

B1-1 SPring-8高難度タンパク質結晶構造解析

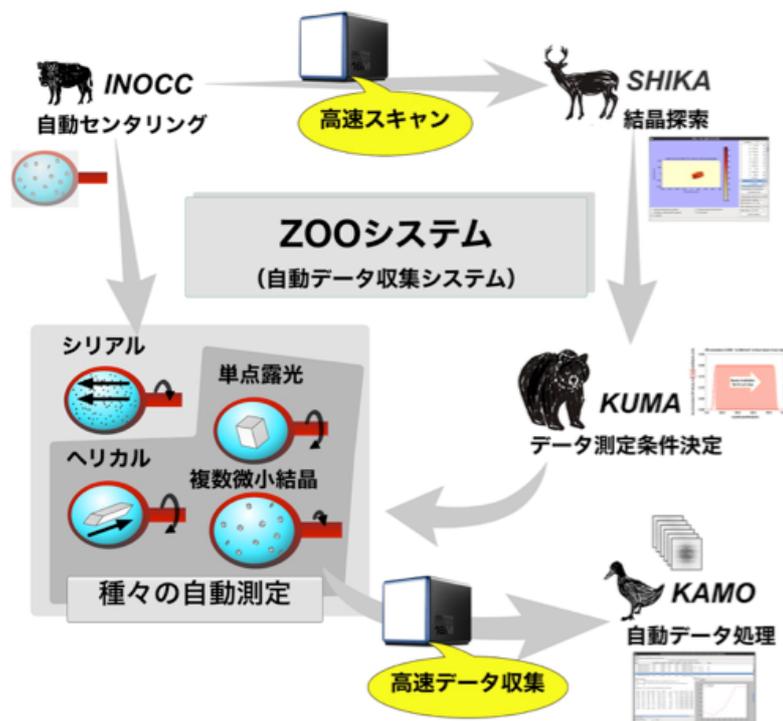
タンパク質微小結晶を利用したスクリーニング・データ収集。自動データ収集システムZOOを利用した微小結晶・ルーチン結晶構造解析データ収集

[1] 支援担当者

所属	①理化学研究所 ②高輝度光科学研究センター	
氏名	①平田 邦生、河野 能顕、山下 恵太郎 ②長谷川 和也	
AMED 事業	ユニット/領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相間構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （SPring-8/SACLAにおけるタンパク質立体構造解析の支援および高度化）
	代表機関 代表者	理化学研究所 山本 雅貴
支援技術のキーワード	微小結晶、スクリーニング、大量データマージ、全自動データ収集	

[2] 支援技術の概要

特にSPring-8構造生物学挿入光源ビームラインでは膜タンパク質の微小結晶を用いた高分解能構造解析を中心とした高難度試料からのデータ収集に特化した高フラックス微小ビームの利用を実現してきた。さらにデータ収集時の放射線損傷の見積りや微小結晶の位置調整（センタリング）を簡便化し、高効率にデータ収集が可能な自動データ収集システムZOO[1][2]の高度化と運用を行っている。これらを利用可能なビームタイム支援に加え、課題保有者が来所せずにスクリーニングやデータ収集を実現できるラピッドアクセス測定も提供している。利用者の負担を減らしビームラインの利用を簡便にすることにより、高難度試料の結晶化条件の最適化サイクルを短縮、さらに試料のサイズを問わず大量データ収集を利用した高分解能構造解析技術についても測定・解析支援を行っている。



2種の実験形態をサポート

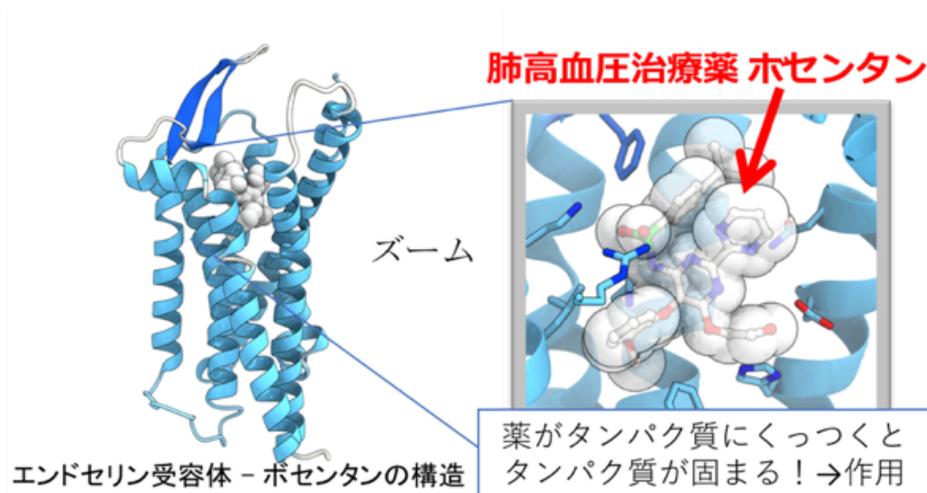
- 1) 来所データ収集 → 高難度試料の測定について実験および解析支援（自動データ収集を含む）測定プロトコル（1点露光データ収集、ヘリカルデータ収集、multiple small wedgeデータ収集、SSROX[3]などの測定スキームが利用可能）
- 2) 来所なしラピッドアクセス → 利用者から送付された結晶をZOOシステムを利用してスクリーニングおよびデータ収集を行う。タンパク結晶か否か、回折能の実測データをタイムリーにフィードバックする。

(参考)

- [1] Hirata, K., et al., Acta Cryst.(2019) D75, 138-150.
- [2] Yamashita, K., et al., Acta Cryst.(2018) D74, 441-449.
- [3] Hasegawa, K., et al., J. Synch. Rad.(2017) 24, 29-41.

[3] 支援技術の利用例

本研究では体からの命令をうけとって血圧を上げるGタンパク質（エンドセリン受容体）に血圧を下げる薬ボセンタンが結合した構造解析を実現し、この成果で薬（ボセンタン）がなぜ作用するか（血圧が上がらなくなる）が解明されました。このような薬が作用するメカニズムを解明し情報を蓄積することでさらに効果のある薬剤の開発などが期待できます。

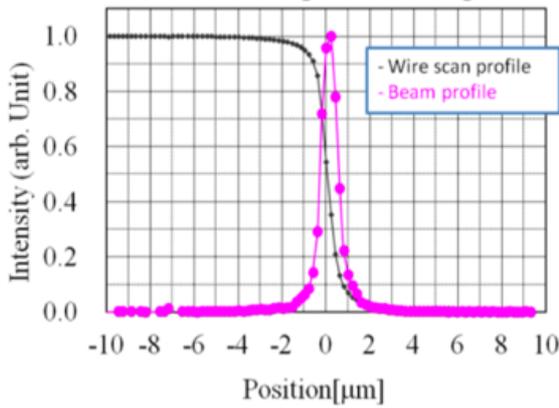


(参考) Shihoya W., et al. "X-ray structures of endothelin ETB receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, (2017) 24, 9, 758-764.

[4] 支援担当者の研究概要

SPring-8の光源性能を活用した高フラックス微小ビームの安定供給および測定技術の開発・高度化を行い、世界に先駆けて微小結晶を利用した高難度タンパク質結晶構造解析の道を切り拓いてきた[4][5][6]。自動データ収集および自動データ処理を提供し、多数の結晶を用いた解析についてのノウハウを蓄積することで、さらなる高効率測定に向けた開発研究を行っている。

高輝度アンジュレータとEEMミラーによる高フラックス微小ビームの実現



ZOO : 自動化した測定スキーム

Experimental schemes

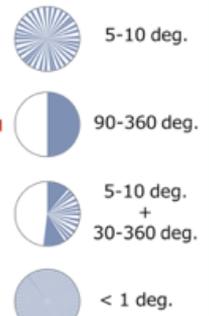
Wedge size (/crystal)

"Small wedge" 10-300 crystals

"Helical" and "normal" single or a few crystals

"Mixed" small & large crystals

"Serial Synchrotron Rotation" 300-10,000 crystals

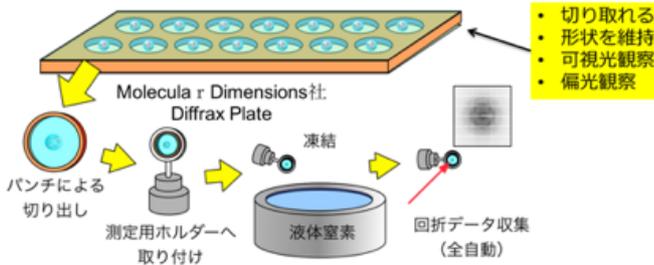


人間が実施するであろうすべてのスキームは自動化

結晶化~測定効率化

cryo in-situ 測定というsolution

COPフィルムによりガラスを代替→フィルムをホルダとして扱う

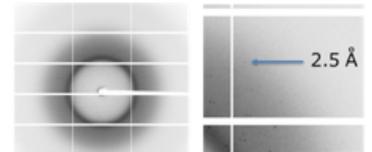


手間なく 手際よく
「生まれた結晶はすべて測定に！」

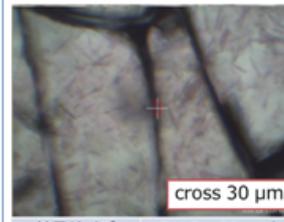
九州大学・神田研

cryo in situ測定の事例

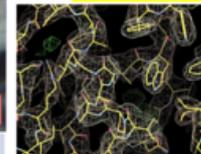
- 4Å のデータ収集に成功@BL32XU
- スポンジ相結晶の凍結が困難と相談
- M.D.プレートを紹介し結晶化
- ホルダ+パンチをもって九大へ
- 学生さんに伝授してBTで測定



5° x 219 datasets from 1 holder



結晶サイズ 5 x 5 x 30 μm³



4.0Å→2.8Å分解能

1wellの結晶からデータコンプリート!

(参考)

[4] Hasegawa, K., et al. *J. Synchrotron Rad.*, **20** (2013), 910-913.

[5] Hirata, K., et al. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **425**(2013), 012002

[6] Hirata, K., et al. *Advanced Methods in Structural Biology*, 5 ed., **22**, Tokyo: Springer Japan(2016), 241-273.

B1-2 SPring-8遠隔実験支援システム

凍結結晶送付によるメールイン・リモート実験の実施、微小結晶、ルーチン結晶構造解析データ収集

[1] 支援担当者

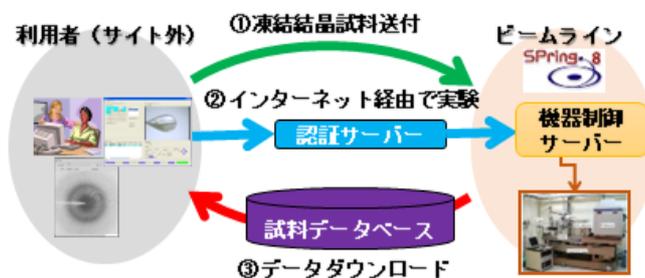
所属	①理化学研究所 ②高輝度光科学研究センター	
氏名	①上野 剛、平田 邦生 ②長谷川 和也、奥村 英夫	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相間構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （SPring-8/SACLAにおけるタンパク質立体構造解析の支援および高度化）
	代表機関 代表者	理化学研究所 山本 雅貴
支援技術のキーワード	メールイン、遠隔実験、自動測定、WEBデータベース	

[2] 支援技術の概要

SPring-8構造生物学ビームラインでは高難度試料を含めた自動回折データ収集システム開発の進展により、利用者が来所することなくデータ収集可能な遠隔実験が可能となっている。従来より支援を行ってきたWEBデータベースによる実験条件の指定や結果の閲覧が可能なメールイン測定[1]、実験室よりビームライン制御端末へ接続してデータ収集を行うリモート測定[2]の利用支援の他、微小結晶解析を目的に開発された自動データ収集システムZOO[3]を利用したデータ収集の利用が可能である。利用者の負担を減らしビームラインの利用を簡便にすることにより、膨大な数の試料を取り扱う高難度微小結晶解析や、創薬における化合物スクリーニングの効率的な実施への適用が期待される。

3種の実験形態をサポート

- 1) メールイン・データ収集 → WEBデータベースとオペレータ介助による実験代行
- 2) 遠隔実験 → 利用者自身で柔軟かつリアルタイムに実験
- 3) メールイン・データ収集 → ZOOによる自動データ収集



(参考)

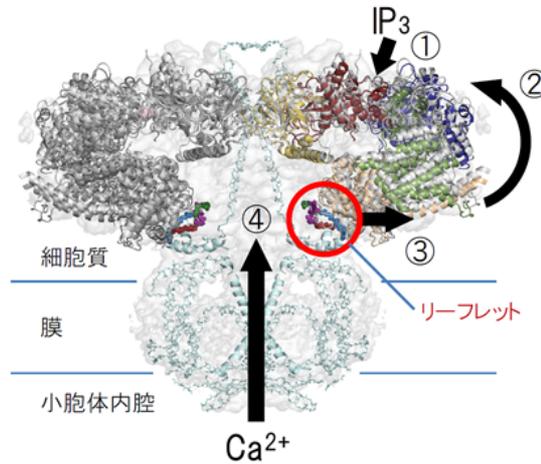
[1] Okazaki et al., Journal of Synchrotron Radiation **15** (2008), 288-291.

[2] Ueno G., et al., AIP Conference Proceedings **1741** (2016), 050021.

[3] Hirata, K., et al., Acta Cryst. **D75** (2019), 138-150.

[3] 支援技術の利用例

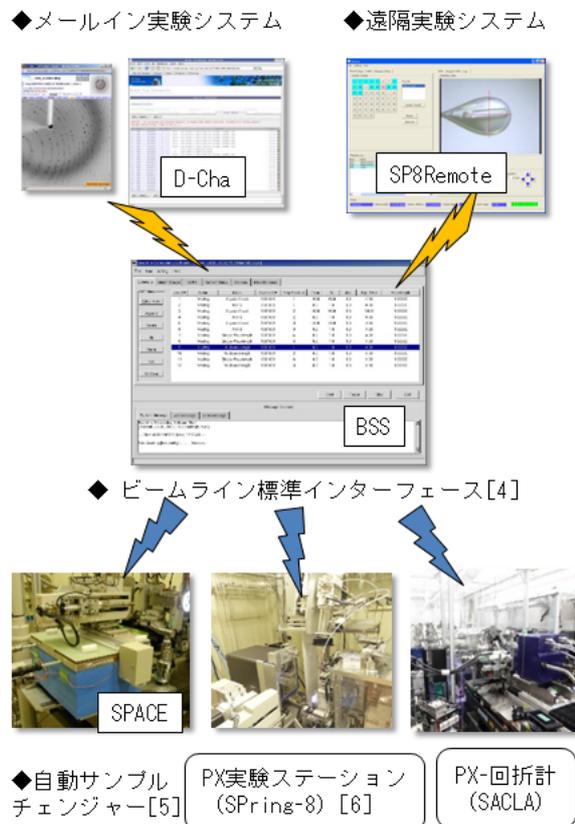
本研究ではメールインデータ収集による結晶試料のスクリーニング、および回折データ収集を実施し、脳機能に必要なIP3受容体の構造解析を行った結果、リガンドの結合を引き金に起こるリーフレット部を介した構造変化に伴う、カルシウムチャンネルの開閉機構が明らかになった。



(参考) “IP₃-mediated gating mechanism of the IP₃ receptor revealed by mutagenesis and X-ray crystallography”, Hamada K., et al., PNAS (2017) **114**, 4661-4666.

[4] 支援担当者の研究概要

放射光を利用したタンパク質結晶解析 (PX) ビームラインの自動化の推進や利用環境共通化のための開発・高度化を通じ、より効率的な利用及び新規測定法提供に向けた測定装置及びソフトウェア開発を進めている。今後は創薬開発等の支援に向けた薬剤複合体構造解析の自動化を目指している。



(参考)

[4] Ueno G., et al., Journal of Synchrotron Radiation **12** (2005), 380-384.

[5] Murakami H., et al., Journal of Applied Crystallography **45** (2012), 234-238.

[6] Ueno G., et al., Journal of Structural and Functional Genomics **7** (2007), 15-22.

