

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域
「医療に向けた化学・生物分子を利用した
バイオ素子・システムの創製」

研究課題
「低分解能生体超分子像からの
原子構造構築技法」

研究終了報告書

研究期間 平成16年10月～平成20年3月

研究代表者: 由良 敬
((独) 日本原子力研究開発機構システム
計算科学センター 研究副主幹)

1 研究実施の概要

ナノバイオテクノロジーの基礎となるデータは、目的の機能を果たす生体分子の立体構造情報である。タンパク質分子が関与する生体内反応を模倣してナノマシンを開発するのであれば、その動作原理を理解するためには詳細な分子構造を知ることが第一歩である。ゲノムプロジェクトによるゲノム塩基配列決定に続き、ゲノムにコードされているタンパク質の立体構造を可能な限りすべて決定するプロジェクトが世界中で進められている。これらのプロジェクトでは、おもにX線結晶解析の手段を用いて、タンパク質単体の立体構造決定が行われており、これらのプロジェクトの成果はナノバイオロジーの基礎データとなり得るはずである。しかし、結晶化されたタンパク質の構造は必ずしも生体中で機能するタンパク質の構造と一致しない。さらに、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(生体超分子)である場合が多い。このような生体超分子の立体構造は、X線結晶解析によって原子構造を明らかにすることは容易ではない。X線結晶解析で明らかにできるタンパク質の大きさは、せいぜい10nmのスケールであり、約100nm以上のスケールをもつ生体超分子の構造決定は困難を極める。

昨今の技術革新により、電子顕微鏡による単粒子解析の技術を用いれば、生体超分子を結晶化することなく、構造を明らかにすることができるようになってきた。しかし、電子顕微鏡単粒子解析によって得られる分子構造と、X線結晶解析により得られる原子分解能の分子構造とは、一般的には解像度にして10倍以上の差がある。電子顕微鏡を用いて得られる生体超分子の構造では、分子を構成する原子の位置が判明する場合は非常にまれである。よって電子顕微鏡観測によって得られる生体分子の構造情報は、生体分子の機能の詳細を理解するには十分ではない。

このような状況においてなすべきことは、X線結晶解析の手法で明らかになる生体超分子を構成する要素分子の原子分解能構造を、電子顕微鏡単粒子解析で得られる生体超分子全体の低分解能構造にあてはめて、生体超分子の原子分解能構造を推定すること、およびX線結晶解析の手法で明らかになる結晶中の原子分解能生体分子構造を、電子顕微鏡で得られる生体中に近い状態の低分解能生体分子構造にあてはめて、原子分解能の活性型構造を推定することである。現在進行中の構造ゲノミクスによって、多くのタンパク質立体構造が原子分解能で判明しつつあると同時に、電子顕微鏡単粒子解析による生体分子像も多く得られるようになってきている。シミュレーション技術を用いて、これら異なる解像度のふたつの情報を橋渡しすることで、実験により得られるデータをより有効に利用できるようになると考えられる。

電子顕微鏡単粒子解析によって得られる生体分子低分解能構造に要素分子原子分解能構造をあてはめる技法開発のために、タンパク質立体構造のホモロジーモデリング、要素分子間相互作用部位の推定、タンパク質の分子動力学と基準振動解析、電子顕微鏡から得られる画像データ解析の技術が必要である。そこで本プロジェクトでは、これらの技術を扱う3つのグループを設置し、チーム構成員がそれぞれの専門技術を生かしてあてはめ技法の構築をめざすこととした。3つのグループは、生体超分子バイオインフォマティクス研究グループ、生体超分子シミュレーション研究グループ、生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループと称した。

それぞれのチームが3年間で得た成果は以下の通りである。

1. 生体超分子バイオインフォマティクス研究グループ

A. 低分解能画像データに原子分解能座標データあてはめるアルゴリズムの開発

低分解能で得られている生体超分子全体構造に、高分解能で得られている要素分子の構造を最適にあてはめることは、解像度の違いがあるために容易ではない。また要素分子の構造座標がどの程度得られているかに依存して、最適なあてはめ位置を見出す難易度が異なってくる。本グループでは要素分子は剛体として取扱い、いろいろな状況に対応できるように、3つの手法を独立に開発した。

第1の手法は混合正規分布モデル法と称し、すべての要素分子の原子分解能構造が判明している場合に利用する最も汎用的な手法である。電子顕微鏡単粒子解析で判明した生体超分子低分解能全体像とX線結晶解析で判明した原子分解能要素分子座標の両者を、それぞれ複数の三次元ガウス関数で表現し、要素分子由来のガウス関数群を、生体超分子全体像由来のガウス関数群に重ね合わせた最適な相対位置を数値計算で見出す。原子数が非常に多くなった場合でも、分子全体を数個のガウス関数で近似するため、高速なあてはめが可能である。

第2の手法は慣性主軸法と称し、X線結晶解析によって生体超分子全体構造が原子分解能で判明しており、結晶構造解析とは異なる環境で同一の生体超分子の電子顕微鏡単粒子解析結果が得られている場合に用いる。原子分解能で判明している生体超分子構造の3つの慣性主軸を求める。また電子顕微鏡単粒子解析三次元像を、均一の物体と仮定して3つの慣性主軸を求める。それぞれの慣性主軸を完全に一致させた後に、それぞれの構造を三次元グリッド(ボクセル)で表現し、ボクセルの重なり数が最大になるように、原子分解能構造を重心のまわりに微小回転させて、あてはめを精密化する。

第3の手法はジオメトリックハッシング法と称し、一部の要素分子の原子分解能座標しかわかっていない場合のあてはめに用いる。電子顕微鏡単粒子解析による三次元像と要素分子原子分解能座標をそれぞれボクセルで表現し、要素分子のボクセルを生体超分子ボクセルに対して全並進回転移動を考慮して配置し、重なり合うボクセル数が最大になる配置を探す手法である。計算時間が膨大にかかる手法ではあるが、生体超分子における要素分子の位置を確実に見出すことができる。

B. 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

要素タンパク質複合体のモデリングには様々な解像度のモデルとその評価が必要である。

第1のモデルは、粗視化されたタンパク質ドメインのモデルである。生体超分子を構成する要素タンパク質の立体構造は、つねに判明しているわけではない。しかし、昨今のゲノム塩基配列決定プロジェクトにより、要素タンパク質のアミノ酸配列が判明していることは十分期待できる。我々は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られた生体超分子の二次元画像にあてはめることで、生体超分子のおよその内部構造を推定することに成功した(原著論文発表 [2])。

第2のモデルは一部の要素タンパク質の複合体ホモロジーモデリングとその精度評価である。生体超分子の低分解能像に要素分子をあてはめる際に、あてはめ位置が一意的に決定できるとは限らない。そこで生体超分子内でとなりあう要素分子を推定することで、複数得られるあてはめ結果から、より確からしいあてはめ結果を見出す必要がある。その一つの手法として、要素タンパク質複合体のホモロジーモデリングとその精度評価方法を開発した。構造ゲノムプロジェクトの進展により、タンパク質複合体の原子分解能立体構造情報が集まってきている。これらの複合体構造には生体超分子の一部をなすタンパク質と共通祖先由来のタンパク質も含まれるようになってきた。そこで原子分解能で判明したタンパク質複合体が、電子顕微鏡で測定した生体超分子内でも複合体を構成しているか否かを判断する手法を開発し、比較的高精度で適確な判断ができるようになった(原著論文発表 [10])。

C. 要素分子間の界面部位を推定するアルゴリズムの開発

要素タンパク質複合体原子分解能構造がわからない場合でも、要素分子の最適なあてはめ位置を選別するために、要素タンパク質単体の原子分解能構造から、他の要素分子との相互作用面を推定する手法を開発した。すでに原子分解能で判明しているタンパク質とRNA、タンパク質とDNA、およびタンパク質とタンパク質の相互作用立体構造から、タンパク質のどのようなアミノ酸残基が相互作用に関与するかを調べ上げて統計処理をすることで、要素タンパク質の表面でどのようなアミノ酸残基が集まっているところが、他の要素分子の相互作用面になるかを推定することができるようになった(原著論文発表 [1, 6])。

2. 生体超分子シミュレーション研究グループ

A. 不活性型構造から活性化型構造を得るためのアルゴリズム開発

不活性型の生体高分子構造(X線結晶解析構造)を活性型の電子顕微鏡単粒子測定像にあてはめるために、従来はタンパク質を部分構造(ドメイン)に切断し、ドメイン構造単位で電子顕微鏡測定像にあてはめることが行われてきた。しかし、実際には生体分子が切断されて再配置されることで活性化型になるわけではないため、ドメイン構造単位であてはめを実行した場合に、できあがった構造が不活性型構造から物理的に到達できる構造である保証がない。タンパク質を切断することなく変形することでこの問題は解決するが、分子動力学シミュレーションによってタンパク質を変形させることは困難である。そこで基準振動解析の手法を導入してタンパク質の構造変化を推定する方法を開発した。この方法では生体高分子の基準振動解析計算と最低モード方向への微小変化構造構築を反復することで、少しずつ生体高分子構造を変形させ、活性化型構造を推定する。この手法を細胞間情報伝達タンパク質インテグリン複合体に適用することで、不活性型X線結晶構造解析構造を活性化型電子顕微鏡測定像にあてはめることができるようになったとともに、不活性化型から活性化型へどのように構造変化するかを推定できるようになった(Matsumoto, Kamata, Takagi, Iwasaki, Yura 投稿中)。

B. 低分解能画像データにあてはめられた原子分解能構造の最適化アルゴリズム開発

要素分子を剛体として扱ったあてはめの結果を最適化するための分子動力学シミュレーション法を開発した。要素分子を剛体としてあてはめた場合には、原子の異常接近や要素分子の

一部が電子顕微鏡単粒子解析像から大きく外れている部分が発生する。これらはあてはめの問題なのか、電子顕微鏡測定像の解像度の問題なのかはわからない。そこで、電子顕微鏡像にあてはめた原子分解能全要素分子の分子動力学シミュレーションを行い、あてはめを最適化した。シミュレーションの際には、電子顕微鏡測定像から要素分子が大きくずれないようにするために、電子顕微鏡像内に分子が収まるための拘束をかける。拘束を徐々に弱め、シミュレーションの最終段階は、分子動力学で用いる力場だけで構造を最適化することができるようになった。また長距離力である静電相互作用はカットオフを導入することなくシミュレーションをすることが正確なシミュレーションのためには重要であることがわかった(原著論文発表 [9])。上記最適化手法を用いて、ペプチド合成生体超分子リボソームのあてはめ構造最適化を行った。

3. 生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループ

A. 単粒子トモグラフィー法の開発

単粒子解析法における最大の弱点は、最終構造の信頼性を評価する手段がないことである。このために、慎重な構造解析が要求される。特に初期構造は重要であり、得られる結果も初期構造の影響を受けるため、たとえ低分解能であっても正しい構造である必要がある。そこで本グループは、原子分解能要素立体構造のあてはめに耐えうる、十分な信頼性をもつ三次元低分解能構造を他チームへ提供することを目的とし、単粒子トモグラフィーの手法を開発した。この手法は通常、細胞のオルガネラなどの三次元可視化に使われる。試料を電子顕微鏡内で -70° ～ $+70^{\circ}$ まで、あるいは -60° ～ $+60^{\circ}$ まで 1° ～ 2° おきに傾斜させながら撮影し、得られた傾斜像シリーズから逆投影法などの方法により三次元像再構成する。この方法を生体高分子に適用し、信頼性の高い三次元構造が得られるようになった(原著論文発表 [7])。

B. 細胞間接着タンパク質インテグリン複合体単粒子解析

単粒子トモグラフィー法を用いてインテグリンの活性化型と非活性化型の低分解能構造と原子分解能あてはめ構造を得ることができた。その結果インテグリンの活性化メカニズムに示唆を与える結果を得られた(原著論文発表 [4,5])。

C. 脳神経系タンパク質リーリン単粒子解析

単粒子トモグラフィー法を用いて、わずか10個の粒子からリーリンタンパク質の三次元像を得ることができた。(原著論文発表 [8])。

D. DNA修復促進タンパク質PprA単粒子解析

ランダムユニカルティルト法およびコモンライン法を用いてPprA多量体の初期構造を得ることができた。

E. DNA複製に関与する生体超分子クランプ-クランプローダー複合体単粒子解析

クランプとクランプローダーおよびDNAの複合体の電子顕微鏡単粒子解析を、ネガティブ染色した資料を用いて行った。その結果クランプの開閉メカニズムがわかった(原著論文発表 [3])。

