# 「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」研究領域 領域活動・評価報告書 - 平成27年度終了研究課題-

研究総括 若槻 壮市

#### 1. 研究領域の概要

本研究領域は、先端的ライフサイエンス領域と構造生物学との融合によりライフサイエンスの革新に繋がる「構造生命科学」と先端基盤技術の創出を目指します。すなわち最先端の構造解析手法をシームレスに繋げ、原子レベルから細胞・組織レベルまでの階層構造ダイナミクスの解明と予測をするための普遍的原理を導出し、それらを駆使しながら生命科学上重要な課題に取り組みます。具体的には、様々な生命現象で重要な役割を果たしているタンパク質を分子認識のコアとして位置づけ、以下の研究を対象とします。

- (1)タンパク質同士または核酸や脂質等の生体高分子との相互作用や、糖鎖修飾、ユビキチン化、リン酸化、メチル化などの翻訳後修飾及び生体内外の化合物による時間的空間的な高次構造の変化等を階層的に捉えることにより機能発現・制御機構を解明する研究
- (2)ケミカルバイオロジー等の手法による将来の分子制御、分子設計に資する研究
- (3)結晶構造解析、溶液散乱、核磁気共鳴(NMR)、電子顕微鏡、分子イメージング、質量分析、計算科学、バイオインフォマティクス、各種相互作用解析法等、様々な位置分解能、時間分解能(ダイナミクス)、天然度(in situ から in vivo)で構造機能解析を行う新規要素技術開発
- (4)要素技術を相補的かつ相乗的に組み合わせることで、重要な生命現象の階層構造ダイナミクスの解明をめざす相関構造解析法の創出

こうした目標達成に向け、最先端の構造生物学的アプローチとの融合により生命科学上の挑戦的なテーマを独自の視点で取り組む研究、または、独自に開発した革新的構造機能解析手法で細胞分子生物学、医学、薬学分野の重要な課題解決に取り組む研究を奨励します。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数: 10件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」領域に設けた選考委員13 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html)の他、以下の点を重視した。
  - (1)最先端の構造生物学的アプローチとの融合により生命科学上の挑戦的なテーマを独自の視点で取り組む研究
  - (2)独自に開発した革新的構造機能解析手法で細胞分子生物学、医学、薬学分野の重要な課題解決に取り組む研究

#### 4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー13名・外部評価者15名の合計28名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選考	書類選考	面接選考			採択数	
<u> </u>	自及达行	田及及行				
				内	3年型	11件(1件)
対象数	269件	33件	11件	訳	5年型	0件(0件)

()内は大挑戦型としての採択数。

#### 備考:

- 1) 平成24年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
  - •村田 武士研究者

大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2年間延長することが決まったため。

5. 研究実施期間

平成24年 10 月~平成28年 3 月(3年型)

- 6. 領域の活動状況
  - 1)領域会議:6回
  - 2) CREST 構造生命科学との合同キックオフミーティング:3回(平成 24、25、26 年)
  - 3)さきがけ、CREST 4 研究領域合同シンポジウム

CREST 生命動態、構造生命科学、さきがけ細胞構成、構造生命科学 4 研究領域が合同国際シンポジウム (JST CREST-PRESTO joint international symposium~Structural Biological Dynamics)を開催(平成 27 年 11 月)

- 5)1 期生の研究成果報告会(平成 27 年 11 月)
- 6) SciFoS(Science for Society)活動

インタビューを通じて自らの研究を位置づけなおし、今後の研究のステップアップにつなげることを目的にした SciFoS に研究者 5 名が参加(平成 25 年度)

7)研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問(サイトビジット): 16回 研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境・体制の確認、上司への協力依頼を行った。異動者については、異動先に対しても行った。

#### 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究成果報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見等を参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

#### (事後評価の流れ)

平成27年11月 評価会開催

平成28年1月 研究総括による事後評価 平成28年3月 被評価者への結果通知

#### 8. 事後評価項目

- (1)外部発表(学術論文、口頭発表等)、特許等研究成果の発信状況
- (2)学術賞、学会招待講演等外部からの評価状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

## 9. 評価結果

総論・・・採択された課題はポンプ、GPCR タンパク質複合体、タンパク質膜透過装置複合体、アクチンフィラメント網、細胞内輸送系等の生命科学の重要課題を研究対象とし、技術的には X 線結晶構造解析、電子顕微鏡構造解析、NMR、X 線小角散乱、一分子計測、分子イメージング、分子動力学シミュレーション、ケミカルバイオロジー等の最先端の研究手法を組み合わせて用いる。さきがけ研究は基本的には個人型研究であるが、本戦略目標の基本的な考え方である異分野連携を推奨した結果、さきがけ研究者同士あるいは外部研究者との様々な連携、共同研究が行われ、研究が進展したことは非常に喜ばしい。

塚崎研究者は、生物学的に重要な膜組み込みに係るターゲットを次々に構造解析し、特に、合成されたタンパク質の膜組み込みを担う YidC の構造解析を世界に先駆けて成功し、組み込みのモデルを提唱した。さらに、構造をもとに TM の膜組み込みに関するモデルの構築も可能になった点は、「タンパク質の構造を解く」から「タンパク質の構造を使う」を研究目的の一つとした本さきがけ研究の趣旨に合致しており重要である。研究成果は、Nature 誌等に発表され、基礎的研究成果でありながら研究成果を 2 回プレスリリースした。

1. 久保 稔 研究者「新規赤外分光法とXFEL 結晶構造解析の融合によるタンパク質の動的精密構造解析」評価結果・・・チトクロム酸化酵素の  $O_2$ 結合型と  $O_2$  結合型ではヘリックス  $O_2$  がされる。この過程の解明のために XFEL による結晶構造解析とフェムト秒赤外レーザーによる結晶分光との時分割同時構造解析を目指し、赤外レーザーでは結晶マウント用フローセルによる結晶試料の  $O_2$  光解離ダイナミクスの時分割測定に成功した。XFEL では、X 線とほぼ同軸の2方向ポンプ光導入及び時分解測定に成功した。また、副次的な成果として、小型の  $O_2$  方向ポンプ装置を開発し、シリアルフェムト秒結晶解析法の時分割利用へ寄与した。さらに、微量( $O_2$ )フローセルによる時分割赤外分光装置を開発し、NO リダクターゼに応用した結果、基質  $O_2$ 0 の時分割赤外測定により、反応機構の解明に寄与した。以上多くの成果が得られたと認められた。

今後は、まずはチトクロム C 酸化酵素を対象とし生命科学の問題として、開発した手法を用いて、金属中心と H 経路との間の連動機構を明らかにして欲しい。将来的には、チトクロム酸化酵素以外の膜タンパク質まで、 応用範囲が広がると予想されるので今後の研究が楽しみである。

本さきがけで開発された時間分解赤外分光装置を用いた研究で、共同研究者が第 15 回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞を受賞(マイクロ流体フローを用いた一酸化窒素還元酵素の触媒反応の動的分光観察)した。また、本さきがけ研究課題がきっかけで多くの共同研究がスタートした。

#### 2. 昆 隆英 研究者 「構造から迫る細胞内輸送マシナリー」

評価結果・・・微小管から外れにくく、モーター活性を保持した、キメラ変異体を用いることによりダイニンのモータードメインの結晶構造を解明し、クライオ電顕の2次元単粒子解析で世界に先駆けて全体の構造を明らかにした成果は大きい。ダイマーが2本足歩行するモデルは非常に魅力的であり、光ピンセットを用いて力学的に検証しており、非常に興味深い。

今後、クライオ電顕(3次元)、さらに高分解能の結晶構造解析との組み合わせにより力を発揮する様々な状態の観測を行い、原子レベルでのダイニンの動的構造解析を望みたい。

また、アルツハイマー病等の神経変性疾患とダイニン異常の関連を調べる共同研究を神経変性疾病専門家と始めており、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果が期待される。

#### 3. 塚崎 智也 研究者 「Secタンパク質膜透過装置の次世代構造生物学)

評価結果・・・助教までの研究室においてもタンパク質の膜透過研究を主宰し、3 つの新規の膜透過装置の構造を解明し、Nature 誌に発表した。これらの論文は、引用件数も多く、世界中で注目されている。特に本さきがけ期間中に構造解明した YidC に関しては、数多くの世界的な競争に打ち勝って、2 生物種由来の構造と分子メカニズムを報告した。

奈良先端科学技術大学院大学で独立准教授になった後も、それまでの技術を駆使して、高分解能の SecYEGの構造を解明し、Cell Reportsに責任著者の論文が受理されており、研究室主宰者としても、今後の成 果が期待される。

これまでの研究のように、構造決定だけにこだわるのではなく、遺伝学、生化学、生物物理等様々な手法を用いて(共同研究も含めて)、多角的に機能に着目し、分子メカニズムを解明して欲しい。

## 4. 成田 哲博 研究者 「アクチンフィラメント網動態の電子顕微鏡法による階層的理解」

評価結果・・・初めの研究提案からやや分散し、研究が広く浅くなってしまったような感じを受けるが、クライオ電子顕微鏡観察、AFM および STEM 観察、膜剥離法と AFM の組み合わせ等により、アクチン線維の様々な構造、細胞内のアクチンフィラメント構造を明らかにしたことは評価できる。

今後は、個々のフィラメントの高い分解能の像を得る努力をするとともにアクチンの全体像を明らかにする研究も推進してほしい。さらに、測定法のアプローチは興味深いので、他の試料に対する応用を進め、当該方法の汎用化と進展に尽力頂きたい。

 としての必要要件が示された。また、色々な共同研究を通じてこの受容体の構造と機能について多くの知見を 得た点は評価できる。

分子全体の構造変化を記述する方法として X 線結晶構造解析だけでは十分ではないので、今後は、結晶構造解析だけでなく電子顕微鏡と組み合わせると良いと思われる。また、P2X は多くのアゴニスト、アンタゴニストが知られている受容体なので、ヘテロ3量体の組み合わせと共に、色々な組み合わせにより面白い知見が得られると期待される。

今後は、本さきがけの枠内に限らず、自他共に達成を実感できるような研究をして時空間ダイナミクスの解明を進めて欲しい。

6. 藤井 高志 研究者 「革新的低温電顕単粒子像解析法による筋収縮制御機構の解明」

評価結果・・・種々の技術開発により、重金属を使った染色なしで、氷包埋した細いフィラメントの低温電子顕微鏡法による解析を行い、Ca 非存在下のみではあるが、フィラメント上のトロポミオシン、トロポニンの構造を得ることに成功した点は評価できる。

今後は、直接検出器の利点を生かし、ソフトウエアの開発、導入を積極的に行ってさらに分解能を上げて構造解析を完了し、トロポニンによる筋収縮の阻害機構を原子分解能レベルで解明してほしい。

7. 堀 雄一郎 研究者「立体構造に基づく化学プローブ設計と蛋白質の機能制御・局在イメージング」評価結果・・・PYP を使った発蛍光プローブにおける、オン時間の短縮化、マルチカラー化、さらに、生体機能との関連化等を達成し、有機合成のみならず、PYP を遺伝子改変する側からのアプローチも行った。また、Regnase-1 の分解や GLUT4 の膜移行等の現象の可視化に開発システムを利用し、その proof-of-concept を証明した。

このようなプローブ開発研究は、良いアプリケーションと組み合わせた時に初めて高く評価される。すなわち既存の技術ではできなかったことができるようになり、医学生物学的に重要な発見につながることが要求される。このことを意識して、応用先の生物学的トピックをまず慎重に選択し、それに役立つような技術という視点で開発するということが今後ますます必要になると思われる。

8. 政池 知子 研究者「顕微鏡による膜タンパク質1分子の3次元構造変化・機能マッピング」 評価結果・・・「先端に蛍光ビーズを結合させることによる繊毛運動の Ca<sup>2+</sup>濃度依存性3次元観察」、「改良型 偏光変調全反射型顕微鏡の利用による構造変化マッピング」、「進化型偏光変調全反射型顕微鏡の利用によ

偏光変調全及射型顕微鏡の利用による構造変化マッピング」、「進化型偏光変調全及射型顕微鏡の利用による1分子3次元角度検出」、「PDMS マイクロチャンバーに閉じ込めた微小管の観察」、「オーバル型チャンバーに閉じ込めた微小管の観察」等、様々な系で光学顕微鏡観察による1分子の動きを観測しており、技術開発面では進展が見られた。

今後は、開発した技術に適した、生理的に意義のあるシステムをうまく探し出し、よりインパクトのある成果を 期待したい。

9. 真柳 浩太 研究者「DNA複製フォーク複合体の構築原理及び遷移・制御機構の解明」

評価結果・・・PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)を介して DNA に結合する DNA polymerase 複合体の構造をクライオ電顕で単粒子解析し、分解能は低いが DNA が含まれた構造を解明することに成功し、新たなメカニズムを提唱した。しかし、まだ分解能が低く、論文発表には至っていない。

今後は、電子直接観察検出器(DED: Direct Electron Detector)のマシンタイムを確保して、高分解能構造を得る努力をするのが急務であると思われる。

10. 山田 和弘 研究者「クロマチン構築に連携した転写dynamicsの構造解明」

評価結果・・・RNA polymerase がクロモソームを乗り越える超分子複合体のクライオ電顕解析を行うべく、厳密な生化学解析(ゲルシフト、光散乱、超遠心分析)を行い、stoichiometric な複合体の形成を確認でき、ネガティブステイニングによる低分解能構造がわかった点は評価できる。

調製の困難な複合体なので、進捗が早くないことはやむを得ないが、試料調製や stoichiometry も慎重に確認しているので、電顕での構造解析をもっと強力におし進め、マシンタイムが確保しやすいのであれば負染色も積極的に行うべきである。今後の複合体の解析に期待したい。



#### 10. 評価者

研究総括 若槻 壮市 米国 SLAC 国立加速器研究所 光科学部門 教授/スタンフォード大学 医学部 構造生物学 教授

領域アドバイザー(役職は平成28年3月末現在)

稲垣 冬彦 \* 1 北海道大学 先端生命科学研究院 次世代ポストゲノム研究センター 特任教授

岩田 想 京都大学 大学院医学研究科 分子生体統御学講座 分子細胞情報学分野 教授

小椋 利彦 東北大学 加齢医学研究所 神経機能情報研究分野 教授

上村 みどり 帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所 創薬化学研究所 上席研究員

木下 タロウ 大阪大学 微生物病研究所 免疫不全疾患研究分野/大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 糖鎖免疫学研究室 教授

栗栖 源嗣 大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質結晶学研究室 教授

阪下 日登志 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 総括研究主幹

杉尾 成俊 三菱化学株式会社 開発研究所 イオン交換樹脂開発室 室長

高木 淳一 大阪大学 蛋白質研究所 分子創製学研究室 教授

永田 和宏 京都産業大学 総合生命科学部 教授

中村 春木 大阪大学 蛋白質研究所 所長 蛋白質情報科学研究室 教授

濡木 理 東京大学 大学院理学系研究科 生物化学専攻 構造生物学·生化学 教授

原田 慶恵 京都大学 物質ー細胞統合システム拠点 教授

宮脇 敦史 理化学研究所 脳科学総合研究センター 副センター長

吉田 稔 \*1 理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室 主任研究員

\*1 平成 25 年 4 月委嘱開始

#### (参考)

件数はいずれも、平成28年3月末現在。

#### (1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	2	35	37
口頭	56	143	199
その他	1	17	18
合 計	59	195	254

## (2)特許出願件数

国 内	国 際	計
1	0	1

#### (3)受賞等

•'昆 隆英

大阪大学総長奨励賞(H24/10)

・服部 素之

第11次「青年千人計画」選出(中国:H27/6)

•堀 雄一郎

大阪大学総長奨励賞(H25/8)

第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 部会講演賞受賞 (H25/9)

•政池 知子

第5回 資生堂女性研究者サイエンスグラント 受賞 (H24/)

## (4)招待講演

国際 21件

国内 47件



# 別紙

# 「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

# (3年型)

(3年至)				
研究者氏名	研 究 課 題 名	現 職(平成28年3月末現在)	研究費	
(参加形態)	(研究実施場所)	(応募時所属)	(百万円)	
久保 稔	新規赤外分光法とXFEL結晶構造解	理化学研究所 放射光科学総合研		
	析の融合によるタンパク質の動的精密	究センター 専任研究員		
	構造解析	(兵庫県立大学 大学院生命理学研	36	
(兼任)	(理化学研究所 放射光科学総合研究	究科 特任准教授)		
	センター)			
昆 隆英	構造から迫る細胞内輸送マシナリー	大阪大学 大学院理学研究科 教授	F0	
(兼任)	(大阪大学 大学院理学研究科)	(大阪大学蛋白質研究所 准教授)	50	
	Secタンパク質膜透過装置の次世代	奈良先端科学技術大学院大学		
塚崎 智也	構造生物学	バイオサイエンス研究科 准教授	59	
(兼任)	(奈良先端科学技術大学院大学 バイ	(東京大学 大学院理学系研究科		
	オサイエンス研究科)	助教)		
	アクチンフィラメント網動態の電子顕微	名古屋大学 大学院理学研究科 准		
成田 哲博	鏡法による階層的理解	はによる階層的理解 教授		
(兼任)	(名古屋大学大学院 理学研究科	(名古屋大学 大学院理学研究科	39	
	構造生物学研究センター)	助教)		
	ATP作動性陽イオンチャネルP2X受	復旦大学 生命科学学院 プロフェ		
服部 素之	容体の時空間ダイナミクスの解明と制	ッ <del>サ</del> ー	52	
(兼任)	御	(オレゴン健康科学大学ヴォ-ラム	52	
	(復旦大学 生命科学学院)	研究所 ポストドクトラルフェロー)		
藤井高志	革新的低温電顕単粒子像解析法によ	科学技術振興機構さきがけ研究者		
(専任)	る筋収縮制御機構の解明	(理化学研究所 生命システム研究	42	
(寺江)	(大阪大学 大学院生命機能研究科)	センター 基礎科学特別研究員)		
	立体構造に基づく化学プローブ設計と	大阪大学 大学院工学研究科 助教		
堀 雄一郎	タンパク質の機能制御・局在イメージン	(同上)	45	
(兼任)	グ		45	
	(大阪大学 大学院工学研究科)			
	顕微鏡による膜タンパク質1分子の3	東京理科大学 理工学部応用生物		
政池 知子	次元構造変化・機能マッピング	科学科 講師	52	
(兼任)	(東京理科大学 理工学部応用生物科	(学習院大学理学部 助教)	53	
	学科)			
真柳 浩太 (兼任)	DNA複製フォーク複合体の構築原理	九州大学 生体防御医学研究所		
	及び遷移・制御機構の解明	助教	42	
	(九州大学 生体防御医学研究所)	(同上)		
山田 和弘 (専任)	クロマチン構築に連携した転写dyna	科学技術振興機構さきがけ研究者		
	micsの構造解明	(スイス連邦工科大学チューリッヒ	41	
	(マックスプランク研究機構 ハイデル	校 分子生物学・生物物理学研究		
	ベルグ医学研究所)	所 オーバーアシスタント)		



# 研究報告書

# 「新規赤外分光法と XFEL 結晶構造解析の融合によるタンパク質の動的精密構造解析」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成24年10月~平成28年3月

研究者: 久保 稔

#### 1. 研究のねらい

生体反応の特異性が、精緻に設計されたタンパク質の構造に基づいていることはよく知られている。その設計原理を理解するためには、反応の動的過程において各原子がどのように動き、機能部位の電子構造やプロトン化状態がどのように制御されているかを詳しく調べる必要がある。

タンパク質の三次元構造を高い空間分解能で決定できる実験手法は X 線結晶構造解析であり、これまでに多くのタンパク質に利用されてきた。この手法を用いれば 0.1 Å レベルで原子配置を決定することが可能である。一方、機能部位の原子団(官能基)の電子構造やプロトン化状態を解析できる強力な手法は、赤外分光法である。赤外分光法とは、COOH/COO-などの官能基の振動状態を観測する実験手法である。官能基の振動数はわずか 0.01 Å レベル(結合次数レベル)の構造変化を鋭敏に反映するため、X 線結晶構造解析では困難な精密な構造解析に有用である。しかし、赤外分光法はタンパク質の三次元構造の可視化には無力である。したがって、X 線結晶構造解析と赤外分光法は互いに相補的な手法であり、これらをうまく組み合わせることができればタンパク質の反応機構解明に有効であろう。

時間分解 X 線結晶構造解析は、X 線自由電子レーザー(XFEL)の出現により新たな道が拓かれた。XFEL は最先端のフェムト秒 X 線源であり、数十 fs の時間分解能を実現できる。一方、時間分解赤外分光法は、最先端のフェムト秒赤外レーザーを用いることで、100 fs の時間分解測定が可能である。またフェムト秒パルスは輝度が高いので、タンパク質結晶のような微小試料の高感度測定も期待できる。結晶の赤外分光は X 線結晶構造解析との相補利用・相関利用に有用であろう。そこで本研究では上記の先端光源を用いて、時間分解 X 線結晶構造解析と時間分解結晶赤外分光法の基盤技術を開発する。その基盤技術を、生体エネルギー分野で重要なチトクロム酸化酵素に応用する。この酵素が O₂を水に変換することでエネルギーを得るしくみを明らかにして、光合成系と並んで重要な呼吸系のエネルギー変換システムの解明と応用に繋げる。

## 2. 研究成果

#### (1)概要

本研究は、時間分解 X 線結晶構造解析ならびに時間分解赤外分光解析の基盤技術を開発し、それらを用いてチトクロム酸化酵素の反応機構を解明することを目的とした。チトクロム酸化酵素とは、呼吸で取り入れた O<sub>2</sub> を水にまで還元するとともに、プロトンをポンプするエネルギー変換酵素である。O<sub>2</sub> 還元反応は、ヘム鉄と銅原子(Cu<sub>B</sub>)からなる金属中心で触媒される。最近の X 線結晶構造解析から、ヘム鉄に CO(O<sub>2</sub>アナログ)が結合すると、H 経路(プロトンポンプ推定経路)のゲートが閉じることが明らかにされた。そこでまずは、金属中心とH経路



との間の連動機構を明らかにするために、CO 光解離に伴うダイナミクスの追跡を目指した。 時間分解赤外分光装置は、高輝度のフェムト秒赤外レーザーを用いることで高感度の装置 を開発した[原著論文 2]。さらに結晶マウント用の赤外フローセルを開発することで、結晶試料の CO 光解離後のダイナミクスの観測に成功した。装置は、励起条件を含めて、時間分解 X 線結晶構造解析の実験条件の決定に利用された。

一方、時間分解 X 線結晶構造解析の装置は、SACLA(理研・播磨の XFEL 施設)を用いて開発した。CO 光解離のための励起光学系は、X 線とほぼ同軸の二方向から励起することで、数百  $\mu$ m の大型結晶でも十分に励起できる系を開発した[原著論文 1]。CO 光解離後の時間分解 X 線結晶構造解析のデータセット収集には成功しており、現在、中間体構造を解析中である。

また、時間分解赤外分光・時間分解 X 線結晶構造解析の基盤開発・応用研究は、本研究を進める中で当初の計画を超えた発展を見せた。時間分解赤外分光においては、極微量送液マイクロフローシステムの開発を通して、酵素反応の時間分解観測を可能にした。NO 還元酵素に適用し、trans 機構で酵素反応が進むことを解明した。一方、時間分解 X 線結晶構造解析においては、数十 μm の微結晶をフローするシリアルフェムト秒結晶解析法(SFX)の研究チームと共同研究を開始し、SFX の装置を時間分解測定が可能な系に発展させた。第一の応用としてバクテリオロドプシンの中間体を観測しているところである。

(2)詳細

## 「時間分解結晶赤外分光の基盤開発」

フェムト秒赤外レーザーを用いた時間分解赤外分光装置を開発し、理研・播磨キャンパス内に設置した。赤外光はダブルビームに分割し、片方は赤外パルス強度のゆらぎの補正に利用した。赤外ビームの試料位置での大きさは、放物面鏡(f25.4)を用いることで(aperture 無しで)約 100  $\mu$ m にまで絞れた。スペクトル測定には、分光器およびマルチチャンネル MCT 検出器(2段64素子)を用いた。検出器からの信号はboxcar 積分器で1パルス毎にゲート検出し、24ビットで AD 変換した。