B1-3 高エネルギーX線を利用した結晶構造解析

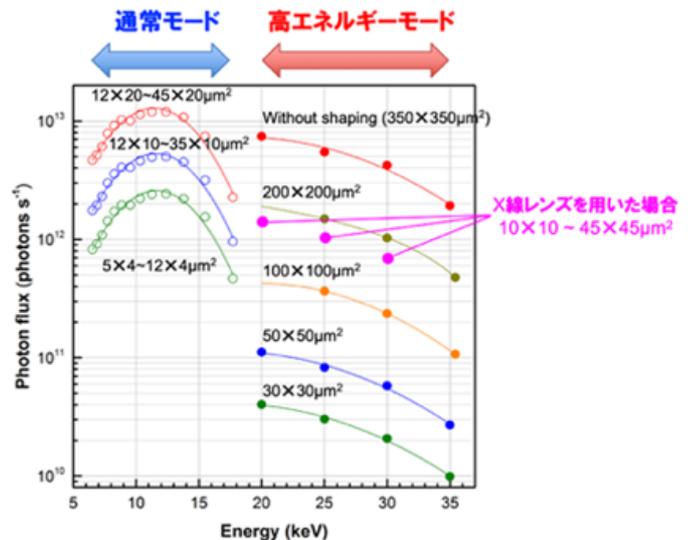
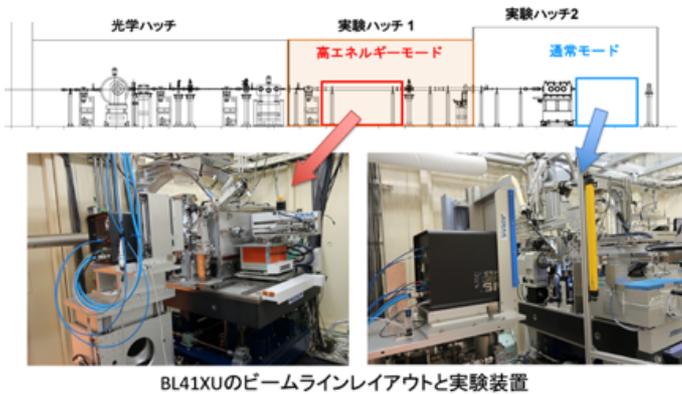
高エネルギーX線 (波長0.6~0.34Å)を用いた超高分解能構造解析、この領域に吸収端を持つ原子の位置の特定やそれを用いた構造決定を支援。

[1] 支援担当者

所属	①高輝度光科学研究センター タンパク質結晶解析推進室	
氏名	①長谷川 和也、水野 伸宏	
AMED 事業	ユニット/領域名 課題名	構造解析ユニット (構造解析領域) 創薬等ライフサイエンス研究のための関連構造解析プラットフォームによる支援と高度化 (SPring-8/SACLAにおけるタンパク質立体構造解析の支援および高度化)
	代表機関 代表者	理化学研究所 山本 雅貴
支援技術のキーワード	結晶構造解析、超高分解能構造解析、高エネルギーX線、異常分散	

[2] 支援技術の概要

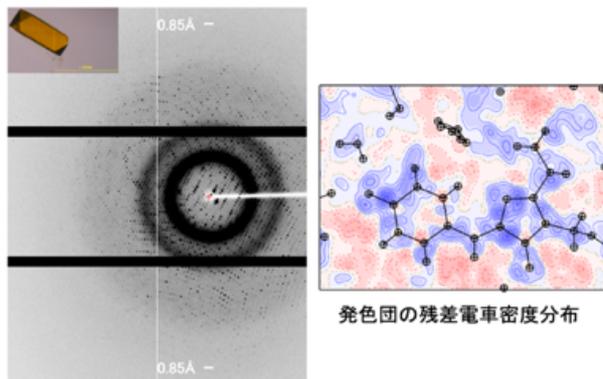
SPring-8 BL41XUは20~36keVの高エネルギーX線 (0.6~0.34Å)を用いた回折データ測定が可能な国内唯一のタンパク質結晶解析ビームラインである。分解能が0.8Åを超えるような超高分解能構造解析による水素原子や電子状態の可視化、高エネルギー領域に吸収端を持つI、Xe、Cd、Cs等の原子位置の特定や及びそれを用いた構造決定を行うことができる。そのために高エネルギーX線に特化した回折計を実験ハッチ1に整備している。一方、波長0.7~1.9ÅのX線を用いた実験(通常モード)は実験ハッチ2で行われ、主として高難度試料の構造解析に使用されている。



BL41XUの通常モードと高エネルギーモードのビーム強度

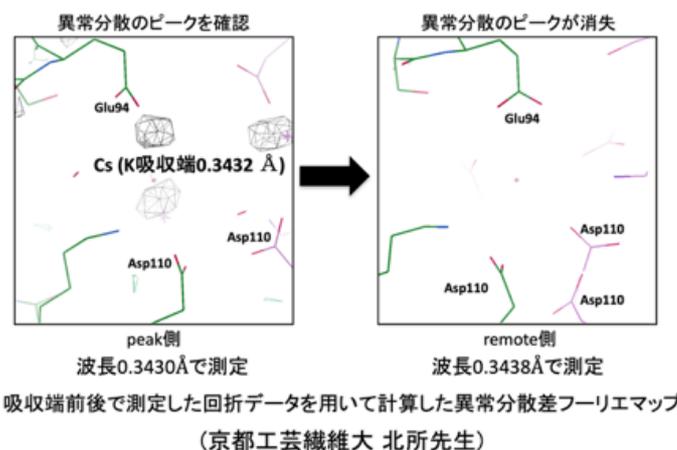
[3] 支援技術の利用例

1) 発光タンパク質GFPの構造解析を0.78Å分解能で行い、発色団周辺の水素の位置・水素結合ネットワークおよび電子密度分布を精密に決定することで発光機構を解明。



波長 0.35Å (35.4 keV)で測定した回折画像
GFPの超高分解能構造解析 (Takaba et al., *IUCrJ* (2019))
(京都大学 三木先生, 竹田先生)

2) Csが結合することが予想されていたタンパク質の結晶から、K吸収端前後の波長を用いて回折データ測定を測定。吸収端前後で異常分散差フーリエマップのピークが出現・消失すること確認し、Cs原子の位置を決定に成功した。



吸収端前後で測定した回折データを用いて計算した異常分散差フーリエマップ
(京都工芸繊維大 北所先生)

[4] 支援担当者の研究概要

高エネルギーX線を用いてタンパク質結晶の回折データ測定を行うために、光学系や回折計、試料マウント方法などの開発を行っている。

高エネルギーX線用光学系・回折計の整備

10~50μmに集光したX線を用いるため、X線レンズを用いた光学系を構築した。また、高エネルギーモードの利用頻度の増加に備えるため、通常モードとの切り替えを短時間で行うための新設計の回折計の構築も進めた。(長谷川)

新しいXe誘導体調整方法の開発 ガラスキャピラリー内でXeガス高圧状態のまま凍結する装置を開発し、高エネルギーモードでのXe誘導体のMAD/SAD測定環境を構築した。(水野)

B1-4 SPring-8:温湿度制御（HAG法）による生理活性状態での構造変化の解析

非凍結状態での回折実験、抗凍結剤の影響を低減した結晶凍結

[1] 支援担当者

所属	①高輝度光科学研究センター	
氏名	①馬場 清喜、熊坂 崇	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための関連構造解析プラットフォームによる支援と高度化 (SPring-8/SACLAにおけるタンパク質立体構造解析の支援および高度化)
	代表機関 代表者	理化学研究所 山本 雅貴
支援技術のキーワード	非凍結回折実験、HAG法、温度湿度制御	

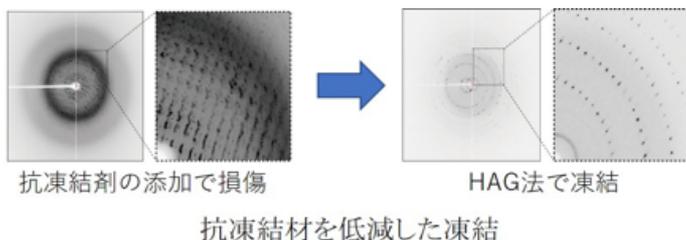
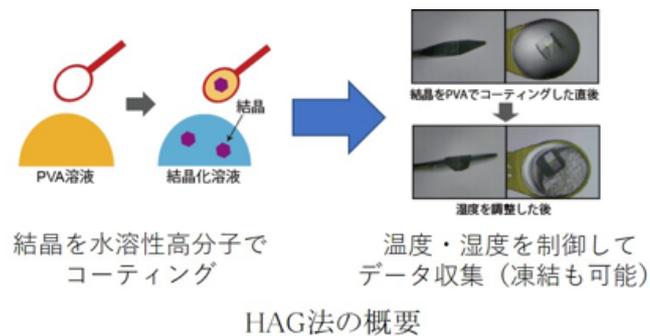
[2] 支援技術の概要

構造ダイナミクス解明に向けた構造多様性解析の実現に向けて、温湿度制御による生理活性条件での活性構造解析、SACLAと連携した生理活性条件での測定用条件スクリーニングの支援を行う手法・装置を提供する。

・非凍結状態での回折実験を実現する手法

タンパク質結晶は、水溶性高分子によりコーティングし、湿度制御する（Humid Air and Glue coating method：HAG法）ことで、非凍結状態で安定に質を保持した回折実験が実現できる[1]。

さらに、HAG法でマウントした結晶は、抗凍結剤の影響を低減した凍結操作も可能である。



(参考)

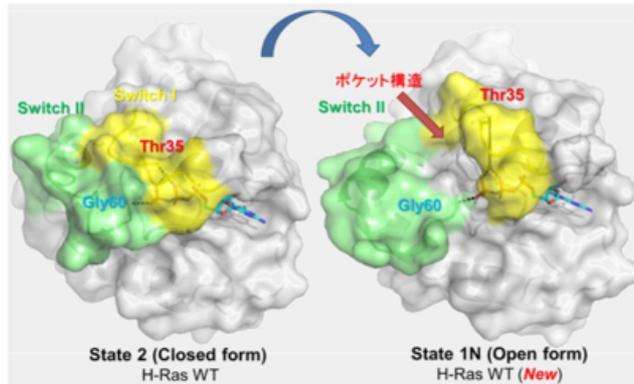
[1] Baba et al. Acta Cryst D69, 1839-1849 (2013).

[3] 支援技術の利用例

利用例1

Rasタンパク質は、細胞のがん化に関連して、その構造と機能の研究が進められている。

その一種であるH-Rasは、HAG法でマウントし湿度制御することにより、結晶内で構造変化が誘導された。この結果、下流シグナル伝達タンパク質と結合するスイッチ領域が開いた構造の解析が可能となった[2]。



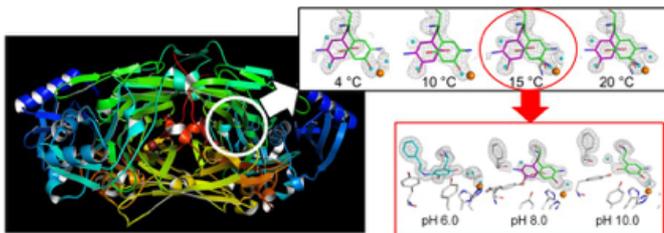
湿度制御による結晶内での構造変化誘導

(参考)

[2] Matsumoto *et al. Sci. Rep.*, **6**, 25931(2016).

利用例2

銅アミン酸化酵素は、様々な生物種に幅広く存在しており、一級アミン類をアルデヒドとアンモニアに分解する活性を持っている。その活性中心には、銅イオンと補酵素トバキノンを含んでおり、ヒトの血清中の本酵素は、糖尿病の発症にも関与している。銅アミン酸化酵素の結晶を温度制御ワークベンチ内でハンドリングしてHAG法でマウントし、調温調湿装置による温度・湿度制御環境下で回折実験を行うことで、非凍結結晶を安定に保ち、天然に近い状態での酵素タンパク質の構造変化を明らかにした。結晶温度を精密にコントロールすることにより、酵素が働くときに起きる構造変化の熱力学解析に成功した[3]。



pH・温度による構造変化を解明

(参考)

[3] Murakawa *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, **116**, 135-140 (2019).

[4] 支援担当者の研究概要

生理活性条件（室温など）のタンパク質から多様な状態の構造解析を行うために、手法・装置の開発を進めている。現在は、右に示す装置が利用可能である。さらに、以下の研究開発を行っている。

- ・温度制御調湿条件下での精密高速データ収集

より高精度での温度・湿度制御が可能となる調温調湿装置、より安定な温度環境を実現する温度制御ハンドリングワークベンチの高性能化を進めると共に、測定の自動化、高速化に向けた開発も進めている。



温度制御調湿装置
(4-20°C、50-100%R.H.)



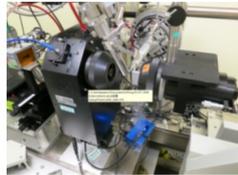
温度制御結晶操作
ワークベンチ (2-20°C)

- ・高速顕微分光測定の測定システムの開発

生理活性条件での変化をリアルタイムに観察するために、オンラインで、より高速な測定を可能とする顕微分光装置を開発する。



顕微分光装置
(クライオ、調湿対応)



顕微・ラマン吸収分光装置
(クライオのみ)

- ・BMBL高輝度化の取り組み

より短時間での測定は、高効率な実験が可能となる。そこで、分光器内結晶の非対称化などを導入し、高輝度化を進めている。[4]

(参考)

[4] Baba *et al.* *AIP Conf Proc*, **2054**, 060008 (2019).

B1-5 SPring-8タンパク質溶液散乱測定

放射光を用いたタンパク質溶液散乱測定による構造解析。

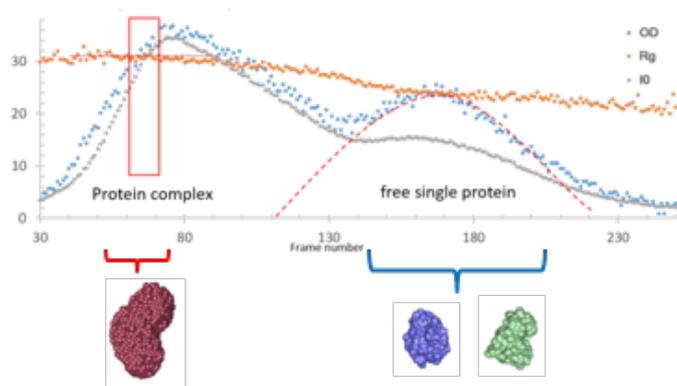
[1] 支援担当者

所属	①理化学研究所 放射光科学研究センター	
氏名	①引間 孝明、山本 雅貴	
AMED 事業	ユニット/領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 (SPring-8/SACLAにおけるタンパク質立体構造解析の支援および高度化)
	代表機関 代表者	理化学研究所 山本 雅貴
支援技術のキーワード	タンパク質溶液散乱測定、BioSAXS、SEC-SAXS、放射光	

[2] 支援技術の概要

SPring-8の高輝度X線を用いたタンパク質溶液散乱測定（BioSAXS）において以下の測定技術を用いて支援を行う。

- 溶液中の生体高分子の会合体形状の測定
- オンラインゲルろ過クロマトグラフィーによる複数の会合体の分離測定（SEC-SAXS）
- ストップフロー-2液混合装置を用いた4ミリ秒分解能からの時間分割測定（TR-SAXS）

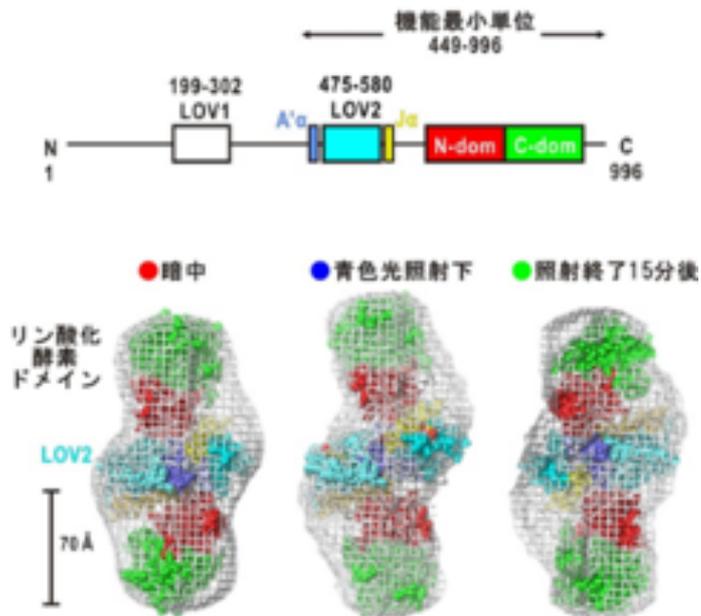


SEC-SAXSを用いた平衡会合体の分離測定例

現在、利用ビームラインをBL45XUからBL38B1へ移設中であり、本年度後期より、ビームライン利用実験の支援を再開する予定である。

[3] 支援技術の利用例

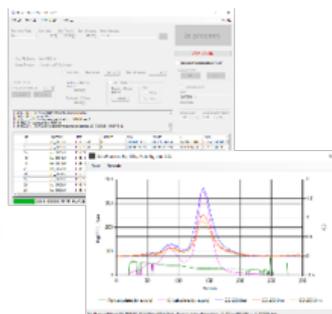
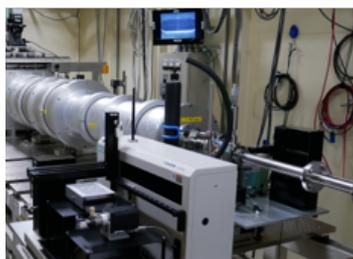
植物由来のフォトトロピン1の機能最小単位の溶液中での青色光受容前後の立体構造の変化を測定し、光受容による構造変化を担うアミノ酸の同定に成功した。



"Blue Light-excited Light-Oxygen-Voltage-sensing Domain2 (LOV2) triggers a rearrangement of the kinase domain to induce phosphorylation activity in Arabidopsis phototropin1", Oide et al, J. Biol. Chem., 291, 19975-10084 (2016).