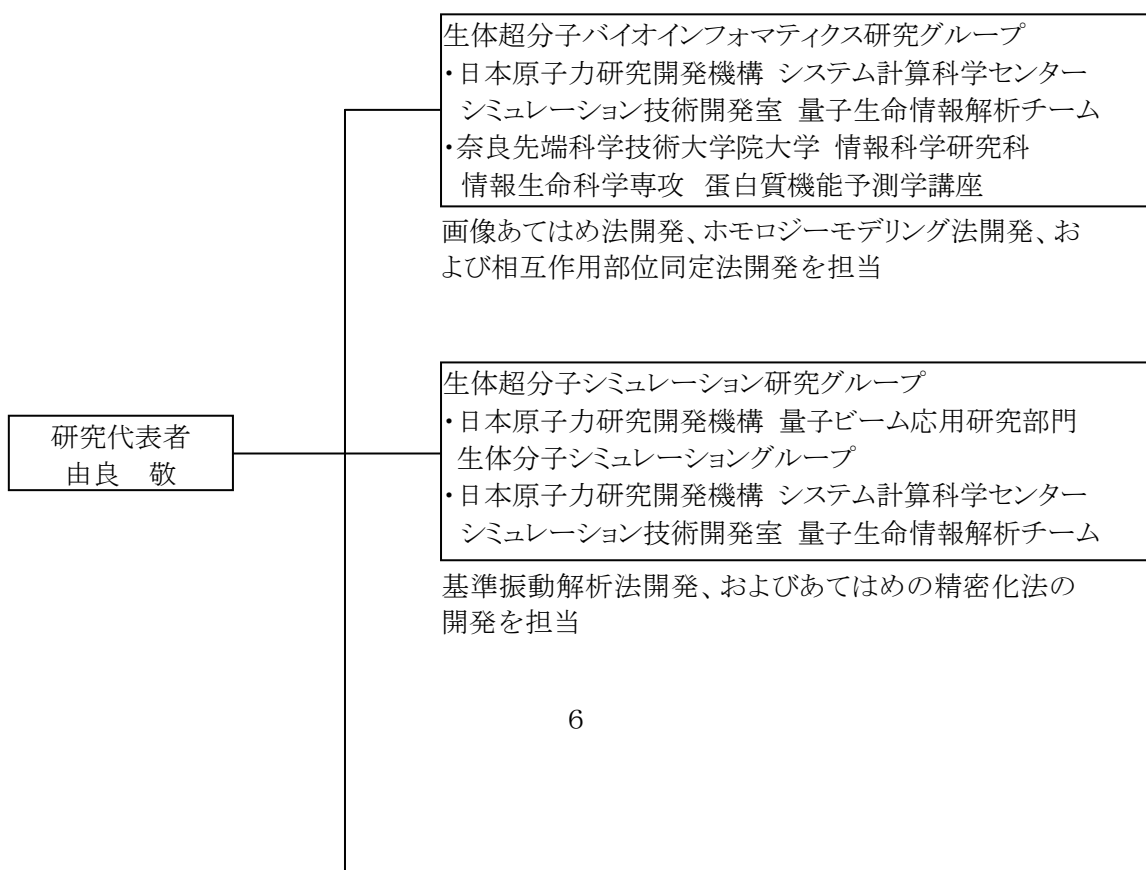
2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本プロジェクトでは、第1年次に次の目標を設定した。(1)画像あてはめ法の開発、(2)ホモロジーモデリング法の開発、(3)相互作用部位同定法の開発、(4)基準振動解析法の開発、(5)あてはめの精密化法の開発、(6)実データ取得および、(7)実データへのあてはめ手法適用。本プロジェクトではこれらの目標を達成するために、3つの研究グループ(生体超分子バイオインフォマティクス研究グループ、生体超分子シミュレーション研究グループ、生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループ)を置き、(1)～(3)は生体超分子バイオインフォマティクス研究グループが担当、(4)～(5)は生体超分子シミュレーション研究グループが担当、(6)は生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループが担当し、(7)は全員で実行することとした。第1年次(6ヶ月)には、目標項目に対応した技法を各研究者が開発し、最初の開発を第2年次前半までに完了させる。生物学的に重要な生体超分子の電子顕微鏡単粒子測定は継続的に行う。第2年次中旬までには技法を接続し、構築技法を実現したツールのプロトタイプを完成させることとした。そのツールを用いて、構造既知生体超分子の構造再構築を行う。ここまでにツールの問題点を明らかにし、問題点の整理および経験的に理解したツールの特性にもとづき技法を改良し、第3年次には試験版を構築することとした。第4年次(6ヶ月)にはマニュアルを整備するとともに、生物学的に特に重要な生体超分子の構造決定に挑戦することとした。

研究開発の展開において、X線結晶解析で判明する不活性型のタンパク質構造を電子顕微鏡単粒子解析で判明する活性型タンパク質の構造にあてはめるために、不活性型構造から活性型構造を推定することが重要であることが明らかになり、(4)の中に活性化型構造の推定を含めた。

(2)実施体制



生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループ

・大阪大学 蛋白質研究所 プロテオミクス総合研究センター
プロテオーム物質創製研究系

・生物分子工学研究所 構造解析研究部

実データ取得を担当

3 研究実施内容及び成果

3.1 画像あてはめ法開発、ホモロジーモデリング法開発、および相互作用部位同定法開発(日本原子力研究開発機構、奈良先端科学技術大学院大学 生体超分子バイオインフォマティクス研究グループ)

A. 高分解能構造の低分解能像へのあてはめ法の開発

A-1. 混合正規分布モデル法(川端)

(1)研究実施内容及び成果

複合体の低解像度三次元画像に、高解像度単量体の原子モデルを重ね合わせて、高解像度の複合体モデルを作成することが本研究の目的である。この計算は本質的に多量体のドッキングの計算であるため、複雑な探索計算が必要となる。また、低解像度であっても三次元画像の画素数は10万から100万程度の非常に大きな数となるため、原子モデルと複合体画像の重なりをチェックするた

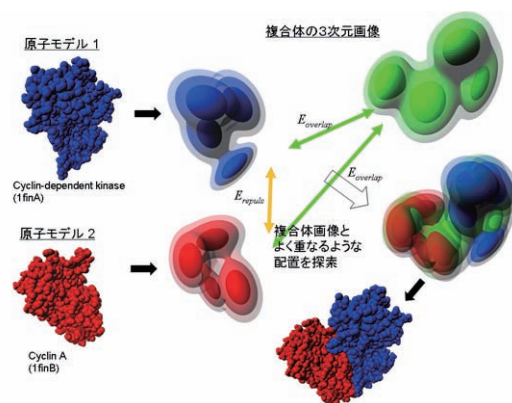


図1: 混合正規分布モデル法の概要

めの計算コストも高い。そこで、ここでは重ね合わせの配置探索を高速に実行するために、混合正規分布モデルを採用し、複合体の三次元画像および単量体の原子モデルを、少数の三次元正規分布の和で近似的に記述する手法を開発した。混合正規分布モデルは、もともと観察データから確率分布を統計推定するために開発された手法であり、三次元形状の近似表現に用いられた例はほとんどない。形状の近似表現を用いて同様の重ね合わせ計算を高速に行う手法としては、自己組織化ネットワークを用いて形状の代表点を置く方法(ベクトル量子化)を採用したプログラム SITUS (Wriggers et al, *J.Mol.Biol.*, (1998), **284**, 1247-1254)が有名である。SITUS は点の集合で形状を表現しているが、ここで開発する手法では三次元正規分布の集合を用いて形状を表現する。三次元正規分布は、一つの分布で楕円球の形状を表現できるため、正規分布の集合は、点の集合のモデルより、高い表現力を持っていると期待される。

混合正規分布モデルでは、三次元形状は、以下のような M_G 個の三次元の正規分布の線形和の確率分布 $G(\mathbf{x})$ で表現される。

$$G(\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^{M_G} \beta_i p_i(\mathbf{x})$$

ここで、 $\mathbf{x}$ は三次元空間の位置ベクトル、 $p_i(\mathbf{x})$ は i 番目の正規分布であり、 β_i は重み係数である。三次元の正規分布 $p(\mathbf{x})$ は以下の式で表される。

$$p_i(\mathbf{x}) = \frac{1}{(2\pi)^{3/2} |\Sigma_i|} \exp \left[-\frac{1}{2} (\mathbf{x} - \mu_i)^T \Sigma_i^{-1} (\mathbf{x} - \mu_i) \right]$$

与えられた原子モデルや三次元画像を表現するためのパラメータ (M_G 個の μ_i と Σ_i) を決定するために、反復解法であるEMアルゴリズム(Expectation Maximization)を用いる。EMアルゴリズムは、観察されたデータ群を出力する尤もらしい確率分布を推定する統計的な手法である。本研究では、原子モデルにおける各原子の位置を観察された点群とみなし、三次元画像における画素の位置には、画素の濃度に比例した観察点があるとみなして計算を行う。原子モデルから得られたモデルを単量体モデル、三次元画像から得られたモデルを複合体モデルとよぶ。

二種の混合正規分布モデルの重ね合わせには少なくとも2種のエネルギーが必要である。すなわち、複合体と単量体モデルが重複するための引力エネルギー E_{imgovr} 、単量体モデルどうしが接触しないための斥力エネルギー E_{repuls} である。混合正規分布モデルでは、これら二つのエネルギーは、以下の $ov(p_i, p_j)$ 、すなわち二つの正規分布 $p_i(\mathbf{x})$ と $p_j(\mathbf{x})$ の積の全空間における積分で表現することができる。この積分 $ov(p_i, p_j)$ は解析的に解を求めることができる。

$$ov(p_i, p_j) = \int_{-\infty}^{\infty} p_i(\mathbf{x}) \cdot p_j(\mathbf{x}) d\mathbf{x} = \frac{1}{(2\pi)^{3/2} |\Sigma_i + \Sigma_j|^{1/2}} \exp \left[-\frac{1}{2} (\mu_i - \mu_j)^T (\Sigma_i + \Sigma_j)^{-1} (\mu_i - \mu_j) \right]$$

E_{imgovr} では、単量体モデルと複合体モデルの正規分布の間に負の ov のエネルギーが働くように設定し、引力を誘導する。 E_{repuls} においては、単量体モデルと別の単量体モデルの正規分布の間に正の ov のエネルギーが働くように設定し斥力を誘導する。また、ホモ多量体の構造を導出する場合には、これらの二つのエネルギーのほかに、対称性のための拘束エネルギー E_{symmet} を補助的に導入する。このエネルギーは、ホモ多量体の対称性を維持するための拘束のエネルギーである。これら三つのエネルギーを重みを乗じて加算した量を全体のエネルギー E_{total} とした。

$$E_{total} = w_{imgovr} \cdot E_{imgovr} + w_{repuls} \cdot E_{repuls} + w_{symmet} \cdot E_{symmet}$$

このように定義したエネルギー関数 E_{total} を最小にするような単量体モデルの配置を以下の方法で探索した。まず、複合体画像を固定し、単量体モデルを並進と回転の自由度に従って

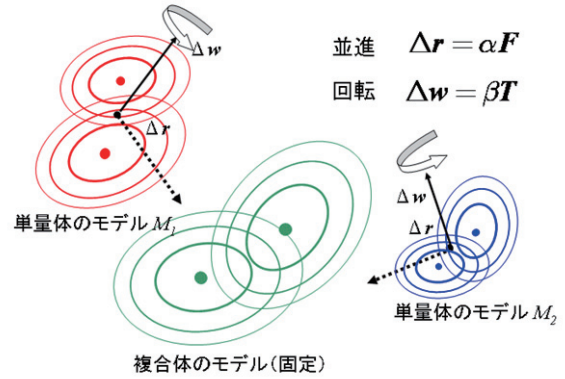


図2: モデルに働く力とトルク

動かすことにする。ここで、上で定義したエネルギー E_{total} に起因する力 $\mathbf{F}$ とトルク $\mathbf{T}$ を解析的に計算する。これらを用いて、並進の変移を $\Delta\mathbf{r}=\alpha\mathbf{F}$ 、回転の変移を $\Delta\mathbf{w}=\beta\mathbf{T}$ とすることで最急降下法を実装した。最急降下法は局所解に陥りやすいため、初期配置をランダムに変えて探索を繰り返し、最もエネルギーが低い配置を採用する方針を採用した。