時間分解測定には、ポンプ・プローブ法を用いた。励起用レーザーとして、Nd:YAG レーザー (4 ns, 532 nm) および XeCI レーザー(8 ns, 308 nm)を設置した。前者はバクテリオロドプシンの光反応やヘムタンパク質のリガンド光解離に有用であり、後者はケージド化合物の光分解に有用である。これらの励起用レーザーと赤外レーザーを同期させることによって、ナノ秒の時間分解測定を可能にした。(なお、フェムト秒赤外レーザーの前段から 800 nm のフェムト秒パルスを一部切り出し、波長変換することでフェムト秒の励起用パルスを生成できる。これを利用すれば、100 フェムト秒の時間分解測定が可能となるが、本研究期間でそこまでは達成できなかった。)

次に、結晶マウント用の赤外フローセルを開発した。このフローセルの流路はテーパー型をしており、結晶を母液とともに流すと、結晶の厚みと流路の深さが一致したところで結晶が留まる。その後は穏やかに母液をフローすることで(数 μL/min)、結晶は安定に固定される。流路の最も浅い箇所の深さは 10 μm とした。このセルは CaF<sub>2</sub> 単結晶を sub-μm 精度で微細加工することにより作製された(慶応大・閻らとの共同研究)。セルは水冷により温調可能である。このセルの利点は二つある。一つは、非常に強い赤外吸収を持つ水が赤外光軸上にほとん



ど存在しない条件となるため、高精度の赤外分光測定が可能な点である。もう一つは、フロー する母液の種類を適宜選択することにより、セル内で試料の状態を制御可能な点である。

## 「時間分解 X 線結晶構造解析の基盤開発」

時間分解測定には、ポンプ・プローブ法を用いた。ここでは、ループマウントした大型結晶の時間分解測定系について述べる(時間分解 SFX については後述)。

大型結晶の利用は、チトクロム酸化酵素のような巨大タンパク質(格子定数の大きな結晶) の高分解能構造解析に有利である。大型結晶を励起する場合、結晶全体を励起することは 不可能なため、励起光を X 線とほぼ同軸で且つ局所的に照射する必要がある。そのための 励起光学系を開発した(図 1)。この光学系は、X 線の上流側・下流側で対称な設計であるため、結晶を表面・裏面の 2 方向から励起することが可能である。実際に 2 方向励起は大型結晶の 100 %励起に有効であった。

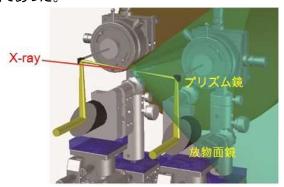


図 1. 大型結晶励起光学系

さらに図 1 の光学系において、励起光の光軸に可視白色光(390-700 nm)を重ねることで、可視吸収スペクトルのその場測定を可能にした。回折データ収集前後での可視吸収測定は、試料状態の確認に有用であった。

励起用レーザーについては、ナノ秒の時間分解能で十分な場合は、ナノ秒レーザーを使用する。一方、数十 fs の時間分解能が必要な場合は、SACLA 共用のフェムト秒同期レーザーシステム(http://xfel.riken.jp/users/eqp000\_2.html)を使用可能である。

時間分解 X 線結晶構造解析においては、光学系のほかに、常温で結晶を安定に保持する機構も必須である。そのための調温調湿装置は、共同研究者が開発した(JASRI・馬場ら)。 ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶において最適な4°Cの条件でも98%以上の調湿環境を実現できるものが開発された。

#### 「ウシ心筋チトクロム酸化酵素の応用研究」

CO 光解離に伴うダイナミクスを時間分解結晶赤外分光と時間分解 X 線結晶構造解析で追跡した。CO がヘム鉄から解離すると、プロトンポンプ経路(H 経路)上の水チャネルが閉状態から開状態へ遷移することが、過去の高分解能 X 線結晶構造解析から明らかにされている。この構造の動的変化の解明が目的である。ヘム鉄からの CO の光解離は、532 nm のナノ秒パルスによって誘起した。

まずは、結晶マウント用赤外フローセルを使用し、4℃の条件で時間分解赤外吸収スペクト



ルを測定した。その結果、ヘム鉄から光解離した CO は、20 ns 以内に  $Cu_B$  に結合し、その後 4.4  $\mu$ s と 13 ms の 2 相で  $Cu_B$  から解離することが明らかとなった。すなわち、 $Cu_B$  のリガンド親 和性が異なる 2 つのコンフォマーの存在が動的解析から明らかとなった。また、6.2 ms と 34 ms の時定数で CO はヘム鉄に再結合する(光解離前の状態に戻る)ことがわかった。

次に、時間分解 X 線結晶構造解析を行なった。実験条件(励起光の偏光特性を含めた励起条件、遅延時間など)は off-line での時間分解分光により決定した。本さきがけ期間中に中間体構造を決定する見込みで解析を進めている(兵庫県立大・月原ら、理研・吾郷、平田らとの共同研究)。

## 「その他の研究発展」

## - 時間分解 SFX の基盤開発とバクテリオロドプシンの中間体の観測

微結晶をフローしながら回折データを収集する SFX の装置(DAPHNIS; <u>Diverse Application Platform for Hard X-ray diffraction In SACLA)</u>に、ナノ秒レーザーパルスを 2 方向から照射する励起光学系を組み込んだ(理研・岩田ら、JASRI 登野らとの共同研究)。励起光を照射した条件の回折データと励起光を照射しない dark 条件の回折データを交互に収集するスキームで、バクテリオロドプシンの中間体構造の解析に応用したところである。

一方で、時間分解 SFX の実験条件を簡便に決定できる off-line 時間分解可視吸収分光装置を開発し、理研・播磨キャンパス内に設置した。現在はマイクロ秒の時間分解能であるが、ナノ秒ゲート付きの ICCD を用いることでナノ秒の時間分解能に改善予定である。バクテリオロドプシン微結晶の時間分解可視吸収スペクトルを測定し、結晶相での光サイクル中間体生成の時定数を明らかにした。事前の off-line 時間分解分光測定は、時間分解 SFX の成功に必須であった。

#### ・酵素反応観測のためのフロー・フラッシュ型時間分解赤外測定系の開発

CO 光解離ダイナミクスのようなサイクル反応の測定では、同一試料を用いた積算が可能であるが、酵素反応の測定では、フローによる試料交換が必須となる。そこで、ケージド化合物を利用して酵素反応を観測できるフロー・フラッシュ型の時間分解測定システムを開発した。具体的には、マイクロ流路フローセル、及びレーザー照射と同期した極微量送液シリンジポンプを開発し、時間分解赤外分光装置に組み込んだ。測定では、①フレッシュな試料の送液(試料交換)、②送液ストップ、③励起光照射(ケージド化合物からの基質放出)、④一定遅延時間後にスペクトル測定、を繰り返す。

装置の第一の応用として、NO 還元酵素の酵素反応(窒素サイクルのキープロセスである NO 還元反応)を観測した。低収量の膜タンパク質の不可逆反応であるため、これまで不可能 とされてきた類の計測である。ケージド NO は市販のものを用いた。NO 還元酵素はチトクロム酸化酵素の祖先型であり、ヘム鉄と非ヘム鉄(Fe<sub>B</sub>)からなる金属中心で 2 分子の NO を N<sub>2</sub>O へと変換する。この反応の NO 結合型中間体(10  $\mu$ s)の観測に成功し、その NO 伸縮振動の振動数の構造敏感性を利用して、本酵素の反応機構が trans 機構であることを解明した。長年の論争に決着をつける研究成果を得ることができた(理研・城らとの共同研究)。

なお、本測定系はケージド O2を用いることで、チトクロム酸化酵素の酵素反応(O2還元/プ



ロトンポンプ反応)の観測に応用可能である。ケージド  $O_2$  は、既報の化合物をベースに開発中である(兵庫県立大・杉村らとの共同研究)。暗所・4°Cの条件で数時間安定な化合物が開発されたところである。

#### 3. 今後の展開

チトクロム酸化酵素の研究については、O2 還元/プロトンポンプ反応の観測が最大の課題である。CO 光解離の系の次には、開発中のケージドO2を用いてこの生理反応の時間分解 X 線結晶構造解析・時間分解赤外分光に挑戦したい。時間分解赤外分光においては、プロトンポンプ経路(H経路)の出口に存在するAsp51のプロトン化・脱プロトン化の観測が一つの目標である。そのバンドの帰属には、結晶(配向試料)の偏光赤外測定を利用する。

装置はチトクロム酸化酵素の応用にとどまらず汎用的なものである。特に最近は種々のケージド化合物が利用可能になってきているので(ケージド ATP やケージド Glu など)、それらを利用した他のタンパク質の応用研究も展開していきたい。それと同時に、より汎用的な mixed flow による測定系の開発も重要な将来課題と考えている。

# 4. 評価

## (1)自己評価

(研究者)

ナノ秒時間分解 X 線結晶構造解析 (ループマウントおよび SFX 測定系) ならびにナノ秒時間 分解赤外分光解析 (結晶およびフロー測定系) の基盤を、理研・播磨に整備した。本研究では チトクロム酸化酵素の CO 光解離の系を第一の研究対象としたが、本基盤を用いた応用研究 はそれに留まるものではない。特に、①ケージド化合物を用いた時間分解 SFX と②ケージド化合物を用いたフロー・フラッシュ時間分解赤外分光は、ケージド化合物の利用という制約はあるものの、光サイクル反応以外のさまざまな酵素 反応への応用が見込める基盤と考えている。

また、理研・播磨に時間分解分光測定環境を整備したメリットも大きいと考えている。SACLA ユーザーが来所した際に利用できる形にしたい。なお、米国の XFEL 施設(LCLS)で時間分解 SFX をした研究グループが、われわれの時間分解分光装置で予備実験をした例もある。時間 分解 X 線結晶構造解析の成功(あるいはデータの解釈)には、結晶中のタンパク質ダイナミクスを時間分解分光測定で理解しておくことが重要だからである。

ただし、時間分解分光の役割が時間分解 X 線結晶構造解析の実験条件の検討にとどまるようでは不十分である。分光情報 (電子状態に関する情報)が反応機構解明に活用されてこそ意義が大きい。チトクロム酸化酵素のプロトンポンプや NO 還元酵素の NO 還元中間体といった酵素反応の研究は、時間分解 X 線結晶構造解析・時間分解赤外分光解析の相補利用・相関利用のよいモデル研究となる。今後は本さきがけで開発された基盤技術をベースにシャープな相関構造解析を進めることが、より広く構造生命科学の発展に繋がると考えている。

研究の進め方自体に大きな問題はなかったと考えている。共同研究体制を築き、理研・播磨にいる利点をフル活用して、できることから着実に進めた。しかし中間目標を多く設けたせいで、やり残したことも多い。一つはフェムト秒領域の現象の測定であるが、これに関してはSACLA共用のフェムト秒同期レーザーを用いてフェムト秒時間分解X線結晶構造解析を計画

している。また時間分解 X 線回折・時間分解赤外分光の同時測定も当初念頭にあった。 SACLA 共用のフェムト秒同期レーザーを用いてフェムト秒赤外光を生成することを考えていた が、共用レーザーは安定性の問題で精密分光用途の測定光には向かないことが判明した。 同時測定の実現には赤外光源の再考が必要である。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。 (研究総括)

チトクロム酸化酵素の O₂結合型と CO 結合型ではヘリックス 10 のバルジ移動により H 経路が閉ざされる。この過程の解明のために XFEL による結晶構造解析とフェムト秒赤外レーザーによる結晶分光との時分割同時構造解析を目指し、赤外レーザーでは結晶マウント用フローセルによる結晶試料の CO 光解離ダイナミクスの時分割測定に成功した。 XFEL では、X 線とほぼ同軸の2方向ポンプ光導入及び時分解測定に成功した。 また、副次的な成果として、小型の 2 方向ポンプ装置を開発し、シリアルフェムト秒結晶解析法の時分割利用へ寄与した。 さらに、微量(20 μ)フローセルによる時分割赤外分光装置を開発し、NO リダクターゼに応用した結果、基質 NO の時分割赤外測定により、反応機構の解明に寄与した。以上多くの成果が得られたと認められた。

今後は、まずはチトクロム C 酸化酵素を対象とし生命科学の問題として、開発した手法を用いて、金属中心と H 経路との間の連動機構を明らかにして欲しい。将来的には、チトクロム酸化酵素以外の膜タンパク質まで、応用範囲が広がると予想されるので今後の研究が楽しみである。

本さきがけで開発された時間分解赤外分光装置を用いた研究で、共同研究者が第 15 回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞を受賞(マイクロ流体フローを用いた一酸化窒素還元酵素の触媒反応の動的分光観察)した。

また、本さきがけ研究課題がきっかけで多くの共同研究がスタートした。

#### 5. 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

- Sakaguchi, M., Kimura, T., Nishida, T., Tosha, T., Yamaguchi, Y., Yanagisawa, S., Ueno, G., Murakami, H., Ago, H., Yamamoto, M., Ogura, T., Shiro, Y.\*, <u>Kubo, M.\*</u> A nearly on-axis spectroscopic system for simultaneously measuring UV-visible absorption and X-ray diffraction in the SPring-8 structural genomics beamline. *J. Synchrotron Rad.* (2016) Vol. 23, 334-338.
- <u>Kubo, M.</u>, Nakashima, S., Yamaguchi, S., Ogura, T., Mochizuki, M., Kang, J., Tateno, M., Shinzawa-Itoh, K., Kato, K., Yoshikawa, S.\* Effective pumping-proton collection facilitated by a copper site (Cu<sub>B</sub>) of bovine heart cytochrome c oxidase, revealed by a newly developed time-resolved infrared system. *J. Biol. Chem.* (2013) Vol. 288, 30259-30269 (Selected for *JBC Bioenergetics* Most-Read Articles in Sep-Oct 2013).



#### (2)特許出願

研究期間累積件数:O件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 招待講演

- [1] **久保稔** ダイナミクス研究における未解決問題と振動分光からのアプローチ. 蛋白研セミナー "構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題", 東京, 2016年3月.
- [2] **久保稔** X線結晶構造解析と振動分光法の併用によるタンパク質の動的精密構造解析. 蛋白研セミナー "結晶構造を併用したハイブリッド構造研究の最前線", 大阪, 2014年2月.
- [3] <u>久保稔</u> 蛋白質水溶液を扱える高感度赤外分光装置の開発:酵素反応の生理条件下での測定を目指して. 第36回溶液化学シンポジウム プレシンポジウム, 札幌, 2013年10月.
- [4] **久保稔** 酵素反応の観測を可能にする振動分光技術の開発と展望. 第13回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ "蛋白質機能を化学的に理解するために", 鳥取, 2013年6月.

## ·国際学会(口頭)

[1] <u>Kubo, M.</u>, Kimura, T., Yamaguchi, Y., Yanagisawa, S., Komiya, R., Yan, J., Nakashima, S., Ogura, T., Shiro, Y. Development of a highly-sensitive time-resolved IR spectrometer and its application to high-background aqueous biological samples. *Pacifichem 2015*, Hawaii (USA), December 2015.

## •その他

本さきがけで開発された時間分解赤外分光装置を用いた研究で、共同研究者(木村)が第 15 回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞を受賞(木村哲就,石井頌子,當舎武彦,城宜嗣,久保稔 マイクロ流体フローを用いた一酸化窒素還元酵素の触媒反応の動的分光観察,第15回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞シンポジウム,徳島,2015年6月,)



# 研究報告書

## 「構造から迫る細胞内輸送マシナリー」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月~平成 28 年 3 月

研究者: 昆隆英

## 1. 研究のねらい

私たちの体を構成する細胞は、神経軸索輸送に代表される効率的な物質輸送システムを 内包しており、その機能は生命活動に必須である。細胞の中心方向への輸送は、質量 1,000 kDa を超える巨大モータータンパク質複合体「ダイニン」が一手に担っているが、その運動発 生・制御機構は、長年の精力的な研究にもかかわらず、いまだに謎に包まれている。

本研究課題では、輸送システムの心臓部であるダイニンの運動を生みだす構造変化を原子レベルで決定するとともに、輸送マシナリーを構成するより高次な複合体構造を明らかにすることで、細胞中心方向への輸送機構の全貌を解明することを目指す。

#### 2. 研究成果

#### (1)概要

本研究の最も重要な成果のひとつは、「ダイニン分子が微小管上を直進運動する姿」をクライオ電子顕微構造解析により初めて捉えたことである。本成果は、従来"想像"するしかなかった、ダイニン輸送系の動く様子を直接可視化し、主要な中間体構造を明らかにしたという点で非常に重要な進展であるといえるだろう。また、本研究では、得られた構造モデルに基づいたダイニン分子の1分子運動・力学解析も行い、ダイニンの歩行機構について新たなモデルを提唱した。さらに、細胞内物質輸送機構の原子レベルでの理解に重要な「ダイニン構造変化中間体」と「ダイニン・モーター活性制御因子複合体」の結晶化にも成功し今後の構造解析へ道を拓いた。これらの成果を基盤として今後研究が進展すれば、ダイニンの機能あるいは部分的な機能不全と深く関連すると考えられているヒトの疾病—神経変性疾患、発生異常、がん、ウイルス感染など—の詳細な発症機構が明らかになると期待される。

#### (2)詳細

私たちの体を構成する細胞は、効率的な物質輸送システムを内包しており、核、ミトコンドリア、RNA、タンパク質など多種多様な物質を、必要な場所に必要なタイミングで輸送している。この輸送システムは、私たちが生きていくうえで欠くことのできない重要なもので、その機能が部分的にでも失われると、脳神経系疾病、発生異常、がん発症などに関連すると考えられている。

本さきがけ研究「構造から迫る細胞内輸送マシナリー」では、輸送システムの心臓部を構成する巨大分子モーター複合体—『ダイニン』の運動を生み出す構造変化を原子レベルで決定するとともに、輸送マシナリーを構成するより高次な複合体構造を明らかにすることで、細胞内物質輸送機構の全貌を解明することを目指している。具体的には、細胞中心方向物質輸



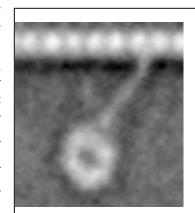
送機構を解明する上で最重要と考えられる以下の4つの研究項目を進めた。

- ダイニンの ATP 加水分解サイクル過程に伴う構造変化を結晶構造解析で捉える
- ダイニンモーター活性制御因子の作用機構の構造基盤を明らかにする
- 微小管上を歩行運動するダイニンの構造をクライオ電子顕微鏡像再構成法で捉える
- 構造に基づく1分子運動・力学計測によりダイニンの運動機構を明らかにする

本報告書では、これらのうち顕著な成果が得られた後半二つの研究項目ついて以下に詳述する。

「微小管上を歩行運動するダイニンの構造をクライオ電子顕微鏡像再構成法で捉える」

細胞中心方向の物質輸送研究(ダイニンのメカニズム研究)の進展を阻んできた主要因のひとつは、その構造情報が十分ではないことにあった。ダイニン中核領域(モータードメイン)の原子構造は、ここ数年で、本さきがけ研究者を含めた複数の研究グループより明らかにされてきた。しかし、ダイニンが力を発生し動くしくみを理解する上で最も重要な、『ダイニンが微



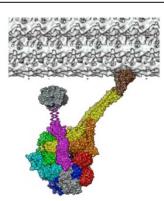


図 1: 微小管上を歩行運動するダイニン分子の クライオ電子顕微鏡像とその原子モデル

されたものである。本研究により次の重要知見が得られている。(図 1)

- ∮ ダイニンが微小管上を運動する際にとる、2つの主要な新規構造を発見した。
- ダイニンは2本の脚(モータードメイン)を用いて微小管上を運動するが、2本の脚がどの 方向を向き、相対的にどのような距離にあり、微小管に対してどのような角度で結合する かという、運動機構理解の根幹となる構造情報が得られた。
- ダイニンは微小管に結合した状態で最大 20 nm 以上も揺らぎながら直進運動することが 明らかになった。

これらの知見は、従来"想像"するしかなかった、ダイニン輸送系の動く様子を直接可視化し、 主要な中間体構造を明らかにしたという点で非常に重要な進展であるといえるだろう。

「構造に基づく1分子運動・力学計測によりダイニンの運動機構を明らかにする」 上述のクライオ電子顕微鏡像解析および、結晶構造解析の結果から、ダイニン分子中の「リンカー」と呼ばれる構造ユニット(図 1 で紫色で示した部分)のスイング運動が、ダイニンの微



小管上の力発生と直進運動に決定的な役割を果たすと推測された。そこで本研究では、この構造情報に基づく作業仮説を検証するため、1分子運動・力学計測を行った(投稿準備中)。 具体的には、ダイニンの2本の脚(モータードメイン)のうち片脚のみリンカースイングをブロックしたヘテロ二量体ダイニンの歩行について詳細な計測を行った。その結果、次の重要知見が得られた。

- ダイニンは、無負荷条件下では、2 本の脚の片方のみを動かすことができれば、正常に 微小管上を直進運動することができる。
- ダイニンは、細胞内で積荷を輸送している条件に近い数ピコニュートンの負荷がかかった状態では、両脚のリンカースイングがあってはじめて、力を発生し微小管上を運動することができる。
- 負荷条件下では、ダイニンの両脚のリンカースイングが協調しておこることが、歩行(輸送)機構に重要である。

これらの知見により、「リンカースイング」のダイニン歩行に果たす役割の詳細が初めて明らかになった。また本研究結果は、ダイニン分子が微小管上を直進運動するしくみには、複数種類のモードがあることを示唆している。ダイニンは細胞内で極めて多様な物質輸送を駆動しており、各々の輸送に適した運動モードを選択できる分子機構を内包しているのかもしれない。

### 3. 今後の展開

本研究の今後の課題は、ダイニン輸送複合体の全体構造をより高空間分解能で明らかにすることである。その構造が原子レベルで明らかになれば、細胞内物質輸送機構の異常によって引き起こされるさまざまな疾病—神経変性疾患、成長異常、がんなど—の発症機構解明につながることが期待される。

#### 4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

● 研究目的の達成状況:

細胞中心方向への物質輸送機構を解明する上で最も重要な研究課題のひとつである「ダイニン分子が微小管上を直進運動する姿」をクライオ電子顕像二次元単粒子解析で捉えたことは非常に重要な進展である。また、得られた主要中間状態構造と 1 分子運動・力学解析を組み合わせることで、ダイニンの歩行機構について、具体的なモデルを提唱するに至った点も評価に値する。しかし、ダイニン複合体の輸送機構を完全に理解するためには、三次元かつ高空間分解能の構造解析が必須であり、道半ばの輸送複合体結晶構造解析とあわせて、更なる研究継続が必要である。

● 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況):

本研究期間中に所属研究機関の変更が 2 回あり、各々で新たな研究室を立ち上げる必要があったため、研究継続の観点からは、多少の停滞期間があったことは否めない。しかし、共同研究体制の構築や研究補助者の配置は適切に行われ、研究実施体制としては十分であった。また、研究補助者雇用や研究機器・消耗品の購入などの研究費執行は適切に行われた。

● 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果:

本研究が主な対象としている「ダイニン」は、私たちが生きていくうえで欠くことのできないタンパク質分子である。上述のように細胞中心方向への輸送のほぼ全てを駆動しており、さまざまな小胞、細胞小器官、RNA そしてタンパク質複合体の移動・配置に重要である。また、ダイニンの運動活性は、紡錘体形成や染色体分離など細胞分裂のキープロセスにも深く関与している。本成果を基盤として研究が進展すれば、これら生命活動に必須なプロセスがどのような仕組みで駆動されているのか、そのメカニズムが原子レベルで明らかになると期待される。

また、ダイニンの機能あるいは部分的な機能不全が様々なヒトの疾病と深く関連することも重要である。例えば、10 種類以上のウイルスが感染過程でダイニン複合体をハイジャックすることが示されている。また、神経変性疾患や不妊・排卵障害の一部はダイニンモーターの機能異常と関連があると考えられている。本研究成果を基盤としてダイニン運動機構理解が進展すれば、これらダイニン関連病の発症機構が明らかになると期待される。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

微小管から外れにくく、モーター活性を保持した、キメラ変異体を用いることによりダイニンのモータードメインの結晶構造を解明し、クライオ電顕の2次元単粒子解析で世界に先駆けて全体の構造を明らかにした成果は大きい。ダイマーが2本足歩行するモデルは非常に魅力的であり、光ピンセットを用いて力学的に検証しており、非常に興味深い。

今後、クライオ電顕(3次元)、さらに高分解能の結晶構造解析との組み合わせにより力を 発揮する様々な状態の観測を行い、原子レベルでのダイニンの動的構造解析を望みたい。 また、アルツハイマー病等の神経変性疾患とダイニン異常の関連を調べる共同研究を神経 変性疾病専門家と始めており、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果が期待 される。

#### 5. 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

- 1. Imai, H., Shima, T., Sutoh, K., Walker, ML., Knight, PJ., Kon, T., Burgess, SA. Direct observation shows superposition and large scale flexibility within cytoplasmic dynein motors moving along microtubules.
  - Nature Commun. 2015, 6, 8179. DOI: 10.1038/ncomms9179.
- 2. Uchimura, S., Fujii, T., Takazaki, H., Ayukawa, R., Nishikawa, Y., Minoura, I., Hachikubo, Y., Kurisu, G., Sutoh, K., Kon, T., Namba, K., Muto, E. A flipped ion pair at the dynein-microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation.