[4] 支援担当者の研究概要

X線小角散乱 (Small Angle X-ray Scattering) と呼ばれる手法を用いて生体試料のナノスケールでの静的および動的な構造・機能相関解析を進めるために、BL45XUの高輝度X線の特徴を活かした測定装置およびソフトウェアの開発を進めている。SEC(Size Exclusion Chromatography)-SAXSでは、X線測定セルを真空チャンバー中に設置することにより、最小20μLのサンプル量でタンパク質溶液散乱測定が可能になった。これは実験室と同じ実験条件 (カラム、流速、温度、試料量など) で溶液散乱測定を行えることになる。



SEC-SAXSシステム

B1-6 X線自由電子レーザーを用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析法

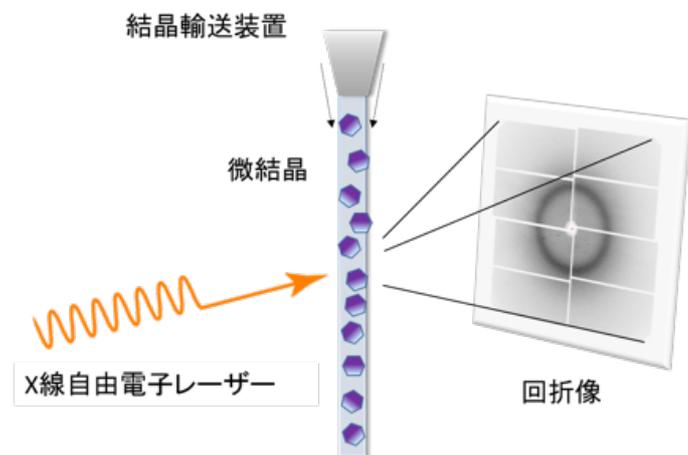
シリアルフェムト秒結晶構造解析。放射線損傷の影響を受けない常温での構造解析。フェムト秒時間分解能も可能な時分割実験。

[1] 支援担当者

所属	①京都大学 ②理化学研究所	
氏名	①/② 岩田 想、南後 恵理子、田中 里枝	
AMED 事業	ユニット/領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための関連構造解析プラットフォームによる支援と高度化 (SPring-8/SACLAにおけるタンパク質立体構造解析の支援および高度化)
	代表機関 代表者	理化学研究所 山本 雅貴
支援技術のキーワード	X線自由電子レーザー、シリアルフェムト秒結晶構造解析、時分割実験	

[2] 支援技術の概要

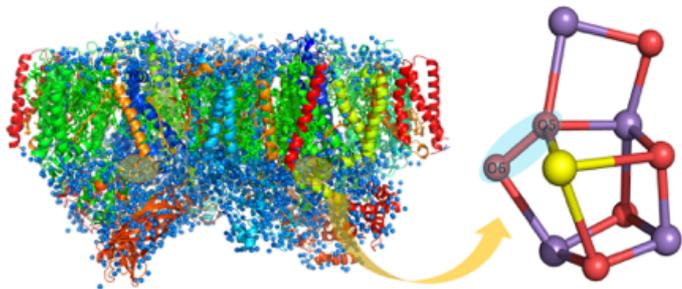
X線自由電子レーザーを用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析では、a) 放射線損傷の影響を受けることなく常温での構造を得ることや、b) フェムト秒～ピコ秒といった時間分解能でも時分割実験が可能であることが特徴である。



シリアルフェムト秒結晶構造解析のイメージ図

[3] 支援技術の利用例

バクテリオロドプシンの時分割実験のために開発した装置システムを用いて、光化学系IIの反応中間体状態の構造を明らかにした。

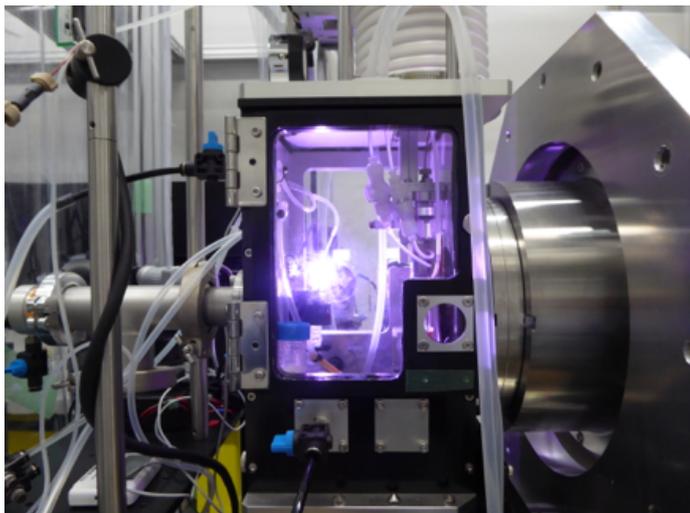


光化学系IIの反応中間体状態の構造。

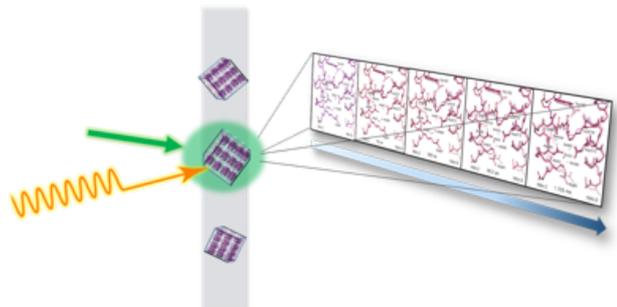
Suga M. *et al. Nature*, **543**, 131-135(2017)

[4] 支援担当者の研究概要

2012年半ばよりX線自由電子レーザー施設SACLAと協力し、医学や薬学に重要であるタンパク質を迅速にかつ高分解能で構造決定する技術を確認することを目指してきた。さらに、現在、時分割実験の装置システムや手法の開発に取り組み、タンパク質が機能する過程の構造変化を捉える技術の汎用化を検討している。



SACLAにおけるシリアルフェムト秒結晶構造解析の装置システムの一つ。写真の中央にヘリウムチャンバー、その中に結晶輸送装置（インジェクター）、右側にマルチポートCCD検出器。写真の左側からX線自由電子レーザーを導入。



シリアルフェムト秒結晶構造解析法を用いたバクテリオロドプシンの時分割実験（左）とその解析結果（右）のイメージ図。黄色の矢印がX線自由電子レーザー、緑色の矢印が励起のためのポンプ光（532nm）。励起光照射後、ナノ秒からミリ秒にかけて13点の時間の測定に成功、バクテリオロドプシンのプロトン移動の構造変化を動画のように捉えることができた。Nango E. *et al. Science*, **354**,1552-1557(2016)

B2-1 KEK-PFタンパク質結晶構造解析プラットフォーム

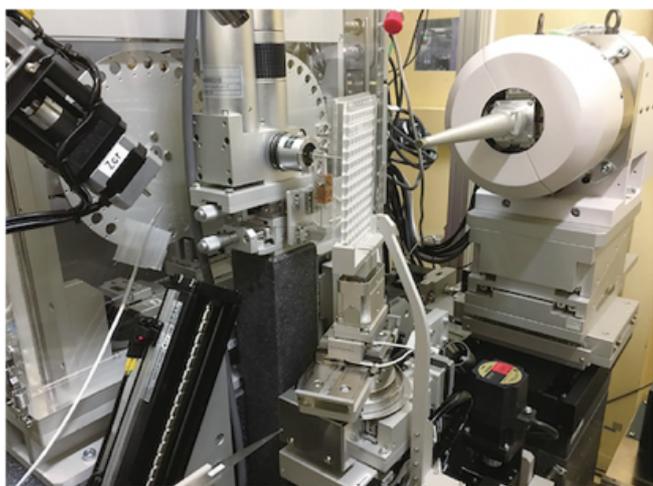
Photon FactoryのX線結晶構造解析用ビームラインを利用したタンパク質結晶の構造解析支援

[1] 支援担当者

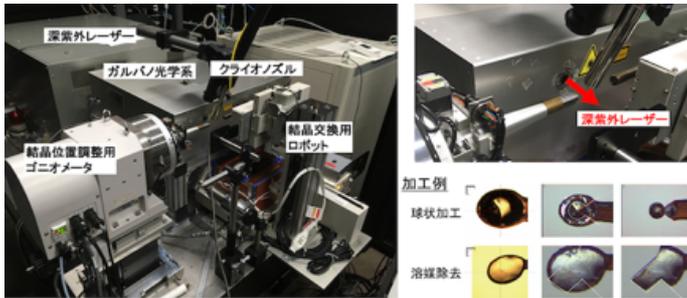
所属	①高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所構造生物学研究センター	
氏名	①千田 俊哉、松垣 直宏、田辺 幹雄、引田 理英	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （PFにおけるタンパク質立体構造解析の支援と高度化、相関構造解析への展開）
	代表機関 代表者	高エネルギー加速器研究機構 千田 俊哉
支援技術のキーワード	タンパク質結晶構造解析、放射光ビームタイム、自動測定、タンパク質結晶加工、顕微分光測定	

[2] 支援技術の概要

- Photon FactoryのX線結晶構造解析ビームライン（BL-1A、BL-5A、BL-17A、NE-3A、NW-12A）を利用したタンパク質結晶の構造解析
- 結晶のサイズや構造解析の手法に適したビームラインを選び、共通化されたインターフェースで効率的に回折データの収集を行うことができる。
- 経験者に関しては、ビームタイムの供給やリモートアクセスサポート、初心者、希望者に対してはタンパク質結晶の生産を含めた実験から構造解析までのサポートを行う。
- 高精度X線回折データ測定や定量的な顕微分光測定を目的とした、深紫外レーザーによるタンパク質結晶加工技術の利用についてサポートを行う。



結晶化プレート上のタンパク質結晶からの
直接回折データ収集にも対応した測定システム(PF BL-17A)



深紫外レーザーを用いたタンパク質結晶加工装置
ガルバノ光学系及びゴニオメータで深紫外レーザー照射位置の調整が可能となっており、球状加工や溶媒除去など任意の形に容易に加工が可能である。結晶をいれたUni-puckを結晶交換用ロボットにセットすることで、結晶交換も容易に行うことができ、そのままビームラインでX線回折実験も可能である。

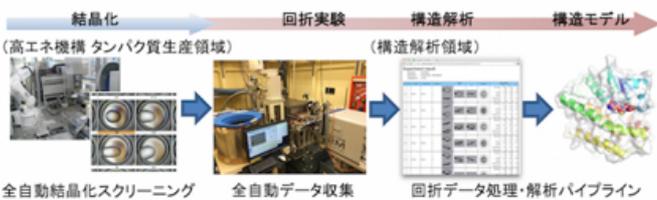
[3] 支援技術の利用例

- 10 μ m程度の微小結晶からの回折データ収集
- 低エネルギーX線を用いたnative SAD位相決定や異常分散シグナルを利用した分子中の軽原子の同定 (B2-2参照)
- 結晶化プレートからの回折データのスクリーニングと収集
- オンライン分光測定 (2019年度より実施予定)
- 大強度ビームによるハイスループットデータ測定及びスクリーニング
- 全自動回折データ収集・データ処理、リモート操作
- タンパク質生産領域と連携した、結晶構造解析のためのタンパク質生産、結晶生成支援 (C9-1参照)
- 深紫外レーザーで加工したタンパク質結晶を用いたnative-SAD位相決定

[4] 支援担当者の研究概要

タンパク質の結晶化から回折実験、構造決定までの統合プラットフォーム開発

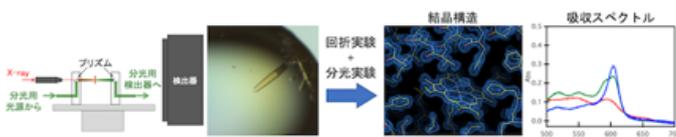
タンパク質結晶構造解析の各工程を自動化/高効率化し、工程間のシームレスな連携を図ることで、すべての研究者の要求に応えられるような構造解析プラットフォームの開発を目指している。



オンライン・オフライン分光装置の開発

分光測定を利用することで、回折実験では得難い、結晶中のタンパク質のより詳細な情報を得ることが可能となる。

- 例) ・リガンドとの結合状態 (結合速度等)
- 結晶中の目的タンパク質の占有率
 - 放射線損傷による影響



オンライン顕微分光装置の一例。
図は紫外・可視吸収測定装置。

上の例では、回折実験に使用する結晶が、目的の状態のタンパク質であることを確認している。

B2-2 KEK-PF天然タンパク質に含まれる硫黄原子を利用したタンパク質の構造解析

新規タンパク質結晶の直接位相決定、結晶中の軽原子種の同定、硫黄原子位置情報を用いた低分解能モデル構築

[1] 支援担当者

所属	①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	
氏名	①山田 悠介、松垣 直宏	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （PFにおけるタンパク質立体構造解析の支援と高度化、相関構造解析への展開）
	代表機関 代表者	高エネルギー加速器研究機構 千田 俊哉
支援技術のキーワード	タンパク質結晶構造解析、位相決定、低エネルギーX線、異常散乱	

[2] 支援技術の概要

- Photon Factoryの低エネルギーX線ビームライン（BL-1A、BL-17A）を利用した生体高分子の結晶構造解析
- 強力かつ高品質な低エネルギーX線（波長1.9-3.3Å）を利用し、ヘリウム環境下で回折データ収集を行うことで天然タンパク質からの微弱的な異常散乱シグナルを検出
- 試料のマウント方法からデータ収集/処理/解析までサポート

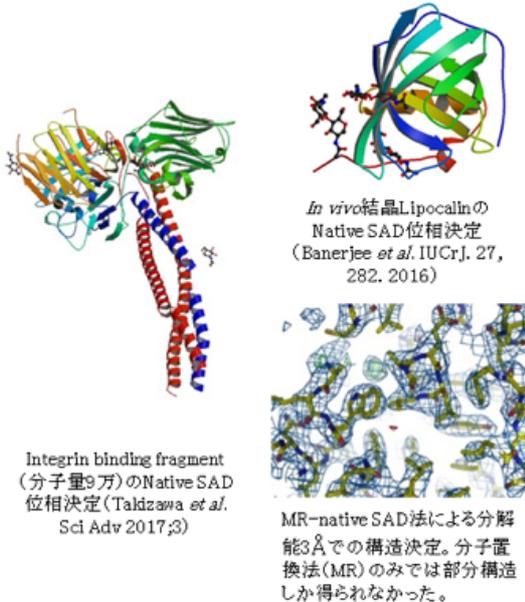


試料部とともにヘリウム環境下に置かれた2台のピクセルアレイ型検出器による高速・高分解能回折データ測定(PF BL-1A)

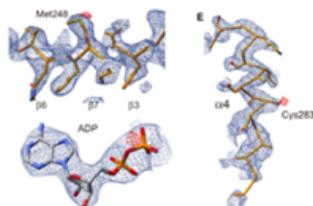
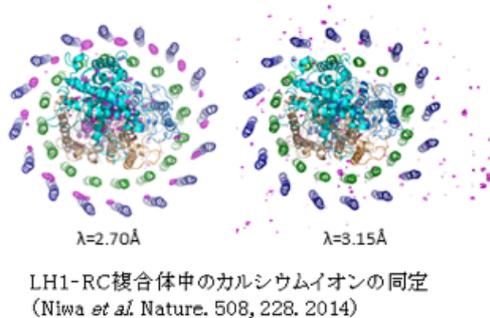
[3] 支援技術の利用例

- Native SAD法（単波長異常分散法）により重原子ラベルの困難な新規タンパク質の構造を迅速決定
- 分子置換法とNative SAD法とを組み合わせることで、探索モデルの相同性が低く分子置換法のみでは構造解析が困難なケースを克服
- 異常分散シグナルを利用した結晶中の軽原子（S、P、Cl、Ca等）の同定
 - 低分解能で困難な主鎖トレースの補助情報
 - 生物学的に重要な軽原子の存在確認

1. Native SAD法による新規タンパク質の構造決定



2. 結晶中の異常分散シグナルから軽原子を同定

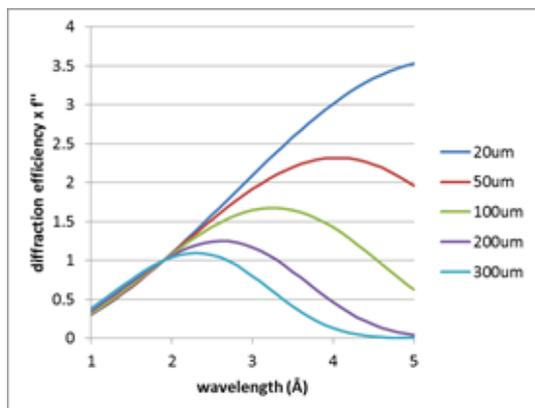


KIF19Aモータードメイン中のリン及び硫黄の異常分散シグナル。Cys283を同定することで主鎖のトレースに成功 (Wang *et al.* eLife. e18101. 2016)