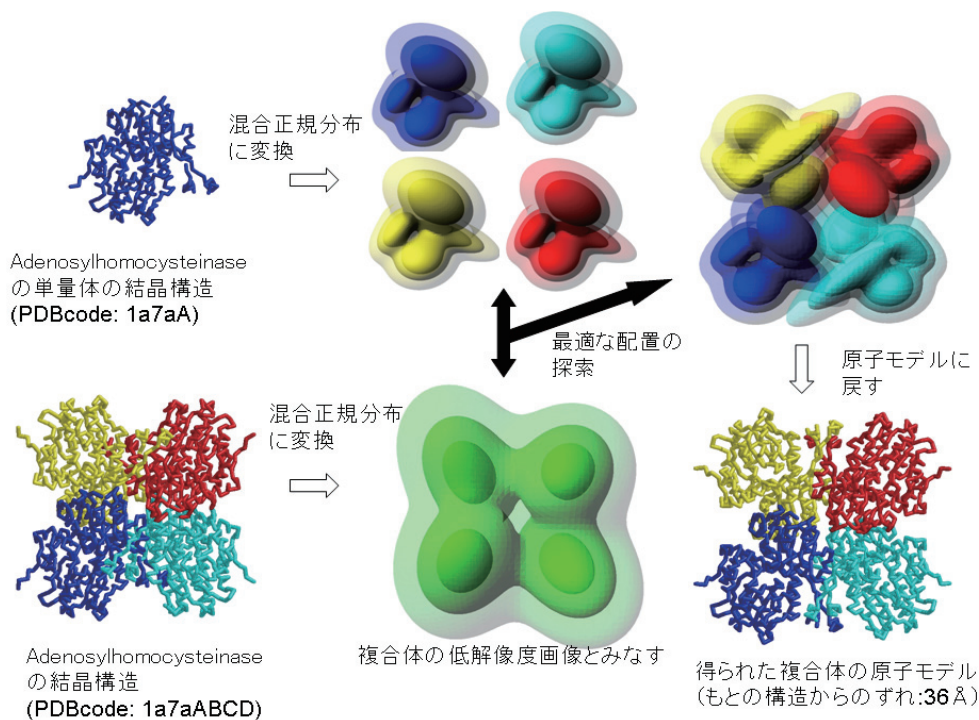


図3: 混合正規分布法によるあてはめの事例

開発したプログラムの性能評価として、次の試験計算を行った。ホモ4量体である Adenosylhomocysteinase の結晶解析による原子モデル(PDB コード:1a7a)を題材とし、まず4量体全体を混合正規分布モデル(正規分布の数は4)に変換し、これを低解像度の複合体画像とみなすこととした。次に、結晶構造から単量体構造だけを抜き出し、これら4つを低解像度の複合体画像にあてはめる問題を解くことにした。単量体のそれぞれを混合正規分布モデル(正規分布の数は4)に変換した。4量体全体の混合正規分布モデル(図3下中央、緑色の分布)に、単量体の混合正規分布モデルを4つ(図3上中央、青シアン黄赤の分布)重ねる計算を行った。ここで、4つの単量体の配置には D2 の対称性を持つ拘束のエネルギー E_{symmet} を設定した。最急降下法によるエネルギー最小化計算を初期値を変えて1000回繰り返した。この探索計算は非常に高速であり、標準的な計算機(Pentium 4, 3GHz)を用いて25秒ほどで完了した。最もエネルギーが低い配置では、もとにした結晶構造と 36 Å のずれにあることがわかった。このエネルギー最小構造は、原子衝突が起こっており、まだ改善の余地があるが、あてはめの最適化を行うための初期構造としては十分有効であると思われる。

(2)研究成果の今後期待される効果

混合正規分布法は、超分子低分解能像への要素分子のあてはめが、一般的なコンピュータを用いて高速で実行できるところに特徴がある。そのため本技法は、電子顕微鏡単粒子構造解析を行っている研究者に広がる可能性がある。あてはめの精度評価を行った後に、でき

るだけはやく公開していく予定である。

A-2. 慣性主軸法(松本)

(1)研究実施内容及び成果

X線結晶解析の手法が強力になるにしたがい、X線結晶解析法によって生体超分子全体構造が原子分解能で判明する場合が出てきている。X線で測定できる全体構造は結晶中での原子分解能構造である。一方電子顕微鏡単粒子解析では、水溶液中(またはそれに非常に近い環境)での全体構造が低分解能で得ることができる。例えば、結晶中では不活性型であり、水溶液中では活性型に近い構造を得る場合がある。そこで、X線結晶解析でえられた原子分解能立体構造を低分解能構造にあてはめることができれば、生体内の構造に近い原子分解能構造を導出するための初期データを得ることができる。ここで開発したあてはめ手法は、2つの手続きからなる。第1段階では、慣性主軸を利用したおおまかなあてはめを実行し、第2段階ではX線結晶解析構造の微小回転による精密化である。いずれの段階も分子を剛体として取り扱った。

電子顕微鏡単粒子解析で得られた三次元像は均質な素材で構成されている物体と見なせば、その重心および慣性主軸を決定することができる。電子顕微鏡単粒子解析による生体分子の構造情報は、実際にはグリッド情報なので、グリッドに等質量の物体が配置していると考ええる。このモデル構造において、慣性主軸は以下の慣性テンソルから求めることができる。

$$I = \begin{pmatrix} \sum_i m_i (y_i^2 + z_i^2) & -\sum_i m_i x_i y_i & -\sum_i m_i x_i z_i \\ -\sum_i m_i y_i x_i & \sum_i m_i (x_i^2 + z_i^2) & -\sum_i m_i y_i z_i \\ -\sum_i m_i z_i x_i & -\sum_i m_i z_i y_i & \sum_i m_i (x_i^2 + y_i^2) \end{pmatrix}$$

ここで、 x_i, y_i, z_i はモデル構造の幾何学重心を原点としたグリッド点 i の座標、 m_i はグリッドに配置した質量(1.0)を意味する。慣性テンソル I が求まれば、慣性主軸 e_x, e_y, e_z は、以下の式を満たすことになる。

$$Ie_x = I_1 e_x, Ie_y = I_2 e_y, Ie_z = I_3 e_z (I_1 \geq I_2 \geq I_3)$$

同様の手法でX線結晶解析構造の慣性主軸を求めることができる。この場合、 x_i, y_i, z_i は超分子の重心を原点とした原子 i の座標を、 m_i はその原子の質量を意味する。両構造の慣性主軸が決定できれば、両原点とX軸を一致させた後に、X軸とY軸のまわりで回転させれば、両構造(の慣性主軸)は完全に一致する(図4)。

第2段階では、電子顕微鏡単粒子解

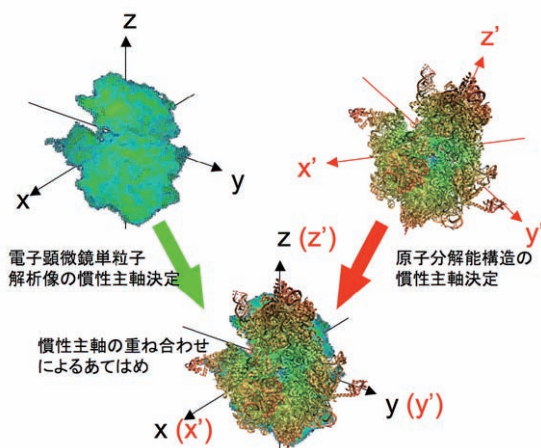


図4: 電子顕微鏡単粒子解析像と原子分解能像の主軸を一致させる

析に由来するデータを空間に固定し、原子分解能構造を微小移動および微小回転させることで、あてはめを精密化する。微小移動および微小回転をおこなうための軸は、慣性主軸に限らずに以下に示す方法で導入する軸を利用する。慣性主軸で構築された直交座標の原点に、正20面体を設置する。Z軸上に正20面体のひとつの頂点が配置されるようにする。原点から正20面体の各頂点に向かうベクトルを考え、このベクトルの方向(正負)に分子を微小移動させ、

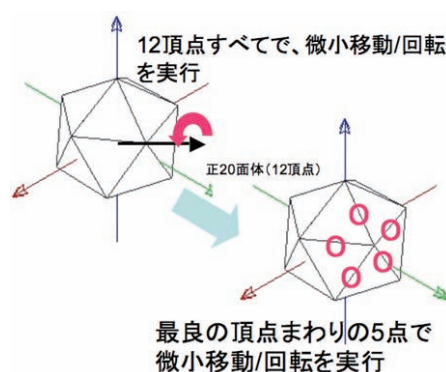


図5: 正20面体を用いたあてはめの最適化

かつこのベクトルのまわりで分子を微小回転させる。あてはめのよさは、電子顕微鏡単粒子解析データによるグリッド点のうち、どれだけを原子座標でしめることができるかで決める。グリッド点からある距離以内に原子が存在する場合の数を数え上げ、数が最大になる微小移動/回転を採択する。あてはめが改善される移動/回転をもたらした頂点の周りには、5個の別の頂点が存在する。それらの頂点とで構成される辺の中点と原点を結ぶベクトルを考え、これら5本のベクトルを用いて同様の精密化を行う(図5)。

この手法をペプチド合成生体超分子リボソームに適用した。リボソームは生体中でいろいろな構造変化が起これと考えられている。その変化は、ペプチドを合成していない状態、合成を開始する状態、合成途中の状態、および合成を完了する状態の少なくとも4つの状態で起これと考えられる。リボソームの原子分解能立体構造はX線結晶解析で決定されており、様々な状態での低分解能構造が電子顕微鏡単粒子解析で得られている。これらの低分解能構造にX線結晶解析構造をあてはめると、慣性主軸をあわせることで、約60%の原子(全重原子数は約148,000)がグリッドと一致する。正20面体による精密化で、この数は約70%に向上できることがわかった。このあてはめ結果を初期構造として、生体超分子シミュレーション研究グループの開発する精密化を行うことで、さまざまな状態でのリボソームの原子分解能構造が得られることになる。

(2)研究成果の今後期待される効果

慣性主軸法の利用は、生体超分子の構造が原子分解能で明らかになっていることが前提である。現在はこのような状況はまれであるが、近年のX線結晶解析法の向上から、近い将来にはこの手法が適用できる範囲は広がっていくと考えられる。本技法をできるだけはやく発表し、構造解析研究者にとっての重要な解析ツールとなるようにする。

A-3. ジオメトリックハッシング法(由良)

(1)研究実施内容及び成果

電子顕微鏡単粒子解析によって低分解能で構造が判明する生体超分子において、すべての要素タンパク質の原子分解能立体構造が常に明らかになっているわけではない。一部の要素タンパク質の原子分解能立体構造が判明している場合には、低分解能で判明した生体

超分子構造全体に対して、その要素タンパク質だけがどこに存在するかを知ることが必要となる。上記A-1 および A-2 の方法は、すべての要素タンパク質の原子分解能立体構造が判明していることを前提としている。ここではジオメトリックハッシングの方法を用いて、ひとつの原子分解能要素タンパク質座標を低分解能生体超分子座標にあてはめる手法を開発した。

ジオメトリックハッシング法による要素タンパク質のあてはめは、以下の手続きで行った。(1) 生体超分子三次元像をボクセルで表現する。電子顕微鏡単粒子解析による生体分子の構造情報とは、グリッドで表現される三次元空間の各グリッド点における物質の存在確率である。現在の電子顕微鏡単粒子解析では、1回の測定で得られる二次元画像はS/N比が非常に悪いので、数百枚程度の測定を重ね合わせてS/N比を改善している。この結果得られる画像は、生体超分子の二次元投影画像であるため、あらゆる方向への二次元投影画像を得た後に、それらの画像をもとにして三次元構造を構築する。よって得られた三次元構造における各グリッド点には、その点付近に物質を観測できた画像数に比例する数値が配置される。グリッド点の間隔は電子顕微鏡に依存するが、電子顕微鏡単粒子解析データベースには、グリッド間隔約3Å前後のデータが多く存在する。雑音の非常に多いデータであるため、数値の閾値を設定しその閾値以上の値を持つ部分に生体超分子が存在すると見なす。生体超分子のおよその分子量はゲノム情報を用いて推定し、分子量から体積を推定することが可能なので、推定体積を満たすように閾値を決定することができる。この結果、電子顕微鏡単粒子解析データは、ボクセル(三次元ピクセル)で表現できたことになる。以降の計算で用いるデータは、このボクセルデータ、または周辺のボクセルを融合した粗視化ボクセルデータである。(2) ボクセルで表現された生体超分子三次元像のハッシュテーブルを作成する。ボクセル化した生体超分子に要素タンパク質をあてはめるにあたって、生体超分子の表面構造が一番重要な情報を持つ。あるボクセルに注目し、前後左右6方位のいずれかにボクセルが存在しない場合、そのボクセルは表面にあると見なし、それ以外のボクセルは生体超分子内部に存在すると見なす。表面ボクセルのみを用いて、ジオメトリックハッシュテーブルを作成する。ここでのハッシュテーブルは、生体超分子の最長辺の2倍の長さをもつ三次元マトリックスであり、マトリックスの各要素は、以下に示すローカル座標に割り当てられた数値の配列とする。表面ボクセル群から、直線上に位置しない3個の表面ボクセルを選び、その3個を用いてローカル座標を定義する。任意の1個を原点とし、原点と残りのうちの1個とからできるベクトルを規格化してX軸とする。原点と最後の1個とからなるベクトルを作り、X軸とこのベクトルとの外積でできるベクトルを規格化してZ軸とする。Z軸とX軸の外積でY軸を構築する。このローカル座標を用いて、すべての表面ボクセルの位置を記述する。各表面ボクセルの位置に対応するハッシュテーブルの要素にローカル座標に割り当てた数値を入れる。以上の操作を可能なすべてのローカル座標で実行する。できあがったハッシュテーブルの要素には、生体超分子の表面をあらゆる方向から見たときの情報が書き込まれたことになる。実際には、コンピュータのメモリ量の制約があるために、全方向からの情報をハッシュテーブルに書き込むことができない場合が多い。乱数を用いてローカル座標を間引く必要がある。(3) 要素タンパク質立体構造をボクセルで表現する。生体超分子のジオメトリックハッシュテーブルを作成した際に用いたグリッドと同じ大きさのグリ