J. Cell Biol. 2015, 208, 211-222, DOI:10.1083/jcb.201407039.

- Ikuta, J., Kamisetty, N.K., Shitaku, H., Kotera, H., Kon, T., Yokokawa, R. Tug-of-war of microtubule filaments at the boundary of a kinesin- and dynein-patterned surface. Sci. Rep. 2014, 4, 5281, DOI: 10.1038/srep05281
- 4. Roberts, A., Kon, T., Knight, PJ., Sutoh, K., Burgess, SA.. Functions and mechanics of dynein motor proteins.

Nature Rev. Mol. Cell. Biol.. 2013, 14, 713-726, DOI: 10.1038/nrm3667.

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

#### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1. Takahide Kon, The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain, 14th International Alpbach Motors、招待講演.
- 2. Takahide Kon, Structure and function of the dynein motors, International workshop DYNEIN2013、招待講演.
- 3. 細胞中心方向への輸送エンジン―ダイニンの構造とその作動メカニズム、第 87 回日本生化学会大会、招待講演.
- 4. 細胞中心方向輸送エンジン: 細胞質ダイニンの構造と運動メカニズム、生化学. 2013, 85(4), 272-275. 総説.
- 5. 細胞中心方向への輸送エンジン「ダイニン」の構造と運動機構、実験医学増刊. 2014, 32(10): 221-224. ショートレビュー.



# 研究報告書

## 「Secタンパク質膜透過装置の次世代構造生物学」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月~平成 28 年 3 月

研究者: 塚崎 智也

#### 1. 研究のねらい

本研究では、ダイナミックな相互作用の変化や構造変化を伴う「Sec トランスロコンを介したタンパク質の膜透過・膜組み込み過程」を可視化すべく、新たな研究手法を取り入れた構造生物学的解析を進める。本研究成果は、Sec タンパク質による膜を越えたタンパク質の輸送のみならず様々な物質輸送の理解の基盤となる。

リボソームによって新規に合成されるタンパク質の膜透過・膜組み込みは Sec トランスロコンを経由するが、Sec トランスロコンは単独では機能しない。実際にタンパク質が膜透過・膜組み込みする際には SecA、SecDF、YidC、リボソーム等と過渡的な複合体を形成し、大きな構造変化を伴いながら機能する。Sec トランスロコンはタンパク質という巨大な分子を通過させる一方で、イオンなどの小分子の透過は厳密に抑制されている。この緻密な Sec トランスロコンマシーナリーは生命必須のシステムである為、その分子メカニズムの解明は重要課題とされ、国内外で構造生物学的解析を中心とした研究が精力的に進められている。この反応に関わる各因子の立体構造情報は得られつつあるが、未だ各 Sec タンパク質の機能的な量体数・トランスロコンを含む超分子複合体の形成状態・作動メカニズムなどについて不明な点が多く残されている。

本研究にて、各タンパク質の別状態(複合体を含む)のX線結晶構造解析を行い、それらがどのように機能しているのか動的メカニズムの解明を進めた。構造決定後、MD シミュレーションによる解析や各種変異体を用いた in vivo、in vitro機能解析を進めるとともに、新たな膜タンパク質一分子観察の手法を開発し、タンパク質膜透過反応を観測を進めた。これらの結果を統合して、生命科学上重要な Sec トランスロコンマシーナリーの作動機構を、時間分解能を加味した構造生物学的解析によって可視化を目指した。

## 2. 研究成果

#### (1)概要

タンパク質の膜透過に関わる各タンパク質のX線結晶構造解析と構造情報に基づく機能解析を進めるとともに、タンパク質膜透過反応の一分子動態観察に向けた準備を進めた。

Sec トランスロコンの構造解析は、これまでにいくつかの報告例があり、タンパク質の透過機構の様々なモデルが提唱されているものの、詳細に議論するには情報が不足している。本研究において、タンパク質膜透過チャネル SecYEG(細菌型 Sec トランスロコン)の高分解能の構造解析を世界で初めて達成した。この構造情報に基づき研究を進めた結果、タンパク質が透過していない状態(閉状態)のチャネルは、複合体を形成する膜タンパク質(SecG)の一部によって「キャップ(蓋)」がされており、タンパク質が透過する時(膜透過状態)には、その蓋が



外れるというモデルを提唱した。この高分解能構造は、最も信頼できる Sec トランスロコンの 構造基盤となった。(論文発表1)

細胞膜には、Sec タンパク質膜透過チャネルと相互作用し、タンパク質を細胞膜に組み込む働きを担っている「膜組み込みタンパク質 YidC」が存在する。このタンパク質は生命の維持に不可欠な因子であるが、これまでの研究で YidC の立体構造は決定されておらず、YidC によってタンパク質がどのように細胞膜に組み込まれるのかについては不明であった。本研究で、世界で初めて YidC の立体構造を決定し、この詳細な構造情報に基づき研究を進めた結果、YidC は、疎水的な生体膜に親水的な凹みを形成するという、ユニークな構造体を形成することを発見した。さらに、細胞膜へと組み込まれるタンパク質がYidCの親水的な溝に結合することを確かめ、YidC によってタンパク質が細胞膜に組み込まれる分子メカニズムを提唱した。(論文発表2-5)

これらの構造解析と並行して、タンパク質膜透過をリアルタイムで捉えるために研究を進めた。タンパク質膜透過を一ユニットで駆動する最小単位を同定し、このサンプルを用いて、1分子動態観察へと展開させている。(その他の成果2)

本研究は、バクテリアから人まで共通した基本的な生命現象を明らかとし、生命科学分野の研究の発展に大きく貢献するものである。また、細菌においても YidC、Sec トランスロコンは生育に必須なタンパク質であることから、病原菌のこれらタンパク質を標的とする新規の抗生物質などの薬剤開発の基盤となる。

#### (2)詳細

「Sec トランスロコンの高分解能構造解析」(論文発表1)

タンパク質膜透過チャネル Secトランスロコン構造がこれまでいくつか報告され、タンパク質膜透過機構のモデルが提唱されてきた。しかしながら、さらなる詳細な議論をするためには、これまで以上の解像度で Secトランスロコン構造を決定することが必要であった。本研究において、Thermus thermophilus 由来の SecYEG 複合体の結晶構造をこれまで最も高い分解能(2.7 Å分解能)で決定した。これまでの SecYEG の複合体の結晶構造は 4.5 Å分解能が最高で、今回得られ

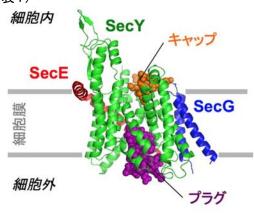


図 1 SecYEG の構造

た構造の分解能は 2.7 Å 分解能と約 2 Å 程度分解能が向上し、より詳細な議論を可能とした。 特筆すべきことは、これまで不鮮明であったループなどの構造も明確に認識できたため、 SecYEG を構成するほぼすべてのアミノ酸残基の位置を正確に配置したモデルを得ることが できた(図 1)。その中でも、SecG のループについて新しい知見が得られた。今回の構造解析 から、SecG のループが、SecY により形成されているタンパク質の透過孔を塞ぐように位置し ていることが判明した。そこで、SecG のループを SecY の細胞内側の表面に固定した変異体 を作製したところ、タンパク質の膜透過が阻害され、その後固定を外すとタンパク質の膜透過 が回復した。このような機能解析や、過去の構造との比較、分子動力学計算の結果から、閉



状態の SecYEG では、タンパク質の自発的な透過を防止するために SecG のループが透過孔に「キャップ」をし、膜透過状態ではその「キャップ」を透過孔の上から退けることで、タンパク質の膜透過を調節しているということが示唆された。また、図 1 中で紫色に表示されているプラグとよばれる部位が細胞外側から蓋をしているという過去の知見と組み合わせて、透過孔は細胞膜の両側から閉ざされ、タンパク質の輸送に応じて開くという新たなモデルを提唱した。同時に、基質をミミックしたと考えられるペプチドが結合した SecYEG の結晶構造も解明し、SecYEG と膜透過基質タンパク質との相互作用や、タンパク質の膜透過における SecYEG の初期の構造変化についても議論を行った。

## 「膜タンパク質を膜組み込みする膜タンパク質 YidC の構造機能解析」(論文発表2-5)

本研究により細菌 Bacillus halodurans と Escherichia coli の YidC の結晶構造をそれぞれ、2.4 Å 分解能、3.2 Å 分解能で決定した(図2)。YidC の結晶構造から、どちらの構造も内部に大きな溝を持っていることが判明した。その溝は多くの親水的なアミノ酸によって構成されており、プラスの電荷を帯びていた。 YidC の「親水的な溝」が、疎水的である細胞膜の中に存在していることは、これまでの研究からは全く予測されていなかった新規の発

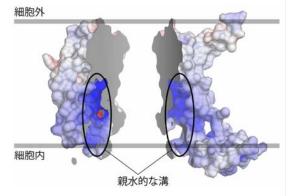


図 2 YidC の構造(断面図)

見であった。この YidC の構造情報に基づいて進めた in vivo クロスリンク実験や枯草菌や大腸菌を用いた遺伝学的解析によって、YidC は「親水的な溝」で細胞膜に組み込まれる膜タンパク質(基質タンパク質)と相互作用することが判明した。この溝を構成する親水的なアミノ酸のうち、溝の中心に位置するプラスの電荷を持ったアルギニン残基(BhYidC では 72 番目のアミノ酸残基)は生物間で広く保存されており、YidC の働きに極めて重要であることを見出した。これらの結果と過去の知見を組み合わせることで、「YidC が基質タンパク質と親水的な溝で相互作用することで、細胞膜の内部に引き込み基質膜タンパク質を生体膜へと組み込む」という新規の分子メカニズムを提唱し、タンパク質が細胞膜に組み込まれる生命現象の解明に大きな進展が見られた。

## 「タンパク質膜透過反応の一ユニット動態観察にむけて」(その他の成果2)

Secトランスロコンを介した膜透過は、細胞質膜に局在する SecA ATPase の反復運動によって、段階的に行うとされている。現在は、各結晶構造情報に基づく機能解などが進められているものの、未だなおこれら Sec タンパク質が何量体で機能しているのか、また、どのような構造変化を伴ってタンパク質を膜透過させているのかの詳細な分子メカニズムについては不明である。本研究室では、タンパク質の膜透過を in vitro で再現し、一ユニットでのタンパク質膜透過反応を観察するための準備を進めた。本研究内容は、平成 26 年度蛋白質科学会シンポジウムにてその詳細を発表した。

Sec 関連タンパク質の X 線結晶構造解析については、着実に様々な状態の構造を明らかと



し、構造情報に基づく分子動力学計算や機能解析などを進めてきた。上記の SecYEG と YidC の構造機能解析だけでなく、いくつかの Sec 関連タンパク質の未発表の構造機能解析データも蓄積している。今後、これらをまとめ発表する予定である。本研究の大きな目標のひとつが、動的な Sec トランスロコンによる膜透過の解明である。本研究によって、*in vitro* においてーユニットで働く系を立ち上げた。この系を用いてタンパク質膜透過反応の測定へと進める。本研究では、達成目標に沿ったかたちで研究を進め、責任著者として論文を4報発表した。同時にーユニット観察という極めて困難な課題にも果敢にチャレンジをして、足がかりを得た。今後の新しい研究の展開につながる研究内容である。研究内容については全般的に計画にそって、順調に進めることができた。

## 3. 今後の展開

Sec トランスロコンマシーナリは膜の透過障壁の機能を失わず、タンパク質という巨大な分子を膜透過・膜組み込みさせる緻密なシステムである。本研究におけるYidCとSecYEGの詳細構造の報告によって、細菌のSecトランスロコン複合体を構成するすべての因子の詳細構造情報が揃ったことになる。今後、これらの構造情報を用いた機能解析が進展すると思われるが、各因子の特定状態の構造だけではSecトランスロコンを完全理解するには至らない。これらの複合体は過渡的であり、常に離合・集散を行っているため、オリゴマー状態の情報や動的な情報を得る必要がある。そのためには、X線結晶構造解析を中心とした手法だけでなく、近年急速に発展してきた電子顕微鏡による単粒子解析や1ユニット動態解析などの手法を組み合わせる必要がある。Secトランスロコンによるタンパク質の輸送については非常に基本的なメカニズムであり、今後も当該分野の研究が進展すると考えられる。

#### 4. 評価

#### (1)自己評価

#### (研究者)

さきがけ研究を含む研究内容が評価され、2013年4月に奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科に准教授として異動し、自身の研究室を立ち上げ、研究に集中できる環境を得た。独立後は、Gordon Research Conferences 国際学会を含む多くの招待講演なども増え、さきがけ研究期間内で研究者としての飛躍につながった。

Sec 関連因子の構造機能解析を進め、責任著者として4報を発表した。うち、2015 年に発表した Cell Rep.の論文は、奈良先端大で行ったデータが主となっている。研究目的の一つである困難な動的なタンパク質膜透過ーユニット観察については、目処がつきつつある。他にも未発表の構造機能解析のデータが蓄積しており、今後これらをまとめて論文発表を行う。これらの研究をスムーズに遂行するために、機器の導入、消耗品などに予算を執行した。さきがけ研究をとおして、研究室を立ち上げ、研究期間内に自身の研究を軌道に乗せることができた。

本研究で進める基礎的な分野の研究には、予算を獲得することが困難であるがさきがけ研究によるサポートによって、本研究を邁進することが可能となった。現在、私たちは Sec トランスロコンの構造生物学的な解析については世界トップレベルである。今後も我々が Sec トランスロコンの構造生物学的解析を先導していきたい。本研究の成果は科学の発展に大いに貢献する研究であった。本研究成果に基づき、当該分野でさらなる研究が進展することを期待し

ている。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

助教までの研究室においてもタンパク質の膜透過研究を主宰し、3 つの新規の膜透過装置の構造を解明し、Nature 誌に発表した。これらの論文は、引用件数も多く、世界中で注目されている。特に本さきがけ期間中に構造解明した YidC に関しては、数多くの世界的な競争に打ち勝って、2 生物種由来の構造と分子メカニズムを報告した。

奈良先端科学技術大学院大学で独立准教授になった後も、それまでの技術を駆使して、高分解能の SecYEG の構造を解明し、Cell Reports に責任著者の論文が受理されており、研究室主宰者としても、今後の成果が期待される。

これまでの研究のように、構造決定だけにこだわるのではなく、遺伝学、生化学、生物物理等様々な手法を用いて(共同研究も含めて)、多角的に機能に着目し、分子メカニズムを解明して欲しい。

#### 5. 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

- 1. Tanaka Y, Sugano Y, Takemoto M, Mori T, Furukawa A, Kusakizako T, Kumazaki K, Kashima A, Ishitani R, Sugita Y, Nureki O and Tsukazaki T. Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State. *Cell Rep.* 13, 1561–1568 (2015). [責任著者]
- 2. Shimokawa-Chiba N, Kumazaki K, Tsukazaki T, Nureki O, Ito K and Chiba S. Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 5063-5068 (2015).
- 3. Kumazaki K, Chiba S, Takemoto M, Furukawa A, Nishiyama K, Sugano Y, Mori T, Dohmae N, Hirata K, Nakada-Nakura Y, Maturana AD, Tanaka Y, Mori H, Sugita Y, Arisaka F, Ito K, Ishitani R, Tsukazaki T and Nureki O. Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509, 516-520 (2014). [責任著者]
- 4. Kumazaki K, Kishimoto T, Furukawa A. Mori H, Tanaka Y, Dohmae N, Ishitani R, Tsukazaki T and Nureki O. Crystal structure of Escherichia coli YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Sci. Rep.* 4, 7299 (2014). [責任著者]
- 5. Kumazaki K, Tsukazaki T, Nishizawa T, Tanaka Y, Kato HE, Nakada-Nakura Y, Hirata K, Mori Y, Suga H, Dohmae N, Ishitani R and Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of YidC, a membrane-protein chaperone and insertase from *Bacillus halodurans*. *Acta Crystallogr. F* 70, 1056-1060 (2014). [責任著者]



### (2)特許出願

研究期間累積件数: 0 件

- (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)
- 1. (学会発表)「Structures of Membrane Protein Insertase YidC」 Gordon Research Conferences: Membrane Protein Folding (アメリカ合衆国 ボストン・2015.6.21)
- 2. (学会発表) 「Sec タンパク質膜透過装置の活写にむけて」 *日本蛋白質科学会年会 シンポ ジウム 構造生命科学をさきがける先端的基盤技術* (横浜・2014.6.5)
- 3. (著作物) 塚崎智也. 「2つの Sec モータータンパク質による蛋白質膜透過のしくみ」 実験医学(増刊 構造生命科学で何がわかるのか、何ができるのか 田中啓二、若槻壮市 編)、32, 1571-1575 (2014).
- 4.(著作物) 塚崎智也、濡木理.「タンパク質膜透過装置 Secトランスロコン複合体」 膜タンパク質構造研究 岩田 想 編、p44-52(2013)
- 5. (プレスリリース) 細胞膜を越えるたんぱく質輸送の新たな機構を解明~通り道を塞ぐキャップを開閉して制御 細胞内における基本的な生命現象の理解へ~ (2015.11.13) http://www.jst.go.jp/pr/announce/20151113/index.html
- 6. (プレスリリース) タンパク質を細胞膜に組み込むメカニズムを解明~バクテリアから人まで 共通した基本的な生命現象の理解~(2014.4.17)

http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140417/index.html



# 研究報告書

## 「アクチンフィラメント網動態の電子顕微鏡法による階層的理解」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成24年10月~平成28年3月

研究者: 成田 哲博

#### 1. 研究のねらい

アクチンフィラメントは、真核細胞において、細胞骨格、接着、運動、分裂等様々な重要な役割を果たし、神経回路形成、癌細胞浸潤、花粉管伸長、細胞分化など様々な観点から盛んに研究されている。これらすべてに共通して、アクチンフィラメントは重合、脱重合を通じて常に形成と消滅を繰り返しており、この動態ゆえに内的、外的環境に応じたアクチンフィラメントネットワークを動的に形成する。このアクチンフィラメント動態を理解することは、ヒトも含めた真核生物において起こる非常に広い範囲の現象の理解に必要不可欠である。この動態はもちろん蛋白質の三次元構造によって説明されるべきものであるが、アクチンフィラメントは X 線結晶解析や NMR 法による構造決定が事実上不可能であるため、電子顕微鏡法による構造解析が最も有効な手段である。アクチンフィラメント動態の理解に向けて、以下の3つを柱として研究を行った。

## 1:アクチン-コフィリン複合体、アクチン-フォルミン複合体の三次元構造解析

コフィリンはアクチンの脱重合、切断促進において中心的な役割を果たす蛋白質であり、細胞内で不必要なアクチン線維を壊すのに主要な役割を担っている。私達はクライオ電子顕微鏡法によって、従来よりも高分解能の構造解析を行い、脱重合、切断促進機構を説明するモデルを構築し、変異体実験によって確かめる。また、フォルミンはアクチンフィラメント形成開始の多くを担い、極めて重要であるが、そのフィラメントとの結合状態の構造がまったくわかっていない。フォルミンはフィラメント端に結合して、しかも一つの構造に留まらないため、解析が非常に難しい。新しい顕微鏡法の開発も視野に入れ、この難題に挑んだ。

## 2:パクテリアアクチンホモログ ParM の三次元構造解析

原核生物においてもアクチンホモログが存在するが、その構造は多様であり、アクチン線維のような二重らせん構造をとらないものも多い。様々な ParM 線維の高分解能構造解析を通じて、生物における線維構造構築の一般原理に迫ることを目標とする。

#### 3:細胞内アクチンフィラメント構造解析

アクチンフィラメントが細胞内に作る構造、特に細胞膜との結合状態は、細胞における多様な アクチンフィラメントの機能を理解するのに必要不可欠である。そのための手法開発を行った。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

アクチン-コフィリン複合体については、7Å台の分解能でクライオ電子顕微鏡写真から三次元構造解析を行い、アクチン第2サブドメインで従来見られない αhelix が観察され、大きな構造変化があることがわかった。この αhelix 構造は X 線結晶解析では観測され、アクチンフィラメントにおいても予測されていたが、フィラメント構造においていままで可視化されたことはな



かった。これを確かめる変異体実験を現在行っている。アクチン-フォルミン複合体については 難航しているが、この解析のための技術開発において、走査透過型電子顕微鏡の構造解析 への有用性が明らかになってきている。透過型電子顕微鏡は焦点はずれ量に伴う像の歪み が避けられないが、低加速の走査透過型電子顕微鏡を用いることで、コントラストを保ちなが ら、歪みの無い像が得られた。ParMの解析においては、3つの構造解析を行い、同じParMフ アミリーでありながら、あるものはバネのようであり、あるものは 4 本のプロトフィラメントから形 成され、あるものは極性が無いなど、非常に多様な線維構造をとることが明らかになってきて いる。

細胞内アクチンフィラメント構造解析については、負染色トモグラフィー、修正徳安法などさまざまな方法を試したが、最終的には新型チップスキャン AFM を使用する手法に行き着いた。オリンパスが開発したチップスキャン型 AFM である BIXAM の性能評価をオリンパスと共同で行った結果、5.5 nm 周期のアクチンフィラメント中のアクチン分子の並びが見え、その像から、フィラメント重合端、脱重合端の方向が決定できた。また、アクチンフィラメント上の幅 2 nm のトロポミオシンが直接観察された。さらに、細胞膜の一部とその上に結合した構造を残すアンルーフィング法を用いると、アクチンフィラメント、クラスリン、カベオラなど、細胞膜上の構造がnmオーダー分解能で観察することができ、細胞内アクチンフィラメント構造解析に一定の目処をたてることができた。チップスキャン型 AFM は蛍光顕微鏡との結合が容易で、現在相関顕微鏡として用いるための手法開発を行っている。

## (2)詳細

## 1:アクチン-コフィリン複合体、アクチン-フォルミン複合体の三次元構造解析

産業技術総合研究所の電子顕微鏡(300 kV, ヘリウムステージ、エネルギーフィルタ装備)を使わせていただき、アクチンーコフィリン複合体構造をクライオ電子顕微鏡法により解析、7 Å程度の分解能で三次元構造決定を行った(右図)。矢印で示したα+helixは、従来のどのアクチン線維構造でもループであり、アクチン線維構造の中でα+helixをとっているのは初めてである。このループーへリックス転移によるフィラメント内の結合の切り替えがコフィリンによるアクチンフィラメント切断の鍵を握ると考えている。現在これを確かめる変異体実験を行っており、その結果が出次第論文を投稿する。

アクチン-フォルミン複合体については、アクチン線維

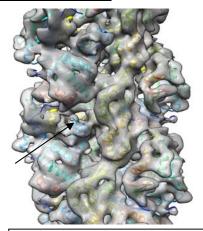


図 1: アクチン-コフィリン複合体構造

の端に結合し、かつ複数の結合状態の構造をとるフォルミンは構造解析が困難であることが 予測された。この構造解析を行うためには、電子顕微鏡像を構造ごとに仕分ける必要であり、 そのためには、低分解能(4 nm 以下)から中間分解能(2-4 nm)の歪みの少ないシグナルが必 要である。しかし、通常の透過型電子顕微鏡(TEM)は、電子の干渉によって像を得る位相コントラストが主なコントラストである関係上、低分解能のシグナルが非常に弱い。また、焦点はずれ量(デフォーカス量)により、像が大きく異なる。私達は、必要な分解能領域のシグナルを効率的に歪み無く得るために、走査透過型電子顕微鏡(STEM)と負染色の組み合わせを試すことにした、STEM は、試料上の点に電子線を収束照射し、散乱しない電子の量を計測、電子線 を試料上でスキャンすることによって像を得る。その原理のため、位相コントラストの邪魔にな

