

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名： 低分解能生体超分子像からの原子構造構築技法

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

#### 研究代表者

由良 敬 ((独)日本原子力研究開発機構 システム計算技術センター 研究副主幹)

#### 主たる共同研究者

川端 猛 (奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 准教授)

石田 恒 ((独)日本原子力研究開発機構 量子ビーム応用研究部門 研究員)

松本 淳 ((独)日本原子力研究開発機構 システム計算技術センター 研究員)

岩崎 憲治 (大阪大学 蛋白質研究所 准教授)

### 3. 研究内容及び成果

#### 3 - 1. 研究課題全体

ゲノム決定後の生命科学研究では、ゲノムにコードされているタンパク質の立体構造解析が重要である。生体中で実際に機能しているタンパク質は、非常に大きな複合体(超分子)を構成している場合が多く、生体超分子の機能を解析するためには、その原子構造を理解する必要がある。このような生体超分子の立体構造は、電子顕微鏡により明らかになってきている。一方、その構成分子であるタンパク質については、X線結晶解析による立体構造決定が進んでいる。しかしながら、両者の間には10倍程度の解像度差があり、生体超分子中のタンパク質の立体構造が明らかになっているものは少ない。

本研究は、基準振動解析や、新たに開発した混合正規分布モデル法、慣性主軸法、ジオメトリックハッシング法を適用して、電子顕微鏡による低分解能超分子像に、X線構造解析で得られた高解像度要素タンパク質構造のあてはめをコンピュータによる計算で行おうとするものである。

電子顕微鏡像の取得においては、透過型電子顕微鏡を用い、電子線トモグラフィーの手法を適用した単粒子トモグラフィー法を開発している。この手法を用いて、細胞接着分子受容体インテグリン、脳の層構造形成を司る細胞外タンパク質リーリン、DNA修復促進タンパク質PprA、DNAポリメラーゼをDNAにつなぎ止めるクランプとクランプローダーの単粒子解析による3次元構造の取得に成功している。

mRNA からペプチドを合成する酵素リボソームの立体構造解析においては、83%のあてはまり度を達成した。クランプの場合には、手作業で数ヶ月を要して得られた84%の当てはまり度に比較できる77.5%の当てはまり度を、ほぼ数日の計算で得ることが可能となった。

まだ、検証すべき項目は多いが、開発された手法が有効であり、この分野でも注目を集めつつあることは、論文の引用数からも推定できる。有用な成果を挙げたと評価したい。

#### 3 - 2. グループ別

##### 1) 超分子バイオインフォマティクス研究グループ

画像あてはめ法、ホモロジーモデリング法、相互作用同定モデリング法の開発を担当。

要素分子を剛体として扱い、3つの座標データあてはめのアルゴリズムを開発した。混合正規分布モデル法:電子顕微鏡像、X線結晶解析像の要素分子の座標を数個のガウス関数で近似し、重ね合わせの最適値を求める手法。慣性主軸法:X線構造解析像と電子顕微鏡像の3つの慣性主軸を重ね合わせ、微小回転させて最適値を求める。X線結晶解析により生体超分子の原子分解能で判明している場合に適用。

ジオメトリックハッシング法:電子顕微鏡単粒子解析像と要素分子原子分解能座標を3次元グリッドで表

現し、重なり合う数が最大になる配置を求める。

要素タンパク質の粗視化モデリングと複合体のホモロジーモデリングを評価する方法を開発した。粗視化されたタンパク質ドメインのモデル：アミノ酸配列から要素タンパク質の粗視化モデルを構築し、粗いモデルを電子顕微鏡で得た二次元像にあてはめることで、おおよその構造を推定する方法で、ある程度の成功を収めることができている。複合体のホモロジーモデリング：遺伝的にみて共通の祖先由来のタンパク質で構造の分かっているものを見出して、同様な複合体を構成しているかどうかを判断する。この方法で比較的高精度での確な判断ができている様である。

相互作用モデリングでは、要素分子間の界面部位を推定するアルゴリズムを開発している。既に判明しているタンパク質とDNA、タンパク質とRNA、タンパク質とタンパク質の相互作用立体構造から、どの様なアミノ酸残基の集合が、他の要素分子との相互作用面になるかを推定する方法を開発している。