[4] 支援担当者の研究概要

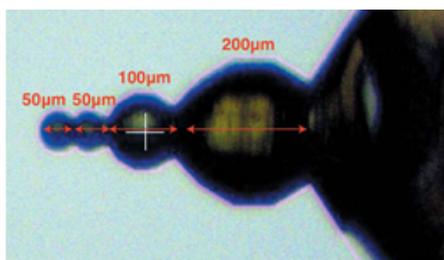
低エネルギー放射光X線を利用したNative-SAD位相決定法の開発

1. 測定に用いるX線エネルギーの最適化



サイズの異なる様々な結晶に合わせた最適なNative SAD法の開発(Liebschner *et al.* Acta Cryst D72. 728. 2016)

2. 試料の加工による高精度回折データ収集



レーザー加工によりサイズを調節した結晶からのNative SAD位相決定(Basu *et al.* IUCJ 6. 2019)

B2-3 KEK-PF生体高分子X線溶液散乱

Photon FactoryのX線小角散乱ビームライン（BL-10C、BL-15A2）を利用した、生体高分子のX線溶液散乱測定解析支援

[1] 支援担当者

所属	①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	
氏名	①清水 伸隆	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための関連構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （PFにおけるタンパク質立体構造解析の支援と高度化、関連構造解析への展開）
	代表機関 代表者	高エネルギー加速器研究機構 千田 俊哉
支援技術のキーワード	X線小角散乱、溶液構造・性状解析、SEC-SAXS/MALS、滴定溶液散乱、自動測定解析	

[2] 支援技術の概要

- Photon FactoryのX線小角散乱ビームライン（BL-10C、BL-15A2）を利用した生体高分子の溶液散乱測定解析



- HPLC（高速液体クロマトグラフィー）、MALS（多角度静的光散乱）等を組み合わせた多分散状態にある溶液試料の高精度測定解析システム（SEC-SAXS/MALS測定システム）



- 多成分平衡系の解析を可能とするμ流路セルを利用した滴定溶液散乱測定システム



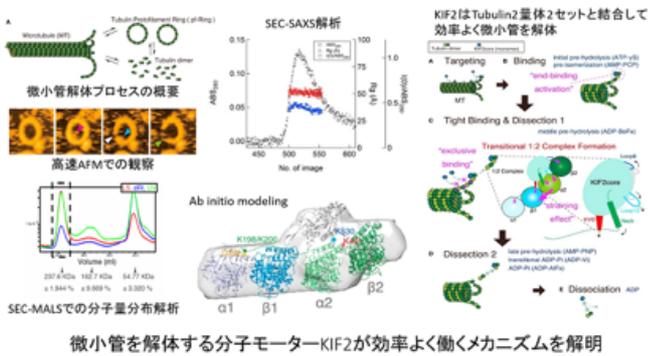
- 経験者に関しては、ビームタイムの供給やビームタイム時のセットアップなどのサポートを、初心者に関しては試料の準備から測定、解析までの全てのサポートを実施する。

[3] 支援技術の利用例

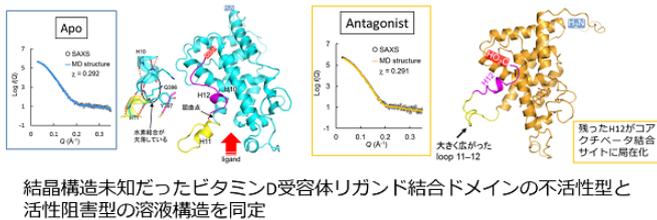
- 溶液中の構造状態（分子サイズ、分子量、会合状態）の推定・評価。
- Ab initioモデリングによる溶液概形解析。
- Rigid bodyモデリングによる溶液概形と結晶構造を用いた分子配置解析。
- 溶液中に存在する構造アンサンブルの推定（アンサンブル最適化法（EOM）による解析）。
- MD-SAXS法による精密溶液構造解析（インシリコユニットとの連携）。
- 多分散状態にある溶液試料に対して、比較的安定な標的分子（複合体）をゲル濾過で単離しながらSAXS/MALS測定を行い、その分子（複合体）の分子量や溶液概形を解析。
- 多成分平衡状態にある不安定な分子間相互作用系に対して、滴定SAXS測定と情報科学的解析を活用して溶液中に存在する全成分の構造状態を同定し、その相互作用メカニズムの理解を目指した解析を行なう。

[4] 支援担当者の研究概要

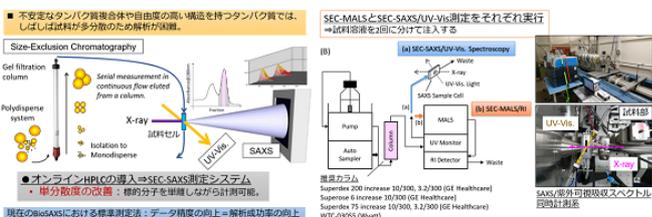
- 高難度のタンパク質複合体に関するSEC-SAXS/MALSを活用した関連構造解析
(Ogawa et al. *Cell Reports* **20**, 2626. 2017)



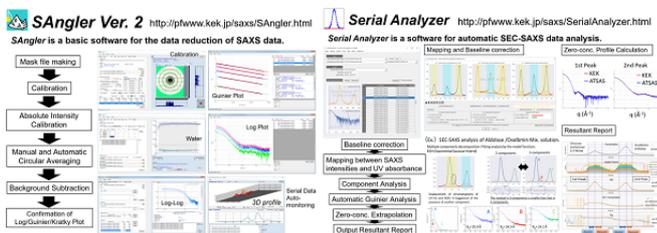
- MD-SAXS関連構造解析：SAXSと分子動力学計算（MD）を組み合わせた精密溶液構造解析
※インシリコユニットの横市大・池口グループとの共同研究
(Anami et al. *J. Med. Chem.* **59**, 7888. 2016)



- 多分散試料の高精度解析を可能とするSEC-SAXS/紫外可視吸収スペクトル同時測定システム、及びSEC-MALS/RI測定システム開発
(Bernadó et al. *BBA - Gen. Sub.* **1862**, 253. 2018)



- SAXS解析ソフトウェア開発：SAngher、Serial Analyzer
(Shimizu et al. *AIP Conf. Proc.* **1741**, 050017. 2016)
(Yonezawa et al. *AIP Conf. Proc.* **2054**, 060082. 2019)



B2-4 KEKクライオ電子顕微鏡による単粒子解析に向けたデータ測定

KEKのクライオ電子顕微鏡（Talos Arctica, Falcon3）を利用したデータ測定支援

[1] 支援担当者

所属	①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	
氏名	①千田 俊哉、安達 成彦、川崎 政人、守屋 俊夫	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （PFにおけるタンパク質立体構造解析の支援と高度化、相関構造解析への展開）
	代表機関 代表者	高エネルギー加速器研究機構 千田 俊哉
支援技術のキーワード	クライオ電子顕微鏡、単粒子解析、クライオグリッド作製、Vitrobot	

[2] 支援技術の概要

- KEKのクライオ電子顕微鏡（Thermo Fisher Scientific社, Talos Arctica, Falcon3）を利用したデータ測定支援（自動測定ソフトはEPUを利用）
- 測定モードとして、Linear mode、Electron Counting modeを選択可能
- 位相板（Volta Phase Plate）を利用可能（連続測定時は非推奨）
- 必要に応じて、KEKスタッフがグリッド作製からデータ測定までサポート
- 必要に応じて、サンプル調製の条件検討に関する相談や初期解析もサポート
- 審査後に、他サイトのハイエンドマシンへの展開も可能



[3] 支援技術の利用例

- 分子量100kDa程度以上のタンパク質について、10-30 μ Mの溶液を3 μ L用いて、Vitrobotによりクライオグリッドを作製
- 作製したグリッドまたは持ち込みグリッドについて、氷の厚みと粒子の有無・分布・向きの相関を確認
- holeの明るさに基づき、数百から数千個のholeを選択してデータ測定（1日枠、3日枠での撮影が可能）
- 必要に応じて、E2サイトの利用に必要なClass2D解析や初期の単粒子解析をサポート

[4] 支援担当者の研究概要

- グリッド作製から、データ測定・初期解析まで包括的にサポート

我々は、グリッド作製・hole選択・データ測定に関する経験を、ユーザーサポートを通して蓄積しています。蓄積したノウハウに基づき、持ち込まれたサンプルに対して、より良いグリッド作製条件・hole・データ測定条件を提案します。



- 常に万全の状態の装置を提供

FEIおよび国内外のクライオ電子顕微鏡研究者の協力を受けて、グリッド作製・装置維持・光軸合わせのためのテキストを作成しました。常に同一の手順でセットアップすることにより、常に万全の状態にある装置を提供します。

B3-1 創薬等ライフサイエンス研究のための多階層構造生命科学解析支援

生体超分子構造解析ビームライン、高分解能クライオ電子顕微鏡、超高磁場NMRを用いた多階層構造生命科学解析による支援

[1] 支援担当者

所属	①大阪大学 蛋白質研究所	
氏名	①中川 敦史、藤原 敏道、加藤 貴之、山下 栄樹、宮ノ入 洋平、櫻井 啓介、堤 研太、杉木 俊彦、杉田 征彦、廣瀬 未果、川本 晃大 丹澤 豪人、岸川 淳一	
AMED 事業	ユニット/領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （創薬等ライフサイエンス研究のための多階層構造生命科学解析技術の支援と高度化）
	代表機関 代表者	大阪大学 中川 敦史
支援技術のキーワード	相関構造解析、X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡、核磁気共鳴吸収法	

[2] 支援技術の概要

X線結晶解析、クライオ電子顕微鏡、核磁気共鳴吸収という3つの異なる相補的な技術を組み合わせた相関構造解析の支援を行い、多階層構造生命科学を推進する。



蛋白質研究所における連携

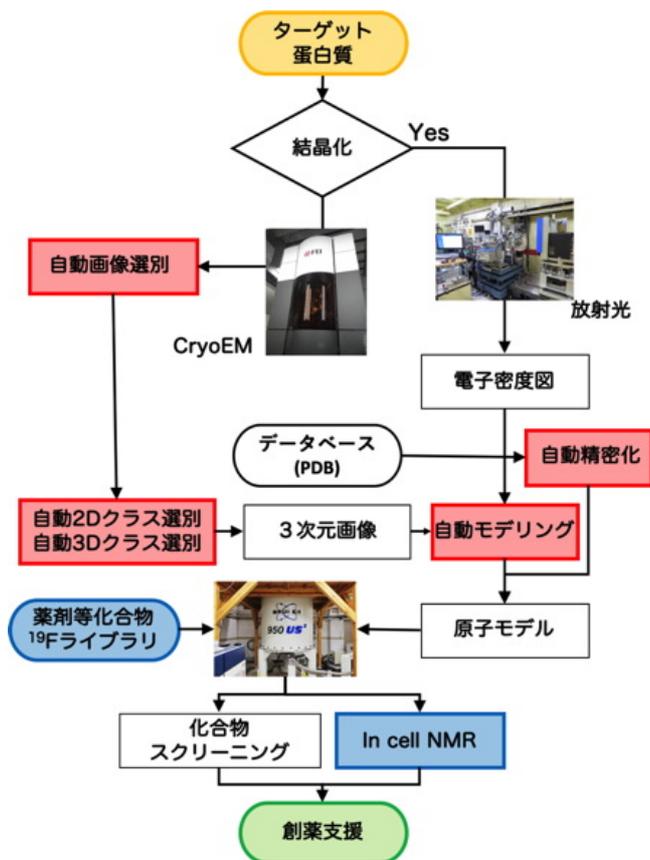


[3] 支援技術の利用例

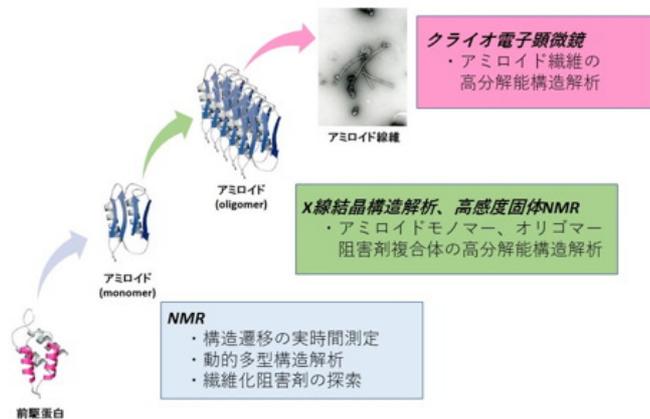
巨大格子定数結晶からのX線回折強度データ収集と構造解析

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析の特徴を活かした構造解析

- 超分子複合体等の結晶化が困難な解析ターゲット
- 測定・解析の高速化・効率化による高分解能解析
- ヒット化合物のスクリーニング
- 構造多様性・構造ダイナミクス解析
溶液および固体NMRの特徴を活かした構造解析
- 相互作用解析
- ^{19}F スクリーニング
- 過渡的構造の解析



創薬支援に特化した相関構造解析支援



繊維形成蛋白質を対象とした多階層構造生命科学解析支援の例

[4] 支援担当者の研究概要

- 中川敦史
放射光や自由電子レーザーを利用したデータ収集や構造解析の方法論の開発、生物学的に重要なタンパク質やウイルスなどの生体超分子複合体の精密な構造解析を目指した研究を進めている。
- 岩崎憲治
最も実績のある最先端のクライオ電子顕微鏡装置を用いて近原子分解能解析を行っている。また、これからのクライオ電顕の立役者となる“ボルタ位相板”による従来は困難だった小さな分子の高分解能解析を進めている。高性能のGPGPU計算機を整備し、もう一つの課題、コンフォメーション変化の可視化にも挑んでいる。
- 藤原敏道
超高磁場溶液NMR及び高感度固体NMRを用いた生体分子相互作用解析、タンパク質構造解析を行っている。また、最先端のスピンの超偏極超感度化法、NMRデータベース利用自動解析法、高分子量タンパク質解析のための同位体標識試料調製法の開発と応用にも取り組んでいる。

B3-2 生体超分子複合体を中心としたタンパク質結晶構造解析 (BL44XU)

生体超分子構造解析ビームライン (SPring-8 BL44XU) を利用したデータ収集と構造解析

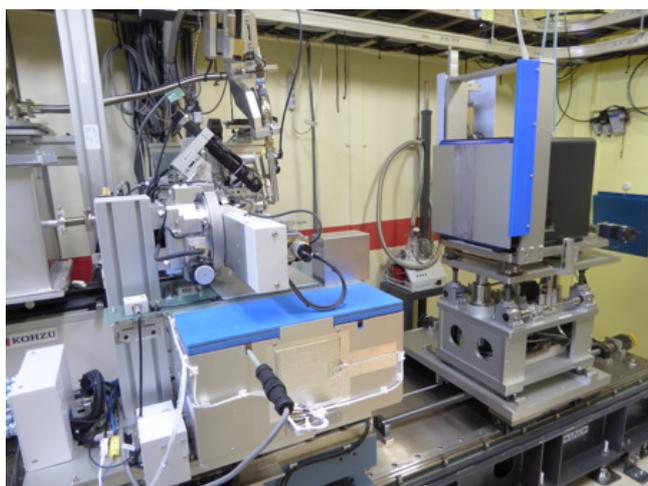
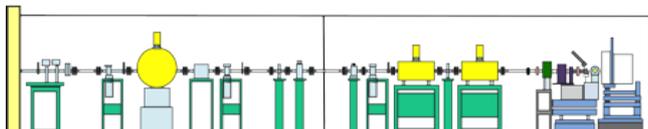
[1] 支援担当者

所属	①大阪大学 蛋白質研究所	
氏名	①中川 敦史、山下 栄樹、櫻井 啓介、堤 研太	
AMED 事業	ユニット/領域名 課題名	構造解析ユニット (構造解析領域) 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 (創薬等ライフサイエンス研究のための多階層構造生命科学解析技術の支援と高度化)
	代表機関 代表者	大阪大学 中川 敦史
支援技術のキーワード	X線結晶構造解析、巨大格子定数結晶、生体超分子複合体	