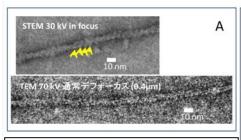
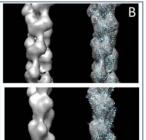


図 2: A 上:STEM によるアクチン線維像。矢印でアクチン分子の並びを示した。はっきりと個々のアクチン分子が見える。下:TEM によるアクチン線維像。低分解能成分のシグナルが弱いため、アクチン分子の並びが見えにくい。B 上:アクチン線維像4本から再構成したアクチン線維構造(左)。サブドメイン構造がはっきり見える。これにアクチン分子構造モデルをあてはめた(右)。ほぼ完全にフィットする。下:同じ条件の TEM から再構成した構造。アクチン分子構造はそれほどよくフィットしない。

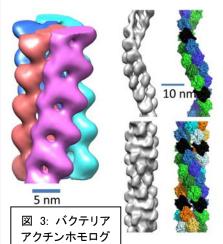


る多重散乱や非弾性散乱もコントラストに寄与し、位相コントラスト結像による像のひずみも存在しない。また、加速電圧を通常TEMの80kV以上よりも低い30kV程度に抑えることによってコントラ

ストを増強することができる。これを用いてアクチンフィラメント像を撮影したところ、歪みの無いコントラストが高い像を得ることができ(図 2 左上)、これを解析すると、従来よりもはるかに少ない500アクチン分子(フィラメント4本分の像)から、原子座標モデルが完全にフィットする三次元構造を得ることができた(図 2 右上)。この結果は、構造多型や小数しか像が

得られない場合の三次元構造解析に、負染色法と STEM の組み合わせが極めて有用であることを示しており、今後広い範囲で応用可能である。

フォルミンの解析そのものについては、ヒトフォルミンである mDia をこの STEM で解析した結果、ほとんど4量体であることがわかり、これ自体発見であるものの、結合状態の構造が当初予想より複雑であることが予想でき、構造解析には向かないことがわかった。現在酵母のフォ



ParM 構造

ルミンを発現、精製しており、こちらは二量体であることがわかり、電子顕微鏡解析を現在おこなっている。

# 2:バクテリアアクチンホモログ ParM

シンガポールのグループと共同研究で、バクテリアアクチンホモログ ParM の三次元構造解析を行った。解析したのは、破傷風菌 ParM, バチルス・チューリンゲンシス ParM, ボツリヌス菌 ParM の三種類である。破傷風菌のものは4本のストランドからなる線維で、ストランドの極性が二本ずつ反対を向いていて、全体として極性が無い線維をつくる(図3左)。バチルスの ParMは、単体ではバネのような独特な構造を作るが(図3右

上)、対応する ParR (ParM の線維形成因子)を混ぜて重合を開始する

と、ちょうどそのバネの隙間にもう一本の ParM 線維が隙間を埋めるようにかみあって、4本ストランドの線維を作ることがわかった(図 3 右下)。ボツリヌス菌については、17 本ストランドの複雑で大きな構造を作ることがわかった(未公開データ)。同じParMでもそれぞれ構造が全くことなり、単量体構造がよく似ているにもかかわらず、少しの単量体構造の差でこのような大きな線維構造変化がどのようにして表れるのかを考察するのがこれからの課題である。

## 3:細胞内アクチンフィラメント構造解析

細胞内のアクチンフィラメント構造解析のために様々な方法を試した。最初にオーストリアの



Victor Small 研究室と負染色した細胞の電子線トモグラフィーの解析を行い、ウィルスが細胞

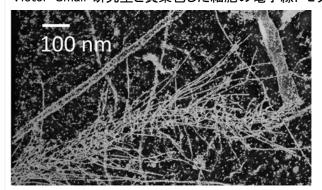


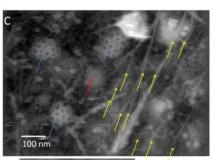
図 4: バキュロウィルスが作る細胞内コメットテイルの電子線トモグラム。

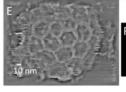
内に作るコメットテイルの構造解析を行った(図 4)。しかし、この方法は細胞膜を溶かしてしまうこと、細胞のごく薄いところにしか適用できないなど、制約が大きかった。そのあと、細胞を糖包埋して凍結、クライオミクロトームで切片を作成し、常温にもどして糖を抜いて再度急速凍結する手法(徳安法の修正)をおこなった。確かに膜やアクチン線維は見えるし、200 nm 程度の厚い切片の解析もできるのだが、残念ながら分

子レベルの構造解析ができるレベルまでは達しなかった。

図 5:新型チップスキャン AFM による像。A:精製アクチン線維像。アクチン分子間隔のストライプがはっきり見え、その1単位(黒線囲い)の形からどちらが重合端かわかる。これは、C の中のアクチン線維でも同様に観察される。B:A にトロポミオシンを結合させると、直径 2 nm のトロポミオシンがはっきり見える(矢印)。C:アンルーフィングされた細胞の観察の。アクチン線維(黄色矢印)、クラスリン(青矢印)、カベオラ(赤矢印)がはっきり観察される。E:クラスリン拡大図。F:クラスリン分子帯造(F)に存在する αヘリックスバンドル構造が観察でき、この新型 AFM が、条件が良ければ 1nm オーダーの分解能を持つことがわかる。









#### その中で、2014 年末からオリンパ

スとともに新型チップスキャン型原子間力顕微鏡(AFM)の評価を始めた。チップスキャン型AFM は試料ステージが動かないため、容易に倒立型光学顕微鏡と結合でき、ステージの制約もほとんどないため、普通のスライドグラスやカバーグラスが使える一方、時間、空間分解能の制約が大きかった。この新型 AFM は従来のチップスキャン型よりも探針のサイズを大幅に小さくすることに成功し、分解能が大幅に向上していることが期待できた。これを実際に評価したところ、アクチンフィラメント内の分子間隔や、フィラメント極性(どちら側が重合端か、脱重合端か)がはっきり見え、アクチンフィラメント上の幅2 nmのトロポミオシンが直接観察された(図5)。これを細胞内アクチンフィラメント観察に応用するためには、試料調製のしかたが重要である。細胞膜の一部とそこに結合した細胞内構造を残すアンルーフィング法を用い、名古屋大学臼倉名誉教授と共同で、観察を行った。その結果、細胞膜上のアクチンフィラメントにおいても極性を決定でき、クラスリン、カベオラなど多くの構造をnmオーダー分解能で観察できた(図5)。チップスキャン型AFMは蛍光顕微鏡との結合が容易で、現在相関顕微鏡として用いるための手法開発を行っており、これが成功すれば、蛍光分子の位置の周りのタンパク質分子構造を明らかにするまったく新しい相関顕微鏡を実現できると考えている。



### 3. 今後の展開

本さきがけにおいては、二つの重要な技術的進展があった。一つは STEM と負染色法の組み合わせが、歪みが無く、低分解能成分のシグナルが強い情報をもたらすことである。これを用いると、比較的少ない像から三次元構造解析ができ、タンパク質のローカルな構造変化や、構造多型の分類など、従来難しかった構造の解析が可能になる。私達はこれを少数構造生物学と呼びたいと考えており、実際に複数のターゲットに関して解析を始めている。

もう一つはチップスキャン型 AFM とアンルーフィング法の組み合わせである。初めて細胞内構造が AFM によって nm オーダー分解能で観察ができるようになった。現在このチップスキャン型 AFM の蛍光顕微鏡部分の改良を行っており、蛍光顕微鏡の性能が上がれば、AFM によって得られる細胞内構造を蛍光によって同定、解釈することができるようになる。これは、生物学に非常に有用な情報を与えるであろう。たとえば、細胞接着のアークテクチャ、ウィルスの進入に伴う細胞骨格の変化、特定チャンネル周辺の分子構造など、多くのいままで得られなかった情報を得ることが期待できる。

#### 4. 評価

#### (1)自己評価

#### (研究者)

さきがけの途中で研究室の責任者になり、いろいろ不慣れなところで時間をとられ、全体に研究、特に論文投稿が遅れているのは否めない。しかし、一方で今後の展開で述べたような予想しなかった新しい発展もあり、STEMと負染色法の組み合わせによる少数構造生物学や、チップスキャン型 AFM による新しい相関顕微鏡法など、近い将来の生物学の重要なツールになりそうな期待が持てる成果を挙げることができている。これらは是非次年度中に確立し、新しい世界を拓いていきたいと考えている。

また、アクチン-コフィリン、バクテリア ParM、チップスキャン AFM, STEM のそれぞれで年度内に論文を投稿する(AFM については 2 つ、ParM については 1 つ論文投稿済み)ことで、当初目標のレベルにはおおむね到達できるのではないかと考えている。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

初めの研究提案からやや分散し、研究が広く浅くなってしまったような感じを受けるが、クライオ電子顕微鏡観察、AFM および STEM 観察、膜剥離法とAFM の組み合わせなどにより、アクチン線維の様々な構造、細胞内のアクチンフィラメント構造を明らかにしたことは評価できる。

今後は、個々のフィラメントの高い分解能の像を得る努力をするとともにアクチンの全体像 を明らかにする研究も推進してほしい。さらに、測定法のアプローチは興味深いので、他の 試料に対する応用を進め、当該方法の汎用化と進展に尽力頂きたい。



## 5. 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

- 1. Imai, H., <u>Narita, A.</u>, Maeda, Y. & Schroer, T. A. (2014). Dynactin 3D Structure: Implications for Assembly and Dynein Binding. *J Mol Biol* 426, 3262-71. 査読有り
- 2. Mueller, J., Pfanzelter, J., Winkler, C., Narita, A., Le Clainche, C., Nemethova, M., Carlier, M. F., Maeda, Y., Welch, M. D., Ohkawa, T., Schmeiser, C., Resch, G. P. & Small, J. V. (2014). Electron tomography and simulation of baculovirus actin comet tails support a tethered filament model of pathogen propulsion. *PLoS Biol* 12, e1001765. 查読有り
- 3. <u>成田 哲博 (2013)</u>. 電子線トモグラフィーによる細胞内アクチンフィラメント構造解析 顕微 鏡 48,78-83 査読有り
- 4. Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, K., Narita, A., Maeda, Y. & Oda, T. (2012). Role of the actin ala-108-pro-112 loop in actin polymerization and ATPase activities. J Biol Chem 287, 43270-6.
- 5. #Popp D, <u>#Narita A</u>, Lee LJ, Larsson M, Robinson RC. (2012) Microtubule-like properties of the bacterial actin homolog ParM-R1. *J. Biol. Chem.*, 287, 43270-6 査読有り(#は equally contributing authors)

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

- (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)
  - ・成田哲博 重合、脱重合によって駆動する分子モーター、アクチンフィラメントとその電子顕微鏡による解析 2015.10.03 日本顕微鏡学会関西支部平成27年度特別講演会京都大学宇治キャンパス、招待講演
  - Akihiro Narita, Structural analysis of the actin filament by various microscopy techniques 2015.09.15 第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学、招待講演
  - ・成田哲博 重合・脱重合によって駆動する分子モーター、アクチンフィラメントと、その電子顕微 鏡による解析 2015.1.15 神戸大学先端融合科学シンポジウム「生体分子のダイナ ミクスを眺 める」、招待講演
  - Akihiro Narita Structural analysis of the actin filament in vitro and in vivo 2014.9.26 第 52 回日本生物物理学会年会、札幌、招待講演
  - ・成田哲博 多機能生体線維アクチンフィラメントの電子顕微鏡による構造解析 2014. 5.11 日本 顕微鏡学会第 70 回記念講演会、千葉幕張メッセ国際会議場、招待講演
  - •Akihiro Narita, Structural analysis for the actin filament, in vitro and in vivo, 2014. 1. 14 Cryo-EM 3D Image Analysis Symposium 2014 Granlibakken Coference Center Lake Tahoe, USA、招待講演



# 研究報告書

## 「ATP作動性陽イオンチャネルP2X受容体の時空間ダイナミクスの解明と制御」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成24年10月~平成28年3月

研究者: 服部素之

## 1. 研究のねらい

ATP は生命において代謝、生合成、能動輸送などのエネルギー源として広く用いられている。 従来からよく知られていたこれらの役割に加えて、細胞外 ATP を介したシグナル伝達が近年注 目されている。ATP 作動性陽イオンチャネル P2X 受容体は細胞外 ATP シグナル伝達における 主要な ATP 受容体であり、筋肉収縮、痛覚、炎症反応など幅広い生命現象との関わりから、創 薬ターゲットとしても注目を集めている。本研究では、この P2X 受容体の X 線結晶構造解析と電 気生理学的解析を中心とし、以下の 3 点を研究のねらいとする。

第一に、P2X 受容体の X 線結晶構造解析と電気生理学的解析を行うと共に、異分野連携により、NMR 法、FTIR 法および分子動力学法等による相関構造解析およびダイナミクス解析を行う。これら要素技術を相乗的に用いることで、「P2X 受容体のダイナミクスの理解」を目指す。

第二に、上記の P2X 受容体の X 線結晶構造解析を通して得られる P2X 受容体の発現系などの技術基盤と異分野連携を組み合わせることで、P2X 受容体を標的とした化合物の同定および電気生理学的解析等による化合物の機能評価を行う。さらに機能制御化合物とP2X 受容体との複合体構造解析を行い、P2X 受容体によるそれら化合物の認識機構の構造基盤を解明する。これらの成果は、P2X 受容体を標的とした創薬の実現に重要な知見となる。

第三に、サブタイプの組み合わせによって、生体内の幅広い組織における多様な機能を発揮する P2X 受容体へテロ複合体等の膜タンパク質複合体の X 線結晶構造解析に向けた「組み換えタンパク質を用いた膜タンパク質複合体の構造解析の技術基盤」の確立を行う。これは、複合体間の相互作用に基づきその機能発現および制御が行われている他の数多くの真核生物由来膜タンパク質複合体の構造解析にも適用可能なものである。そのため、この技術基盤の確立は、「複合体形成を介した膜タンパク質の時空間ダイナミクスの理解」という「次世代構造生命科学」におけるフロンティアを大きく前進させるものとなる。

本計画では、上記の実現を通して、「P2X 受容体のダイナミクスの理解」、「P2X 受容体を標的とした創薬に重要な知見の提供」、「組み換えタンパク質を用いた膜タンパク質複合体構造解析の技術基盤の創出」をねらう。

#### 2. 研究成果

#### (1)概要

P2X 受容体のダイナミクスの解明のため、「ATP および亜鉛結合型プレ開状態」のダニ由来 PX 受容体の構造決定を行った(図 1A)。 亜鉛イオンは P2X 受容体を含む多くのチャネルに対する開閉制御因子として知られているが、P2X 受容体への作用機序の詳細は不明であった。この立体構造に基づき、亜鉛結合部位変異体についての電気生理解析および分子動力学シミュレーションを行うことで、立体構造情報とあわせて「亜鉛イオンによるチャネル活性化



促進のダイナミクス」を明らかにした (Kasuya G, et al. Cell Reports, 2016)。

さらに、P2X 受容体のダイナミクスの解明に加えて、各種化合物による制御機構の解明に向けた取り組みとして、特に CTP と $\alpha\beta$ -meATP に注目した研究推進を行った。

CTP は、P2X 受容体に対する弱い親和性を持ったアゴニストとして知られている。本研究では、「CTP 結合型」のゼブラフィッシュ P2X4 受容体の構造決定を行った (図 1B)。この構造と既知の ATP 結合型構造との比較に基づき、電気生理学的解析および赤外分光法による解析を推進することで「P2X 受容体の塩基特異性」を明らかにした(分子科学研究所古谷祐詞准教授、大阪大学藤原祐一郎准教授との共同研究。投稿論文準備中)。さらに、メチオニンの <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>等を指標とした NMR 解析により、P2X 受容体の部分作動薬である αβ-meATP 下における構造平衡を明らかにすることで、αβ-meATP による P2X 受容体の部分活性化作動機構を解明した(東京大学薬学系研究科嶋田一夫教授・上田卓見助教との共同研究。Minato Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A., in press)。これら化合物の作用機序は、P2X 受容体を標的とした創薬に重要な知見となりうる。また、チャネルに対する阻害剤等の新規化合物の同定のため、化合物スクリーニングに適用可能な「脂質膜デバイスを用いた P2X 受容体の一分子活性計測」の確立もあわせて行った(東京大学工学系研究科野地博行教授・渡邉力也助教との共同研究。国際学会にて発表済)。

さらに、膜タンパク質複合体発現評価技術基盤の確立を試み、この技術を適用することで新規膜タンパク質 1 種の構造決定に貢献した(投稿論文準備中)。これらの成果は、組み換えタンパク質を用いた膜タンパク質複合体構造解析の技術基盤の確立につながる。

#### (2)詳細

研究テーマ 1「P2X 受容体のダイナミクスの解明」

P2X 受容体のダイナミクスの解明のため、X 線結晶構造解析により「ATP および亜鉛結合型プレ開状態」のダニ由来 PX 受容体の構造決定を行った(図 1A)。 亜鉛イオンは P2X 受容体を含む多くのチャネルに対する開閉制御因子として知られている。この立体構造に基づき、亜鉛結合部位変異体についての電気生理解析および分子動力学シミュレーション推進することで、細胞外ドメインのドメイン界面への亜鉛イオン結合が活性化促進に重要であること、また、その際の亜鉛イオン依存的な P2X 受容体のダイナミクスの詳細が明らかとなった(Kasuya G, et al. *Cell Reports*, 2016)。

さらに、メチオニンの  $^{13}$ CH $_3$ 等を指標としたゼブラフィッシュ由来 P2X4 受容体の NMR 解析により、P2X 受容体の部分作動薬である  $\alpha\beta$ -meATP 下における構造平衡の解析を行った(東京大学薬学系研究科嶋田一夫教授・上田卓見助教との共同研究)。その結果、 $\alpha\beta$ -meATP 下結合状態において、P2X4 受容体の膜貫通領域が閉じた状態と開いた状態の平衡状態にあることにより、 $\alpha\beta$ -meATPによる P2X 受容体の部分活性化が引き起こされていることが明らかとなった(Minato Y, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A., in press*)。リガンド作動性イオンチャネルに対する部分作動薬は、医薬品の候補としても注目されており、したがって、この成果は研究テーマ 1「P2X 受容体のダイナミクスの解明」に加えて、研究テーマ 2「P2X 受容体の機能制御の解明」の観点からも重要であること考えられる。



以上の成果により、研究テーマ 1「P2X 受容体のダイナミクスの解明」については、X線結晶構造解析、電気生理学的解析、異分野連携による他の生物物理学的手法の3者を組み合わせた相関構造解析によるダイナミクスの解明という目的を予定通り達成できたと考えられる。

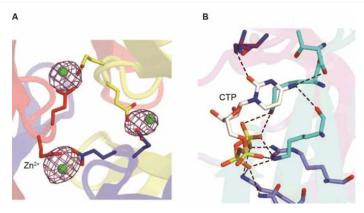


図1. 本研究で得られた P2X 受容体構造 (A) 亜鉛結合型構造 (B) CTP 結合型構造

研究テーマ 2「P2X 受容体の 機能制御の解明」

各種化合物による制御機構の解明に向けた取り組みとして、まず、上記の $\alpha\beta$ -meATP に加え、ATPと同じヌクレオシド三リン酸である CTP について、「CTP 結合型」のゼブラフィッシュ P2X4 受容体の構造決定を行った(図 1B)。 CTP は、P2X 受容体に対する弱い親和性を持った アゴニストとして知られている。この構造と既知の ATP 結合型構造との比較に基づき、ATP および CTP それぞれの塩基認識に重要なアミノ酸残基を同定し、それらの残基に対する変異体 について、電気生理学的解析および赤外分光法による解析を推進することで「P2X 受容体の塩基特異性」を明らかにした(分子科学研究所古谷祐詞准教授、大阪大学藤原祐一郎准教授との共同研究。投稿論文準備中)。 CTPにおけるピリミジン骨格を持つ P2X 受容体阻害剤の過去の報告などから、CTP の認識機構の解明は P2X 受容体を標的とした創薬に重要な知見となりうると考えられる。

また、チャネルに対する阻害剤等の化合物の同定に向けた「脂質膜デバイスを用いた P2X 受容体の一分子活性計測」の確立を行った(東京大学工学系研究科野地博行教授・渡邉力 也助教との共同研究。国際学会にて発表済)。これは、Ca²+感受性蛍光色素を利用したチャネル活性の 1 分子計測 P2X4 の非標識デジタル個数計測を可能とするものであり化合物スクリーニングにも応用可能な系である。

以上の成果により、研究テーマ 2「P2X 受容体の機能制御の解明」については、P2X 受容体を標的とした化合物スクリーニングの系の確立および立体構造による P2X 受容体による化合物の認識機構の構造基盤の解明という成果から、研究目的を概ね達成できたと考えられる。

#### 研究テーマ 3「膜タンパク質複合体発現・構造解析の基盤技術の確立」

膜タンパク質複合体発現評価技術基盤として、蛍光ゲルろ過クロマトグラフィー法を応用した膜タンパク質複合体形成スクリーニング法の確立を行った。確立した手法を膜タンパク質とそれに対する抗体との複合体形成評価に適用することで、新規膜タンパク質 1 種の構造決定に成功した(抗体作成について京都大学医学部岩田想教授との共同研究。投稿論文準備中)。これらの成果は、組み換えタンパク質を用いた膜タンパク質複合体構造解析の技術基盤の確立につながると考えられる。以上の成果から、研究テーマ 3「膜タンパク質複合体発

現・構造解析の基盤技術の確立」については、ヘテロ複合体などの真核生物由来膜タンパク質複合体の構造決定には至らなかったものの、技術確立の面では進展が得られたと考えらえる。

#### 3. 今後の展開

本研究により得られた知見、技術基盤を元にさらなる相関構造解析を行うことで、受容体のダイナミクスの解明と制御の深化につながると考えられる。具体的には、結晶構造が得られているダニ由来 P2X 受容体については、これらの立体構造情報および大量精製系を活用した NMR 解析をすでに進めており、これによりチャネル開閉のダイナミクスがより明らかになることが期待される。また、本研究により培われた膜タンパク質の高度発現技術基盤を活用することで、他の医学的に重要な膜タンパク質の構造解析への貢献が期待される。

## 4. 評価

#### (1)自己評価

#### (研究者)

研究目的の達成状況については、「2. 研究成果」に記したように、研究テーマ 1「P2X 受容体のダイナミクスの解明」についてはほぼ予定通り、研究テーマ 2「P2X 受容体の機能制御の解明」についても概ね達成できたといえる。その一方で、研究テーマ 3「膜タンパク質複合体発現・構造解析の基盤技術の確立」については技術確立の進展にとどまりつつも、新規膜蛋白質 1 種の構造決定に貢献するなど一定の達成をすることができたと考えられる。また、研究の進め方、特に研究実施体制としては、本領域の特色といえる「異分野連携」を積極的に推進することで、領域の内外における様々な研究者との共同研究を進める形での研究実施を行うことができたと考えられる。また、研究費執行については研究計画に沿った執行を行った。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果については、 イオンチャネルの作動機構の解明という基礎科学上の貢献に加え、本研究における CTP やαβ-meATP などの化合物の P2X 受容体による認識、作用機序の解明は、今後、これらの知見がアカデミア内外で活用されることで、受容体を標的とした創薬の実現が近づくことが期待される。また、本研究により培われた膜タンパク質の高度発現技術基盤を活用することで、他の医学的に重要な膜タンパク質の構造解析へのさらなる貢献が期待される。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

弱い親和性のアゴニストである CTP との結合構造解析を行い、電気生理学的な解析でアゴニストとしての必要要件が示された。また、色々な共同研究を通じてこの受容体の構造と機能について多くの知見を得た点は評価できる。

分子全体の構造変化を記述する方法として X 線結晶構造解析だけでは十分ではないので、 今後は、結晶構造解析だけでなく電子顕微鏡と組み合わせると良いと思われる。また、P2X は 多くのアゴニスト、アンタゴニストが知られている受容体なので、ヘテロ3量体の組み合わせと 共に、色々な組み合わせにより面白い知見が得られると期待される。 今後は、本さきがけの枠内に限らず、自他共に達成を実感できるような研究をして時空間ダイナミクスの解明を進めて欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

- Minato Y, Suzuki S, Hara T, Kofuku Y, Kasuya G, Fujiwara Y, Igarashi S, Suzuki E, Nureki O, <u>Hattori M</u>, Ueda T, Shimada I. Conductance of P2X4 receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. *Proc Natl Acad Sci U S A. in* press
- 2. Kasuya G, Fujiwara Y, Takemoto M, Dohmae N, Nakada-Nakura Y, Ishitani R, <u>Hattori M</u>\*, Nureki O\*. Structural insights into divalent cation modulations of ATP-gated P2X receptor channels. *Cell Reports*. (2016) 14, 932-944. \*Corresponding author
- 3. Takeda H, <u>Hattori M</u>, Nishizawa T, Yamashita K, Shah ST, Caffrey M, Maturana AD, Ishitani R, Nureki O. Structural basis for ion selectivity revealed by high-resolution crystal structure of Mg2+ channel MgtE. *Nat Commun.* (2014) 5:5374.
- 4. Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, <u>Hattori M</u>, Iwase N, Tsukazaki T, Sugita Y, Kandori H, Newstead S, Ishitani R, Nureki O. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2013) 110, 11343–11348..
- 5. Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, Katoh T, Kato HE, <u>Hattori M</u>, Kumazaki K, Tsukazaki T, Ishitani R, Suga H, Nureki O.:Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* (2013) 496, 247–251.