ッドを用いて、要素タンパク質の原子分解能構造データをボクセル化する。要素タンパク質の存在する空間をグリッドに切り、あるグリッド点が表面原子に対応するかどうかによって、要素タンパク質のボクセル化を行う。(4) 要素タンパク質の任意の方位を選び、その方位を用いた要素タンパク質構造の記述とできるだけ一致する記述をハッシュテーブルから探す。ボクセル化された要素タンパク質立体構造データから、直線上にのらない任意のボクセル3個を選び、ローカル座標を定義する。このローカル座標を用いて、すべてのボクセルの位置を記述する。要素タンパク質の各ボクセル座標と一致するハッシュテーブルの要素を探す。この要素に格納されたローカル座標の数値をすべて記憶する。全ボクセルに対してハッシュテーブルの問い合わせを完了した時点で、一番多く記憶されたローカル座標の数値を取り出す。このローカル座標と要素タンパク質のローカル座標を重ね合わせることで、生体超分子に対する要素タンパク質の最良のあてはめができたことになる。実際には、メモリ量の制約からハッシュテーブルが完全ではないため、要素タンパク質ボクセルのローカル座標を数個の異なる原点で構築し、同じ手続きをへてあてはめ像を構築する。それらの中で最良のあてはめを実現している場合を選択する。この手続きによって、ボクセルサイズの解像度において、全あてはめ探索をしたことに相当する。

ジオメトリックハッシング法を用いて、要素タンパク質のあてはめをテストしたところ、図6に示すような結果となった。これはほぼ正解に近い位置に要素タンパク質をあてはめることができた結果である。この方法は非常に大きなメモリを要することが問題であるが、一部の要素タンパク質の構造のみが判明している場合には有効であることがわかった。また生体超分子が何個の要素タンパク質を含んでいるかが不明な場合も、この手法で要素タンパク質を1つずつあてはめていくことで、生体超分子ボクセルに何個の要素タンパク質があてはめられるかがわかるようになる。

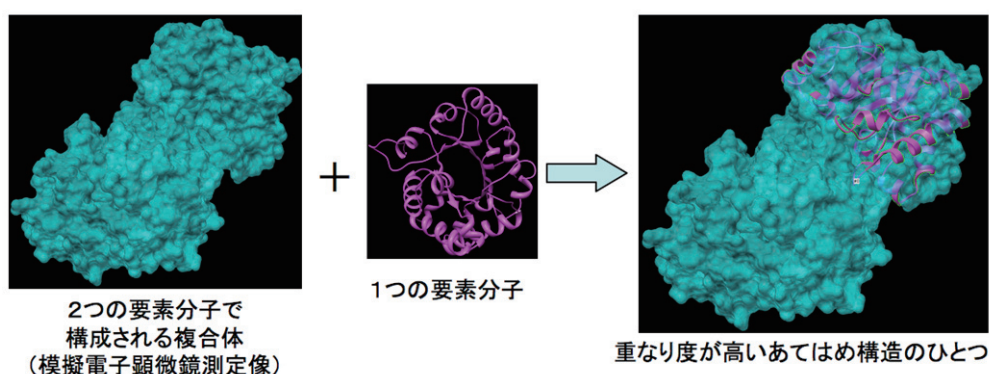


図6: ジオメトリックハッシング法による要素タンパク質あてはめ実験結果

(2)研究成果の今後期待される効果

ジオメトリックハッシング法による生体分子の取扱いは、国外で開発されている同様なソフトウェアにも用いられている。さらに、複数タンパク質のドッキング問題を解くためや、タンパク質の構造比較のためにもジオメトリックハッシング法は用いられている。この手法開発そのものに、本プロジェクトの独自性はない。しかし、この手法と他の手法を組み合わせることで低分解能生体超

分子像から高分解能像を構築する努力は、本研究グループのもつ特徴である。

B. 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

B-1. 二次元電子顕微鏡像あてはめのためのタンパク質ドメイン粗視化モデリング(由良)

(1)研究実施内容及び成果

低い分解能で生体超分子立体構造が判明した場合や要素タンパク質立体構造が判明していない場合には、生体超分子の原子分解能構造構築が困難な場合がある。そのような場

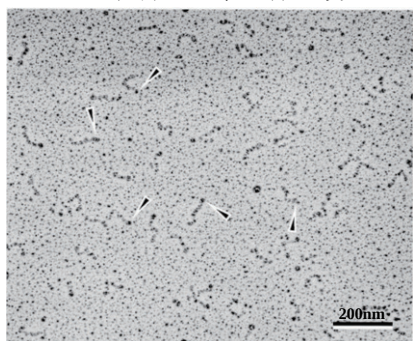


図7: Gli349 の電子顕微鏡二次元像 (Adan-Kubo, et al. (2006) *J. Bacteriol.* 188, 2821-2828, Fig3 より)

合でも、生体超分子のどの付近に、どのようなタンパク質が存在するかを推定することができれば、ゲノム情報と生体超分子構造情報をつなぐ重要な情報となる。ゲノム塩基配列から推定されるアミノ酸配列のどの部分が、生体超分子構造のどの付近に存在するかがわかることで、生体超分子の抗体作製や変異体作製を進めることができるようになるからである。本プロジェクトでは、*Mycoplasma mobile* の運動に関与すると考えられている生体超分子 Gli349 の電子顕微鏡像(図7)

とゲノム塩基配列から推定されるアミノ酸配列にもとづき、Gli349 の粗視化モデル構築することができた(原著論文発表 [2])。

ゲノム塩基配列から推定される Gli349 のアミノ酸配列、および共通祖先由来のアミノ酸配列を詳細に調べたところ、140 残基程度からなるドメインの繰り返し構造があることがわかった。アミノ酸配列類似性の統計的有意性を確認したところ、3183 アミノ酸残基から構成される Gli349 には、少なくとも 18 回の類似ドメインの繰り返しがあることがわかった。Gli349 の約 80% の領域が、この繰り返し構造の中に含まれる。このドメインの立体構造を原子分解能でモデリングすることはできなかったが、140 残基程度から構成されること、および既存の立体構造予測法を用いて推定される立体構造にもとづき、このドメインは長軸が約 42Å 程度の回転楕円体で近似できることが推定できた。

Gli349 の電子顕微鏡二次元像は Adan-Kubo らにより測定されていた(図7)。この二次元像から、Gli349 は棒状に伸びており、3 カ所で屈曲している構造と推定された。屈曲により 4 分割される各棒状部分の長さも、電子顕微鏡二次元像からほぼ推定することができていた。そこで、本プロジェクトでは、この電子顕微鏡二次元像にドメインの回転楕円体モデルをあてはめることで、全体の粗視化モデルを構築することができた(図8)。

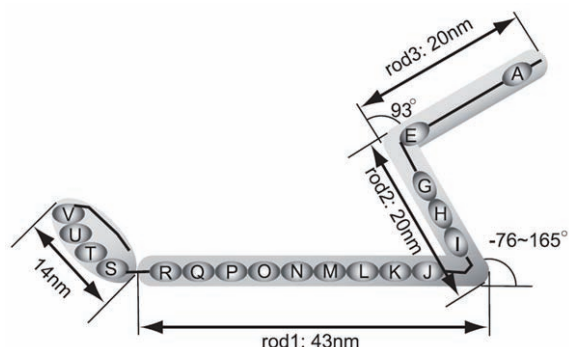


図8: 電子顕微鏡像(外形)に回転楕円体ドメインモデルをあてはめた結果

(2)研究成果の今後期待される効果

Gli349の粗視化モデルは、*M. mobile*の運動メカニズムの解明に現在貢献している。原著論文発表[2]は、発表以来少なくとも8回(2007年9月現在)引用されており、*Proceedings of the National Academy of Science in USA*における解析記事にも引用された。*Mobile*には病原性種もあることから、本プロジェクトの結果が何らかの形で病原性解明の一助になることが期待される。

B-2. タンパク質複合体のホモロジーモデリング評価(川端)

(1)研究実施内容及び成果

生体超分子を構成する要素タンパク質そのものの立体構造がすべて決まっていることは、まれである。しかし共通祖先由来タンパク質の立体構造が決まっていることは多い。そこで、共通祖先由来の立体構造既知タンパク質をもとにして、要素タンパク質の立体構造を推定(ホモロジーモデリング)する必要がある。ホモロジーモデリングの技術はすでにほぼ確立しているが、要素タンパク質の立体構造を正しく推定できるかを評価する方法は確立していない。要素タンパク質は、他の要素分子と相互作用して生体超分子を構成していることから、要素タンパク質単体ではなく、複数の要素タンパク質の複合体が正しく構築されているかを評価する必要もある。そこで、2つのタンパク質の立体構造が複合体で判明しており、両タンパク質が生体超分子の要素タンパク質である場合に、その複合体立体構造をもとにしてホモロジーモデリングした構造が、生体超分子の要素として適当かどうかを判断する方法を開発した(原著論文発表[10])。

複合体立体構造の評価に重要なことは、構築された複合体構造界面で相互作用するアミノ酸残基対が適切であるかどうかを見極めることである。最善の方法は、分子シミュレーションを用いて会合の自由エネルギーを正確に計算することであるが、ホモロジーモデリングの場合には、アミノ酸残基を構成する原子の位置が厳密に予測できておらず、またタンパク質複合体が置かれている溶媒環境が厳密にはわからないために各種のエネルギーパラメータを決定することができない。そこで、ここでは物理化学的な計算と経験則とを併用して、3つの値による評価方法を構築した。

第1の指標として、タンパク質の複合体において、どのようなアミノ酸残基が対を形成するかをデータベースから調べ、観測値から擬似コンタクトエネルギー e_{con} を構築した。擬似コンタクトエネルギーは以下の式で定義する。

$$e_{con}(a, b) = -\log \frac{Q(a, b)}{P(a)P(b)}$$

ここで、 a, b はアミノ酸残基20種類のいずれかひとつ、 $P(a)$ はアミノ酸残基種 a がタンパク質の表面に出現する頻度($\sum_{i=1}^{20} P(a_i) = 1.0$)、 $Q(a, b)$ は複合体を構築するタン

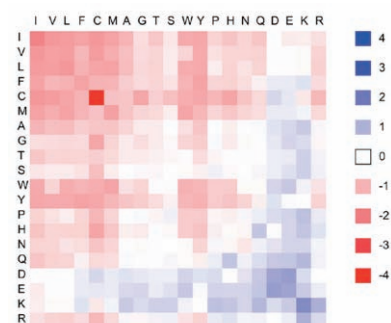


図9: e_{con} の値。縦横両軸はアミノ酸残基種を意味し、疑似エネルギーの値を色で示した。

パク質 A と B において、A におけるアミノ酸残基種 a と B におけるアミノ酸残基種 b が $7.0\text{\AA}$ 以内に存在する場合の頻度を意味する。 e_{con} の値は図9に示すように分布する。この分布は、今までに経験的に知られている界面におけるアミノ酸残基対の出現とよく呼応する。疎水性アミノ酸残基対ではエネルギーが下がり、同一符号電荷をもつアミノ酸残基対では、エネルギーが高くなる。ホモロジーモデリングによって構築された複合体に対しては、以下の式を用いて第1の指標のエネルギーを求める。

$$E_{con} = \sum_{i,j \text{ (i contacts with j)}}^{N,M} e_{con}(a_i, a_j)$$

第2の指標では、静電相互作用を評価する。特に遠距離におけるタンパク質間の相互作用においては、静電的な力が重要な役割を果たしていることは、実験的に指摘されている。ここでは、距離 r だけ離れた二つの電荷 q_1 と q_2 に対して、以下の式にしたがってエネルギー e_{ele} を計算する。

$$e_{ele}(r, q_1, q_2) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_1 q_2}{r} \frac{e^{-\kappa(r-a)}}{1+\kappa a}$$

ここで、 κ はデバイ-ヒュッケルの遮蔽因子 ($= 0.488\text{\AA}^{-1}$) であり、 a は $6.0\text{\AA}$ とした。ホモロジーモデリングにより構築したタンパク質複合体界面アミノ酸残基がもつ電荷の位置を厳密に求めることはできない。そこでテンプレートとなったアミノ酸残基の側鎖の構造を固定し、各原子をターゲットとなるアミノ酸残基の側鎖原子に可能な限り交換し、交換できなかった原子(テンプレートの側鎖がターゲットのアミノ酸残基側鎖よりも短い場合などに発生)は、テンプレートのアミノ酸残基側鎖末端原子に仮想的に縮退させた。この構造を用いて、アミノ酸残基側鎖の各原子に電荷を配置し e_{ele} を計算する。ホモロジーモデリングによって構築された複合体に対しては、以下の式を用いて第2の指標のエネルギーを求める。

$$E_{ele} = \sum_i^N \sum_j^M \sum_{s \in Q_i} \sum_{t \in Q_j} e_{ele}(r_{st}, q_s(a_i), q_t(a_j))$$

