods* **11**, 734 (2014).
 13. E. Nango, *et al.* *Science* **354**, 1552 (2016).
 14. T. Hosaka, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**, e2117433119 (2020).
 15. N. Fisher, *et al.* *Nature* **466**, 329 (2010).
 16. M. Liao, *et al.* *Nature* **504**, 107 (2013).
 17. S. Tojo, *et al.* *Nat. Commun.* **11**, 5204 (2020).