## (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等) 学会発表 (口頭発表)

- 1. 「イオンチャネル型細胞外 ATP 受容体の構造とチャネル活性化機構」第86回日本生化学 会大会、2013年
- 2. 「Mechanism of ligand recognition and activation of ATP-gated cation channels」、第 91 回日本生理学会大会、2014 年
- 3. 「Structural insights into ATP binding and channel gating in bacterial MgtE Mg2+ channels」Cold Spring Harbor-Asia Conference-Membrane Proteins: Structure & Function、2015 年

#### 受賞

1. 第11次「青年千人計画」選出、2015年



# 著作物

1. 実験医学増刊 Vol.32 No.10「構造生命科学で何がわかるのか,何ができるのか」第2章 膜タンパク質の構造生物学7. ATP 作動性陽イオンチャネル P2X 受容体



# 研究報告書

# 「革新的低温電顕単粒子像解析法による筋収縮制御機構の解明」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月~平成 28 年 3 月

研究者: 藤井 高志

# 1. 研究のねらい

心筋・骨格筋は蛋白質分子モーターが精巧に組み合わされた柔らかな機械である。この高機 能で柔らかな機械の作動原理を、原子レベルの視点で解き明かすことが本研究のねらいである。 筋肉は多数の筋原繊維の束からなり、筋原繊維はサルコメアと呼ばれる単位構造が繊維方向 に連結したものである。サルコメア内には"細いフィラメント"と"太いフィラメント"と呼ばれる2種 類の繊維がお互い重なり合うように規則正しく並んでいる(図1)。細いフィラメントは、アクチン繊 維上にアクチン7分子に対してトロポニンとトロポミオシンが1分子ずつ取り巻くように結合したも のである。太いフィラメントは主にミオシンが繊維状の束を形成したものである。筋収縮は、ミオシ ン頭部とアクチン分子との間に起こる、ATP 加水分解エネルギーを利用した滑り運動の巨視的 現象である。この滑り運動の開始は細胞内中のカルシウムイオンによって制御されており、カル シウムイオンが細いフィラメント上のトロポニン C に結合することにより、構造変化が誘起されア クチンとミオシンが力発生を行うと考えられている。このカルシウム制御のメカニズムこそが筋弛 緩・収縮のミクロな視点での本質的な現象である。低温電子顕微鏡法を用いてカルシウムイオン の存在下・非存在下において細いフィラメントを構造解析し、筋収縮カルシウム調節メカニズムの 原子レベルでの解明を目指した。また、本研究課題を実現するための相補的課題と言える低温 電子顕微鏡法の高度化を行った。世界的にこの数年の低温電子顕微鏡法の進展および成果は 目覚ましいものであり、2~4 オングストロームでの構造解析例が急増している。これにより、X 線 結晶構造解析を必要とすることなくリボソームや膜蛋白質の構造解明が進められている。我々も、 試料作成の最適化や画像解析法の厳密化・改良をおこない、さきがけ期間中に3オングストロー ムを超える高分解能構造解析に取り組んだ。

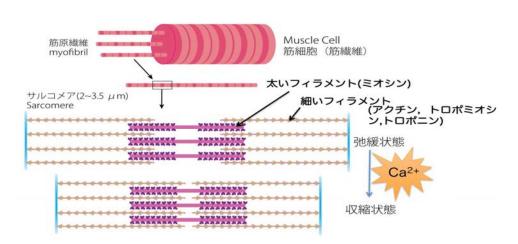


図 1 筋収縮・弛緩制御機構の模式図



# 2. 研究成果

#### (1)概要

細いフィラメントはアクチン繊維状に非常に細長いトロポミオシンとアクチン 14 個に2つ周期的に結合するトロポニンからなる分子複合体である。アクチン繊維の構造やトロポミオシン・トロポニンのそれぞれの単体 X 線結晶構造は明らかになっている(図2)。しかしながら、機能体である複合体構造については明らかになっていない。これまでにも、電子顕微鏡像の解析による細いフィラメントの立体構造の報告はあったが、多くは、重金属を使った染色によるものであり乾燥や重金属による変形により自然状態のモノでない(そのため分解能も限られる)。また、低温電子顕微鏡による構造解析例も 1 例あるが(Narita et al., 2001, J. Mol. Biol.)、分解能が極めて低いものであった。その結果、Ca<sup>2+</sup>存在下・非存在下におけるその構造変化については未だにその詳細は解明されてこなかった。

本研究において、カルシウム制御機構を明らかにするべく、低温電子顕微鏡法による細いフィラメントの高分解能構造解析を目指した。ワタリガニからネィティブな細いフィラメントを単離精製する方法を開発し、その方法を改良することにより、最終的にアクチン・トロポニン・トロポミオシンの成分のみの精製産物を得る事に成功した(図3)。低温電子顕微鏡法ではサンプルを薄い氷の薄膜に閉じ込め観察する。その際に結合力が弱い分子が解離する傾向はこれまでも観察されていたが、細いフィラメントにおいても氷薄膜に細いフィラメントを包埋する際に、トロポミオシンが解離することが明らかになった。画像解析により分類した結果約75%ものフィラメントからトロポミオシンが解離していた。しかし、生化学的な遠心による沈殿実験では、トロポミオシンの解離は見られない。氷薄膜包埋中に、解離したものと考えられた。グルタルアルデヒドにより、アクチン・トロポニン・トロポミオシンを架橋することにより氷薄膜中での解離を防ぐことができることを見いだした。架橋により、100%のフィラメントにトロポミオシンが結合していることを確認した。

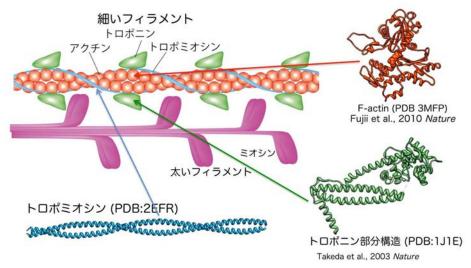


図2 アクチン・トロポミオシン・トロポニン複合体(細いフィラメント)の模式図 制御機構を明らかにするためには部分構造ではなく機能体としての全体構造を明 らかにする必要がある



トロポニンはアクチン 14 分子に 2 分子、細いフィラメント上に周期的にぽつぽつと存在する特異な立体配置をしているため、従来のらせん対称を仮定した画像解析法では解析できず、新たな画像解析法の開発が必要であった。また、従来の負染色像で適用されている 2 次元画像を1次元投影する方法では、水とタンパク質のコントラストを使う氷包埋像では高いノイズレベルにより、トロポニン密度の位置でのセンタリングは不可能であった。主成分分析法を用いることにより先にリファレンスフリーで画像を分類・平均化し、S/N 比が上がった平均像をセンタリングに用いることにより、その位置情報を原画像に割り当てることにより、トロポニンの位置でのセンタリングを可能にした。この粗い整列情報を使い、ローカルでの精密化をうまく行う事ができた。

これらの開発・改良により、カルシウム非存在下で、3次元立体構造を得る事ができた。

今後は、カルシウム存在下での構造解析を行うことにより、2状態の構造を得て、メカニカルな構造変化を明らかにする。また、現在、低温電子顕微鏡技術はダイレクトディテクターなどの要素技術の発展により急速に分解能を伸ばしている。我々も細いフィラメントと似たような直径7 nm の赤痢菌毒素タンパク質輸送装置ニードル複合体のニードル繊維構造を 2.9Å 分解能で構造解析し、ニードル繊維の原子構造を構築した。細いフィラメントのような比較的取り扱い・画像解析の難しいサンプルにおいてもアミノ酸側鎖を解像できるような高分解能解析を実現するべく、技術革新を進めていく。

また、さきがけ期間中に、MRC 研究所の Jan Löwe グループとの国際共同研究、Francis Crick 研究所の Caetano Reis e Soursa グループとの国際共同研究等を含む計5報の論文を出版した。

#### (2)詳細

# 研究テーマ A 筋繊維からのアクチン・トロポニン・トロポミオシン 3 者複合体状態での単離

ワタリガニからのアクチン・トロポニン・トロポミオシン 3 者複合体の単離・精製を行った。遠心条件や溶液条件をワンステップずつ電子顕微鏡で確認することにより精製方法をリファインした。それにより当初、かなり多くの粗雑物が存在していたが、これを大幅に減らすことができた。最後まで取り除くことが難しかったミオシンについても、Reactive Red と呼ばれるミオシンに結合する色素をアガロースゲルに結合したレジンを使用することにより、特異的にミオシン成分のみを吸着し、減らすことができた。最終的には SDS-PAGE レベルでは細いフィラメントの成分(actin, tropomyosin, troponin T, troponin I, troponin C)のみの精製物を得る事ができるようになった(図3)。このサンプルを用い氷包埋を行い観察およびデータ収集を行った。得られた画像を切り出し、トロポニンの存在は無視し、アクチンのらせん対称性を用いて画像解析した。トロポミオシンが約25%の画像にのみ結合していることが明らかになった。サンプルを10,000gの遠心にかけペレットと上清に分ける生化学的実験ではトロポミオシン・トロポニンの解離は見られなかったため、氷包埋作製時に解離が起きていると考えられた。ろ紙によりサンプル溶液を極限まで吸うことにより数十 nm の氷の薄膜にサンプルタンパク質を閉じ込める。最も考えられる影響は表面張力である。また、気液界面に近いため、変性などが引き起こされる可能性がある。この現象はアクチン・ミオシン複合体 ATP 無しの強結合状態においても起きており、生化学的に



かなり強い結合のものでも氷包埋による解離が起きる(アクトミオシン強結合状態の解離定数は 0.5 nM~10 nM である(T.Katoh et al., 1996, J.Biochem))。トロポミオシンはカルシウム有り無しでダイナミックにアクチン上を動く構造体であり、アクチンとのメカニカルな結合が強くないことが予想される(生化学的な解離定数は 0.2 μM である。(Urbancikova et al., 1994))。 我々はこの問題を解決するために低濃度 0.15%のグルタルアルデヒドで細いフィラメントを架橋し、この 3次元構造を解析した。画像解析によりほぼ 100%の画像においてトロポミオシンが結合していることが明らかになった。このサンプルを用いて、EGTA でキレートとしたバッファー条件でカルシウム非存在下の細いフィラメントの低温電子顕微鏡解析をおこなった。

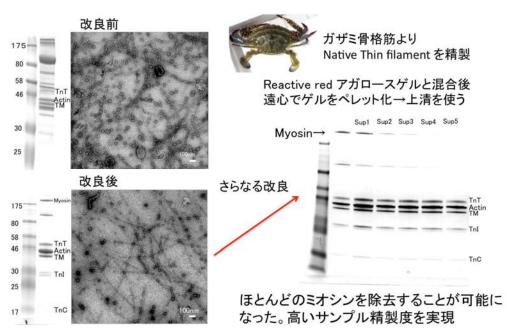


図3 ガザミ骨格筋からの細いフィラメント精製法の改良



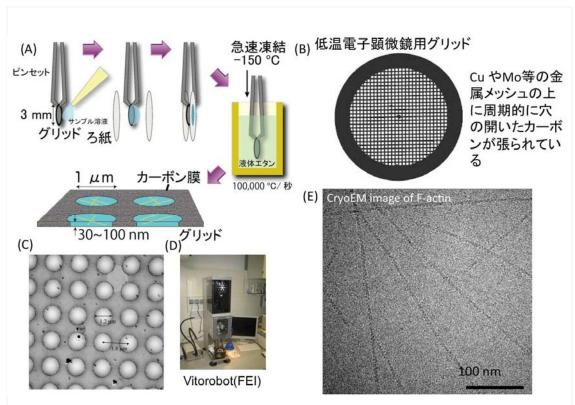


図4 永包埋試料作製。(A) 氷包埋試料作製法の模式図 (B)低温電子顕微鏡用グリッド。 直径3mmでCuやMo等でできている。(C) グリッドに張られている穴あきカーボン膜。 1.2 um のサイズの穴が1.8 um 間隔で開いている。(D) 氷包埋試料作製装置 Vitrobot(FEI 社) (E) 氷包埋像の典型例



図5 細いフィラメントのグルタルアルデヒドによる架橋。100%の繊維像でトロポミオシンが結合している



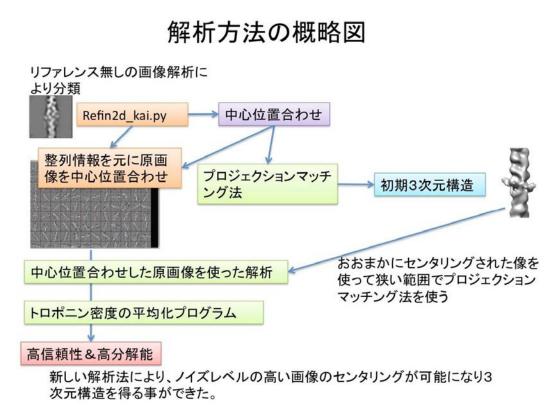
# 研究テーマ B 自動技術を用いた低温電子顕微鏡による大規模データ収集

細いフィラメントに結合するトロポニン・トロポミオシンはアクチンとの量比が1:7であるため、アクチン繊維の構造解析で使用したデータ量の7倍データを集める必要がある。大量データ収集が必須であり、自動化する必要がある。自動化自体は電子顕微鏡メーカーが行ったが、実際上の運用や、その運用面でのフィードバックなどにより、完全自動化を目指している。現時点では、撮影する試料の状態が最終的な分解能に大きく影響するため、自動化は非効率であり、実際的ではない。単純にデータを膨大に撮影することは可能になっているが、電子顕微鏡の場合、得られる画像は非常に S/N が低く、その画像から単純にクオリティを判定することが容易ではない。また、マシンタイムも限られるため、自動化により無駄なデータを撮影する余裕が現実的ではないという観点もある。現在、氷の厚さや、試料の密度、氷の張り方など判断基準を自動判定に落とし込むべく検討中である。

# 研究テーマ C 新規画像解析プログラムの開発

トロポニン T.I.C 複合体はアクチン14分子ごとに2つ結合するという特異な構造をしている。 トロポニン複合体は分子量10万であり、2分子を1セットとして解析するとしてもその分子量は わずか20万である。これは現在、低温電子顕微鏡法における下限ぎりぎりの分子量である。 アクチン繊維状にトロポニンが結合しているため、トロポニンを除くと、全く同じ画像が並んでい ることになる。そのため、ノイズレベルの高い画像を分類する際にローカルミニマムに落ちやす くなってしまう。これを避けるためには、データ取得に関しても薄い氷を作製してコントラストを上 げる必要があるが、画像解析についてもロバストな方法が必要であった。図6に概略図を示し ているが、一枚一枚リファレンスと比較するプロジェクションマッチング法は広範囲について計 算するのには計算リソースの観点から向いていない。またこの方法では、リファレンスが必要で あり、何を初期構造にするかにより、結果が大きく変わる恐れがある。特に分子量20万程度の 小さい分子の場合その懸念はより増大する。一方で、リファレンス無しの主成分分析をベース とした方法では、情報を低次元化することにより、計算スピードの点で非常に有利である。ま た、ローカルミニマムにも落ちにくくなる。加えて、初期構造に依存的でなくなり、高信頼性を確 保できる。そこで、リファレンス無しの方法により、似ている画像を平均化した。その平均像には トロポニンの密度がはっきり見て取ることができる。この S/N 比の上がった平均像を用いてセン タリングを行った。当然、S/N 比の高い平均像を使っているため、センタリングは非常にうまくい った。平均像を作成するために使った原画像は平均像に対して x-sift 値、y-shift 値をそれぞれ 持つ、この値と、平均像をセンタリングした際の x-sift 値、y-shift 値を組み合わせることにより、 原画像をセンタリングした。これによりノイズレベルが格段に高い原画像を精度良くセンタリン グすることができ、狭い範囲で分類・整列を行うだけでよくなり、分類・整列精度が飛躍的に向 上した。





#### 図 6 解析方法の概略図

# 細いフィラメントの構造

これまでに、負染色像による細いフィラメントの構造が数例(Pirani et al.,2005 J. MOI. Biol., Paul et al., 2010 J. Struct. Biol., Yang et al., 2014 Biophysical J.)、低温電子顕微鏡法による低 分解能構造が 1 例(Narita et al., 2001 J. Mol. Biol.)が報告されている。今回我々が立体構造解 析した CryoEM マップはそのいずれよりも分解能が高い。アクチンおよびトロポミオシンの構造 は明らかになっているため、それらを差し引いた図7の緑の密度がトロポニンの密度であると 考えられる。トロポニンの密度がはっきりと見えており、解析の段階で、ミスアライメントに帰因 するアベレージアウトの影響をほとんど受けていないことがわかる(図7)。トロポニンはトロポミ オシンに沿って板状の密度が存在しそこから塊がつきだした特徴的な構造をしている。これは X 線結晶構造解析で解かれたヒト心筋およびウサギ骨格筋由来のトロポニン構造と一致する。 図8B に見られるように、トロポニンはトロポニン T, トロポニン I の cヘリックスのバンドルとそれ に埋まるように存在するトロポニンCのC端ドメインの板状の構造からトロポニンIのヘリックス およびトロポニン C の N 端が板から突き出すように出ており、さらにその先に結晶構造解析で は見えていないトロポニン I の~20 残基が存在する。図8AB は同じ縮尺で低温電子顕微鏡像 と結晶構造を比較したものであり、両者がよく似た特徴をしていることがわかる。また、トロポニ ンの構造は 2 種類解かれており、トロポニン C の 2 つのドメインの間の角度がよく動く事が示さ れている。つまりその部分がカルシウムに応答して可変する可能性が高い。



# 細いフィラメントの構造 続き

また、図8A に見られる通り、トロポニンの直下に存在するアクチンはドメインが回転しているように見える。アクチンは単量体アクチン(G-アクチン)から繊維型アクチン(F-アクチン)に構造変化する際にドメインが回転しそれを実現している。今回の構造はトロポニン直下のアクチンはさらにそのドメインが回転しトロポニンとアクチン D-loop が相互作用する可能性を示唆している。もちろん、現在のマップは分解能が十分ではなく、トロポニンの他の密度がそこに存在していることも考え得る。今後、高分解能化にともないこの点は明らかになる。

カルシウムイオンによる細いフィラメントの構造変化は次のように考えられる。カルシウムによりトロポニン C の構造が変化し、トロポニン I, C の角度が変わり、アクチンとの相互作用がなくなる。それに伴いアクチンは Tn-アクチン構造から F-アクチン構造に変わる(図 8C, D)。アクチンと相互作用していたトロポミオシンはその相互作用を失い、ミオシン結合部位を露出するように移動する。

この仮説を明らかにするために、今後、収集データ数をさらに増やし高分解能化を行う。また、カルシウム存在下での立体構造解析を行う。

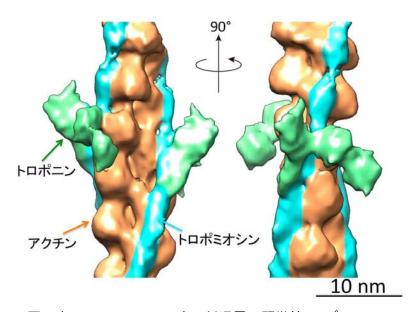


図 7 細いフィラメントの 3 次元低温電子顕微鏡マップ オレンジがアクチン繊維, 水色がトロポミオシン, 緑がトロポニンの密度に相当する。



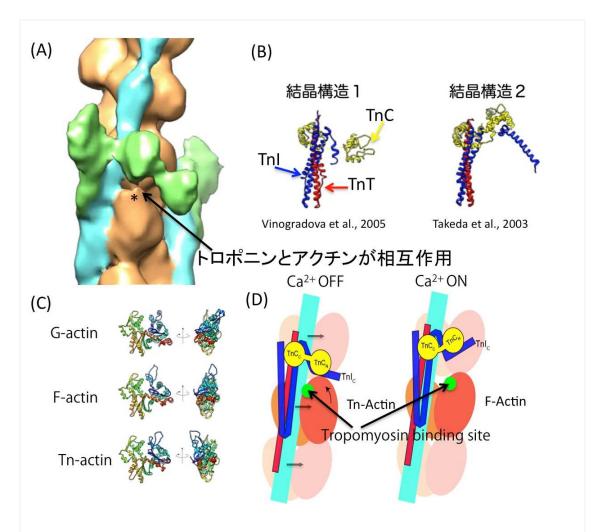


図8 細いフィラメントの低温電子顕微鏡マップと結晶構造の比較。低温電子顕微鏡マップより考えられるトロポニン・トロポミオシンによるカルシウム制御機構。

(A) \* はアクチン D-loop の位置を示す。

# 3. 今後の展開

ワタリガニ骨格筋の細いフィラメントの高分解能構造解析から筋収縮・弛緩の原子レベルでの動作原理を明らかにする一方で、将来的には、ヒト心筋細いフィラメントの再構成系の高分解能構造解析により医学・創薬につながるような知見を得ることができると考えられる。組換え発現系はほぼ確立できており、再構成条件などの最適化などにより、より良い系を確立できる。様々な変異体などを用いることで、構造解析のみならず、一分子蛍光観察法などの方法を用い、in vitro での解析を行う事ができる。拡張型心筋症の変異部はトロポニンに多く存在しており、その知見をもとに、詳細な分子シミュレーションなどを通じ、医薬創薬等の社会実装に役立てることができると考えられる。



# 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

研究目的は、低温電子顕微鏡の技術開発とともにそれを適用し筋収縮・弛緩を担う細いフィラメントの構造を高分解能で解析するというものである。低温電子顕微鏡法の高度化については赤痢菌ニードル繊維において 2.9Å 分解能を達成し、国際的に見ても最高レベルに到達した。細いフィラメントの構造解析については、当初から対称性の低さ、分子の小ささ等、多くの困難が予想された。また、研究を遂行する途上で、複合体が氷薄膜中で解離するなど様々な困難に直面した。氷薄膜中での解離はグルタルアルデヒドによる架橋により防止することができるようになった。また、新規に開発した画像解析法によりトロポニン分子の低分解能での立体構造を得ることが可能になった。現在、高分解能化を目指して、鋭意データ収集・解析中である。低温電子顕微鏡法はダイレクトディテクターの登場などにより、分解能が飛躍的に向上している。このため、主に製薬などの産業界からも新たな高分解能構造解析法として、注目を浴びるようになっている。低温電子顕微鏡法による高分解能構造解析法の技術移転により、社会や経済への貢献ができるのではないかと考えている。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

種々の技術開発により、重金属を使った染色なしで、氷包埋した細いフィラメントの低温電子顕微鏡法による解析を行い、Ca 非存在下のみではあるが、フィラメント上のトロポミオシン、トロポニンの構造を得ることに成功した点は評価できる。