第3の指標では、アミノ酸配列の一致度を評価する。共通祖先由来のタンパク質は、アミノ酸配列の一致度が高ければ、相互作用するタンパク質もまた共通祖先由来のタンパク質であることが多いことが、経験的に知られている。そこで、ホモロジーモデリングをした複合体要素タンパク質において、それらのアミノ酸配列がテンプレートとなったタンパク質複合体のアミノ酸配列と一致度が高ければ、複合体立体構造の信頼性は高いと考えることができる。テンプレートのタンパク質複合体ABと、ホモロジーモデリングをした要素タンパク質複合体A'B'において、アミノ酸配列の一致を測定すると、A 対 A' の一致度と B 対 B' の一致度が得られる。ここでのスコアは、

$$E_{iden} = \min (\text{identity}(A,A'), \text{identity}(B,B'))$$

とした。

以上3つの指標は、単位が異なる値のため直接比較することができない。そこでそれぞれの指標をZスコア(値を平均値から引き標準偏差で割った値)にし、お互いを比較可能とした。 e_{con} と e_{ele} の平均値と標準偏差は、タンパク質表面にあらわれるアミノ酸残基のランダムサンブ

リングから、*identity* の平均値と標準偏差は、アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基の攪拌によって構築されるランダム配列から計算した。

タンパク質複合体を構築し、これらの指標によりその正否を評価すると図10のようになった。3つの評価値はいずれも数値を与えるので、閾値を設定しその閾値以上のタンパク質複合体が、複合体を形成している実験的な証拠があるかないかで評価することができる。様々な閾値で評価をするため、評価結果は図10にあるように連続した線になる。横軸 **Recall** は実験的な証拠があるすべての複合体に対して、予測された複合体の割合を、縦

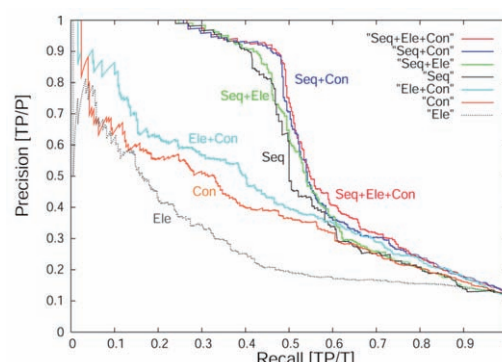


図10: 3つの指標によるタンパク質複合体の評価結果

軸 **Precision** は複合体を形成すると予測されたすべての結果に対して、実験的な証拠がある複合体の割合を意味する。グラフの右上に線が近づくほど、高い予測性能を持つ指標であることを示す。

3つの指標単独では、アミノ酸配列の一致度にもとづく指標以外は、あまりよい結果ではない。しかし3つの指標をたしあわせて複合体構造を評価する(赤)ことで、より正しい複合体が推定できることが判明した。

(2)研究成果の今後期待される効果

この評価方法を用いることで、要素タンパク質の複合体モデルを評価することができるようになった。既存のタンパク質複合体立体構造をテンプレートにして、生体超分子の一部を構成する要素タンパク質複合体立体構造を構築した際には、テンプレートとした立体構造が生体超分子内部での構造と類似であるかどうかは明らかではなかった。ここで開発した指標によって、生体超分子の一部分をなす要素タンパク質複合体構造を可能な限り正しく構築する道が開けた。原著論文発表[10]に発表した指標は、タンパク質間相互作用一般のデータ評価にも利用できる指標であることから、現在盛んに進められている生体分子ネットワーク解析にも利用されていくことが期待される。

C. 要素分子相互作用部位推定法開発(由良)

(1)研究実施内容及び成果

電子顕微鏡単粒子解析で得られる低分解能生体超分子構造に、原子分解能で構造が判明している要素分子をあてはめる場合、分解能に大きな差があるために要素分子が様々な位置および方位であてはまり、一意的に決定できない場合が多々ある。この場合には、まったく別の情報を用いて、複数の候補から尤もらしい位置と方位を選び出す必要がある。ある要素分子が適確な位置に適確な方位であてはまっているかを立体構造以外の情報から推定する方法のひとつとして、その要素分子と他の要素分子との相対的な位置関係が妥当であるかどうかを推定することが考えられる。問題となる要素分子を電子顕微鏡像にあてはめた結果、他

の要素分子と相互作用することになる面が正しい相互作用面であるか、またあてはめた結果、生体超分子全体の溶媒接触面になる要素分子の表面が、他の要素分子と相互作用する面ではないかを推定できるようになると、あてはめ結果を評価できるようになる。

生体高分子における相互作用面を高い信頼性で推定する方法の開発は、構造バイオインフォマティクスにおける最重要課題のひとつでもある。生体高分子の相互作用は、環境の詳細が判明していない細胞中で、非常に多くの原子が関与する相互作用であり、二つの生体高分子が接触しているときと、接触していないときとの自由エネルギー差が小さいために、分子動力学シミュレーションを用いて複合体構造を見出すことはむずかしい。そのため既知複合体構造から複合体形成に重要と考えられる特徴を抽出し、その特徴量を用いて相互作用面を推定する

PDB ID	Name	Number of chains	Number of chains having domain structure	Download PDB
1J25	2-lysozyme oligomeric complex	10	6	[Download]
1J26	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J27	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J28	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J29	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J30	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J31	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J32	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J33	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J34	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J35	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J36	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J37	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J38	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J39	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J40	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J41	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J42	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J43	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J44	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J45	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J46	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J47	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J48	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J49	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]
1J50	2-lysozyme oligomeric complex	8	3	[Download]

図11: 超分子構造データベース EXOM

する経験的手法の方が有望と考えられる。そこで経験則を導出するために、立体構造既知の生体分子複合体を収集したデータベース EXOM (Experiment of MacroMolecule)を構築した(図11)。EXOM には545個の超分子立体構造が格納され(共通祖先由来の超分子はひとつと数えた)、そのうちの約30%はRNA または DNA を含む生体超分子構造であることがわかった。さらに文献調査をおこなったところ、生体超分子には RNA または DNA を含む場合が非常に多いことがわかった。つまり、要素タンパク質のどの表面が RNA, DNA, 他の要素タンパク質の界面となっているかを推定する必要があることがわかった。そこで本研究では、要素タンパク質の RNA 界面の推定方法の開発から開始した(原著論文発表 [1, 6])。

タンパク質の RNA 界面における立体構造の特徴は、今までに明らかにされていない。そこで、EXOMに格納された要素タンパク質と要素 RNA から構成される生体超分子を重複なく86個取り出し、界面の構造特性を調べた。タンパク質の RNA 界面は、タンパク質を構成するアミノ酸残基の溶媒接触表面積にもとづいて同定した。タンパク質とRNAの複合体座標を用いて、タンパク質の全アミノ酸残基の溶媒接触表面積を計算し、次にRNAを無視してタンパク質の座標のみで全アミノ酸残基の溶媒接触表面積を計算する。溶媒接触表面積の値が変化したアミノ酸残基を、RNA 界面のアミノ酸残基とした。このようにして同定された RNA 界面を構成するアミノ酸残基を、最短距離法(single linkage clustering)を用いてまとめ、RNA 界面を同定した。最短距離法の閾値は $7.0\text{\AA}$ とし、異なる RNA 界面に存在するアミノ酸残基は、すべてが $7.0\text{\AA}$ よりも離れるようにした。この結果、タンパク質は1つないしは2つの面

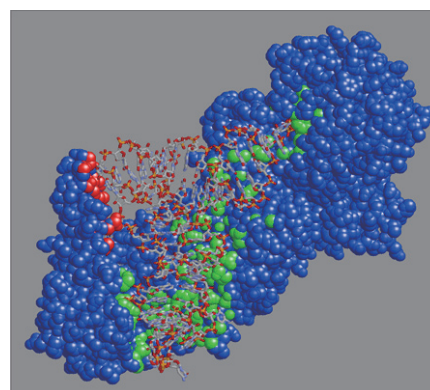


図12: 好熱菌の Val-tRNA 合成酵素。赤と緑が tRNA との相互作用面。tRNA はスティックモデルで、タンパク質は空間充填モデルで表示。

で RNA と相互作用していることがわかった。好熱菌の Val-tRNA 合成酵素では、図12に示す二つの界面(赤と緑)で tRNA と相互作用している。86個のタンパク質では、面の広さは $200\text{\AA}^2$ から $7,000\text{\AA}^2$ までにほぼ分布し、面の広さと面を構成するアミノ酸残基数は比例関係にあった。ひとつのアミノ酸残基は約 $40\text{\AA}^2$ をしめることがわかった(図13)。

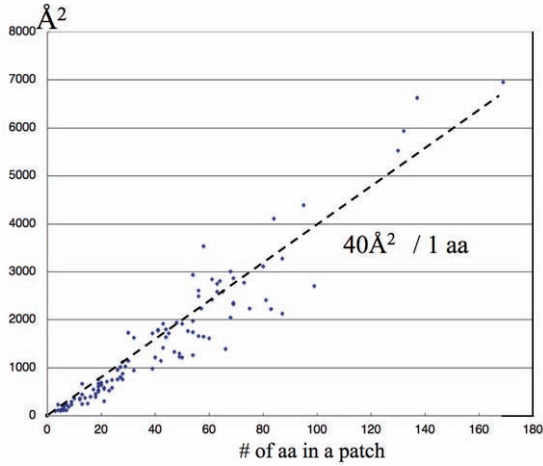


図13:要素タンパク質の各 RNA 界面のアミノ酸残基数と面積の関係

次に、RNA 界面におけるアミノ酸残基種 i の出現頻度を測定した。出現頻度 f_i は以下の式で求めることができる。

$$f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^{20} n_i} \quad (1)$$

ここで、 n_i はアミノ酸残基種 i が RNA 界面にあらわれる回数である。この値を、タンパク質の表面にあらわれるアミノ酸残基の頻度 $\bar{f}_i$ と比較することで、RNA 界面にどのような残基があらわれやすいかを数値 P_i (singlet propensity) で表現することができる。

$$\bar{f}_i = \frac{\bar{n}_i}{\sum_{i=1}^{20} \bar{n}_i} \quad (2)$$

$$P_i = \frac{\bar{f}_i}{f_i} \quad (3)$$

ここで、 $\bar{n}_i$ はアミノ酸残基種 i がタンパク質表面にあらわれる回数である。

先に示したように、要素タンパク質の RNA 界面は空間的にまとまって存在する。これは RNA 界面になっているアミノ酸残基の隣に存在するアミノ酸残基も RNA 界面を構成する場合が多いことを意味する。それならば、RNA 界面を構成する隣り合ったアミノ酸残基の出現頻度には、RNA 界面ではない部分で隣り合っているアミノ酸残基の出現頻度とは異なった傾向が見られることが予想できる。RNA 界面における隣り合うアミノ酸残基種 i と j の出現頻度 f_{ij} および、タンパク質表面における隣り合うアミノ酸残基の出現頻度 $\bar{f}_{ij}$ は以下の式で求める。

$$f_{ij} = \frac{n_{ij}}{\sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^{20} n_{ij}}, \quad \bar{f}_{ij} = \frac{\bar{n}_{ij}}{\sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^{20} \bar{n}_{ij}} \quad (4)$$

ここで、 n_{ij} はアミノ酸残基種 ij が RNA 界面にあらわれる回数、 $\bar{n}_{ij}$ はアミノ酸残基種 ij がタンパク質表面にあらわれる回数である。 f_{ij} および $\bar{f}_{ij}$ は、それぞれ f_i と $\bar{f}_i$ とは独立ではなく、以下の関係にある。

$$f_{ij} = f_i \times f_j \times C_{ij}, \quad \bar{f}_{ij} = \bar{f}_i \times \bar{f}_j \times D_{ij} \quad (5)$$

C_{ij} と D_{ij} は、それぞれ f_{ij} および $\bar{f}_{ij}$ の f_i および $\bar{f}_i$ からの独立度を示す係数である。アミノ酸残

基 i と j が隣り合う頻度がまったく独立に決まっているならば、 C_{ij} と D_{ij} は 1 になる。そこで、RNA 界面にどのようなアミノ酸残基対があらわれやすいかを数値 P_{ij} (doublet propensity) で表現すると以下ようになる。

$$P_{ij} = \frac{D_{ij}}{C_{ij}} \quad (6)$$

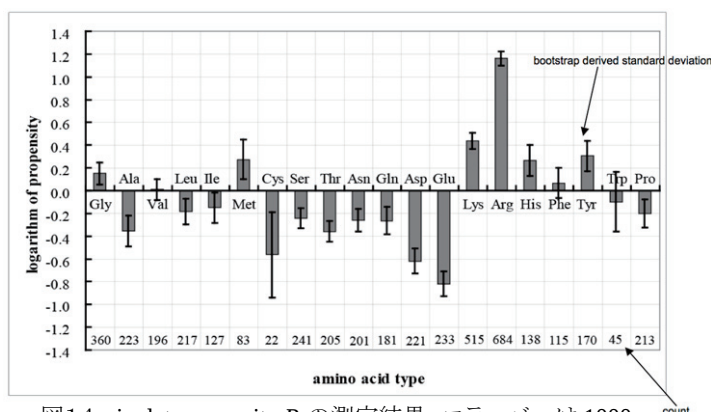


図14: singlet propensity P_i の測定結果。エラーバーは 1000 回のブートストラップ計算により求めた。

86 個の要素タンパク質と RNA の複合体構造において、 P_i と P_{ij} を調べたところ図14と図15のようになった。どちらの図も傾向値を底2の対数で表示している。singlet propensity (図14) では Arg 残基が突出しており、その後に Lys が続く。両者は正電荷をもつアミノ酸残基であり、RNA