## 2) 生体超分子シミュレーション研究グループ

基準振動解析法、およびあてはめの精密化法の開発を担当。

生体超分子は核酸などを取り込んで活性になっている構造と、不活性な状態の構造は異なっている。不活性型の構造(X線結晶解析像)を活性型の電子顕微鏡単粒子測定像にあてはめる方法として、基準振動解析の手法を導入して構造変化を推定する方法を開発している。この手法をインテグリン複合体に適用して、不活性型から活性型への構造変化を推定出来るようになっている。

電子顕微鏡像にあてはめられたX線結晶解析像の最適化を行うための分子動力学シミュレーション法を開発して、リボソームのあてはめ構造最適化を行いあてはまり度を77-83%に上げることに成功している。

## 3) 生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループ

生体超分子の電子顕微鏡像の提供を担当。

原子分解能要素立体構造のあてはめに耐えうる、十分に信頼性のある三次元低分解能構造を得るために、細胞のオルガネラなどの三次元可視化に用いられる電子線トモグラフィーを改良して、単粒子トモグラフィーの手法を開発して、質の良い生体分子三次元像を得ることに成功した。インテグリン：細胞接着分子受容体インテグリン  $\alpha 2 \beta 1$  の三次元構造を単粒子トモグラフィーで求め、起き上がり型(活性型)と折れ曲がり型(非活性型)の2種類の構造があることを明らかにしている。リーリン：脳の層構造形成をつかさどる細胞外タンパク質リーリンの構造解析を行って、僅か10個の粒子からドメイン一つ一つが区別できるほど明瞭な三次元像を得ることに成功している。PprA：DNA修復促進タンパク質 PprA は、原子力研究開発機構で単離同定されたタンパク質であり、放射線抵抗性細菌の放射線抵抗性を生み出す因子の一つと考えられている。このタンパク質は分子量が31kDaと小さいため、コモンライン法で初期構造を求めている。

クランプとクランプローダー：DNAポリメラーゼをDNAにつなぎ止める分子がクランプとクランプローダーであり、クランプとクランプローダーはDNAと複合体を構成するが、単粒子解析によって、DNAを含むすべての要素分子の構造を明らかにし、クランプが上下に開いていることを明らかにしている。

これらの成果はタンパク質の構造解析に有用であり、タンパク質に機能解析に寄与することを期待したい。

## 4. 事後評価結果

### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		講演		その他 (著作など)		特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
12	0	16	27	3	18	1	3	0	0

発表論文数は多くはないが、まだ執筆中のものも数件あるとのことである。3年間という研究期間と研究の分野を考慮すると、妥当な数といえるであろう。主要な研究が、評価の高い学術雑誌に掲載されている。加えて、発表された時期から考えると、引用数は比較的多いといえそうであり、インパクトは小さくない。知的財産については、プログラムも特許として認められているため、何らかの戦略が必要であろう。

新たに開発した手法により、インテグリン、リーリン、PprA、クランプとクランプロードナーなどの構造のあてはめを行って、あてはまり度80%程度の成果を得ているが、まだ一般化できたというには、解析例が少ないように思われる。さらに解析例を追加して、あてはまり度の向上と一般化を進めていって欲しい。当初設定された目標はチャレンジアブルなものであった。新しいコンピュータをリースで調達して研究を開始しているが、計算量が想定より膨大なものとなり、時間を要した様である。

当初の目標はほぼ達成されている。

#### 4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

掲載された論文の引用回数が多いことから分かるが、タンパク質の構造解析は生化学プロセスの解析には必要不可欠なものである。多くのタンパク質の解析が進み結晶構造や、タンパク質分子のX線結晶構造解析データが公開されている。電子顕微鏡像と生体超分子の機能の解析がなされているが、生体超分子の原子レベルの構造は不明なものが多い。その構造を推定する手法の開発は、誠に時宜を得ており、この成果が今後この分野に大きく貢献することになる可能性がある。そのために、多くの解析例の追加や、解析の精度の一段の向上を期待したい。

#### 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

研究代表者 由良 敬 研究副主幹が、平成20年4月1日付でお茶の水女子大学教授に就任することが内定した。

共同研究者 岩崎 憲二 研究員が、平成17年4月より、大阪大学超高压電子顕微鏡センター特任研究員より、大阪大学蛋白質研究所 助教授に昇任