今後は、直接検出器の利点を生かし、ソフトウエアの開発、導入を積極的に行ってさらに分解能を上げて構造解析を完了し、トロポニンによる筋収縮の阻害機構を原子分解能レベルで解明してほしい。

#### 5. 主な研究成果リスト

- (1)論文(原著論文)発表
  - 1. Nishimura, M.\*, **Fujii, T.**\*, Hiyoshi, H., Makino, F., Inoue, H., Motooka, D., Kodama, T., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., Nakamura, S., Namba, K., Iida, T. "A repeat unit of Vibrio diarrheal T3S effector subverts cytoskeletal actin homeostasis via binding to interstrand region of actin filaments." Sci. Reports, 5, 10870, (2015) \*Co-first author
  - 2. Hanč, P.\*, Fujii, T.\*, Iborra, S., Yamada, Y., Huotari, J., Schulz, O., Ahrens, S., Kjær, S., Way, M., Sancho, D., Namba, K., Reis e Sousa, C. "Structure of the Complex of F-Actin and DNGR-1, a C-Type Lectin Receptor Involved in Dendritic Cell Cross-Presentation of Dead Cell-Associated Antigens." Immunity, 42, 839-849, (2015) \*Co-first author
  - 3. Uchimura, S., **Fujii, T.**, Takazaki, H., Ayukawa, R., Nishikawa, Y., Minoura, I., Hachikubo, Y., Kurisu, G., Sutoh, K., Kon, T., Namba, K., Muto, E. "A flipped ion pair at the dynein-microtubule interface is critical for dynein motility and ATPase activation." J. Cell Biol., 208, 211-222,



# (2015)

- 4. Morimoto, D., Walinda, E., Fukada, H., Sou, Y.S., Kageyama, S., Hoshino, M., Fujii, T., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Iwai, K., Namba, K., Komatsu, M., Tanaka, K., Shirakawa, M. "The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates." Nature Communication, 6, 6116, (2015)
- 5. Gayathri, P.\*, **Fujii, T.**\*, Namba, K., Löwe, J. "Structure of the ParM filament at 8.5 Å resolution" Journal of Structural Biology 184, 33-42. (2013) \*Co-first author

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

- (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)
- 1. 藤井高志「低温電子顕微鏡法による繊維複合体の高分解能構造解析」第 14 回日本 蛋白質科学会、横浜
- 2. 藤井高志 「複雑な生命機能を理解するための構造解析の最先端」第 87 回日本生化学 会大会、京都
- 3. 藤井高志「低温電子顕微鏡法による赤痢菌ニードル繊維の高分解能構造解析」第 86 回 日本生化学会大会
- 4. 藤井高志「低温電子顕微鏡によるらせん複合体の高分解能構造解析」第50回日本生物物理学会 シンポジウム『若手オーガナイズシンポジウム: 生命科学の新しい地平を切り開く若手研究者たち』 シンポジスト兼オーガナイザー



# 研究報告書

# 「立体構造に基づく化学プローブ設計と蛋白質の機能制御・局在イメージング」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成24年10月~平成28年3月

研究者: 堀雄一郎

# 1. 研究のねらい

近年、合成分子を用いて生体分子の機能を調べる化学アプローチが生命科学の新しい解析手法として発展しつつある。合成分子の利点は、自由度の高い分子設計が可能であるため、従来の生物学的手法では得られなかった生体分子の機能・局在情報が得られることである。本研究では、化学原理と蛋白質の立体構造情報に基づき合成分子の設計を行うとともに、蛋白質工学を組み合わせることで、生命科学の課題を解決する新しい化学ツールを開発することを目的としている。

蛋白質の機能や局在を明らかにする代表的な化学的手法として、タグ蛋白質とそれに特異的に結合する蛍光プローブを用いた蛋白質標識法が挙げられる。イメージング研究では、蛍光蛋白質がよく用いられるが、蛍光蛋白質は、サイズが大きいことや、恒常的に発現するため特定のタイミングでの動態解析が困難であることが問題として指摘されていた。これに対し、タグ蛋白質と蛍光プローブを用いた手法では、小さなサイズのタグ蛋白質を利用でき、特定のタイミングで標識できるため、蛍光蛋白質の問題を解決することが期待される。一方、この手法の問題は、遊離プローブの蛍光が原因となり、イメージングの S/N 比を低下させることや、遊離プローブの除去のための洗浄に時間を要することであった。

そこで、報告者は、遊離状態では非蛍光性で、蛋白質を標識すると蛍光性となる「発蛍光プローブ」の開発により、この問題の解決に取り組んだ。これまでに、紅色細菌由来 PYP をタグ蛋白質として、その特異的発蛍光プローブの開発を行ってきた。しかしながら、これまでに開発したプローブでは標識に 24 時間以上を要し、反応速度の向上が課題となっていた。本研究では、化学原理と蛋白質構造情報に基づいたプローブ設計と PYP 変異体の創製により、迅速かつ高い S/N 比で蛋白質をイメージングする技術を開発した。また、蛋白質動態の詳細な時空間解析を行うことができるように、異なる波長の蛍光を発する発蛍光プローブによるマルチカラーイメージング技術を開発した。実際に、これらの技術を生命現象の制御や疾病に関わる蛋白質の細胞内動態の解析へ応用した。更に、蛋白質の局在を視る技術から蛋白質の機能を視る技術へと発展させるべく、機能性分子と標識技術を組み合わせることで、合成分子で機能化した蛋白質を立体構造情報に基づき設計・開発した。

# 2. 研究成果

# (1)概要

研究テーマ A では、PYP タグと発蛍光プローブの標識速度を向上させるため、PYP タグの 蛋白質工学的改変とプローブの化学原理に基づいた再設計を行った。PYP タグは酸性蛋白 質であり、アニオン性プローブとの反応速度は静電反発のため遅い。そこで、リガンド結合部 位付近の3つの酸性アミノ酸をアルギニンに変異させることで、静電反発を緩和し反応速度を



向上させた。また、プローブの脱離基の pKaに着目し、より脱離能の高い脱離基をプローブに組み込むことによって反応速度を向上させた。更に、この改変した蛋白質標識技術を用いて、アセチルヒストン結合蛋白質であるブロモドメインの局在解析とブロモドメイン阻害剤の阻害効果の可視化を行った。

研究テーマ B では、マルチカラー蛍光標識技術を開発し応用することで、グルコーストランスポーターGLUT4 の細胞内動態における糖鎖の役割を明らかにした。まず、4 つの蛍光色素と新たな消光基としてジニトロベンゼンを導入した発蛍光プローブを設計・合成した。更に、反応速度を向上させるため、pK。に着目した脱離基の再設計を行った。そのうち、生細胞イメージングにおいて最適なものを選択し、GLUT4 の細胞内動態の可視化に応用した。これらのプローブと組み合わせて糖鎖の欠失変異体や糖鎖形成阻害剤を用い、マルチカラーイメージング実験を行うことで、糖鎖が GLUT4 の膜局在の維持に関わることを示唆する知見を得ることができた。

#### (2)詳細

# 研究テーマ A「ラベル化速度向上のための PYP タグの改変とプローブの再設計」

# A-1) 静電相互作用に着目した PYP タグ変異体の創製

ジメチルアミノクマリンをリガンド部位とした PYP タグの発蛍光プローブ TMBDMA 及び CMBDMA を開発した  $^4$ 。しかしながら、CMBDMA は TMBDMA に比べ感度が良いものの、反応速度が遅いことが分かった。そこで、CMBDMA のラベル化速度を向上させるうえで、タグとプローブの静電相互作用に着目した(図  $^{12}$ 。PYP タグの立体構造情報から、リガンド結合部位の近くに複数の酸性アミノ酸(D71、E74、D97)が存在していることが分かっている。アニオン性である CMBDMA と PYP タグの反応性が低いのは、これらの酸性アミノ酸との静電反発によると考えられた。そこで、これらのアミノ酸を塩基性アミノ酸であるアルギニンに換えた変異体 PYP3R を創製し用いることで、静電引力を誘起させ反応速度が向上すると考えた。その結

果、PYP3R は、野生型に 比べ反応速度が約 11 倍 向上した。当初予測して いなかったことであるが、 PYP3R に結合したプロー ブの蛍光強度は、野生型 PYPwt に結合した時に比 べ、約 1.6 倍高くなること が示された。

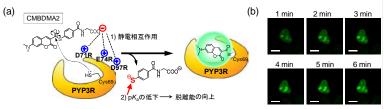


図 1. PYP 変異体と発蛍光プローブを用いた蛋白質ラベル化。(a) 静電相互作用に着目した PYP 変異体 PYP3R の創製と pKa に着目したプローブ CMBDMA2 の開発。(b) CMBDMA2 による核局在化 PYP3R のイメージング。

# A-2) pK』に着目した脱離基の再設計

次に、更なる反応速度の向上のため、プローブの再設計に取り組んだ(図 1a)<sup>2</sup>。プローブは、チオエステル交換反応により PYP タグの Cys69 と共有結合し、このとき、プローブからチオール化合物が脱離する。ラベル化速度は、この脱離基の脱離能と相関し、脱離能はチオール化合物の pK<sub>a</sub>と相関する。このため、pK<sub>a</sub>を低下させることにより、脱離能が高くなり、ラベル化速度が向上すると期待される。そこで、CMBDMA のチオフェノールの pK<sub>a</sub>を低下させるため



に、パラ位にあるメチレンを除去し電子吸引性のカルボニルが直接結合した新規プローブ CMBDMA2 を設計・合成した。 $pK_a$ 計算プログラムである Epik を用いて  $pK_a$ を計算したところ、CMBDMA2 は、CMBDMA に比べ  $pK_a$ が約 1 低くなっていることが示された。ラベル化速度を検討したところ、CMBDMA2 は、CMBDMA に比べ 5.6 倍速く PYP タグに結合することが明らかとなった。次に、上述の PYP3R と CMBDMA2 を反応させたところ、PYP タグ (野生型)と CMBDMA の反応速度に比べ 18 倍反応速度が向上していることが判明した。さらに、PYP3R を細胞内に発現させ、CMBDMA2 により標識したところ、PYP-3R が特異的に標識され蛋白質の局在を可視化することができた。また、蛋白質は、約 1 分で検出できることが示された(図 1b)。

# A-3) ブロモドメインとその阻害剤のイメージング解析への応用

更に、本技術をアセチル化ヒストンに結合するブロモドメインの局在の可視化解析に応用した<sup>2</sup>。BRD4 由来ブロモドメインを PYP3R に融合させ、標識したところ、核内から不均一な蛍光分布が確認された。興味深いことに、ブロモドメインとアセチル化ヒストンの結合阻害剤である JQ1 を添加したところ、その分布がより均一になった。以上のことから、ブロモドメインは、アセチル化ヒストンの豊富な領域に局在し、ブロモドメイン阻害剤によりアセチル化ヒストンから解離したことが示唆された。

以上をまとめると、変異体創製とプローブ再設計により、PYP タグとプローブのラベル化速度を向上させ、細胞内蛋白質の検出時間を1分にまで短縮することに成功した。また、本技術をブロモドメインとその阻害剤の生細胞解析へと応用できることを示した。

# 研究テーマ B「マルチカラーイメージング技術の確立と応用」

B-1) マルチカラーイメージングプローブの開発

上述のプローブは、リガンド部位と蛍光色素部位が一体化しており、異なる蛍光色素を導入して、波長の異なる蛍光を発するプローブを設計することができない。そこで、報告者は、桂皮酸リガンドを基本骨格とするプローブFCANBに着目した。FCANBは、リガンド部位として桂皮酸誘導体、蛍光色素部位としてフルオレセイン、消光基部位としてニトロベンゼンを有している。フルオレセインは、遊離状態ではニトロベンゼンと分子内で会合し消光しているが、ラベル化に伴いニトロベンゼンが脱離し蛍光性となる。このプローブの蛍光色素部位に、より長波長の蛍光を発する色

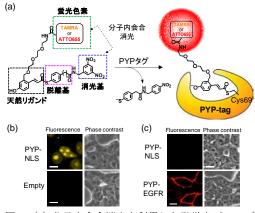


図 2. (a) 分子内会合消光を利用した発蛍光プローブの設計。(b) TAMRA-DNB による核局在化 PYP タグのイメージング。(c) AT-DNB2 による細胞膜局在化 PYP タグのイメージング。

素を導入し、それらの色素に対応する消光基を組み込むことで、異なる波長の蛍光を発する複数の発蛍光プローブを設計することができる。報告者は、フルオレセインより長波長の蛍光を発する蛍光色素として、蛍光波長が 570~590 nm(黄色)である Cy3 または TAMRA、670~690 nm(赤色)である Cy5 または ATTO655 を選択した(図 2a)。また、消光基を二トロベンゼンからジニトロベンゼン誘導体へと変更した。更に、前述の  $pK_a$ に着目して脱離基を再設計する



ことで、反応速度に関しても検討した。これらの組み合わせの一連のプローブを設計・合成・評価した結果、黄色蛍光色素として TAMRA を組み込んだプローブ TAMRA-DNB と、赤色蛍光色素として ATTO655 を組み込んだプローブ AT-DNB2 が、標識に伴う蛍光強度変化(10 倍以上)及び標識速度(二次速度定数  $k_2$  = 700~800)において優れた結果を示した。次に、PYP タグを細胞核や細胞膜に発現させた細胞にこれらのプローブを添加し無洗浄でイメージングしたところ、TAMRA-DNB は細胞膜を透過し核内の PYP タグを標識できた(図 2b)。一方、AT-DNB2 は膜非透過性であり核内の PYP は標識できなかったものの、細胞膜表層に発現させた PYP タグを標識できた(図 2c)。

# B-2) GLUT4 の細胞内動態解析への応用

開発したプローブを用いて、グルコース輸送体の一つである GLUT4 の細胞内動態を可視化した。GLUT4 は、2 型糖尿病に関わりのある蛋白質であり、インスリン刺激により細胞膜に移行し血中のグルコースを細胞内に取り込む役割を持っている。GLUT4 の膜移行が障害されることは、2 型糖尿病の一因となることから、その膜移行機構を明らかにすることは、生命科学・医学の観点から重要である。報告者は、GLUT4 の細胞外ループに PYP タグを挿入し発現させ(PYP-GLUT4)、AT-DNB2 を用いてインスリンによる PYP-GLUT4 の膜移行を可視化した。その結果、インスリン刺激により細胞膜から時間の経過とともに蛍光が観測され、インスリンを除去するとその蛍光が内在化し粒上になった。以上の結果から、PYP-GLUT4 は、インスリン応答性を保持しており、その動態を AT-DNB2 により追跡できることが分かった。

# B-3) GLUT4 の糖鎖の細胞内動態への役割

GLUT4は、細胞外の第一ループにN結合型糖鎖が修飾された糖タンパク質であるが、その糖鎖の細胞内動態への役割には論争があり、現在のところ明確にはわかっていない。そこで、糖鎖形成を阻害するキフネンシンまたはGLUT4の糖鎖欠失変異体(N57Q)を用いて、AT-DNB2及びTAMRA-DNBによる動態イメージング実験を行った。キフネンシン処置前にTAMRA-DNBで標識し、1日静置した結果、GLUT4は部分的にリソソームに移行したことが明らかとなった(図3a)。また、キフネンシン処置の場合またはGLUT4 N57Qを用いた場合において、インスリンとAT-DNB2を同時添加したところ、

その蛍光が細胞内から観測された(図 3a)。膜非透過性の AT-DNB2 の蛍光が細胞内から観測されたことから、次の仮説を立てた。 GLUT4に糖鎖がない場合や異常をきたしている場合、GLUT4はインスリン刺激時に細胞膜移行はできるものの、膜局在を維持することなく迅速に内在化しているため、AT-DNB2の蛍光が細胞内から観測されたのではないか、と考えられた。そこで、実際に、膜移行が起こっていることを確かめるために、キフネンシンもしくは GLUT4 N57Qを用いた実験で、インスリン刺激時に氷上で処置することで、エンドサイトーシスを阻害してイメージング実験を行った(図 3b)。その結果、膜上から蛍光が観測されたことから、糖鎖に異常がある場合でも過渡的に

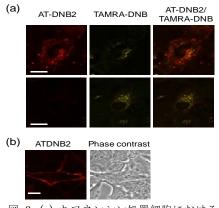


図 3. (a) キフネンシン処置細胞における AT-DNB2 及び TAMRA-DNB による PYP-GLUT4 のラベル化。(b) 氷上でインスリン刺激した際の PYP-GLUT4 の AT-DNB2 によるラベル化。



GLUT4 が細胞膜移行していることが分かった。以上の結果から、GLUT4 の糖鎖はインスリン刺激時における膜局在の維持に関わっていることが示唆された。このことは、PYP タグとその発蛍光プローブを用いて初めて明らかとなったことである。

# 3. 今後の展開

本研究では、化学原理と構造情報をもとに、プローブとタグ蛋白質を改変し、標識速度の向上に成功した。今後は、構造情報をもとに進化分子工学の手法を取り入れてタグ蛋白質を更に改変することにより、標識速度及び標識効率の一層の向上を図り、細胞内蛋白質をより高感度に検出することを目指す。また、蛋白質の動態を観測することで、糖鎖の役割を可視化解析することができた。合成プローブの利点の一つは、様々な機能を持った分子をプローブに組み込むことができることであり、タグ蛋白質標識技術を用いることで、細胞内でその機能を蛋白質に賦与することができることである。この点を活用し、機能性プローブを蛋白質に導入することで、蛋白質の局在のみならず、様々な生体分子情報を得られる技術へと進化させたい。合成分子と蛋白質の利点を活かすことで、従来の手法で見ることのできなかった生命現象を解明する技術革新へと結び付けたい。

# 4. 評価

# (1)自己評価

#### (研究者)

本研究では、生命科学の課題に答える化学ツールを開発することを目的として、化学プローブによる蛋白質ラベル化技術の開発・最適化とその技術の生命現象可視化への応用、蛋白質の機能を視る技術の開発を行った。本さきがけ研究により、蛋白質ラベル化技術は実用化の水準にまで到達したといえ、実際の生理現象の解明への応用にも成功した。開発した発蛍光蛋白質ラベル化プローブは、生細胞での蛋白質検出時間の短さや、マルチカラーイメージングへの実用化の観点から、現在報告されているラベル化技術のなかでも最高水準にあるといえる。更に、合成分子で標識した蛋白質の機能化にも成功している。現段階では、その機能化蛋白質の研究は試験管レベルにとどまっているが、今後細胞レベルにおいて実証し、生理現象の解明に迫る成果が得られることが期待される。本研究では、化学の原理に加え、蛋白質の立体構造情報に基づき、化学プローブやタグ蛋白質が開発されており、また、領域内での共同研究の実施も行っており、このことは本領域に参画したことの成果といえる。

本研究では、報告者を中心として2名の技術補佐員と2名の大学院生を研究協力者として研究を遂行した。研究費は、主に技術補佐員の雇用や備品や試薬・器具類の購入に研究期間中に順調に執行されており、研究遂行に多大な貢献があった。

本研究で開発した蛋白質ラベル化技術は、蛋白質の生理的役割の解明に貢献するとともに、生命科学の幅広い分野の研究への応用が期待される。このため、市販化や他研究者への技術提供などによる技術の普及が今後重要となるといえる。また、研究テーマ A においても示したように、本技術の応用で、阻害剤の効能を生細胞で検証することが可能であり、医薬品のアッセイ系への応用を見込むことができる。今後、実施例を増やし、その有用性を示していくことで、生命科学分野の研究ツールとして発展していくことが期待される。



(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

PYP を使った発蛍光プローブにおける、オン時間の短縮化、マルチカラー化、さらに、生体機能との関連化などを達成し、有機合成のみならず、PYP を遺伝子改変する側からのアプローチも行った。また、Regnase-1 の分解や GLUT4 の膜移行などの現象の可視化に開発システムを利用し、その proof-of-concept を証明した。

このようなプローブ開発研究は、良いアプリケーションと組み合わせた時にはじめて高く評価される。すなわち既存の技術ではできなかったことができるようになり、医学生物学的に重要な発見につながることが要求される。このことを意識して、応用先の生物学的トピックをまず慎重に選択し、それに役立つような技術という視点で開発するということが今後ますます必要になると思われる。

# 5. 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

- Yuko Kamikawa, Yuichiro Hori, Kazuo Yamashita, Lin Jin, Shinya Hirayama, Daron M Standley, Kazuya Kikuchi, "Design of a Protein Tag and Fluorogenic Probe with Modular Structure for Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins", Chemical Science, in press
- 2. Yuichiro Hori, Shinya Hirayama, Motoki Sato, Kazuya Kikuchi, "Redesign of a fluorogenic Labeling System to Improve Surface Charge, Brightness, and Binding Kinetics for Imaging the Functional Localization of Bromodomains", Angewandte Chemie International Edition, 2015, Vol. 54, No. 48, 14368–14371.
- 3. Reisuke Baba, Yuichiro Hori, Kazuya Kikuchi, Intramolecular Long-Distance Nucleophilic Reactions as a Rapid Fluorogenic Switch Applicable to the Detection of Enzymatic Activity.

Chemistry -European Journal 2015, Vol. 21, No.12, 4695-4702.

4. Yuichiro Hori, Tomoya Norinobu, Motoki Sato, Kyohei Arita, Masahiro Shirakawa, Kazuya Kikuchi, "Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins", Journal of the American Chemical Society, 2013, Vol.135, No.33 12360-12365. (Featured in JACS Spotlights)

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:1件

1.