分子が負電荷を帯びた生体高分子であることを考えると当然の結果である。Lys 残基と Arg 残基はどちらも正電荷をもつ残基であるにもかかわらず、RNA との界面にあらわれる傾向に有意な差がある。この差が何に由来するのかは不明である。Arg、Lys 残基の次に His、Tyr、Met 残基が比較的強い傾向をもつ。タンパク質における RNA との界面には、芳香環をもつアミノ酸残基が多くあらわれることが、以前から指摘されている。Tyr 残基が強い傾向を持っているのは、今までの観測事実と呼応する。しかし同様に芳香環を持つ Phe 残基が Tyr 残基よりも有意に低い傾向をもつ理由は定かではない。doublet propensity (図15) では、正電荷を持つ

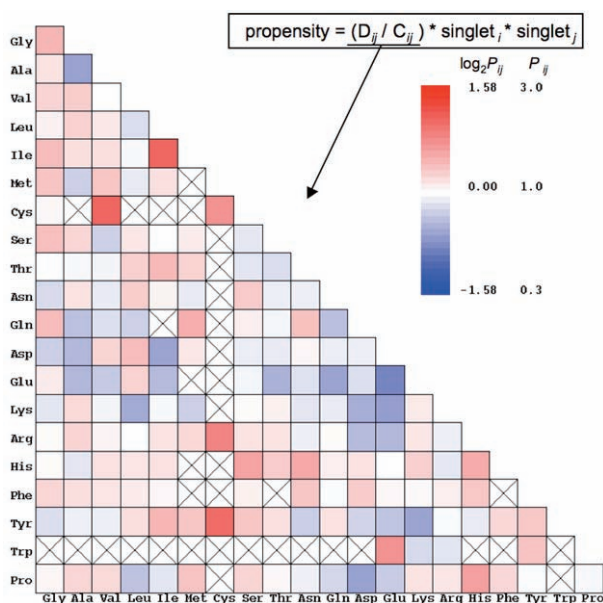


図15: doublet propensity P_{ij} の測定結果。×印は 1000 回のブートストラップ計算にもとづいて有意な結果を得られなかった部分。

Arg、Lys 残基の傾向はほとんど零である。負電荷を持つ Glu、Asp 残基の傾向は負、芳香環をもつ Tyr、Phe 残基の傾向は正である。Lys-Tyr が大きく負に偏っていること、および Ile-Ile が大きく正に偏っていることなどは、今までに指摘されていないことであり、また物理化学的な理由もよくわからないことである。doublet propensity をこのように示したのは、本研究がはじめてである。

EXOM データベースから得ることができたこれらの傾向値を利用することで、要素タンパク質の RNA 界面を推定できる可能性がある。最も単純な予測方法は、要素タンパク質の表面に存

在する各残基に singlet propensity 式(3)を割り振り、大きな値をもつ表面を RNA 界面と見なす方法である。

$$S_x(S) = \log_2 P_{i(x)}$$

ここで、 x はタンパク質表面のある位置を意味し、 i はその位置に存在するアミノ酸残基種を意味する。この方法で要素タンパク質の RNA 界面推定を行うと、正答率が非常に低いことが判明した。そこで、要素タンパク質表面の近隣に存在するアミノ酸残基の予測値の平滑化と、doublet propensity 式(6)の導入を行った。

$$S_x(AS) = \frac{1}{N_x} \sum_{y \in 7.0A}^{N_x} \log_2 P_{j(y)}$$

$$S_x(ASD) = S_x(AS) + \frac{1}{N_x} \sum_{y \in 7.0A, y \neq x}^{N_x-1} \log_2 P_{i(x)j(y)}$$

$$S_x(A^2SD) = \frac{1}{N_x} \sum_{y \in 7.0A}^{N_x} S_y(ASD)$$

タンパク質の機能部位を形成するアミノ酸残基は、分子進化の過程でよく保存されることがわかっている。そこでゲノム塩基配列情報から、要素タンパク質と共通祖先由来のタンパク質をすべて選び出し、アミノ酸配列の保存度を上記予測法と融合すれば、よい予測が可能であると考えられる。共通祖先由来のタンパク質において、同一アミノ酸残基部位由来部分を見出す手法(マルチプルアラインメント)によって、位置 x にあるアミノ酸残基種が判明した場合、位置 x のアミノ酸残基保存度を以下の式であらわすことができる。

$$V_i(x) = \frac{m_i(x)}{\sum_{j=1}^{20} m_j(x)}, \quad \left(\sum_{i=1}^{20} V_i(x) = 1 \right)$$

ここで、 $m_i(x)$ とは位置 x にあるアミノ酸残基種 i の数である。同様に位置 x と位置 y におけるアミノ酸残基ペアの保存度は、

$$U_{ij}(x, y) = \frac{m_{ij}(x, y)}{\sum_{k, l=1}^{20} m_{kl}(x, y)}, \quad \left(\sum_{i, j=1}^{20} U_{ij}(x, y) = 1 \right)$$

ここで、 $m_{ij}(x, y)$ とは位置 x にあるアミノ酸残基種が i で、位置 y にあるアミノ酸残基種が j である場合の数を意味する。これら保存度と singlet propensity および doublet propensity を利用して、要素タンパク質における RNA 界面を予測するには、以下のそれぞれの式を用いる。

$$S_x(P) = - \sum_{i=1}^{20} V_i(x) \log_2 V_i(x)$$

$$S_x(SP) = \sum_{i=1}^{20} V_i(x) \log_2 P_i$$

$$S_x(ASP) = \frac{1}{N_x} \sum_{y \in 7.0\text{\AA}}^{N_x} \sum_{j=1}^{20} V_j(y) \log_2 P_j$$

$$S_x(ASPD) = S_x(ASP) + \frac{1}{N_x} \sum_{y \in 7.0\text{\AA}, y \neq x}^{N_x-1} \sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^{20} U_{ij}(x, y) \log_2 P_{ij}$$

$$S_x(A^2SPD) = \frac{1}{N_x} \sum_{y \in 7.0\text{\AA}}^{N_x} S_y(ASPD)$$

これらの予測方法を評価した結果、 $S_x(A^2SPD)$ による予測が約 80%の精度を持っていることがわかった(図16)。ここでいう精度とは、本予測法によって、RNA 界面を構成すると予測された残基のうちの約 80%が本当に RNA 界面を構成していたという評価結果にもとづく。この予測においては、すべての RNA 相互作用残基を予測できたわけではなく、わずか 10%の RNA 相互作用残基を推定できたにすぎない。つまり、RNA 界面に存在すると予測された残基は、ほぼ間違いなく実際に RNA 界面に存在するが、まだまだ多くのアミノ酸残基が RNA 界面に存在することを意味する。この程度の精度ならば、低分解能像にあてはめた要素タンパク質の RNA 界面を予測した際に、予測された部分が RNA 界面になっていない場合は、そのあてはめの信頼性が低いと見なすことが十分可能である。

生体超分子のひとつであるスプライセオゾームは多くの

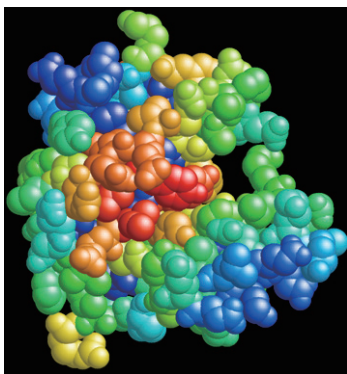


図17: スプライセオゾームの要素タンパク質における推定 RNA 界面

タンパク質と RNA から構成されている。その構成要素のひとつであるタンパク質 P14 の RNA 相互作用面を上記の方法で推定できた(図17)。この予測により、図17の手前の面が、超分子内部にある RNA 側を

向いており、奥側が超分子表面になっている可能性が高いことがわかる。この情報と整合性をもつ電子顕微鏡

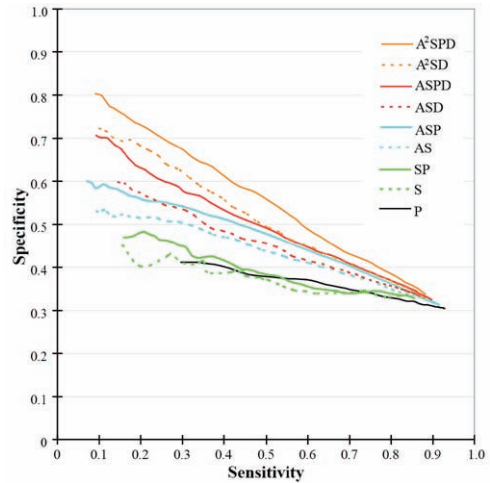


図16: それぞれの予測法を用いて、86 タンパク質の RNA 界面を予測した結果。横軸は本物の RNA 界面残基を予測した割合。縦軸は予測した RNA 界面残基が本当に RNA 界面である割合。各残基の予測結果は数値で出するため、ある閾値を用いて予測結果を二分した。いろいろな閾値で評価したため、各予測法の評価がグラフ内で線として表現されている。

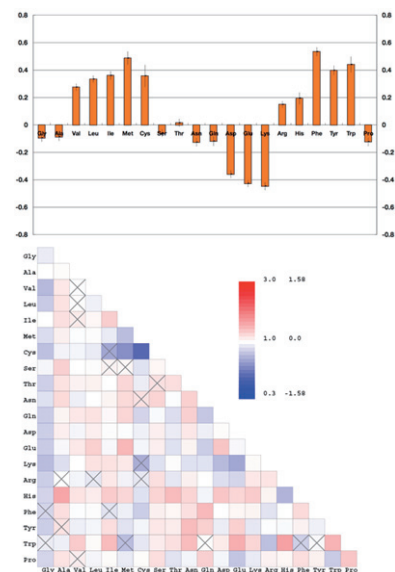


図18: 要素タンパク質間の singlet propensity と doublet propensity

像へのあてはめ結果を選別できるようになった。

生体超分子の構造構築において、このような予測を積極的に用いている方法はまれであり、多くの場合は、可視化された生体超分子構造を、研究者が過去の経験にもとづいて選別しているのが現状である。本グループによる研究は、選別の定量化と自動化に貢献すると考えられる。

同じ予測方法は、要素タンパク質の DNA 界面予測及び要素タンパク質間の相互作用面予測に拡張できる。要素タンパク質界面の傾向に拡張した結果は図18の通りである。このパラメータを用いて要素タンパク質の相互作用部位推定が可能と考えられる。これらの拡張はこれからなされなければならない。

(2)研究成果の今後期待される効果

原著論文発表[6]にあるタンパク質の RNA 界面を予測する方法は、今までにない新規の手法である。また構造バイオインフォマティクスにおける様々な予測において、80%の精度をもつ予測法は、高精度の手法と見なされることが一般的である。よってここで開発できた手法は、タンパク質の RNA 界面を推定する高精度の手法と位置づけることができる。原著論文発表[6]に付随して、RNA 相互作用面予測ツールをインターネット上で利用可能としたところ (<http://yayoi.kansai.jaea.go.jp/qbg/kyg/>)、本ツールの利用は、1日1.5 件以上の割合で利用され続けており、世界中のタンパク質-RNA 相互作用研究に貢献している。

3. 2 基準振動解析による要素分子の構造変化推定法開発とあてはめの精密化法の開発 (日本原子力研究開発機構 生体超分子シミュレーション研究グループ)

A. 基準振動解析法の開発(松本)

(1)研究実施内容及び成果

ある生体高分子の原子分解能構造を X 線結晶解析で得た場合と、同一の生体高分子を電子顕微鏡単粒子解析した場合とでは、一見して立体構造が大きく異なる場合がある。この理由は、生体高分子の結晶構造形成による構造変化と、生体高分子が存在する環境の違いによる活性化型と不活性型の構造転移があげられる。いずれの場合でも、X 線結晶構造解析による原子分解能構造を、低分解能三次元像にあてはめるためには、原子分解能構造を変形させる必要がある。従来は、タンパク質を部分構造(ドメイン)に切断し、ドメイン構造単位で電子顕微鏡測定像にあてはめることが行われてきた。しかし生体中では、生体分子が切断されて再配置されることで活性化型に変化するわけではない。ドメイン構造単位であてはめを実行した場合にできあがった構造が、不活性型構造から物理的に到達できる構造である保証がない。タンパク質を切断することなく変形することでこの問題は解決できるが、分子動力学シミュレーションによってタンパク質を大きく変形させることは困難である。