[2] 支援技術の概要

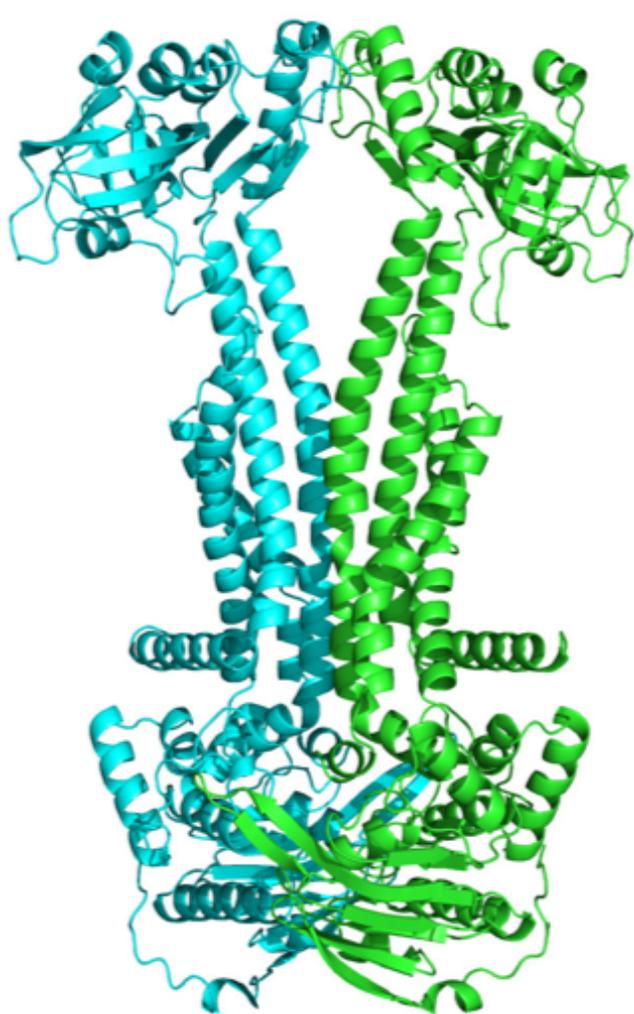
500Åを超える長格子定数結晶や分解能の低い結晶、膜タンパク質結晶などからの高精度な回折強度データ収集と構造解析 (超高分解能データ収集も可能) の支援を行う。

- 2000Åの格子定数の結晶から3.7Å分解能のデータ収集が可能
- 光学系のレイアウト変更なしで0.7Å以上の高分解能データ収集が可能

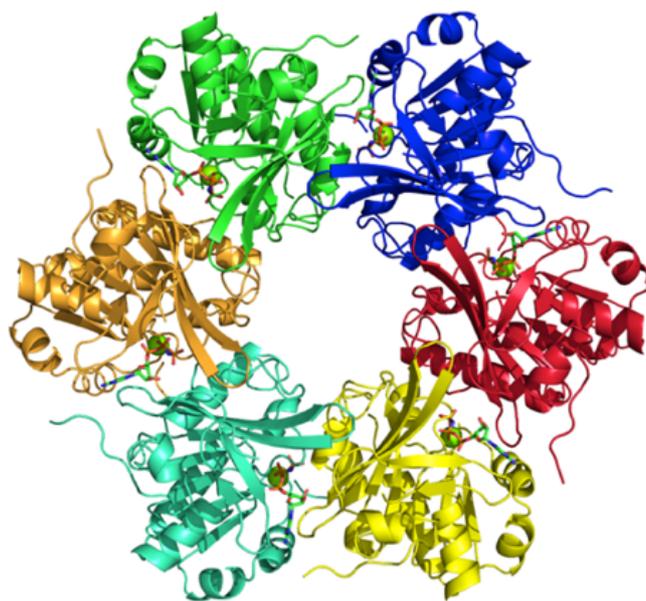


[3] 支援技術の利用例

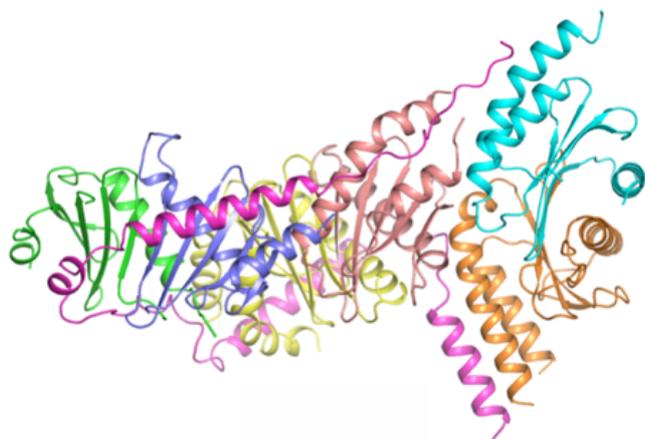
巨大格子定数結晶からのX線回折強度データ収集と構造解析の支援により、巨大な生体超分子複合体の詳細な原子構造決定が行われている。



薬剤排出トランスポーター



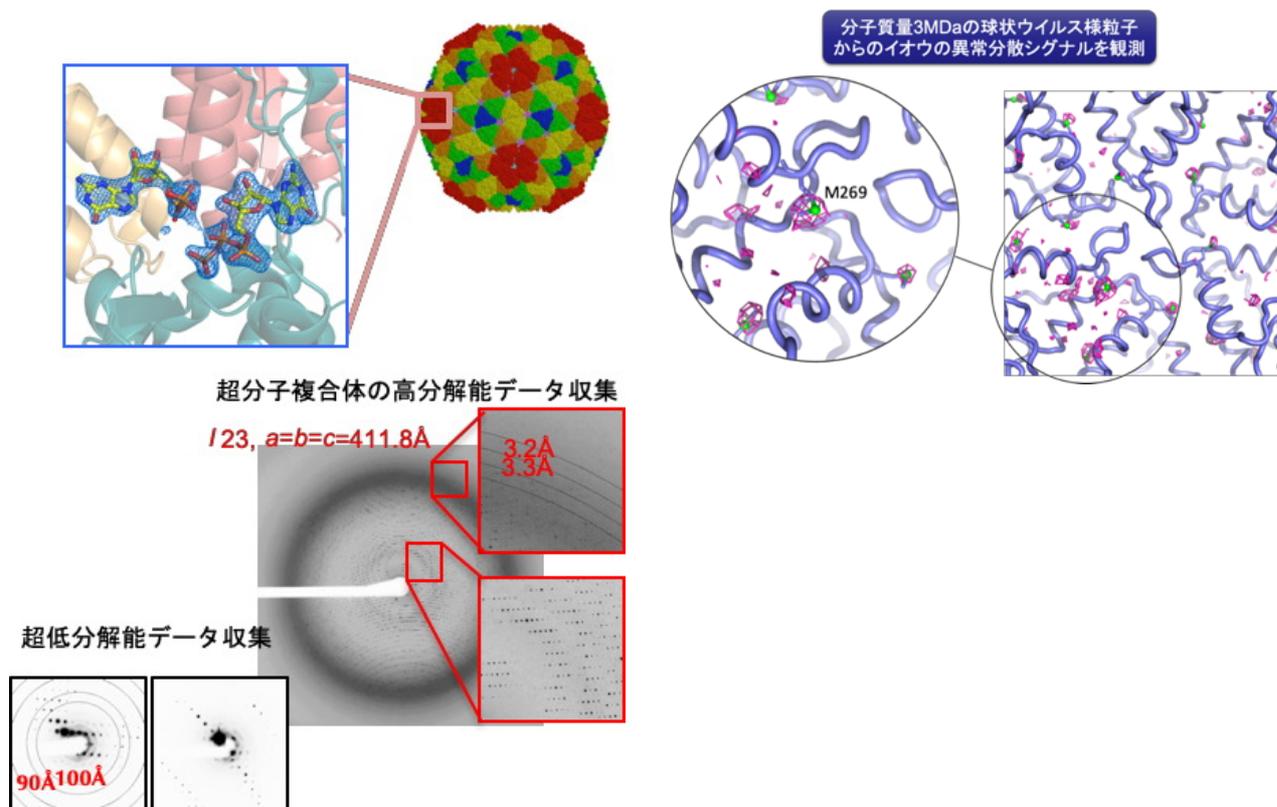
時計タンパク質 KaiC



シグナル伝達7者複合体
Ragulator/RagAC

[4] 支援担当者の研究概要

- 高精度回折強度データ収集システムの開発
分子量が大きく回折強度の弱い生体超分子複合体や分解能の低い膜タンパク質からの高精度な回折強度データ収集のためのシステム開発を行っている。
- 生体超分子複合体の構造解析
分子質量75MDaのイネ萎縮ウイルスや分子質量1GDaを超える巨大なクロレラウイルスなどの生体超分子複合体、分子量20KDaの膜タンパク質複合体などの構造解析を進めている。
- 超高分解能構造解析
水素や殻外電子の可視化を目指した超高分解能構造解析と、そのための方法論の開発を進めている。
- 生物学的に重要なタンパク質の構造解析
電位センサータンパク質ファミリーや核輸送タンパク質複合体など生物学的に重要なタンパク質の精密な構造解析を目指した研究を進めている。



B3-3 高分解能クライオ電子顕微鏡解析

世界最高の実績をもつ高性能クライオ電子顕微鏡を利用した構造解析

[1] 支援担当者

所属	①大阪大学 蛋白質研究所	
氏名	①加藤貴之、廣瀬未果、丹澤豪人、川本晃大、杉田征彦、岸川淳一、中川敦史	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （創薬等ライフサイエンス研究のための多階層構造生命科学解析技術の支援と高度化）
	代表機関 代表者	大阪大学 中川 敦史
支援技術のキーワード	相関構造解析、クライオ電子顕微鏡、単粒子解析法	

[2] 支援技術の概要

高効率クライオ電子顕微鏡解析 凍結試料のスクリーニングを凍結試料を再利用可能な状態で回収できる200kVクライオ電子顕微鏡で行い、高分解能用のデータを300kVの高性能クライオ電子顕微鏡で収集する。

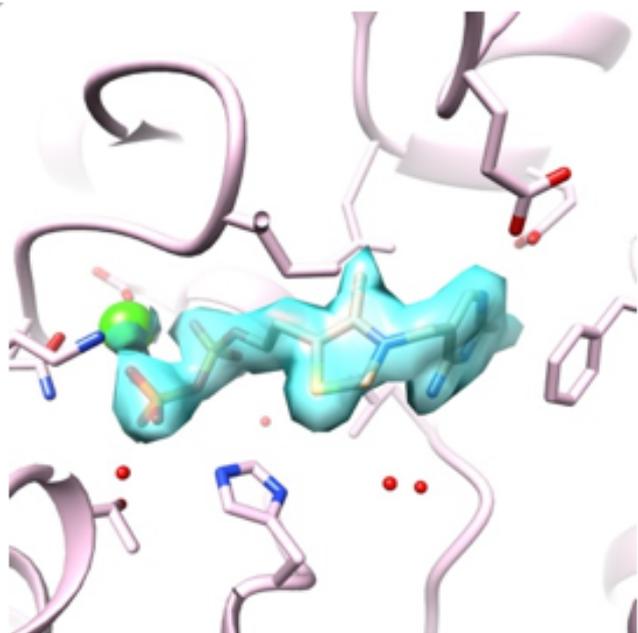
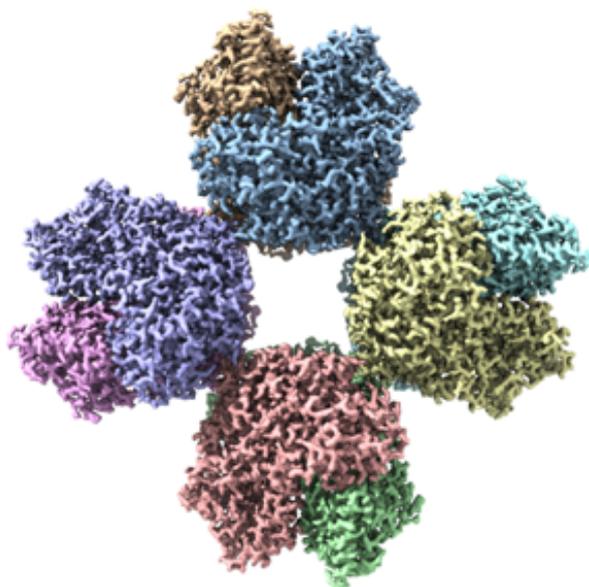
難結晶性分子の構造解析 生体分子のクライオ電子顕微鏡画像から構造解析を行う、いわゆる単粒子再構成法を世界トップレベルの環境で提供。

巨大分子複合体の構造解析 非常に複雑で巨大な複合体の構造解析を実績に基づいた試料作製から実施する。

多様なコンフォメーションの解析 溶液中の分子は、多様なコンフォメーションをとっているが、これらは機能発現と相関がある。この構造解析を自動撮影による大量画像取得と高性能GPGPUマシンにより可能にする。

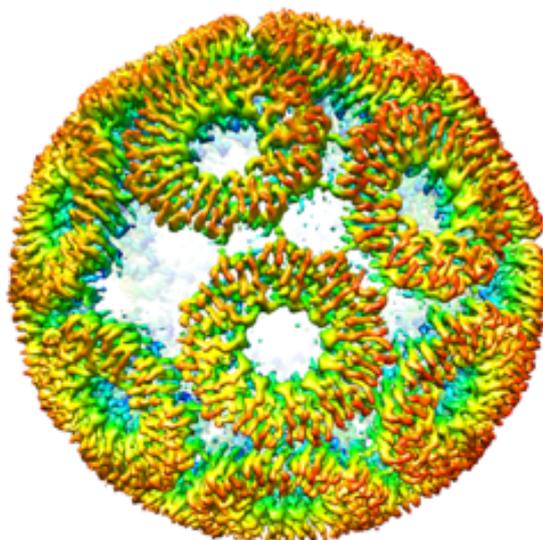
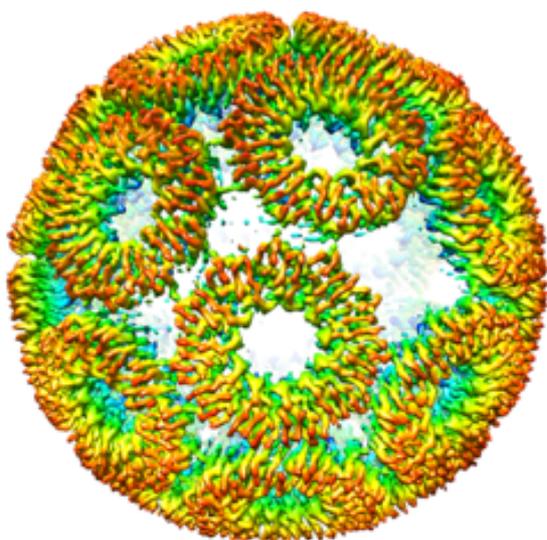
[3] 支援技術の利用例

低分子化合物結合状態の可視化。



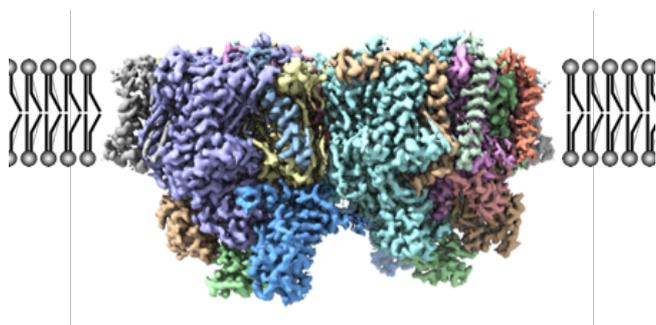
クライオ電子顕微鏡単粒子解析の支援例。(左) 2.1Åで解析された酵素。(右) 酵素に結合している500Da未満の低分子。

> 鏡像対称分子の分類による高分解能構造解析。



この例では1 : 1の割合で生成される鏡像関係にあるタンパク質複合体を分類した。それによって飛躍的に分解能が改善された。

> 巨大膜蛋白質複合体の2Å台分解能解析。



[4] 支援担当者の研究概要

これまで支援担当者達はクライオ電子顕微鏡による分子モーター、ウイルス、リボソームをはじめとした様々な生体高分子の構造解析を行ってきた。また、クライオ電子顕微鏡の開発にも携わっており、その経緯を通してつづいた知識に基づいた高分解能構造解析の手法についても開発している。

より高分解能に、より便利にをコンセプトに誰でも構造解析ができる技術開発と技術提供を行う。

◇ **凍結試料を回収し、再利用できる利点**を生かした高効率のクライオ電子顕微鏡解析システム



B3-4 NMR生体分子構造相互作用解析

タンパク質間相互作用解析、タンパク質リガンド相互作用解析、タンパク質動態解析

[1] 支援担当者

所属	①大阪大学 蛋白質研究所	
氏名	①藤原 敏道、宮ノ入 洋平、杉木 俊彦	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化 （創薬等ライフサイエンス研究のための多階層構造生命科学解析技術の支援と高度化）
	代表機関 代表者	大阪大学 中川 敦史
支援技術のキーワード	溶液NMR、SAIL法、 ¹⁹ F化合物スクリーニング、固体NMR	

[2] 支援技術の概要

- 超高磁場NMR装置群による高感度・高分解能な立体構造・分子間相互作用・動的ダイナミクスの解析：国内最高感度を誇る溶液950MHzおよび固体700MHz NMR装置をはじめ、幅広い磁場強度の先進的・高感度NMR装置のラインナップで生体分子の構造解析・動態解析ならびに相互作用解析等を支援する。