発 明 者: 菊地 和也, 堀 雄一郎, 乙村 法道 発明の名称: メチル化 DNA を蛍光標識する方法

出 願 人: 国立大学法人大阪大学

出 願 日: 2014/8/1

出 願 番号: 特願 2014-158061号



# (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1. Yuichiro Hori, "Development of protein-labeling probes with fluorogenic switches for imaging cellular events", Pacifichem2015, Honolulu, Hawaii, December 17, 2015(招待講演)
- 2. Yuichiro Hori, "Fluorescent probes for in vivo imaging and epigenetic analysis", 日本化学会第 94 春季年会アジア国際シンポジウム, 千葉, March 27, 2015(招待講演)
- 3. Yuichiro Hori, "Development of Chemical Tools for Imaging Protein Localization and Epigenetic Phenomena", Swiss-Japanese Chemical Biology Symposium 2014, Bern, Switzerland, October 3, 2014(招待講演)
- 4. Yuichiro Hori, "Development of Fluorogenic PYP-tag Probes for Quick Live-Cell Imaging of Interacellular Proteins," EPFL-OU workshop, Lausanne, Switzerland, September 30, 2014(招待講演)
- 5. 堀 雄一郎、「環境応答性発蛍光プローブと PYP タグを利用した細胞内蛋白質抗争イメージング技術の開発と生物応用」、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 部会講演賞受賞(2013/09/27)



# 研究報告書

# 「顕微鏡による膜タンパク質1分子の3次元構造変化・機能マッピング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月~平成28年3月

研究者: 政池 知子

# 1. 研究のねらい

タンパク質の「静止画」である構造情報を「動画」に発展させることが本研究のねらいである。 近年、X 線結晶構造解析、NMR、電子顕微鏡などの技術開発により、可溶性蛋白質のみなら ず膜蛋白質の構造情報も蓄積され、複数の中間体まで明らかになりつつある。これらの「静止 画」を「連続写真」として扱い、機能発現のメカニズムを議論することも現実的になってきた。しか しそれをさらに「動画」にして蛋白質の作動機構を説明するためには、実際に機能を発揮してい る最中に結晶で得られた構造が中間体として現れるのかを検証し、更に中間体同士の間をつな ぐ構造変化の途中経過も実際にとらえることが重要である。

本研究では、光学顕微鏡を用いて蛋白質1分子の構造変化を2次構造レベルで検出することで、作動機構を説明する動画を得ることを1つの柱とした。まず、モデル蛋白質として骨格筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase と ATP 合成酵素の一部分である  $F_i$ -ATPase を選んだ。結晶構造を手掛かりとして、大きな構造変化が予測されるドメイン毎に蛍光分子を標識し、これをプローブとした角度変化検出を通じて構造変化を動画にするという戦略である。ただし、このアプローチのみでは各構造変化がもたらす酵素反応の素過程にまで踏み込むことはできない。

そこで次に、本研究のもう1つの柱として位置付けたのが、構造変化の動画に酵素反応の進捗を関連づけることである。構造変化に共役する酵素反応の素過程を明らかにすることができれば、検出された各構造がどの反応中間体に相当するのか検証が可能となる。このために、蛍光性ヌクレオチドの1分子観察や、リン酸結合蛋白を用いたリン酸解離のタイミング検出のための実験系構築を目標とした。

本さきがけ研究の3つ目の柱は、生物学的階層を上り、オルガネラレベルでの構造変化に着目することである。たくさんのモータータンパク質ダイニンが ATP 依存的に微小管上を滑り運動することで微小管の間に屈曲が生まれ、繊毛軸糸の鞭打ち運動が発生することが知られる。この運動を顕微鏡下において3次元で観察し、気管からの異物排出機構を解明することを目的とした。

このようにして本さきがけ研究では、ヌクレオチド加水分解に伴って酵素機能を発揮する蛋白質群の動画を通じて、作動機構の普遍性と多様性に迫った。



# 2. 研究成果

# (1)概要

蛍光分子の角度を検出するための光学顕微鏡を構築し、時間分解能 100 ミリ秒、角度分解能約±2 度で蛍光分子の遷移双極子モーメントの向きをサンプル面への射影角度(XY)として決定することが可能となった。また、励起光の偏光の向きをサンプル面に垂直な向き(Z)に設定して蛍光分子の観察を行い、蛍光分子の Z 成分も定性的に見積もった。

この顕微鏡を用いてディスク状人工脂質二重膜ナノディスクに埋め込んだイオンポンプ  $Ca^{2+}$ -ATPase に標識した蛍光分子を観察したところ、界面活性剤無しでも凝集することなくガラス基板上に単離固定され、1分子レベルでの角度検出が可能であることがわかった。そこで、Pドメインもしくは Aドメインへの優先的な蛍光標識が想定される  $Ca^{2+}$ -ATPase を用意し、 $Ca^{2+}$ -ATPase がターンオーバーする条件で構造変化検出を行った。その結果、蛍光分子の角度が観察中に変化する分子がいくつか見出された。そこで、各中間体の滞在時間について時定数の詳しい解析を検討している。

回転分子モーターF<sub>1</sub>-ATPase については、これまでの研究で中心軸回転に伴う触媒サブユニットの C 末端へリックスの構造変化を検出した例がある(Masaike, T. et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2008)。そこで、本研究では構造変化マッピングという観点でこれを拡張することを目標とした。ヌクレオチド結合部位から中心軸の回転を駆動する C 末端へリックスに至るまでの各ドメインを代表する部位を6種類選定し、そこにシステイン変異を導入して蛍光標識と構造変化観察を進めた。一方蛍光分子とは別波長で、中心軸に結合した回転観察用ビーズを同時に観察する光学系を立ち上げた。この同時観察の光学系を用い、2箇所のドメインの角度変化を中心軸の回転と同時に測定した。その結果、中心軸の回転角度の変化に伴い触媒サブユニットに標識した蛍光分子の角度変化が検出される分子が見いだされた。

また、蛍光性ヌクレオチドや蛍光標識リン酸結合蛋白を用いて酵素上での反応の素過程を可視化する方法の開発や、3次元構造変化検出をオルガネラに拡張し繊毛運動を定量化する研究も行った。このようにして、光学顕微鏡による構造変化・機能観察を進めた。

# (2)詳細

# 研究テーマ1「膜蛋白質 Ca²+-ATPase の局所構造変化の1分子観察」

旭川医大・鈴木研究室の協力により、ディスク状人工脂質二重膜に埋め込んだ膜蛋白質 Ca<sup>2+</sup>-ATPase を用意し、ガラス基板上に単離して固定した。Pドメインもしくは Aドメインに優先的に結合すると考えられる方法で標識した蛍光分子をプローブとして、励起光の偏光の向きを一定速度で回転させる全反射型顕微鏡を用い遷移双極子モーメントの角度決定を行った。まず溶液交換により2つの中間体間を遷移する構造変化の検出を試みた。しかし、画像のドリフトや溶液の流れによるガラスからの分子の解離などの問題があったため、次に溶液交換を行わず 2 つか 3 つの中間体の構造間を巡回すると考えられる溶液条件で角度の推移を測定した。また、ナノディスクの末端に結合したヒスチジンタグでサンプルを固定するために、ガラス基板を Ni-NTA で修飾した。その結果、角度変化を繰り返す分子がいくつか見いだされた。今後、視野中の分子のうち角度検出が可能な分子の割合を調べ更に適切な溶液とガラスの条件を検討し、各角度に滞在する時定数の解析と生化学的に求められた各中間体間の



速度定数から見積もった時定数との対応を考察する予定である。

本研究では、学習院大学・西坂研究室の協力により上記の方法と並行してデフォーカスイメージングの手法でも角度変化検出を試みた。この測定の過程で、ナノディスクに埋め込まれた Ca<sup>2+</sup>-ATPase に標識されている蛍光分子は、Ca<sup>2+</sup>-ATPase の構造を強固に固定する溶液条件でも、1分子観察に最適なレーザー強度下で秒単位の暗状態に頻繁に陥ることがわかった。これまでのところ、この現象は蛍光分子と脂質の相互作用の変化によるものであると予想している。この現象を定量化すれば、ナノディスクに組み込まれた分子を組み込まれていない分子と区別して観察することができる可能性も拓けると考える。

# 研究テーマ 2 「局所構造変化マッピングによる F<sub>1</sub>-ATPase の回転駆動機構の解明」

 $F_1$ -ATPase は、触媒部位への ATP 結合をきっかけとした構造変化が C 末ドメインへ伝搬しで動きが拡大し、中心軸を押すことで回転を駆動すると考えられてきた。本さきがけ研究者のこれまでの研究では、ATP 加水分解の素過程ごとの中心軸のステップ状回転に対応する触媒サブユニットの C 末端へリックスの角度変化ステップが明らかになった。しかし、C 末端でのこの構造変化がどのような構造変化のリレーで生み出されるのかは未解明であった。

そこで本研究では、横浜市大・池口研究室 伊藤祐子博士の提案したモデルを参考に ATP 加水分解サイトと C 末端へリックスを繋ぐ特徴的な2次構造を抽出し、6種類のダブルシステイン変異体を作成して 2 箇所固定蛍光分子で標識し、これをプローブとして偏光変調顕微鏡を用いて角度変化検出を行った。このテーマでは、テーマ1とは異なり触媒サブユニットに標識した蛍光分子以外に中心軸に結合したビーズも別波長で同期撮影し、触媒サブユニットの構造変化と中心軸の回転運動の関係を調べた。条件検討を重ねた結果、中心軸が回転している F<sub>1</sub>-ATPase の触媒サブユニットに蛍光分子が結合している分子の発見頻度が高まり、触媒サブユニットのヘリックスの構造変化と中心軸の回転の相関関係を示すデータが得られつつある。

#### 研究テーマ3「マウス気管繊毛の3次元運動」

学習院大学・西坂研究室の協力を得て3次元位置検出顕微鏡を構築し、浜松医大・池上浩司博士・瀬藤光利博士の技術協力により単離・脱膜してガラス基板上に固定したマウスの気管上皮繊毛1本1本の動きを、先端に結合した蛍光ビーズの動きとして観察した。繊毛運動の軌跡を球面近似して運動の各パラメーターを調べた結果、野生型マウスでは広範囲の Ca²+濃度で運動に顕著な差異が見られなかった。しかし、ATP については高濃度になるに従い鞭打ち速度が増加し振幅には違いが認められず、結果として周波数が増加していると考えられる。このことからまず、繊毛運動における周波数の堅牢性が明らかになった。更に本研究結果を総合して、異物侵入により細胞内に Ca²+が流入してシグナルとなって ATP 産生を亢進し、その結果として繊毛運動が活性化することで粘液の流速を上げ、異物排出に寄与するというモデルを立てた。

# 研究テーマ4「極小体積のマイクロチャンバー内での微小管ダイナミクスとリン酸検出」

マイクロデバイスを使用すると、数 fl~数十 fl の極小体積溶液中における蛋白質の振る舞



いを観察することができる。これを利用して、微小管ダイナミクスの観察とリン酸検出系の構築を行った。

まず、微小管ダイナミクスの観察の狙いは、細胞内の微小体積環境を模倣し、容積組成の 急激かつ局所的な変化が重合・脱重合に及ぼす影響を調べることにある。大阪大学・産業科 学研究所・榊原昇一博士の協力を得て、微小管形状の細長いモールドを用いて体積約 15fL のオーバル型 PDMS 樹脂製マイクロチャンバーを作成し、このチャンバー内に理研・QBiC・岡 田康志博士と東大・島知弘博士から供与を受けた微小管のシードと遊離チューブリンを閉じ 込め、微小管重合・脱重合を撮影することに成功した。マイクロリットルオーダーの十分な体 積がある条件での重合・脱重合との比較は、溶液交換の効率やチャンバーの乾燥などのいく つかの技術的問題を克服した後に慎重に議論すべきではあるが、これまでのところ極小体積 空間では重合・脱重合のサイクルが比較的速いという特徴が示唆されている。

リン酸検出系については、本さきがけ研究者主宰の研究室で調製した蛍光標識リン酸結合 蛋白を蛍光分光器によるリン酸滴定に供し、リン酸結合に伴う蛍光強度の増加率が高いロットをその後の実験に用いる事とした。上記オーバル型チャンバーと油中水滴チャンバーにこれを封入したところ、顕微鏡下でもリン酸濃度依存的な蛍光強度増加を検出できる場合があった(東大・野地研究室との共同研究)。今後この結果の再現性を検証する。

# 3. 今後の展開

Ca<sup>2+</sup> -ATPase についてはナノディスクだけでなく平面膜や膜チャンバーデバイスとの組み合わせを検討し、ガラスに対する配向が均一になるように工夫することによって結果の解釈がつきやすくなるようにしたい。

F₁-ATPase については、触媒サブユニット以外にも蛍光標識を行うことで、F₁-ATPase 全体としての構造変化マッピングに拡張することが重要であると考える。

マウスの気管繊毛運動の3次元観察については、ポリグルタミン酸化酵素以外のノックアウトマウスを用いて3次元パラメーターを比較し、粘液の流れが生み出される機構をより多面的に理解するつもりである。

リン酸結合蛋白については、体積をより小さくすることにより、アトーリットルレベルでのデジタルカウンティングを可能にすることや、リン酸を1分子レベルで検出する実験への応用を検討したい。

#### 4. 評価

#### (1)自己評価

#### (研究者)

本さきがけ研究では、活性を保った蛋白質もしくはオルガネラの構造変化や機能を光学顕微鏡による1分子観察で解明する構造生命科学を展開した。本研究により人工脂質二重膜に埋め込んだ蛍光標識膜蛋白質の2次構造レベルでの角度変化を1分子で検出するための技術が進歩したと考える。また、可溶性蛋白質については角度検出を複数の部位に拡張し、2次構造配置変化の因果関係を明らかにする「構造変化マッピング」を実現しつつある。3次元解析については気管繊毛運動の観察において実現した。機能の可視化については、リン酸結合蛋白とマイクロデバイスを用いて独自の検出系を構築しつつある。このよう

に、研究課題のすべてのキーワードを内包する研究を遂行することができた。ただ、今後は 現在明らかになっている知見を論文化するために、データをまとめる作業を急ぐ必要があ る。

研究実施体制については、本さきがけ研究者が主宰する研究室において研究補助者と多数の学生と連携しつつ、研究を軌道にのせ、実験を効果的に行うことができた。また、個人研究ではあるが多数の共同研究者に恵まれ、多角的な展開が可能となった。焦点を絞った研究が肝要であるという指摘があれば謙虚に受け止めるが、今後これらの研究結果の「芽」を見定めてテーマを絞り込み、長期的にさきがけ研究の成果として発信していく事を覚悟している。研究費執行状況については、前半の時期に必須の大型装置を購入して運用を開始し、以後は消耗品を中心に購入して適切に使用することができた。

このように持続可能な研究体制を確立したことにより、今後公開されることが予想されるさまざまな蛋白質の結晶構造に本さきがけ研究の手法を適用し、相関構造解析へと発展させる技術的基盤ができたといえる。これにより、作動メカニズムに焦点を当てた機能回復を主眼に置いて創薬に展開したり、様々な分子の高感度検出キットを作成したりすることにより社会・経済への波及効果が期待できる。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

「先端に蛍光ビーズを結合させることによる繊毛運動の Ca<sup>2+</sup>濃度依存性3次元観察」、「改良型偏光変調全反射型顕微鏡の利用による構造変化マッピング」、「進化型偏光変調全反射型顕微鏡の利用による1分子3次元角度検出」、「PDMS マイクロチャンバーに閉じ込めた微小管の観察」、「オーバル型チャンバーに閉じ込めた微小管の観察」等、様々な系で光学顕微鏡観察による1分子の動きを観測しており、技術開発面では進展が見られた。今後は、開発した技術に適した、生理的に意義のあるシステムをうまく探し出し、よりインパクトのある成果を期待したい。

#### 5. 主な研究成果リスト

- (1)論文(原著論文)発表
  - 1. 菊池洋輔, 中裕佑, 小酒部秀光, 岡本哲明, 政池知子, 上野博史, 鳥谷部祥一, 宗行英朗
  - "Thermodynamic analyses of nucleotide binding to an isolated monomeric b subunit and the  $a_3b_3g$  subcomplex of  $F_1$ -ATPase" *Biophys. J.*. 2013  $\pm$ . 105, 2541-2548
  - 2. 木下佳昭, 中根大介, 須河光弘, 政池知子, 水谷佳奈, 宮田真人, 西坂崇之
  - "Unitary step of gliding machinery in Mycoplasma mobile"

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2014 年, 111, 23, 8601-8606

# (2)特許出願

研究期間累積件数:0件



# (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等) 【主要な学会発表】

「光学顕微鏡により明らかにするモーター蛋白とその集合体の動き」 政池知子,西坂崇之

物理学会 第 68 回年次大会, 2013 年 3 月 26 日, 広島大学, 招待講演

"Motions in Ciliary Axonemes that Cause Functions"

政池知子, 西坂崇之

The 25th CDB Meeting, 2013 年 6 月 18 日, 理研 CBD, 招待講演

「1個から数個の分子が引き起こす運動と酵素反応のイメージング」 政池知子, 池上浩司, 瀬藤光利, 鈴木裕, 西坂崇之 第 51 回 日本生物物理学会年会・シンポジウム, 2013 年 10 月 29 日, 京都国際会議場, シンポジウムオーガナイザー

「プローブの向きと位置から蛋白質の局所構造変化を検出する」 政池知子, 鈴木裕, 西坂崇之 日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム, 2013 年 11 月 16 日, ウィンクあいち, 招待講演

"Imaging Motions, Functions,and Reactions of Single Molecules" 政池知子

OIST workshop Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses, 2014 年 4 月 21 日, 沖縄科学技術大学院大学, 招待講演

"Conformational changes and chemistry of single-molecule enzymes revealed under the optical microscope"

#### 政池知子

Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, 2014 年 6 月 8 日-11 日, 日本科学未来館, 招待ポスター発表

"Observation of Single-Molecule Enzymes through Probes under the Optical Microscope" 政池知子

Taiwan-Japan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences, 2014 年 9 月 13 日,台湾新竹市•清華大学,招待講演

「イオンポンプとの比較による、塩化物イオンチャネル CFTR の作動機構研究」 政池知子,相馬義郎

第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月26日, 札幌コンベンションセンター, 招待講演

「膜輸送蛋白等の計測における1分子顕微鏡観察とマイクロデバイスの活用」



# 政池知子

第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月15日, 金沢大学・角間キャンパス, 招待講演

# 【受賞】

第5回 資生堂女性研究者サイエンスグラント 受賞 (2012年度)

# 【著作物】

Coupling of chemical events and mechanical work in single  $F_1$ -ATPase molecules revealed under the optical microscope.

Masaike, T., Hasimoto, Y., Nishizaka, T.

The Journal of Physiological Sciences 62 (Supplement 1) S58 (2012)

「ATP 加水分解蛋白質の映画撮影」

学会誌 300号記念 若手研究者から「生物物理の未来に寄せて」 政池知子

日本生物物理学会誌 生物物理 52,108-109(2012)

「Following the Random Walk: Howard Berg 先生インタビュー」 小嶋誠司, 政池知子, 南野徹, 宮田真人 日本生物物理学会誌「生物物理」54, 4. 227-229, (2014)

「新しい偏光イメージングとトラッキング技術」

木下佳昭, 政池知子, 西坂崇之

DOJIN BIOSCIENCE SERIES 17 1 分子生物学 第 14 章 P193-194 化学同人 (2014)

「蛍光偏光イメージング」

西坂崇之, 政池知子

発光の事典 ―基礎からイメージングまで― 7.3.7 章 朝倉書店 (2015)



# 研究報告書

# 「DNA複製フォーク複合体の構築原理及び遷移・制御機構の解明」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成24年10月~平成28年3月

研究者: 真柳浩太

# 1. 研究のねらい

本研究は DNA の複製・修復・組換え(Replication, Recombination, Repair)に関与する所謂3 R関連蛋白質群、なかでも遺伝情報の継承の根幹をなす DNA の複製装置であるレプリソームの機能と構造の関係を電子顕微鏡による単粒子解析を用いて解明することを目的とする。これら3R 系は互いに、とりわけ密接にカップルしており、特に修復の異常は直ちに癌などの重篤な疾患に繋がるため医学的にも注目されている。近年、個々の3R 関連蛋白質に関しては、主に結晶構造解析研究の結果から多数の原子構造が明らかになり、各反応の活性中心、反応機構についての構造的知見は蓄積されてきている。しかしながら、実際の生体内ではこれらの蛋白質は巨大な超分子複合体として DNA に結合しており、綿密に制御されることで複雑な一連の反応をスムーズに行っている。また反応の各段階で新たに蛋白質因子をリクルートし、或は余分な因子を解離させることによって適切に複合体を再編成させている。したがって、このシステムの機構を理解するためには個々の蛋白質の構造のみでは不十分であり、反応の各段階で遷移していく複合体の全体構造の解析が必須であるが、一般的にこれら複合体の結晶化が困難であるため、レプリソームやリペアロソーム等の実体についての立体構造的知見は乏しいのが現状である。

電子顕微鏡はナノメーター領域に威力を発揮し、また生理的条件下で試料の機能的構造を直接可視化できる利点がある。本研究では PCNA をはじめとするレプリソーム関連タンパク質と DNA からなる超分子複合体の機能構造を解析し、結晶の高分解能データの知見を最大限に活用し、変異体解析、計算機によるモデリング技術を加えてより詳細な解析を行うことで、電子顕微鏡データと有機的に融合していく。この様なアプローチにより複製フォーク複合体の構造学的実体に迫る情報を獲得し、その構築・再編及び反応制御機構の分子レベルの理解に貢献することが本研究の主要な目的である。これと同時に新規電子顕微鏡観察技術、画像解析・構造解析技術や、複合体の安定条件の迅速検索法、新規分子ラベル法等、超分子複合体の解析に必要な新規技術の開発を行っていく。

# 2. 研究成果

#### (1)概要

DNA の複製は、リーディング鎖においては連続的に DNA の重合が行われるのに対して、 ラギング鎖では断続的に、多数の岡崎断片の形成及び連結によって行われる。本研究においては、因子の切り換えがより頻繁に起こるラギング鎖に注目し、複製因子と PCNA、DNA から構成される複製フォーク複合体の構造解析を行った(テーマ A)。

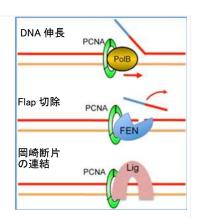
ラギング鎖においては、ポリメラーゼ(PolB)による DNA 伸長、FEN による Flap 切断、リガーゼ(Lig)による岡崎断片の連結が繰り返し行われる。各因子は全て基盤分子 PCNA3量体リン



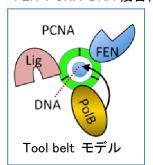
グに結合することから、因子を3つとも常時保持し効率をあげる tool belt モデルが提唱されている。

その一方で、PCNAに結合するタンパク質の数は既に50種を超えており、また反応ステップ毎に該当する因子が呼び込まれ、反応後離脱する sequential モデルを示唆する生化学データも報告される等、機構の詳細は全く分かっていない。

精製した複製因子及び DNA から複合体を再構成して、電子顕微鏡による単粒子解析で立体構造を構築し、構築原理及び遷移再編、機能制御の機構を考察した。これまでに



PolB-PCNA-DNA 及び Lig-PCNA-DNA 複合体の構造を得ていたので、残る3つ目の FEN-PCNA-DNA 複合体の解析から着手した。続いて tool belt モデルの検証や、因子切り換



えの中間状態を調べるため、複製因子を複数含んだ Lig-FEN-PCNA-DNA 複合体等の解析を行った。更に、近年飛躍 的にその性能が向上した電子直接検出カメラを用いて、研究開始 当初は解析が困難であったクライオ電子顕微鏡法による解析にも 着手した。

MCM を中心に構成される複製ヘリケース複合体の解析も平衡して行い、その構成因子である MCM オリゴマーや、GAN-GINS 複合

体の単粒子解析を行った(テーマB)。

解析する系が複雑になるに従い、構成因子の標識技術の導入・開発が必要となる。DNAの可視化、特に単鎖領域の可視化は電子顕微鏡を用いても極めて困難であるため、DNA末端の可視化用標識の開発を行った(テーマC)。

#### (2)詳細

# 研究テーマA (複製因子-PCNA 複合体の構造解析):

精製した各因子から複合体を再構成し、安定な組み合わせを電気泳動、ゲルろ過、そして電子顕微鏡観察などで探索した。安定な条件が得られたものについては単粒子解析を開始し、3次元マップの構築、及びその精密化を行い、各因子の結晶構造をマップに当てはめることで、原子モデルを構築した。更に、より高分解能化を目指し、近年飛躍的に性能が向上した電子直接検出カメラを用い、クライオ電子顕微鏡法による凍結試料の解析を行った。

#### 1) FEN-PCNA-DNA 複合体

FEN は DNA ポリメラーゼが形成したプライマー構造を認識しこれを切断、リガーゼが連結可能なニックを形成する。FEN と PCNA(Sakurai et al., 2005)、FEN と DNA (Tsutakawa et al., 2011) の結晶構造は既に明らかになっていたものの、FEN-PCNA-DNA 複合体は未だ解かれていなかった。 DNA 基質としてフラップ構造をもつオリゴ DNA を精製し、FEN、PCNA と混合して複合体を再構成、ゲル濾過によって精製を行った。 野生型 FEN は通常のフラップを切断してしまうので、切断箇所の DNA の分岐領域を S 化することで、安定な複合体の形成を試みたが、FENのヌクレアーゼ活性が予想以上に強く、反応を抑えきれないことが明らかになった。 そこでFEN の活性部位のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体 FEN を用いて解析を行い、



PCNA のリング上に FEN、PCNA リングを貫通し且つ FEN と結合する DNA を可視化することに成功した。この構造は FEN-PCNA の結晶構造から予想されたものとは異なっていた。これまでに我々は PolB-PCNA-DNA 及び Lig-PCNA-DNA 複合体の構造を明らかにしており、本複合体の解析によって、ラギング鎖の複製における重要な3つの反応ステップを担う複合体の解析を完結することができた。

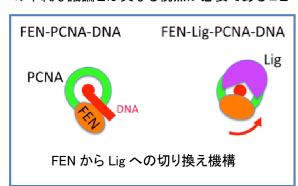
本複合体は分子量が15万程しかなく、これまでは凍結試料の解析が困難であった。しかしながら次項の FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体の解析の結果、本複合体でも電子直接検出カメラを用いることで解析が可能であることが分かり、クライオ電子顕微鏡観察を開始し、凍結条件の検討を行った。

# 2) FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体

以前に解析した Lig-PCNA-DNA 複合体において、クランプを形成する3つの PCNA サブユニットのうち2つは Lig と結合していたが、3番目の PCNA は空いており、ここに FEN 分子が結合できることが示唆された。実際に4つの構成因子から複合体を再構成し単粒子解析を試みたところ、FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体の構造を初めて明らかにすることができた。