そこで基準振動解析の手法を導入してタンパク質の構造変化を推定し、変形させた構造を低分解能構造にあてはめる方法を開発した。従来のタンパク質基準振動解析では、タンパク質全原子を用いた基準振動解析の結果が、タンパク質の熱揺らぎとよく対応することが議論されてきた。昨今のタンパク質の基準振動解析研究では、低モードによる振動とタンパク質が

機能を発揮するために必要な運動との関係が精力的に研究されている。その結果、低モード方向の変形は、タンパク質の機能と関連している場合が多いことが判明してきている。さらに基準振動解析手法を簡略化した方法が試されるようになり、タンパク質を構成する全原子ではなく、アミノ酸残基をひとつの原子で代表させ、それらの原子を仮想的なバネで結合したモデルでも、タンパク質の運動を解析するためには十分なモデルであることがわかってきている。基準振動と機能との関係、およびモデルの簡易化が実現したことは、生体超分子の基準振動解析と不活性型構造から活性化型構造の推定ができるようになったことを意味する。そこで、本プロジェクトでは、細胞膜外生体超分子インテグリンの不活性型X線結晶解析構造を、電子顕微鏡単粒子解析で得られている活性化型構造へあてはめるための、基準振動解析シミュレーションを行った(A. Matsumoto, T. Kamata, J. Takagi, K. Iwasaki, K. Yura 投稿中)。

今までのタンパク質基準振動解析研究による知見を利用して、ここではアミノ酸残基ひとつをひとつの原子(C α)で表現をする簡易モデルを用いることとした。原子間の仮想的な結合は、以下の基準にしたがって求めた。二つのアミノ酸残基 i, j において、それぞれの残基を構成する原子(水素原子を除く)のいずれかの組みが距離 r 以内に存在するならば、 i と j を表現する原子を仮想的に結合する。結合のバネ定数は k とし、すべての結合で同一の値とする。また、現在の距離では力がかからないとする(ティリオン・ポテンシャル)。さらに i と $i+2$ 、および i と $i+3$ の残基間には、無条件で仮想的結合を導入する。このようにしてできたモデルの基準振動を求める。

従来の研究で、低いモードの方向への動きがタンパク質の機能に関係する動きと関連することが言われている。そこで、最低モードを含めて低い方から3つのモードによるインテグリンタンパク質の構造変化を調べた。ここで用いた基準振動解析では、各モードにおける振幅を決めることはできない。そこで、モデルを構築している原子の平均二乗変位が 0.1Å 以内になる最大の振幅を与えた。電子顕微鏡単粒子解析で得られているインテグリンの構造は、ほぼ直線上に延びており、X線結晶構造解析により得られている原子分解能構造は、分子の中央付近で二つ折りになっている。このような大きな構造変化を、1回の基準振動解析の結果から見出すことは不可能である。そこで、3つのモードによる構造変化のうち最も延びる構造を選択し、その構造を出発点にして再び基準振動解析を行う。この手続きを繰り返すことで少しずつ構造を開いていき、電子顕微鏡像にもっともよく合う構造を導出した。基準振動解析計算の繰り返しはモデル構造に変化が見られる限り続けた。

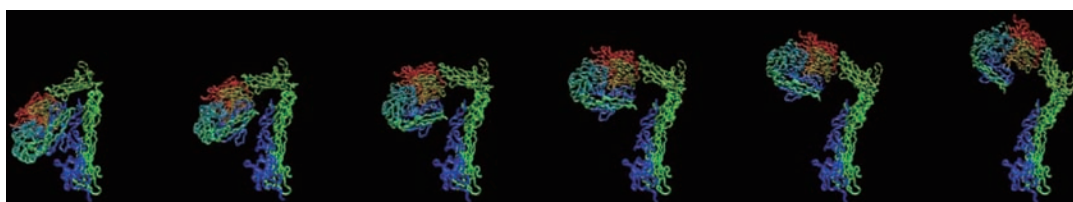


図19: 基準振動解析の手法を繰り返し適用し、不活性型インテグリン(左)を活性化型(右)まで立ち上げた。

以上の方法を用いることで、インテグリン細胞外ドメインの構造を図19のように変形させるこ

とができた。ただし、この構造変化を起こさせるためには、375 番目の Leu、389 番目の Leu および 633 番目の Arg において形成される仮想的結合を、切断する必要があった。これらのアミノ酸残基は、X線結晶構造解析ではお互いに近くに存在し、インテグリンが立ち上がらないように施錠しているようにも見えた。

上記の構造変化をもたらすために用いたモードは、ほぼすべての段階で最低振動モードであった。このことは、インテグリンの構造変化が位相空間内の谷間に沿って移動して行ったことを意味しており、X線結晶解析による折れ曲がった構造から立ち上がった構造に至るまでの間に大きなエネルギー障壁はないと考えられる。

立ち上がった構造を本プロジェクトで得られているインテグリンの電子顕微鏡低分解能像にあてはめると、図20のようになった。あてはめは本プロジェクトで開発した慣性主軸法を用いた。インテグリンは本来は α 鎖と β 鎖の2量体であるが、X線結晶解析では、 β 鎖の大部分が見えていない。図20の右側は、 β 鎖が入る部分と考えられるので、その部分の密度を無視してあてはめを行った。基準振動解析により立ち上がった構造(赤)が低分解能像によくあてはまっていることがわかる。

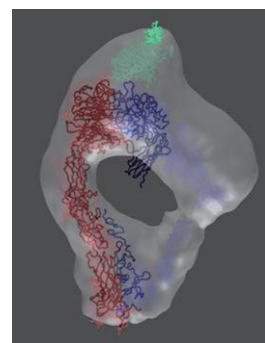


図20: 立ち上がったインテグリン原子分解能構造(赤と青)を電子顕微鏡単粒子解析像(灰色)にあてはめた。

(2)研究成果の今後期待される効果

現在投稿中の論文(A. Matsumoto, T. Kamata, J. Takagi, K. Iwasaki, and K. Yura)では、電子顕微鏡単粒子解析データにあてはめることができるタンパク質の原子分解能構造を提供できただけでなく、その構造を得るためには、375 番目の Leu、389 番目の Leu および 633 番目の Arg の相互作用が何らかの方法で失わなければならないことを示した。活性化にこの相互作用が重要であることを示したのははじめてであったため、分子生物学の手法を用いて、この相互作用が構造変化を妨げる鍵になっているかどうかを確かめた。その結果これらのアミノ酸残基を小型のアミノ酸残基に置換すると、インテグリンの機能制御がうまくいかなることが判明した。今回の研究結果は、インテグリンの研究者に対して機能に重要な新しい部位を新たに提示できたことを意味し、インテグリン研究の発展に貢献できたと考えられる。インテグリンは細胞間相互作用に関与するタンパク質であり、血液凝固や免疫反応の際に活躍することがわかっている。そのため炎症抑制剤や血液凝固剤などの研究では、インテグリンと薬剤分子との相互作用の研究が盛んに進められている。さらに今回の計算結果は、計算機によるタンパク質基準振動解析の結果が、タンパク質の機能に重要な部位を予測できたことを意味する。インテグリンの例のように、局所的な相互作用の変化が大規模な構造の変化を引き起こすことは、タンパク質では頻繁に起こっていると考えられるので、ここで用いた手法が他のタンパク質の構造変化の解析においても力を発揮すると期待される。

B. あてはめの精密化法の開発(石田、堤、米谷)

(1)研究実施内容及び成果

生体超分子低分解能像に、原子分解能要素分子構造をあてはめた直後には、要素分子を剛体として扱っているために、あてはめがうまくいっていない部分が随所に存在する。生体超分子構造形成過程では、要素分子の構造変化がある程度起こっているためと考えられる。また要素分子のみでのX線結晶解析を行った結果、分子の結晶化の際に生体超分子内では見られない相互作用が発生し、構造が変化してしまっていることも考えられる。よって要素分子の構造変化(柔軟さ)を考慮しながら要素分子構造を低分解能の超分子構造にあてはめる必要がある。そこで本研究グループでは、立体化学的な拘束条件下で、分子動力学シミュレーションの手法を用いて要素分子の立体構造を生体超分子の低分解能像にあてはめる技法を開発した。

分子動力学シミュレーションによるあてはめの最適化では、あてはめられた立体構造から擬似的な電子顕微鏡像を次式で求める。

$$\rho_{\text{sim}}(\mathbf{r}_{M_k}) = \sum_i \rho_i G(\mathbf{r}_{M_k} - \mathbf{r}_i) \quad (1)$$

ここで、 $\rho_{\text{sim}}(\mathbf{r}_{M_k})$ は k 番目のグリッド位置 $\mathbf{r}_{M_k}$ における計算による電子顕微鏡像のデータ値で、 ρ_i は原子 i の原子質量、 $\mathbf{r}_i$ は原子 i の原子座標、 G は Gaussian 関数である。本技法で用いる分子シミュレーションでは、次のエネルギー関数にもとづいて分子を運動させる。

$$U_{\text{total}} = k_{EM} \cdot U_{EM} + U_{\text{str}} \quad (2)$$

ここで、 k_{EM} は重み定数、 U_{EM} は実験による電子顕微鏡像と計算による電子顕微鏡像との不一致度を表す量で、次式のように求める。

$$U_{EM}(\{\mathbf{r}_M\}_{\text{exp}}, \{\mathbf{r}_M\}_{\text{sim}}) = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n (\rho_{\text{exp}}(\mathbf{r}_{M_k}) - \rho_{\text{sim}}(\mathbf{r}_{M_k}))^2 \quad (3)$$

ここで、 $\{\mathbf{r}_M\}_{\text{exp}}$ と $\{\mathbf{r}_M\}_{\text{sim}}$ はグリッド $\mathbf{r}_{M_1}, \mathbf{r}_{M_2}, \dots, \mathbf{r}_{M_n}$ におけるそれぞれ実験と計算による

電子顕微鏡像データの集合を表す。(3)を最小化すれば実験による電子顕微鏡単粒子解析像と、計算による電子顕微鏡像が最大限に一致するが、過度にあてはめると原子間に不自然な衝突が生じる恐れがある。(2)の k_{EM} は、そのような過度なあてはめを抑制する適切な値をもつパラメーターである。 U_{str} は、分子動力学シミュレーションで通常扱われる原子間の共有結合と非共有結合にもとづく原子間相互作用エネルギーである。実験による電子顕微鏡像と、計算による電子顕微鏡像の違いを最小になるように人工的な力(フィッティング力)は、次式にしたがい計算する。

$$\mathbf{F}_{EM}(\mathbf{r}_i) = \sum_{k=1}^n \left\{ (\rho_{\text{exp}}(\mathbf{r}_{M_k}) - \rho_{\text{sim}}(\mathbf{r}_{M_k})) \cdot (-\Delta_{\mathbf{r}_M} \rho_{\text{sim}}(\mathbf{r}_{M_k})) \times \frac{\rho_i \cdot G(\mathbf{r}_{M_k} - \mathbf{r}_i)}{\rho_{\text{sim}}(\mathbf{r}_{M_k})} \right\} \quad (4)$$

ここで、 $\Delta_{\mathbf{r}_M}$ は $\mathbf{r}_{M_k}$ 周りの差分演算子である。このフィッティング力を分子動力学シミュレーションが通常扱う共有結合と非共有結合にもとづく原子間相互作用力に加えて、分子を熱運動させる。

分子動力学シミュレーションを用いて(2)を最小化するためには、系の温度を高温からゆつくりと 0 度に冷やすシミュレーティッドアニーリング法を用いるのが有力である。このように分子動力学シミュレーションを用いることにより、物理化学的に可能な範囲の中で構造を変化させ

ることができる。電子顕微鏡像の解像度によっては、タンパク質の二次構造など部分的な形状が明瞭でない場合もありえる。このような状況にも対応できるように、分子動力学シミュレーションの実行時に、要素分子立体構造の任意の部分を剛体として扱えるようにした。これにより、電子顕微鏡像において、信頼性の低い部分には原子を無理やりあてはめず、信頼性の低い部分はシミュレーション開始時に構造を固定することも可能とした。

この技法を用いて、ポリペプチド合成生体超分子リボソームのX線結晶解析構造を、様々な反応状態の電子顕微鏡単粒子解析像にあてはめることで、それぞれの反応状態に相当する立体構造モデルを原子レベルで構築した。リボソームは要素分子であるタンパク質と核酸が約50個集合して構成される生体超分子である。