● 溶液 NMR 装置



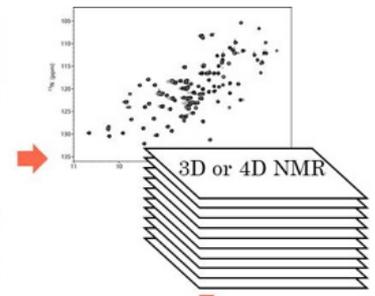
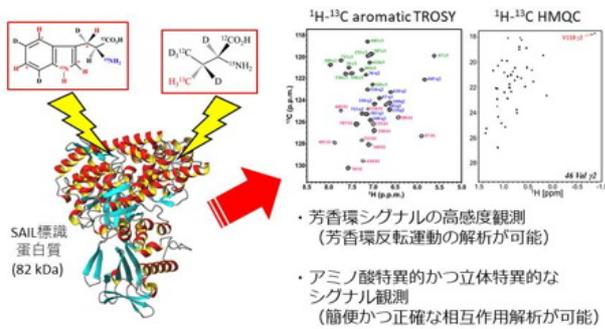
● 固体 NMR 装置



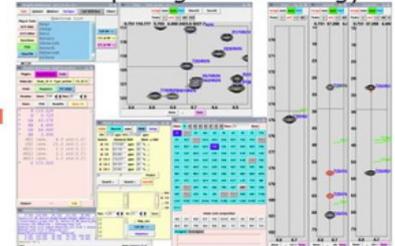
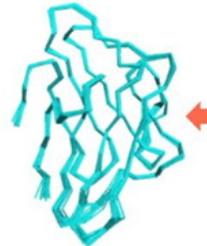
溶液 950 MHz: 世界最高感度
溶液 400-950 MHz: 国内最大の磁場強度幅
固体 700 MHz DNP: 世界最高感度の DNP 装置
固体 500-700 MHz: 国内最大規模の固体専用装置群

支援に供する先進的能力をもつNMR装置群

- 最適な安定同位体標識法によるNMR解析：目的タンパク質中の特定の原子にのみ安定同位体標識を施す先進的NMR技術であるSAIL法により、高分子量・高難度タンパク質のNMR解析を支援する。
- NMRによるタンパク質構造の高速自動構造決定：NMRスペクトルの帰属から立体構造解析までをパイプライン化・自動化した技術（Deep-MagRO：阪大独自で開発）により、目的タンパク質の立体構造解析を支援する。



Deep-MagRO technology



全自動NMR構造解析

- ^{19}F 化合物ライブラリーによる効率的・スループットなりリガンドスクリーニングNMR：60検体オートサンプラーを装備した溶液400MHz NMR装置と、当グループが独自に開発した ^{19}F 標識フラグメント化合物ライブラリーを用いて、目的タンパク質に結合する未知化合物のスループット探索を ^{19}F NMR実験にて支援する。
- In-cell NMR法による細胞内タンパク質のNMR解析：大腸菌、酵母、哺乳動物細胞等の生きた細胞内における目的タンパク質の立体構造および分子間相互作用のNMR解析を支援する。

^{19}F 化合物ライブラリーの構築 (~900化合物)

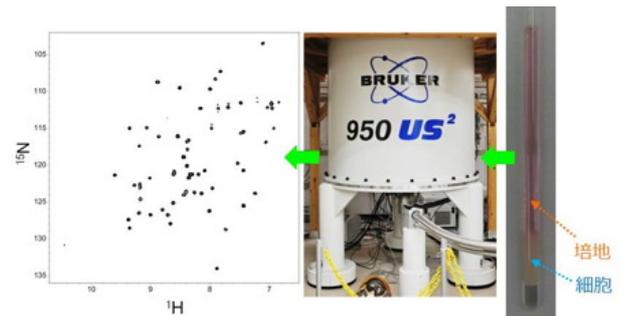
^{19}F NMR測定でヒット化合物のスクリーニング

^{19}F 標識化合物の ^{19}F NMRスペクトル

+ 標的蛋白質

✓ 標的タンパクを混ぜて ^{19}F の1次元NMR測定を行うだけ (タンパクは標識不要・少量。高感度、迅速)
 ✓ 低アフィニティーのフラグメント($K_d \sim \mu\text{M}$)のヒットも検出可能

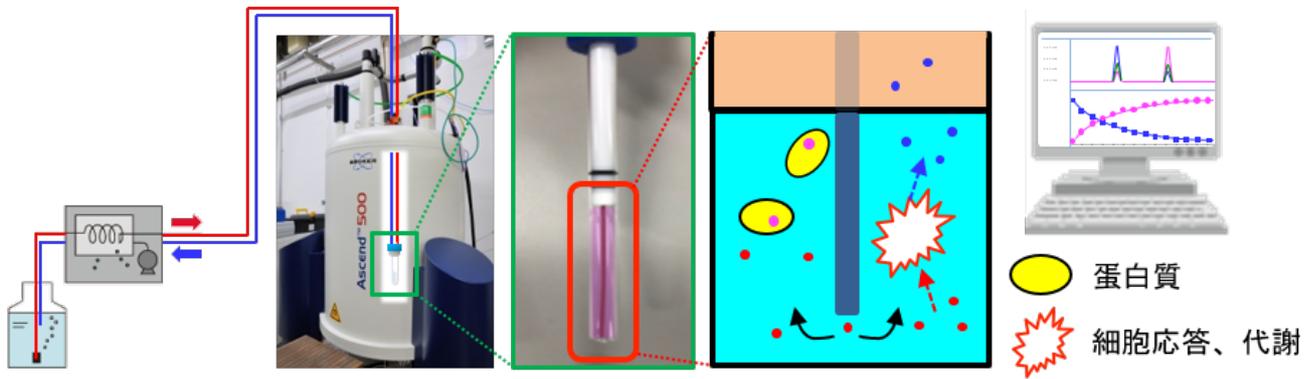
溶液NMR装置にオートサンプラーを実装



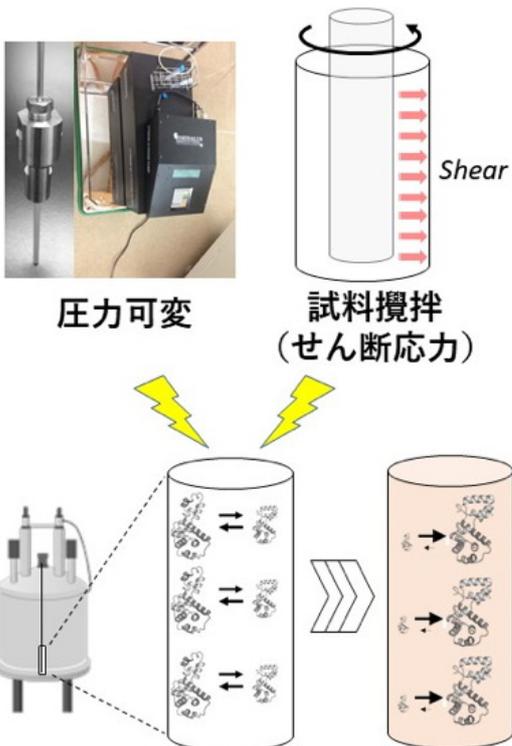
生細胞中の目的蛋白質のNMR解析 (In-cell NMR)

^{19}F NMRによる創薬候補化合物のスループットスクリーニング

- 溶媒の自動還流システムによるリアルタイム溶液NMR観測：InsightMR/Cell (Bruker) システムを搭載した溶液NMR装置を用いて、化学反応、蛋白質-薬剤の相互作用、in-cell NMR実験との技術融合による細胞応答や代謝のリアルタイムNMR観測とその解析を支援する。

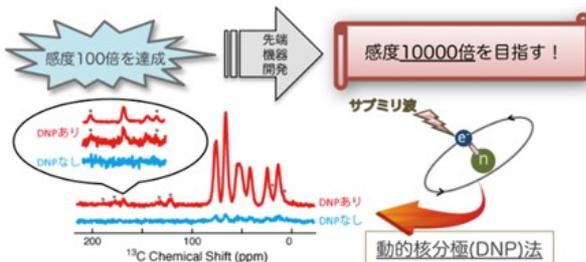


溶媒の自動還流システムを搭載した溶液NMR装置による 化学反応、蛋白質-薬剤相互作用、細胞応答・代謝などのリアルタイム観測実験



蛋白質の準安定構造の高感度解析

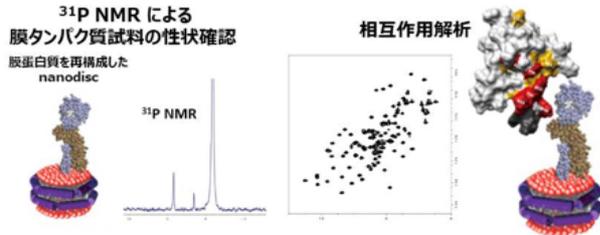
- 新たなNMR測定技術を利用した蛋白質の動的多型構造の解析：溶液NMR法では、弱い相互作用に伴う過渡的複合体や、多型構造間の動態を定量的に観測することが出来る。圧力可変装置や試料攪拌装置を取り入れた新しいNMR測定（高圧NMR, Rheology NMR）を行うことで、これら準安定構造の高感度観測ならびに多型構造間の動態解析を支援する。
- 高磁場極低温DNP法による超高感度固体NMR解析：高磁場DNPでは、高磁場で核スピンと同時に電子スピンを共鳴させてNMRの感度を約1000倍向上させられる。この方法で微量試料や高分子量タンパク質、天然存在比の生体試料について、構造や相互作用の解析を支援する。



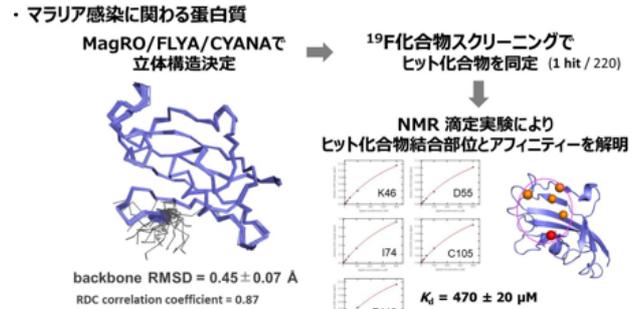
- 超高速マジック角試料回転法による高分解能高感度¹H-NMR解析：生体試料を50kHz以上で回転させることにより、1mg以下の固体状態の試料についてこれまで測定が難しかった¹H-NMRを高感度に測定できるようにする。この方法で、¹³C,¹⁵N-NMRを¹H-NMRを通じて高感度に測定して、生体分子の構造と相互作用解析を支援する。

[3] 支援技術の利用例

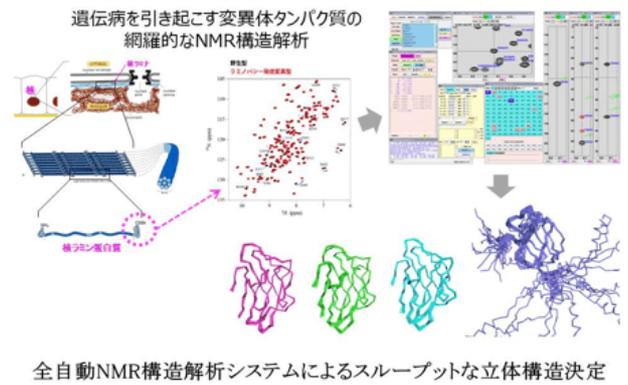
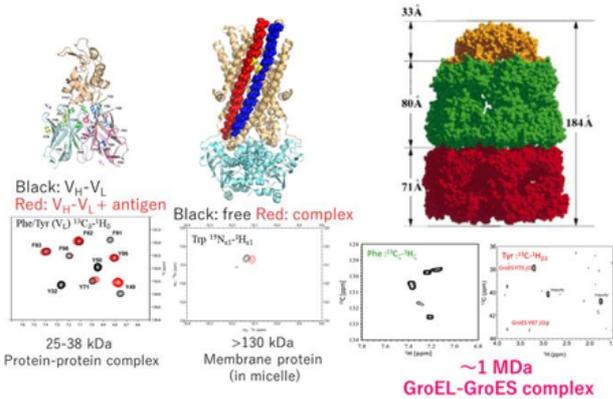
- タンパク質間相互作用解析：膜タンパク質を脂質二重膜に再構成したnanodiscの性状を³¹P NMRで確認し、可溶性タンパク質リガンドとの相互作用部位を超高磁場溶液NMR解析により同定した。
- タンパク質リガンド相互作用解析：マラリア感染に関わるタンパク質の溶液NMR構造決定、¹⁹F化合物スクリーニングNMR実験による新規リガンド化合物の同定、溶液NMR実験によるタンパク質-新規リガンド化合物間相互作用部位および結合親和性の同定を、約1週間で達成した。
- SAIL法による高難度タンパク質のNMR解析：通常ではNMR解析が困難な高分子量タンパク質、膜タンパク質、抗体などにオーダーメイドで目的の部位に安定同位体標識を施し、相互作用領域の特定ならびに相互作用に伴うアミノ酸残基側鎖の動態変化を解析した。
- タンパク質の立体構造解析：遺伝病発症を引き起こす変異体タンパク質の立体構造解析を網羅的に行った。



タンパク質 - 膜タンパク質間相互作用のNMR解析

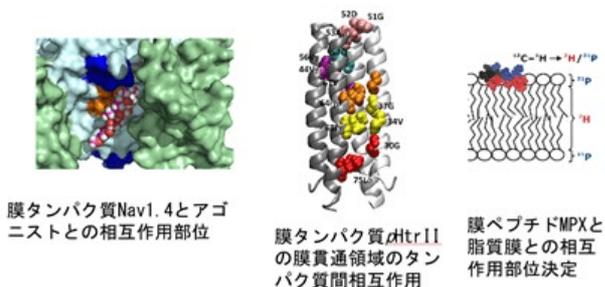


上記全てを約1か月で達成



SAIL-NMR 法による高分子量蛋白質の分子間相互作用および動的ダイナミクスの解析

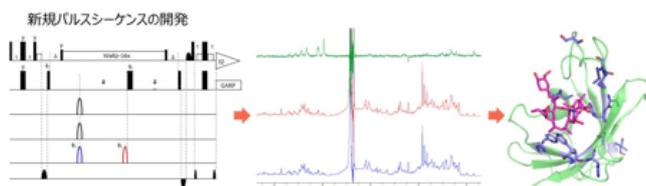
- 固体NMRを用いたタンパク質相互作用および構造解析：膜タンパク質Nav1.4とアゴニストとの相互作用部位解析を行った。膜タンパク質pHtrIIの膜貫通領域のタンパク質間相互作用。膜ペプチドMPXと脂質膜との相互作用部位決定。βIIミクログロブリンのアミロイド構造の解析を行った。



[4] 支援担当者の研究概要

上記の支援の概要および利用例に加えて、次のような研究開発に取り組んでいる。

- 蛋白質動態の高感度・定量解析技術の開発：これまでに、独自の安定同位体標識技術（SAIL法）を駆使して、分子量80-1000 kDa に及ぶ蛋白質複合体についても高感度かつ先鋭的なNMRシグナルを獲得することに成功し、溶液NMR研究の解析対象を大幅に拡大してきた。今後、膜蛋白質や繊維形成蛋白質といった高難度蛋白質の立体構造解析や動態解析を進めていくうえで、新たな安定同位体標識パターンを有するアミノ酸の開発を進めている。また、高圧NMR測定やRheology NMR測定と独自の安定同位体標識法を組み合わせることで、高感度かつ定量的な蛋白質動態解析法の開発を進めている。
- SAIL法による高難度タンパク質のNMR解析：通常ではNMR解析が困難な高分子量タンパク質、膜タンパク質、抗体などにオーダーメイドで目的の部位に安定同位体標識を施し、相互作用領域の特定ならびに相互作用に伴うアミノ酸残基側鎖の動態変化を解析した。
- "Hit to lead" 研究の支援へ向けて — ヒット化合物-目的タンパク質複合体の立体構造情報の取得へ向けた手法開発 —：¹⁹F化合物スクリーニングNMRで得られたヒット化合物を合成展開し、創薬候補化合物へと成熟させるには、目的タンパク質とヒット化合物の複合体の立体構造情報を得ることが不可欠である。その情報を正確・迅速に得ることを可能にする先端的NMR実験法の開発を進めている。



Hit-to-lead研究のための新規NMR実験法の開発

- 超高感度NMR法の開発と応用：高磁場DNP-NMR法を高磁場極低温で行う装置の開発とその応用を行っている。これまでNMR感度を1000倍向上させた。さらに10000倍まで向上させる技術を開発している。これによりGPCRのNMR相互作用解析が1 μ gの試料で可能になる。

B4-1 NMRによるタンパク質の相互作用解析

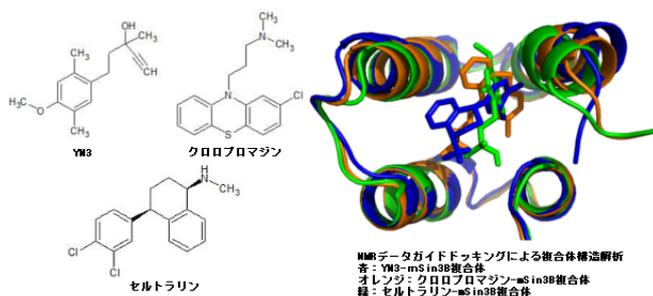
タンパク質相互作用、スクリーニング、天然性変性タンパク質、¹⁹F-NMRやLC-NMRや固体NMR、NMRセミナー開催