この構造は前述の FEN-PCNA-DNA によるフラップ切除から、次の岡崎断片連結を担う Lig-PCNA-DNA 複合体へ移行する中間状態に相当する。 FEN 分子が反応後も複合体中に留まり、次のライゲーション反応の担い手である Lig に DNA を正に手渡ししている様子を可視化することができ、切換え機構を考察する上で重要な知見を得る事ができた。 本研究による結果からは PCNA クランプを「単なる留め金」とは捉えることができず、またこれまでの「ツールベルト」か「シーケンシャル」か、という二者択一の単純な議論とは異なる視点が必要であること

を示す。FEN 分子はフラップを解消した後も留まり、PCNA のむしろ中心側へシフトして、DNA を押し込むように「手渡し」している様子を捉えていた。このような DNA hand over(手渡し)或は、DNA をリレー競技のバトンに見立てた DNA baton pass モデルは塩基除去修復に関する報告で言及され(Wilson & Kunkel, 2000)、また FEN



の構造解析においてこれを引用する記述(Tsutakawa et al., 2011)がみられるものの、同一の PCNA 上の異なる2つの因子間で実際に行われているところを可視化したのは今回が始めて である。

更にこの複合体を本プロジェクトで導入した急速凍結装置 EM-GP(Leica)、及び所属研究所に既設の極低温電顕 Polara (FEI)を用いて凍結条件を検討し、良好な条件を得ることができた。得られた条件のもと、作成した試料を電子直接検出器で観察し、2次元平均像において DNA の螺旋構造の可視化に成功した。立体構造解析に関しては、現在氷中の分子の向きに偏りがあり、高分解能の解析には至っておらず、負染色と同程度の解析(分解能15Å)に留まっている。



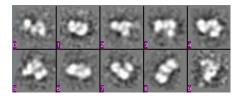
# 3) Him-PCNA-DNA 等その他の複合体

古細菌の Hjm ヘリケースは大腸菌の RecQ やヒトの Hel308 の機能ホモログであり、複製フォークの進行停止の際に DNA の修復に寄与する DNA ヘリケースである。Hjm-PCNA-DNA 複合体をゲル濾過で精製し、単粒子解析で立体構造を再構築、用いた DNA の全長を含む各因子の可視化に成功した。しかしながら現時点では低分解能に留まっており、特に Hjm の向きについては恣意性が残る。また PolD に関しては PolB 同様 PCNA との相互作用が確認されているが、PolD 単独の解析に留まっており、PolD-PCNA-DNA 複合体の立体構造解析には至っていない。

# 研究テーマ B (複製ヘリケース複合体の構造解析)

複製ヘリケース CMG 複合体は MCM の6量体と GINS4量体、及び CDC45 から構成される。 GINS 及び古細菌の CDC45 ホモログの GAN を精製し、両者の相互作用を調べたところ、非常に安定な複合体を形成することが明らかになった。 再構成した GINS-GAN 複合体をゲル濾過

により精製し、電顕で観察、単粒子解析を行った。 2次元平均像解析の結果、本複合体が非常に柔軟な構造をもつことが明らかとなった。この他 MCM オリゴマーの観察等を行ったが、MCM、GINS、GAN、DNA の全てからなる複合体については、未だ最適な複合体再構成条件を得るに至っていない。



GINS-GAN 複合体の2次元クラス平均像

# 研究テーマ C (新規解析手法の開発)

# 1) DNA の高次構造体を利用した標識法

複合体の構成因子が増えて複雑になるにつれ、たとえ立体構造が得られても、分子間の境界が明確でなく、個々の蛋白質や DNA の原子モデルを組み込む事が困難になってくる。そのような場合、ターゲットの因子を標識することが極めて効果的な場合がある。これまで電子顕微鏡では主として金属クラスター等の高密度の標識を用いてきたが、単粒子解析では標識としてターゲットと同程度の密度のもの、即ち蛋白質や DNA を用いた方が有効な場合も多い。

本研究課題の先行研究においてストレプトアビジンを標識に用いて、DNA 末端の同定に成果を上げてきたが、高分解能の解析の際にはストレプトアビジン 4 量体(約60kD)は標識として必要以上に大きいことも分かってきた。

そこで DNA 末端を DNA の高次構造を用いて標識する方法を試みた。2重鎖の両端に DNA 高次構造体を形成する反復配列を付加したところ、設計通りアレイ状 DNA が形成されることを単粒子解析で明らかにした。この標識法は単に標識部の配列を付加するだけで、事前の精製等も必要なく、大変簡便に利用できることが分かった。また実際のタンパク質-DNA 複合体において、本標識を用い設計通り標識部が可視化されることを確認できた。

#### 2)金支持膜によるクライオ電子顕微鏡の改善

電子直接検出カメラによる高速撮影の結果、凍結試料の観察において、電子線の照射により観察している粒子が動くことで分解能が向上しなかったこと、画像処理によりこのブレを補正することで飛躍的に分解能が向上することが近年明らかになった。更に従来の炭素から金



に試料支持膜を変えることで、この現象自体を大幅に抑制できるという報告があった。現時点で国内では電子直接検出カメラは未だ一般的に普及している状態ではなく、マシンタイムも不足している。この金の支持膜の効果を調べ、本プロジェクトのターゲットに対して最適化するため、金薄膜の厚さを再現性良く制御可能なスパッタ装置を導入し、凍結試料を作成、電子顕微鏡で観察した。現在、電子直接検出カメラによる、粒子揺動抑制の効果の測定には至っていない。しかしながら、炭素支持膜による過剰な吸着作用が抑制されることによって、観察可能な氷中の複合体粒子の数が大幅に増加する等、試料の質の向上が確認できた。

# 3. 今後の展開

本研究によって、複製因子が切り替わる際の中間状態を明らかにすることができ、DNA の「手渡し」(或は「バトンパス」)機構を初めて可視化することができた。今後は DNA 基質を変えることで中間状態の前後のステップの可視化や、PolB 等の他の複製因子間での切り換え機構を調べる。また、電子直接検出器によって高分解能の解析の可能性が示されたので、試料作成条件の検討を行い、高分解能の立体構造解析を目指し、原始レベルでの切り換え機構の考察を行う。

# 4. 評価

# (1)自己評価

#### (研究者)

複製因子-PCNA 複合体の構造解析に関しては、FEN-PCNA-DNA 複合体の構造を得ることで、ラギング鎖における重要な3つの3者複合体の構造解析を完結することができた。また次のライーゲション反応への過度的状態である FEN-Lig-PCNA-DNA 複合体の構造解析も進展し、2つの因子の間で実際に「DNA バトンパス」がなされる様子を初めて可視化することができるなど、概ね当初の計画通りの成果を達成できたと思われる。

単粒子解析に関しては近年、研究開始時には想定できなかった革新的な検出器の進化がみられ、本研究においても急遽取り組み、高分解能の解析の可能性を示すことができた。 今後は早急に同新技術により高分解能の解析を完遂することが急務であると考える。

PCNA は複製のみならず、DNA の修復、転写に関わる様々な因子と結合することから、本研究は他の DNA 代謝に関わる超分子複合体の制御機構の解明にも、直接繋がる可能性が高い。また本研究で培われた解析技術も、これらの超分子複合体の解析に応用可能であると考えている。

一方、複製ヘリケース、複合体ヘリケースに関しては、上記のテーマAに注力したこと、安定な複合体の再構成条件を得るのが困難であったため、複合体全体の解析に進展しなかった。最近、海外で MCM 複合体の電子顕微鏡による高分解能の解析が報告された(Li et al., 2015)が、DNA については可視化されておらず、DNA の2重鎖から単鎖への巻き戻しの機構も全く未知のままである。この系についても解析を進めて行く必要がある。

標識技術については、簡便で実効性のある DNA 末端標識が得られた。本標識は AFM 等の他の可視化技術にも応用可能で、汎用性は高いと考えている。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での



評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。 (研究総括)

PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)を介して DNA に結合する DNA polymerase 複合体の構造をクライオ電顕で単粒子解析し、分解能は低いが DNA が含まれた構造を解明することに成功し、新たなメカニズムを提唱した。しかし、まだ分解能が低く、論文発表には至っていない。

今後は、電子直接観察検出器(DED: Direct Electron Detector)のマシンタイムを確保して、 高分解能構造を得る努力をするのが急務であると思われる。

# 5. 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

 Kozo Takeuchi, Tatsuya Nishino, Kouta Mayanagi, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Testuya Hori, Hitoshi Kurumizaka, Tatsuo Fukagawa. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA. *Nucleic Acids Research* (2014), 42(3):1644-1655.

#### 著者. 発表論文タイトル. 掲載誌名. 発行年, 巻号, 始頁-終頁, その他

2. Shinji Aramaki, Kouta Mayanagi, Kazuhiro Aoyama, Takuo Yasunaga. Revealing the intracellular ultrastructure of filopodia with cryo-electron tomography. *Microscopy* (2014) **63**: 133–134.

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

# (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等) 学会発表

- 1. Kouta Mayanagi, Molecular Architecture and Regulation Mechanism of DNA Replication Fork Complex Revealed by Single Particle Analysis. IGER International Symposium on Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies, Nagoya, 2015 年 1 月 15—16 日(招待講演)
- 2. Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Sonoko Ishino, Ryosuke Fujikane, Mihoko Saito, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kouta Mayanagi Single particle analysis of molecular architecture of DNA replication fork complex and switching mechanism of replication factors. 18th International Microscopy Congress, Prague Czech Republic, 2014 年 9 月 8 日
- 3. Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Sonoko Ishino, Mihoko Saito, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Molecular architecture and switching mechanism of the replication fork complex Gordon Research



Conference, Three Dimensional Electron Microscopy, Girona, Spain, 2014年6月23日

- 4. 真柳 浩太 DNA 複製に関与する超分子複合体の単粒子解析、日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム、名古屋、2013年 11月 16日(招待講演)
- 5. Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Sonoko Ishino, Mihoko Saito, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Electron microscopic analysis of molecular architecture and switching mechanism of DNA replication fork complex, ICSG2013-SLS, Sapporo, 2013 年, 7 月 30 日-8 月 31 日

# 総説

真柳浩太、単粒子解析で迫る DNA 複製フォーク複合体の機能構造連関. 顕微鏡、(2014)、49(2): 110-117.(査読有)



# 研究報告書

# 「クロマチン構築に連携した転写dynamicsの構造解明」

研究タイプ:通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月~平成 28 年 3 月

研究者: 山田和弘

# 1. 研究のねらい

真核生物の細胞核は、数 μm 幅の球状領域であるが、その微小空間に、直径僅か 2nm とはいえ合計長さが 2m に及ぶ染色体 DNA が収納されている。この高度に DNA を凝集・パッキングする機構を支える基本単位がヌクレオソームと呼ばれる円盤状の構造である。この構造では 4 種類の塩基性タンパク質・ヒストン(H2A, H2B, H3, H4)がそれぞれ2コピーずつ集まり、ヒストンオクタマーを構成し、これに二重鎖 DNA が反時計回りに約 1.75 周回巻き付いてヌクレオソームとなる。このヌクレオソーム構造は、染色体 DNA 上におおよそ数十 b.p.毎に存在し、理論的には beads on the string(10nm 構造)と呼ばれる 1 次元的な周期構造を成するが、各ヌクレオソームは、実際には相互に作用し合い two-start-model(30nm 構造)と呼ばれる 3 次元的に幅のあるファイバー構造を形成する。この繊維状の高次構造が、染色体の凝集やパッキング機能の根幹を成す機構である。

染色体上のコード遺伝子はエピジェネティクス的に活性化されると、この高次ファイバー構造は unfold されることが観察されているが、その状態下でも 10nm 構造は染色体構造に残ると予想される。この 10nm 構造にある周期的なヌクレオソームは、転写伸長時の RNA ポリメラーゼ (Pol-II)にとって mRNA 伸長反応の物理的な障害となるが、種々の実験から Pol-II 自身には転写前方にあるヌクレオソームを解体・取外し転写を継続する活性が極めて低いことが証明されている。従って、in vivo に於ける転写時には、Pol-II に種々の補助因子、例えばヒストンシャペロン因子・クロマチンリモデリング因子等が結合して超分子複合体を形成し、これがヌクレオソームを解体・撤去・再構築しつつ、同時進行で mRNA の転写伸長反応を促進することが想定されている。

しかしながら、この機構を支える超分子複合体に関しては、それに含まれる分子種の多数が大よそ同定されたとはいえ、あくまで proteomics データ解析の段階に留まっており、複合体に含まれる分子の stoichiometry を初めとして、その物理化学的安定性やヌクレオソームに対する生化学的機能など、構造生物学的アプローチを開始する前段階のレベルに於いても不明な点が多い。本研究ではこの現状を踏まえ、酵母に於ける超分子複合体の物理化学的解析・生化学的解析から研究をスタートをさせ、この研究結果を足掛かりに、Cryo 電顕・X 線結晶解析を用いた原子レベルでの構造解析に繋げ、これらの統合的データから超分子複合体の持つヌクレオソームプロセス反応と転写伸長反応の両者機能リンクの詳細を、構造生物学的に明らかとすることを目標とした。

# 2. 研究成果

# (1)概要

ヌクレオソーム構造を物理的に disassemble しつつ mRNA の伸長反応を促進する役割を持つ因子群の組合せは in vivo に於いて幾つか考えられる。しかしながら、そのうちの minimum



essential なものは、クロマチンリモデリング因子 CHD1(C)、ヒストンシャペロン因子 FACT(F)、これら両者を Pol-II と物理的・機能的にリンクしつつ modulate させる役割を果たす PAF1c(P) の、計3因子モジュールで構成される複合体に相当する点がこれまでの proteomics 解析から示唆されている。但し、研究の狙いの項で説明したように、これら3因子で構成される複合体への解析は、生化学解析の段階ですらその詳細は不明である。そこで、本研究を進めるにあたり、

- ① PAF1c-FACT-CHD1(PFC)複合体が、実際に溶液中で安定な複合体を形成出来るのか
- ② PFC 複合体は、inter-及び intra-module 間でどの様な stoichiometry を持つのか
- ③ PFC 複合体は、ヌクレオソームに対し実際にどの様な生化学的プロセス機能を持つのか
- ④ ①が可能として、PFC 及び PFC-nucleosome 複合体の電顕観察像は実際にどの様な形状なのか及び、これらに対する direct electro detector+CryoEM の組合せでの原子分解能構造解析の見込みはどの程度なのか
- ⑤ PFC 及び PFC-nucleosome 複合体に対する結晶化の試みと X 線結晶構造解析の見込み はどの程度なのか
- ⑥ PFC 複合体の機能が③で確認されたとして、この複合体は実際に Pol-II と更なる超分子 複合体を形成出来るのか

及び、この複合体に対する CryoEM 解析成功の見込みはどの程度か」

の各項を中間達成目標として定め、これらを順に進めることにより、最終目標である⑥項の達成を可能ならしめる戦略を立てた。なお、各項目に対する研究の進捗・達成状況は次項説明に譲るが、現在、①及び②項の解析は終了し、③項に於いては、PFC 複合体がヌクレオソームをプロセスする活性を、生化学的解析法によって検出済みである。④項は、GraFix 法によるサンプル精製と負染色法(NS)-単粒子解析法により NS グリッド上で良好な粒子像が得られており、その EM-3D 再構成も一部計算されている。しかしながらこの手法では、得られるデータの分解能とそこから導き出される生物学的意義に限界が存在する為、今後は原子分解能データ取得が見込める direct-electron-detector + Cryo 電顕解析を推し進める計画で、PFC複合体に関しては、対象粒子のクライオグリッド上の分散が良好な像が得られている。⑤⑥に関しては、今後研究を始める予定である。

# (2)詳細

① PAF1c-FACT-CHD1(PFC)複合体が、実際に溶液中で安定な複合体を形成出来るのか

Pはそれぞれ異なる5つの component, Fは2つの hetero-component, Cは単独 component からなるモジュール因子であるが、MultiBac タンパク質共発現システムを用いた昆虫細胞系で、各因子のタンパク発現とその可溶化を実現した。C 及び F に関しては既にその stoichiometry は既知であるが、Pに関してはこれに相当するデータ報告がない。そこで、ゲル ろ過と多角度光散乱法を組み合わせた計測法(SEC-MALS)により、その stoichiometry を解析したが、それぞれの component は monomeric で構成されている結果が得られた。また、PFC 複合体の in vitro 再構成方法を確立させると共に、ゲルろ過中で安定な複合体を維持することを確認した。



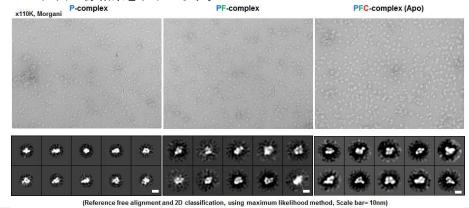
# ② PFC 複合体は、inter-module 間でどの様な stoichiometry を持つのか

PFC 複合体のみならず、PF, PC, FC の各複合体に関しても SEC-MALS 及び沈降速度法 (Sedimentation Velocity [SV])・沈降平衡法(Sedimentation Equilibrium [SE])を適応した超遠心 分析(AUC)により、モジュール間 stoichiometry の問題を解決した。結論的には、PF, PC, FC の 各複合体は、それぞれ 1:1、PFC 複合体は 1:1:1 の inter-module stoichiometry であることが判明した。なお、Sedphat プログラムを用いた SE-AUC 解析により、P-F, P-C, F-C 間の解離定数(Kd)も算定可能となり、それぞれ 3.7nM, 11nM, 738nM の数値が得られた。

③ PFC 複合体は、ヌクレオソームに対し実際にどの様な生化学的プロセス機能を持つのか 酵母のヒストン H2A, H2B, H3, H4を用いたヌクレオソームを作製し、これを基質とした反応 系に PFC 複合体と ATP を加え、time-course で反応をトレースしつつ native-PAGE を用いて その product がどの様に現れるかエチジウムブロマイド(EtBr)で染色観察した。現段階では、 まだ preliminary な結果が得られただけであるが、PFC による反応は ATP 水解依存的である ことが観察され、反応前基質であるヌクレオソームはヒストンと DNA に解離されることが確認 出来た。。

# ④①が可能として、PFC 及び PFC-nucleosome 複合体の電顕観察像は実際にどの様な形状なのか及び、これらに対する direct electro detector+CryoEM の組合せでの原子分解能構造解析の見込みはどの程度なのか

②の inter-module 間の解離定数の結果から、PFC 複合体以外にも PF 複合体は溶液中で安定して存在することが示唆された。従って、単粒子電顕解析のサンプル調製に於けるターゲット複合体は、その分子の安定性・分子量から判断して P, PF, PFC の計 3 者を電顕解析の対象とした。当初は、酢酸ウラニウムを染色剤として用いた負染色(NS)法を適応したが、その際の染色剤塩濃度の為、対象粒子に解離の傾向が見られた。その為、通常方法による NS グリッド作製を諦め、代わりとしてグリセロールとグルタルアルデヒドの濃度勾配を利用した GraFix 法を適応して対象粒子に共有結合を導入し複合体を安定化させると共に、グリセロール濃度勾配により対象粒子を分子量で分画精製した。なお、GraFix 法で調製したサンプルを用いての NS グリッド像結果を以下に示す。



他方、Cryo 電顕解析の進捗状況であるが、PFC 複合体に関しては、粒子分散の良好なクライオグリッド調製条件がほぼ固まり、2016 年早々に複数のクライオグリッド作製及び Titan Krios によるデータ収集を開始する予定である。なお、PFC-nucleosome 複合体についても、材

料調製が完了次第、クライオグリッド調製条件の最適化に入り、これが済めば同様に Titan Krios によるデータ収集を開始する計画である。

# ⑤PFC 及び PFC-nucleosome 複合体に対する結晶化の試みとX線結晶構造解析の見込みはどの程度なのか

これまで500種類以上の結晶化条件を利用して、P, FC, PFC それぞれの結晶化を試みたが、一つの結晶化成功の条件も得られていない。これらの理由として、5 つの component で構成される P 因子上に Intrinsic Disorder(ID)領域[自分自身単体では 2 次構造や fix ループ構造など、特定の構造体を取らない]が残っており、これが結晶化の障害になっていると考えている。この ID 領域は真核生物の核内因子に頻繁に見られ、構造解析を行う際に取り扱いの厄介な領域の一つである。しかし一方で複合体を形成する際の重要な認識ループに関わる場合があり、この領域を遺伝子コンストラクトの際に安易に除くと、却って複合体を形成しなくなる恐れがあり、慎重な取り扱いが求められる。このような背景の元、タンパク分解酵素を用いた従来の限定分解解析法に代わり、重水素交換と質量分析装置を組み合わせた手法で ID 領域を検出するのが妥当と予測しており、これらの結果を現在使用している遺伝子コンストラクトの再構成にフィードバックする計画である。PFC 及び PFC-nucleosome 複合体の結晶化成功の確率は、このフィードバック以降の結果にかかっていると予測している。

# ⑥PFC 複合体の機能が③で確認されたとして、この複合体は実際に Pol-II と更なる超分子複合体を形成出来るのか及び、この複合体に対する CryoEM 解析成功の見込みはどの程度か

Preliminary な生化学解析結果ながら、PFC 複合体が nucleosome をプロセスする機能が確認された。従って、今後はつくば高エネ研の千田教授・安達助教との共同研究を通じて Pol-II を入手し、PFC-Pol II 間の結合能のチェックと安定性確認をゲルろ過解析で行い、これらの結果が良好ならば、クライオ電顕解析を開始する予定。本項目の解析対象としては、Pol-II-PFC 及び Pol-II-PFC-nucleosome の計 2 種類を考えている。

#### 3. 今後の展開

本研究の直接の成果となる最初の論文は、PFC の物理化学的性状解析(解析終了)とその生化学的解析(解析中)及びPFC, PFC-nucleosomeのクライオ電顕解析(解析中)の各結果を統合して発表する予定である。この論文完成後は、①PFC及びPFCとヒストン複合体の結晶化とそのX線構造解析、②Pol-IIとPFCの2者複合体及びPol\_-II-PFC-nucleosomeの3者複合体のクライオ電顕解析を次なる研究項目に掲げている。これら2つの項は、達成毎に論文として発表の計画である。なお、今後発表予定の論文に上記①②項の内容が加われば、本さきがけ研究課題である「クロマチン構築に連携した転写 dynamics の構造解明」を、ほぼ達成出来得る成果になると考えている。

#### 4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況



2.(2)項で述べたように、本研究を遂行するにあたり6つの達成目標を掲げた。これらのうち、今の段階で完全に達成出来た目標は①②のみであり、③も preliminary なデータながら対象分子の活性が確認されているとはいえ、論文掲載に必要なデータ収集には、あと数ヶ月かかる見込みである。他方、④~⑥の構造生物学的研究に関しては、ほぼ達成されたと言える項目は、GraFix による NS 単粒子解析だけであり、大部分の項目が研究途中である。従って、全体的な研究達成の概況としては、50%程度と自己評価している。

# •研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

現在、ドイツ・ハイデルベルグの MPImf 研究所に於いて、一人の研究補助員を雇い、電顕解析及び試料調製の観点から、2 箇所の研究室と共同研究を進めている。本研究を遂行する上で、人員的には今の体制で充分であるが、今後も電顕解析を継続し最初の論文を発表するまでに、最低 1 年程度は掛かると予想している。その為、さきがけサポート期間終了後の研究費を獲得する為、ドイツ国内でグラントを申請中である。

# ・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究を遂行するにあたり 6 つの達成目標を掲げたが、これらを全て達成できれば、本研究課題である「クロマチン構築に連携した転写 dynamics の構造解明」の具体的命題に全て答えることが可能となる。これらの命題証明は、構造生物学的に殆ど未開拓ともいえる"クロマチン構造中の転写メカニズムの詳細"に初めて言及するものとなり、この基礎生物学分野の学問的発展に大きく寄与する点は間違いない。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

#### (研究総括)

RNA polymerase がクロモソームを乗り越える超分子複合体のクライオ電顕解析を行うべく、厳密な生化学解析(ゲルシフト、光散乱、超遠心分析)を行い、stoichiometric な複合体の形成を確認でき、ネガティブステイニングによる低分解能構造がわかった点は評価できる。

調製の困難な複合体なので、進捗が早くないことはやむを得ないが、試料調製や stoichiometry も慎重に確認しているので、電顕での構造解析をもっと強力におし進め、マシンタイムが確保しやすいのであれば負染色も積極的に行うべきである。今後の複合体の解析に期待したい。

#### 5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

なし

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等) なし