[1] 支援担当者

所属	①横浜市立大学 生命医科学研究科	
氏名	①西村 善文	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） NMRによるタンパク質の相互作用解析
	代表機関 代表者	横浜市立大学 朴 三用
支援技術のキーワード	NMRスクリーニング、 ¹⁹ F-NMR、リアルタイムモニタリング、LC-NMR、ultrafast MAS	

[2] 支援技術の概要

- 高感度NMRによる多検体自動測定(¹H、¹³C、¹⁵N、¹⁹F)
- 低分子結合によるタンパク質の化学シフト変化
- ドッキングシミュレーションによる低分子とタンパク質の複合体構造解析
- スピン拡散の観測による複合体の構造評価
- 酵素反応のリアルタイムモニタリング
- 世界最高磁場LC-NMRによる微量化合物の同定
- 国内最大級の超高速試料回転固体NMR
- 標的タンパク質結合化合物の網羅的スクリーニング
- 天然変性タンパク質間の動的相互作用観測



[3] 支援技術の利用例

- 標的タンパク質の観測や低分子化合物の観測による網羅的創薬スクリーニング
- 標的タンパク質の化学シフト変化による低分子とのドッキングシミュレーションでの複合体の構造解析及びスピン拡散を用いた複合体構造の評価
- タンパク質のリン酸化やアセチル化やメチル化などの酵素反応のリアルタイムモニタリングと各酵素の特異性の評価
- LC-MSで構造が同定できなかった微量代謝物のLC-NMRによる化学構造の同定
- 国内最大級固体NMRを用いた巨大複合体の分子間相互作用の観測

[4] 支援担当者の研究概要

ヒトは約300種類の細胞からなるが、各細胞は基本的には同じDNAを持っている。同じDNAをもっている細胞機能が異なるのはDNAの高次構造であるクロマチン構造が異なるためである。クロマチン構造はDNAのメチル化や、天然変性状態にある各ヒストンの末端テイル領域のアセチル化、メチル化、リン酸化やユビキチン化等で変化する。このクロマチン構造に異常が生じると、癌や神経疾患をはじめ様々な疾病が発症することが知られている。またクロマチンの構造単位は4種類のヒストン(H2A,H2B,H3,H4)各2個で形成されるヒストン8量体に約146塩基対のDNAが巻き付いたヌクレオソームである。

クロマチンには遺伝子の発現が促進されているユークロマチンと抑制されているヘテロクロマチンがある。ユークロマチンでは転写開始部位のヌクレオソームはクロマチンリモデリング因子等によりはがされ、むき出しになったDNAに基本転写因子とRNAポリメラーゼが結合しRNAを合成していく。RNA合成時にはヒストンシャペロンやクロマチンリモデリング因子によりヌクレオソームの構造が連続的に変化していく。セントロメアやテロメアに代表されるヘテロクロマチンではDNAのメチル化やヒストンH3の9番目のリシンがメチル化されヘテロクロマチンタンパク質のHP1等が結合し、凝集したクロマチンを形成する。我々はDNAのメチル化機構、転写因子TFIIEやp53、DNA修復酵素XPC、細胞周期特異的転写因子DP1などのハブである基本転写因子TFIIHのp62サブユニットのリクルート機構、ヒストンシャペロンNAP1やFACTとヒストンH2AH2BやH3H4との相互作用、ヘテロクロマチンタンパク質HP1とメチル化ヒストンH3の相互作用や細胞周期的なパッセンジャー複合体との相互作用、ヌクレオソーム中でのヒストンテイルの動的な構造変化、テロメア形成タンパク質TRF2と4重鎖DNAとの相互作用等をNMRにより解析している。特にこれらのタンパク質はテイルやヒンジ、リンカーに天然変性領域をもつ、この天然変性領域は伸びた紐状構造での標的タンパク質との結合や、紐状構造同士での動的な絡み合いによりタンパク質間相互作用に関与している。

特に基本転写因子TFIIHのp62サブユニットを認識する様々なタンパク質の伸びた紐状構造による相互作用、HP1、NAP1、FACTやヒストンメチル化酵素によるヒストンとの伸びた紐状構造間の絡み合い相互作用、ヌクレオソーム結合タンパク質での伸びた紐状構造での相互作用等、結晶化できない天然変性タンパク質を標的としている。さらにこのような天然変性領域と標的タンパク質間相互作用解析技術の創薬への応用として髄芽腫や神経疼痛に関連する神経特異的転写因子NRSF/RESTの機能を阻害する化合物を同定し、神経疾患治療薬物の開発も目指している。

B5-1 クライオ電顕ネイティブ複合体解析

様々な電顕を用いた分子複合体や細胞小器官の3次元構造解析、試料作製および構造解析の支援

[1] 支援担当者

所属	①東京大学 大学院医学系研究科 ②東京大学 大学院理学系研究科 ③理化学研究所 生命機能科学研究センター	
氏名	①吉川 雅英、中村 一彦、Radostin Danev、福田 善之、柳澤 春明、坂巻 陽一、古屋 俊江 ②濡木 理、草木 迫 司、志南谷 涉、木瀬 孔明 ③山形 敦史、横山 武司	
AMED 事業	ユニット/領域名 課題名	構造解析ユニット (構造解析領域) クライオ電顕による細胞内ネイティブ複合体構造解析
	代表機関 代表者	東京大学 吉川 雅英
支援技術のキーワード	クライオ電子顕微鏡、単粒子解析、構造多型解析、細胞構造解析、試料調製	

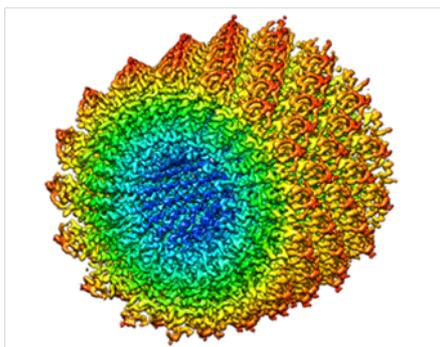
[2] 支援技術の概要

クライオ電子顕微鏡を用いたたんぱく質の構造解析や細胞内小器官の構造解析の支援を行っている。主に電子顕微鏡のハードウェアの取り扱いを中心にトレーニングを行った技術員が観察をサポートし、スタッフを含む研究員が単粒子解析を希望する利用者から試料を受け入れ、試料作成とデータ収集、解析などを支援している。支援の際には、BFAYOS (Bring, Freeze, and Analyze Your Own Sample)のコンセプトに従い、基本的には利用者自身、あるいは利用者の立会いのもとに技術員が支援を行っている。得られた情報は直接利用者にフィードバックしており、ネガティブ染色によるスクリーニング、凍結グリッドの作製条件の探索、大規模なデータ収集などが行われている。データ解析環境としては東京大学のスーパーコンピュータ上にクライオ電顕の解析のためのソフトウェアが整備され、利用者が外部から解析できるようにしている。

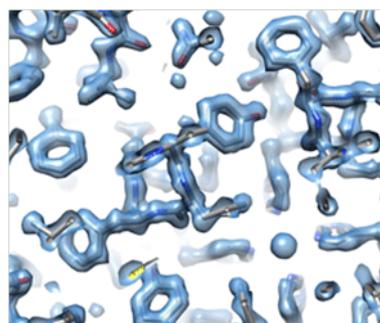
また、3次元構造解析のためクライオ電子線トモグラフィーの支援を行っている。トモグラフィーについても、新規導入された電子顕微鏡(Titan Krios)がデータ収集の効率化・高解像度化に大きく貢献している。

この分野への理解を深めてもらうため、ワークショップを毎年、開催しており、トモグラフィーなどをテーマに基本的な原理や試料作製方法、解析事例などを紹介し、研究者のすそ野を広げている。

クライオ電子顕微鏡は共用設備として学内外に開放されており、利用についてはWeb (<http://structure.m.u-tokyo.ac.jp/emfacility>) を参照していただきたい。



3D structure of Tobacco
Mosaic Virus at 3.6 Å



3D structure of
Apoferritin at 1.62 Å

[3] 支援技術の利用例

ネガティブ染色法による構造解析やクライオ電子顕微鏡を用いた膜タンパク質、筋肉フィラメント、繊毛、クロマチンなどの構造解析が行われており、2018年度は32課題の利用実績があった。研究途上のため、すべての結果を公開することはできないが、論文発表が行われた例を紹介する。

1. 陰イオンチャンネルLRRC8Aのクライオ電子顕微鏡による構造解析

すべての生物は細胞外の浸透圧の変化に応じて細胞の容積を制御することにより、その容積をつねに一定に保つことで、正常な機能を維持している。

LRRC8ファミリーは細胞の膨張を感知して活性化する陰イオンチャンネルである。塩化物イオンなど浸透圧を調節する物質を細胞の外へと排出することにより細胞の容積を維持する。

この研究において、クライオ電子顕微鏡による解析によりヒトに由来するLRRC8Aの構造が決定された。構造解析の過程において、LRR領域が“閉じた構造”と“緩んだ構造”の2つが確認され、これらの構造の比較から、LRR領域が剛体として動くことによりイオンの透過孔を開閉する可能性が示唆された。

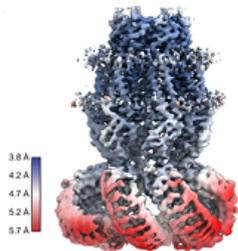


図 ヒトに由来するLRRC8Aの構造

Cryo-EM structures of the human volume-regulated anion channel LRRC8

Go Kasuya, Takanori Nakane, Takeshi Yokoyama, Yanyan Jia, Masato Inoue, Kengo Watanabe, Ryoki Nakamura, Tomohiro Nishizawa, Tsukasa Kusakizako, Akihisa Tsutsumi, Haruaki Yanagisawa, Naoshi Dohmae, Motoyuki Hattori, Hidenori Ichijo, Zhiqiang Yan, Masahide Kikkawa, Mikako Shirouzu, Ryuichiro Ishitani & Osamu Nureki

Nature Structural & Molecular Biology volume 25, pages 797–804 (2018)

2. AIM/IgM複合体構造解析

これまで正五角形をしていると信じられていた IgM 五量体は、実は一カ所大きなギャップを持つ非対称で歪な五角形をしていることが電子顕微鏡解析により明らかになった。急性腎障害を始めとするさまざまな疾患を制御する血中タンパク質 AIM は、そのギャップに嵌まり込むような形で、IgM 五量体と安定的に結合し、不活性化していることが明らかになった。

これまで 50 年以上教科書に記載されていた IgM 五量体の構造を書き変える成果が得られた。また、IgM から AIM を解離させ活性化することにより、さまざまな疾患に対する新規かつ効率的な治療法の開発に貢献することが期待される。

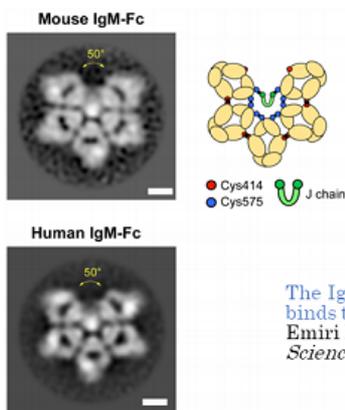


写真 左上：マウスIgM五量体
左下：ヒトIgM五量体
図 IgM五量体のモデル

The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein.

Emiri H, Akihisa T, Risa S, Shigeru M, Satoko A, Masahide K & Toru M. *Science Advance*. 4(10), DOI: 10.1126/sciadv.aau1199 (2018).

[4] 支援担当者の研究概要

東大・院・医学系研究科・吉川研

クライオ電子線トモグラフィーと遺伝学を用いた標識法を開発してきた。この方法を一般化し、より多くの細胞内小器官で分子の動きを3次元で可視化。

東大・院・理学系研究科・濡木研

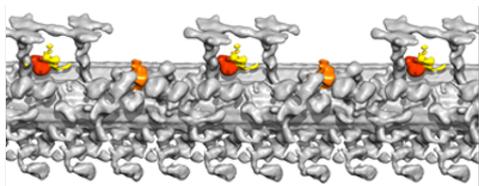
膜タンパク質のクライオ電顕・単粒子解析用の試料調製を、膜タンパク質の取り扱いに精通した濡木研究室が支援。

理研・ライフサイエンス技術基盤研究センター・横山グループ

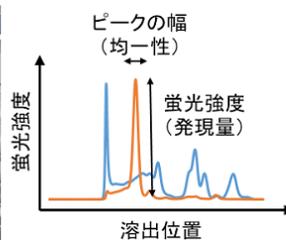
リボソームやRNAポリメラーゼなど、ダイナミックな構造をもつ核酸-タンパク質複合体の構造を解析している。大規模なデータ収集を行い、構造多型解析の実績がある。

クライオ電顕のオープンコースウェア・ワークショップ

クライオ電顕技術になじみのない研究者・学生に対し、インターネットを使った講義シリーズを開講する。また、実地での経験を積むためのワークショップも開催する。



繊毛内のタンパク質を標識して3次元上の位置を決定した。これにより、細胞内の「モノサシ」を同定した。
Oda et al, *Science* 346:857-860 (2014)



蛍光ゲルろ過HPLC（左）を使用した膜タンパク質の性状評価（右）未精製の状態でも膜タンパク質の均一性、発現量を評価することで、精製条件などの検討を効率的に行うことができる。

B6-1 クライオ電子顕微鏡による構造解析(トモグラフィ ー・単粒子解析)

We provide research support for structural analysis of proteins, etc. on cryo-electron microscopy using tomographic or single particle analysis methods

[1] 支援担当者

所属	①沖縄科学技術大学院大学 イメージングセクション	
氏名	①Bruno Humbel、菅野 亮、Malgorzata Hall	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） クライオ電子顕微鏡によるタンパク質等構造解析—最高の支援体制の構築
	代表機関 代表者	沖縄科学技術大学院大学 Bruno Humbel
支援技術のキーワード	Cryo-sample preparation, single particle analysis, training program, cryo-electron microscopy	

[2] 支援技術の概要

- Support for structural analysis of biological samples, etc., using the cryo electron tomography
- Consultation on sample preparation and feasibility of a single particle analysis project
- Collaboration on structural analysis of proteins by single particle analysis
- Operation of three cryo-transmission electron microscopes within the allocated beam time
- Offering a programme on single particle analysis for at short-stay training workshop



Titan Krios (Thermo Fisher Scientific) 300kV

グリッドホルダー：Cryo stage/Autoloader plan 3
 カメラ：
 FEI Falcon 3EC
 Gatan Orius SC200 camera
 Gatan K2-BioQuantum
 他の装備：Phase plate, STEM (BF/DF/HAADF detector)



Talos Arctica (Thermo Fisher Scientific) 200kV

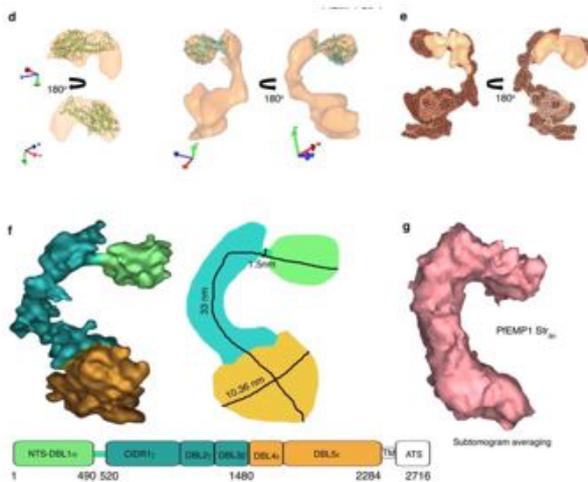
グリッドホルダー：Cryo stage/Autoloader plan 3
 エネルギーフィルター：None
 カメラ：
 FEI Falcon 3EC
 FEI Ceta camera
 他の装備：Phase plate, STEM (BF/DF/HAADF detector)



Talos L120C G2 (Thermo Fisher Scientific) 120kV

グリッドホルダー：Single-tilt holder/High-field-of-view tomography holder
 Cryo transfer Holder (Fischione Model2550)
 エネルギーフィルター：None
 カメラ：FEI Ceta 2 camera

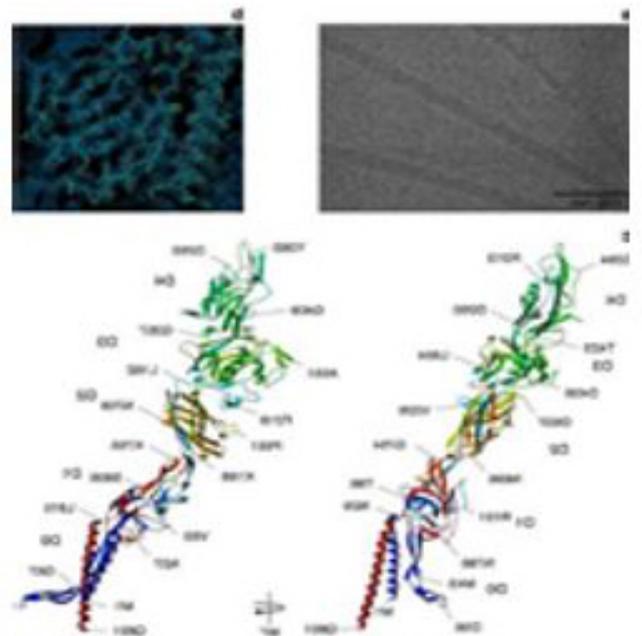
[3] 支援技術の利用例



Cell Reports (2016)

-Tomography

Red blood cells of parasites causing malaria
Membrane protein **PfEMP1**



Nature Communications (2016)

-Single particle analysis

Bacterial flagellar
Protein **FlgE**

[4] 支援担当者の研究概要

Operating the Imaging Section of Research Support Division at OIST (Bruno Humbel)

He is in charge of managing the OIST common facility for imaging (electron microscopy, light microscopy and x-ray microscopy) and providing research support service. In this project he supervises the cryo-preparation and structural analysis of proteins by cryo-EM. He also works on the improvement of sample preparation and imaging.

Operating structural analysis and the short-stay training programme (Bruno Humbel, 菅野 亮, Malgorzata Hall)

For structural analysis of proteins they teach and support sample preparation, quality control of samples, acquisition of cryo-EM data and their analysis. They also accept trainees of members of the national cryo-EM Network for a short-stay training programme in sample preparation, data acquisition and analysis. The workshop aims at young scientists to disseminate and promote the skills of structural analysis by cryo-electron microscopy and to expand the network of cryo-electron microscopy users and specialists in whole Japan and other Asian countries.

Structural analysis of proteins, etc., using the cryo electron tomography (Ulf Skoglund, Lars-Goran Ofverstedt)

They collect images of isolated samples or composites, or cell or tissue samples within the vitrified ice layer from various different angles, and use these images in the 3D structural analysis. At the same time, they also work on the development and improvement of analysis algorithm and its software package. In 2016, they succeeded in visualizing the process that Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein (PfEMP1) binds to an IgM antibody to form a bouquet expressed on the surface of a malaria-infected red blood cell, which contributed to obtaining a clue to a cure against the infection strategy of malaria (Akhouri et al., 2016, Cell Reports 14, 723-736).

Structural analysis of proteins, viral particles, etc. using cryo single particle analysis method (Matthias Wolf)

In 2016, studying the bacterial flagellar hook which functions like a universal joint of the bacterial flagellar, the molecular system that makes bacteria motile, his team determined the structure of FlgE, the protein forming the hook, and revealed the mechanism of how the protein polymerizes to form the stable structure of the hook (Matsunami et al., 2016, Nat Commun. Nov 4;7:13425. doi: 10.1038/ncomms13425).

B7-1 クライオ電子顕微鏡法による生体分子構造解析の高分解能化と効率化

生体分子複合体の水溶液試料を電顕グリッド上で急速凍結後撮影し、収集した分子像の解析により立体構造を解析する技術を提供

[1] 支援担当者

所属	①大阪大学 大学院生命機能研究科	
氏名	①難波 啓一、加藤 貴之、宮田 知子	
AMED 事業	ユニット／領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） クライオ電子顕微鏡法による生体分子構造解析の高分解能化と効率化
	代表機関 代表者	大阪大学 難波 啓一
支援技術のキーワード	クライオ電子顕微鏡、単粒子像解析法、膜タンパク質、繊維状複合体、高分解能化	

[2] 支援技術の概要

クライオ電子顕微鏡の単粒子像解析法による生体分子の立体構造解析は、X線のように結晶化を必要とせず、NMRのように対象分子の分子量に上限もなく、最近の技術進歩によりわずか数十マイクログラムの試料で原子分解能に近い構造解析が可能になり、しかも準安定な構造が混在するような試料であっても解析が可能である。そのため、これまで構造解析の対象となり得なかった試料でも解析可能になっている。それには膜タンパク質や繊維状複合体、そして柔軟な構造や内在的にフォールドしていない部分を持つタンパク質などを含む膨大な数の生体分子が含まれ、構造ゲノム科学や構造生命科学といった研究分野を大きく推進する基盤技術となりつつある。

単粒子像解析法による構造解析の到達分解能は、電子線直接検知型CMOSカメラの導入により大幅に向上し、4 Åを超える近原子分解能と分子モデルの構築はもはや特筆すべき成果ではなくなった。クライオ電子顕微鏡への電子分光装置の導入等による高画質電顕像の収集効率化と、さまざまな画像解析法の工夫により、数年前までは複数年を要していた構造解析期間が数日にまで短縮されている。2016年には最高到達分解能が初めて2.0 Åを超え、酵素GDHで1.8 Åの構造が報告されたが、2018年6月にはアポフェリチンで1.62 Å分解能の構造が報告され、そして2019年2月には我々の研究グループが同じアポフェリチンで1.53 Åという世界最高分解能を達成した。これは、日本電子と共同開発した新型の自動クライオ電子顕微鏡CRYO ARM 300を活用した成果で、24時間で自動撮影したわずか840枚のクライオ電子顕微鏡像から得られた成果である。このように数少ない画像データで極めて高分解能を達成できた理由は、このクライオ電子顕微鏡に搭載した冷陰極電界放射型電子銃が発生する電子ビームの干渉性の高さにより、画像信号強度の高分解能での減衰が小さくなったことによる。

我々は構造生命科学分野の発展に貢献すべくこれらの最先端技術を提供し、試料のスクリーニング、クライオ電顕画像データの収集、画像解析と構造解析、そしてこの技術の教育トレーニングを含めて、様々な構造生命科学研究を支援する。



電子顕微鏡設備

[3] 支援技術の利用例

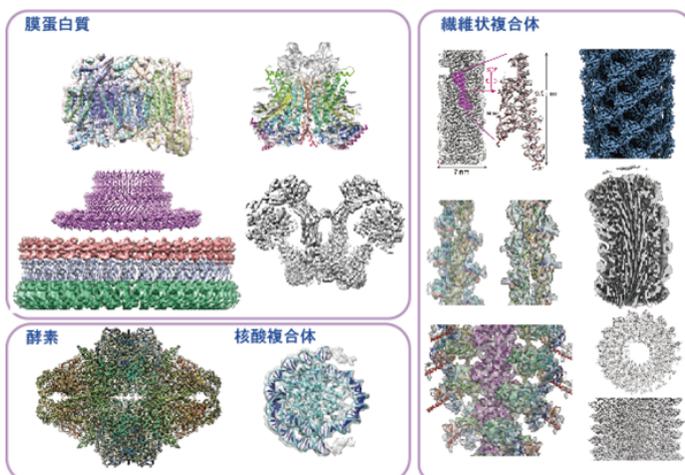
クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子像解析法は、タンパク質や核酸など生体試料の水溶液を薄膜として急速凍結し、薄い氷に閉じ込めた生体分子の電子顕微鏡像を撮影し、画像解析により立体構造を求める手法であるため、安定に多数の粒子像が撮影できれば構造解析が可能である。例えば、試料溶液のpHや塩濃度を変えたり様々な基質を加えることで、通常とは異なったコンフォメーションの構造を解析することも可能である。

水溶液中での構造解析が可能のため、試料が水溶液中に溶けて分散しているかぎり、試料の形状もサイズも選ばない。そのため、ウィルスのような対称性の高く大きな複合体から、リボソームのような対称性のない複合体、繊維状に重合したタンパク質など、様々な形態の複合体試料で構造解析が可能である。可溶性タンパク質だけでなく、膜タンパク質のように可溶性でない分子であっても、界面活性剤によって可溶化する脂質ナノディスクに組み込むことで水溶液中に分散させれば構造解析は可能となる。

生体試料は本質的に水溶液中で柔軟かつ動的に構造を変化させながらその機能を発揮する。分子のコンフォメーションを固定化しがちな結晶での構造解析では、その動態や機能発現にともなう構造変化を可視化することは困難である。しかし単粒子像解析法では、画像解析によって複数の異なるコンフォメーションを持つ粒子群を分類することが可能なため、分子の構造動態を解析することができる。

図はこれまでに解析された様々な生体試料の構造例である。

単粒子像解析法のこのように汎用性に優れた特性により、クライオ電子顕微鏡法は標的分子の構造を基盤とする医薬品開発にとって最も優れた手法となった。



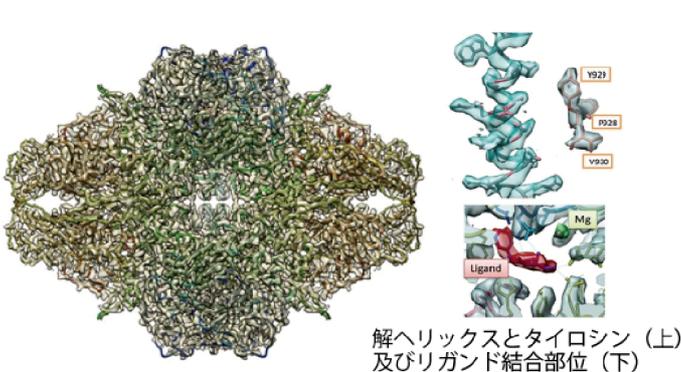
クライオ電子顕微鏡による構造解析の実施例

[4] 支援担当者の研究概要

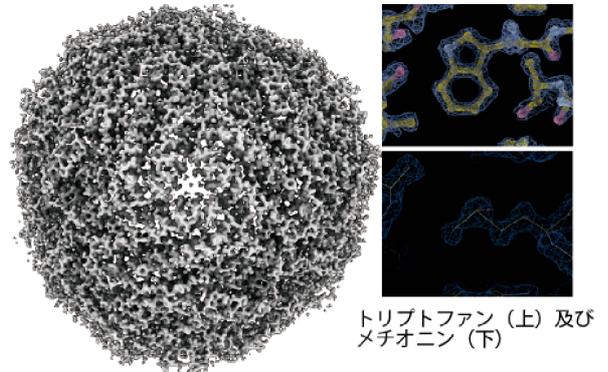
現在に至るまでの約30年間、細菌の運動器官であるべん毛の高速回転モーターやせん型プロペラ、細菌が宿主感染時に使う3型病原性因子分泌装置とその原型であるべん毛タンパク質輸送装置、骨格筋のアクチン繊維等、主に分子モーターを対象とし、それらが超分子ナノマシンとして働く仕組みを支える立体構造とその変化、そしてその形成機構や機能の解析を進めてきた。X線回折法とクライオ電子顕微鏡を組み合わせることで解明した詳細な立体構造から、生体分子の自己集合とその制御や、柔軟な立体構造中に実現される超高精度スイッチの仕組みを解明するとともに、光学ナノ計測法の時間分解能をマイクロ秒レベルに、空間分解能をナノメートルにまで高めて動的な振る舞いを詳細に観察してきた。その結果、人工機械に比べて桁違いに高い効率でエネルギーを変換する分子モーターの仕組みが、モーターを構成するタンパク質の結合解離の際に、構造的に非対称なタンパク質間相互作用が、ランダムな熱ゆらぎを一方に偏らせることで実現されているらしいとの手掛かりを得た (Fujii & Namba 2017 Nature Commun.)。

クライオ電子顕微鏡による生体分子の立体構造解析法についても、1991年頃から長年にわたって独自の技術開発を進め、2004年には世界に先駆けて、クライオ電子顕微鏡像の画像解析によりタンパク質の主鎖や側鎖を初めて可視化することに成功した (Yonekura et al. 2004 Nature)。電子顕微鏡像の撮影にCCDやCMOSカメラを活用し始めた2000年代後半以降は、骨格筋アクチン繊維や細菌の病原性因子分泌装置のニードルなど、直径10 nm以下と極めて細いため詳細な立体構造観察は不可能であろうと思われていたものについても、1週間から1ヶ月という短期間のデータ収集と解析によって原子レベルの分解能を達成し、形態形成や動作の仕組みを明らかにした (Fujii et al. 2010 Nature; Yamada et al. 2019 投稿論文2報準備中)。以前は数年にもおよんだ大変な作業を大幅に効率化したことで、生命科学におけるこの解析技術の有効性と重要性を一層高めた。

2010年頃より日本電子社とともに、高度に自動化された高分解能クライオ電子顕微鏡CRYO ARMの開発を進めており、2016年に大阪大学に導入設置されたプロトタイプでは、3日間の自動撮影で得た約2500枚のクライオ電顕画像の解析により、 β -galactosidaseの構造が2.4Å分解能で解けている (Kato et al. 2017 EMDB ID: EMD-6840)。2019年2月には理研Spring-8に設置された商用1号機のCRYO ARM 300を使い、アポフェリチンの構造を1.53Åという世界最高分解能で解明した (Kato et al. 2019 EMDB-9865)。これは24時間で自動撮影したわずか840枚のクライオ電子顕微鏡像から得られた成果で、このように数少ない画像データで極めて高分解能を達成できた理由は、CRYO ARM 300に搭載した冷陰極電界放射型電子銃が発生する電子ビームの干渉性の高さにより、画像信号強度の高分解能での減衰が小さくなったことによるものである。このように構造生物学と生物物理学の分野で常に世界最先端を牽引しており、今後も一層の貢献を目指している。



2.43Å で解析された β - ガラクトシダーゼ



1.53Å で解析されたアポフェリチン

B8-1 クライオ電子顕微鏡による膜タンパク質の単粒子解析

単粒子解析の試料調整から構造解析までにおける相談・技術指導、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析のための講習会開催

[1] 支援担当者

所属	①三重大学 大学院医学系研究科	
氏名	①谷 一寿	
AMED 事業	ユニット/領域名 課題名	構造解析ユニット（構造解析領域） クライオ電子顕微鏡を用いた膜タンパク質の高分解能動的構造解析と技術人材育成支援
	代表機関 代表者	三重大学 谷 一寿
支援技術のキーワード	膜タンパク質の単粒子解析、クライオ電子顕微鏡	

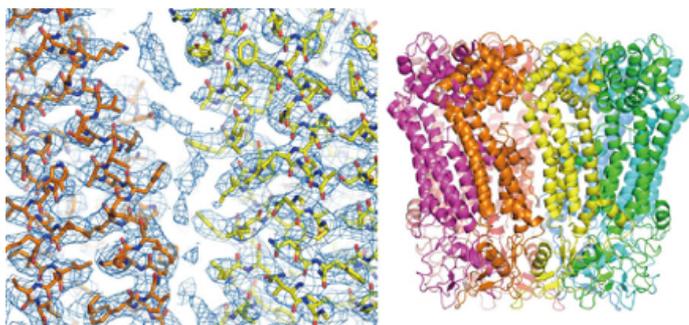
[2] 支援技術の概要

- 電子線損傷を抑える冷却ステージを備えたクライオ電子顕微鏡を用いた高分解能構造解析支援。
- 膜タンパク質の中でも比較的分子量が小さなものを中心に単粒子解析の試料調製～構造解析までを支援する。要望に応じて各ステップの技術指導を介した人材育成支援。
- 高速解析可能なGPU計算機を使用した支援。



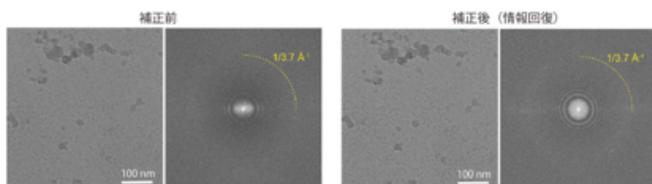
[3] 支援技術の利用例

構造既知ホモログのない膜タンパク質の場合でも3.3Å分解能（例：線虫由来Innexin-6）でde novoモデル構築が可能。

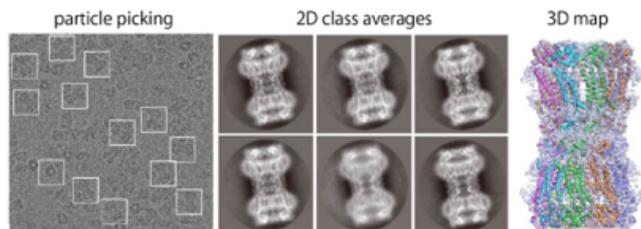


[4] 支援担当者の研究概要

- **クライオ電子顕微鏡データ収集システムの開発** On the flyで電子顕微鏡画像のムービー補正を可能にするシステムの開発を行っている。



- **膜タンパク質の単粒子構造解析** ギャップ結合チャンネルinnexinや水チャンネルaquaporinなどチャンネルの立体構造解析を原子分解能レベルで進めている。



- **複数のコンフォメーションを分離して構造解析** 結晶構造解析と異なり単粒子解析において溶液中では、複数のコンフォメーションを取ることが可能である。試料調整技術・画像解析を組み合わせ、これらを分類抽出し、機能・動的ゆらぎ・分解能向上へ役立てる。