リボソームの原子解像度構造として、30S サブユニットと 50S サブユニットのX線結晶解析による立体構造(PDB:1YL3と1YL4、解像度 5.5 Å、高度好熱菌由来、遺伝子情報翻訳進行状態)を用いた。電子顕微鏡単粒子解析データとしては、EMBL-EBI に登録されている大腸菌由来のリボソーム像で、以下の4つの状態にある6つを用いた。(1)ポリペプチド合成初期状態のリボソームの像(登録番号 1003(解像度 11.5 Å、グリッド間隔 2.93 Å))。(2)ポリペプチド合成状態のリボソームの像(登録番号 1004(解像度 13 Å、グリッド間隔 2.25 Å))。(3)ポリペプチド合成終了状態のリボソームの像(登録番号 1005(解像度 14 Å、グリッド間隔 2.419 Å)、登録番号 1006(解像度 11.3 Å、グリッド間隔 2.82 Å)、登録番号 1007(解像度 12.9 Å、グリッド間隔 2.82 Å))。(4)ポリペプチド合成休止状態のリボソームの像(登録番号 1068(解像度 13.4 Å、グリッド間隔 3.33 Å))。これらの電子顕微鏡単粒子解析データは、三次元グリッドの各点にスカラ量をもつデータである。観測データとX線結晶解析により得られる構造との体積を合わせるために、電子顕微鏡データのグリッド点における値が閾値以上の場合は、グリッド点の値を 1 に、閾値未満の場合は値を 0 にした。閾値はリボソームの分子量から推定される体積にもとづいて決定した。この2値化によって式(4)にあげるフィッティング力は、生体超分子表面で顕著に現れるようになる。要素分子の構造変化は、多くの場合分子表面で起こることが期待されるので、2値化は妥当な手続きと考えられる。分子動力学シミュレーションでは系の温度を高温からゆっくりと 0 度に冷やすシミュレーティッドアニーリング法を用いて、物理化学的に可能な範囲の中でリボソーム立体構造の最適化を実行した。なお最適化においては、静電相互作用の計算に十分注意する必要がある。静電相互作用は長距離力であり、静電相互作用計算を実行する際に長距離部分を無視するカットオフ距離を導入すると、そのことが原因になり、シミュレーション結果に不自然なことが発生する(原著論文発表 [9])。

本プロジェクトで開発した慣性主軸法を用いて、リボソームX線立体構造全体を電子顕微鏡像にあてはめると、電顕微鏡像データの値をもつ全グリッド点のうち約 70%のグリッド点の近傍に原子が存在するようになった(表)。その構造を初期値として分子動力学シミュレーションによる最適化を行ったところ、7%程度の向上が見られた。つまり、要素分子の柔らかさを考慮した手法は、剛体フィッティングより約 7%程度あてはめを向上させることができた。構築したリボソームの立体構造と初期構造との違いは、全原子の平均二乗変位で約 5 Å 程度であった。また各要素タンパク質は初期構造と比較すると、2 から 6Å 程度移動していることがわかった。こ

これらの構造変化は、リボソームのポリペプチド合成の様々な反応状態における立体構造の違いを反映していると考えられる。

立体構造モデルを電子顕微鏡単粒子解析像にあてはめる際には、要素分子の立体構造は剛体として扱われる場合が多い。そのために、要素分子を構成する原子間に不自然な衝突が生じたり、電子顕微鏡像と要素分子とのずれが残ることが問題となる。そこで本プロジェクトでは、要素分子の柔らかさも考慮しながら要素分子を電子顕微鏡像にあてはめるための分子動力学シミュレーションを実行するプログラムを開発し、より現実的な生体超分子原子分解能立体構造をえることができるようにした。要素分子の柔らかさも考慮しながら要素分子を電子顕微鏡像にあてはめる計算機的技法は、本プロジェクト以外でも開発されている。しかし多くの技法では、計算コストを下げるために立体構造の変化を限定しているため、原子間の不自然な衝突を完全に解消することができていない。ここで開発した技法は計算コストの問題を計算手法の並列化によって解決し、要素分子を完全な形で取り扱うことを実現している。

表:さまざまなリボソームの状態にX線構造をあてはめた結果

データベース登録番号	1003	1004	1005	1006	1007	1068
剛体あてはめ度(%)	76.9	64.4	58.7	70.3	71.8	73.0
最適化後(%)	83.1	72.6	65.8	79.6	80.0	77.7
変異(Å)	5.04	5.77	4.59	4.54	4.67	3.50
重心移動(Å)	1.27	1.96	1.20	3.08	3.21	1.53
要素分子の配向(度)	2.44	3.40	3.10	6.57	6.75	2.81

(2)研究成果の今後期待される効果

この技法を用いれば、様々な反応状態のリボソームの原子分解能の立体構造を網羅的に構築することが可能になった。これらの立体構造の違いを詳しく解析することで、リボソームのポリペプチド合成機構の詳細がわかっていくことが期待できる。

3.3 生体分子像データの取得(大阪大学 生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本グループは、原子分解能で判明している要素分子の立体構造をあてはめるための生体分子低分解能密度図を提供してきた。透過型電子顕微鏡による生体分子の三次元構造解析には、単粒子解析法がもっともよく使われる。しかし、単粒子解析法における最大の弱点は、最終構造の信頼性を評価する手段がないことである。このために、慎重な構造解析が要求される。特に初期構造は重要であり、得られる結果も初期構造の影響を受けるため、たとえ低分解能であっても正しい構造である必要がある。昨今は、単粒子解析用ソフトウェアパッケージの普及と共に、中央断面定理に基づいたコモンライン法(角度再構成法)による初期構造の計算が頻繁に使用されるようになってきた。この方法を用いると、初期構造を得るために、改

めてデータを取り直す必要がなく、非常に簡便に初期構造が得られるがゆえに、頻繁に使われるようになっていいると考えられる。対称性を内在する分子や、核酸などの強いコントラストをもつ分子であれば、この方法を用いることは妥当である。しかし、対称性のない分子や構造が柔軟に変化する生体分子では、コモンライン法はうまく動作しない。さらにこの方法で導出された低分解能構造が正しいかどうかを評価できない。そこで本グループは、原子分解能要素立体構造のあてはめに耐えうる、十分信頼性のある三次元低分解能構造を他チームへ提供することを第一の目的とし、低分解能構造導出法の開発も行った。

A. 単粒子トモグラフィー(岩崎)

原子分解能要素立体構造のあてはめに耐えうる、十分信頼性のある三次元低分解能構造を得るために単粒子トモグラフィーの手法を開発した(原著論文発表 [7])。電子線トモグラフィーは、通常、細胞のオルガネラなどの三次元可視化に使われる。つまり、平均化のできない構造物を三次元再構成するための道具である。試料を電子顕微鏡内で -70° $\sim$ $+70^{\circ}$ まで、あるいは -60° $\sim$ $+60^{\circ}$ まで 1° $\sim$ 2° おきに傾斜させながら撮影し、得られた傾斜像シリーズから逆投影法などの方法により再構成する。この方法を生体高分子に使えば、角度が既知のため信頼性の高い三次元構造が得られる。

この方法は、大きな構造変化をおこす分子の解析にも利点がある。透過型電子顕微鏡の写真は生体分子の投影像となっているため、同種の分子であるにもかかわらず異なる構造の像が混ざっている場合には、一般的には粒子の配向が異なるためにそのように見えていると考えられる。しかし生体分子が大きな構造変化を起こしている場合でも、異なる構造の像が混在することになるため、実際には両者の区別はつかない。しかし電子線トモグラフィーの手法を用いれば、真に一つ一つの粒子の三次元構造を求めることになるので、三次元構造に基づいて粒子の分類が可能になる。さらに、それら同一の構造をもった分子で像の平均化を行うことができるので、分解能が改善された構造の異なる分子像が得られるようになる。このことは、電子線トモグラフィーの手法が固有にもつ、試料傾斜角が制限されるためにおこるデータ欠損領域による分解能の異方性の問題も解消できるのである。

本グループでは、電子線トモグラフィーの手法を生体高分子に適用するにあたり、新たにサブティルトシリーズという概念を導入した。生体分子の電子線トモグラフィーの手法では、精製した生体分子をネガティブ染色し傾斜像シリーズを撮った後に全体像を三次元再構成し、粒子を切り出す方法が考えられる。しかしこの手続きでは、傾斜像シリーズを撮影している間に試料が付着している支持膜(カーボン膜)が、電子線による照射のためにわずかながら変動する。そのために、トモグラフィーによる再構成領域が広がれば広がるほど、この歪みの影響が深刻になり、得られる像が全体的にぼけた像となる。そこで、本グループは細胞のような大きな構造物でなく、生体分子の三次元構造が目的であることを生かし、次の手順で解析を行った。まず粒子一つ一つの画像を各傾斜像から切り出し、粒子一個一個についての傾斜像シリーズ(サブティルトシリーズ)を作製する。次にそれぞれで画像アライメントを行い、逆投影法により再構成する。得られた三次元像の立体像アライメントを行い平均化する。この結果、アライメ

ントの精度が格段によくなり、原子構造があてはめられるほどの質のよい生体分子三次元像を得られるようになった。

B. インテグリン(岩崎、永井)

単粒子トモグラフィー法を用いて、細胞接着分子受容体インテグリンの、 $\alpha 2 \beta 1$ の三次元初期構造を求めた。インテグリンは、 α サブユニット 18種類、 β サブユニット8種類からなる24種類のヘテロダイマーを形成するタンパク質群の総称である。動物の基底膜や血小板など様々な組織に存在することから、創薬と病理解明のターゲットとしても非常によく研究されている。血小板や白血球に存在するインテグリンは、必要な時にのみリガンドに対する結合能を迅速に発揮しなければならないが、その分子メカニズムは不明であった。2001年に Arnaout らの $\alpha v \beta 3$ 細胞外ドメインの原子構造の報告、および2002年の高木らのジャックナイフモデルの報告にて、分子メカニズムの解明が急速に展開した。

$\alpha 2 \beta 1$ は I ドメインとよばれる部分を介して、コラーゲンなど様々なマトリックスおよび非マトリックスリガンドと結合する。 $\alpha 2 \beta 1$ は免疫応答において非常に重要な役割を果たしており、活性化されたT細胞やNK細胞などに高発現している。I ドメインを介してインテグリンがリガンドと結合したことが、何らかの形で細胞内部に伝わり、その結果細胞に変化が生じることが細胞生物学の手法によって明らかにされているが、どのようにしてシグナルが細胞内へと伝わるかはまだ明らかにされていない。この謎を解くためには、 $\alpha 2 \beta 1$ の原子分解能立体構造モデルが必要だが、インテグリンの結晶化は非常に困難であるうえに、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンは糖鎖修飾が他のインテグリンより非常に多いために、X線結晶解析は絶望的である。しかし、幸いなことに I ドメインのみの結晶構造は解かれており、その他のドメインは、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンと類似であることが期待されるので、 $\alpha 2 \beta 1$ の低分解能像にそれらをあてはめることができれば、 $\alpha 2 \beta 1$ の原子分解能立体構造を得ることができ、活性化のメカニズム解明の一助となりうる。活性化抗体 TS2-16 を HEK 細胞で発現したインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の三次元像を、単粒子トモグラフィーの手法で求めたところ、起き上がり型(図21)と折れ曲がり型と推測できる二種類の構造が観察された。

同様に、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンの電子顕微鏡三次元像をリガンド低親和性状態で単粒子解析で測定し、すでにX線結晶解析によって原子分解能で明



図21: インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ の単粒子トモグラフィー法による構造解析結果

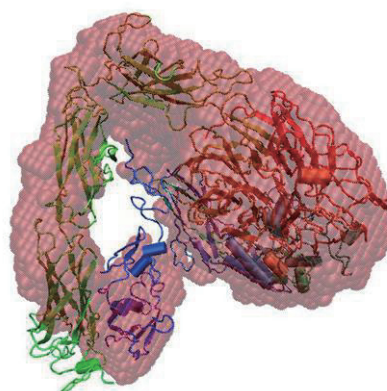


図22: インテグリン $\alpha v \beta 3$ の非活性化型構造を単粒子トモグラフィー法により明らかにし、基準振動解析法により変形したX線原子分解能構造をあてはめた結果。

らかになっている構造のあてはめを試みた。 $\alpha v \beta 3$ の結晶構造は折れ曲がっているために本プロジェクトで開発した基準振動解析の方法により、構造を変形する必要がある。折れ曲がった構造は、当初は結晶化による人為的構造変化だと思われていた。しかしその後、折れ曲がった構造はリガンドに対する低親和性状態を反映している構造(非活性型)であることが実験的に判明している。本グループでは、低親和性状態をつくりだす 5mM Ca^{2+} の条件下で $\alpha v \beta 3$ インテグリンを固定し、電子顕微鏡観察を行った。得られた像は非常に均一な構造に由来していたことより、単粒子解析法を用いて $\alpha v \beta 3$ インテグリンの非活性型三次元構造を得た。X線結晶解析で得られている非活性型原子構造をあてはめたところ、X線結晶解析による構造そのままではあてはまり度が悪く、分子の折れ曲がり角度をすこし緩くする必要があった(図22)。このことは、インテグリンの低親和性状態は、結晶構造解析の構造よりもやや開いており、結晶内の構造は実際の折れ曲がり角度よりさらに曲げられていることを示唆している(原著論文発表 [4,5])。

C. リーリン(岩崎)

単粒子トモグラフィー法により、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おこなった。リーリンは、分子量 388kDa で、大脳皮質や海馬の神経構造の形成に必須であることが知られている。リーリンのアミノ酸配列には、特徴的な繰り返し配列(リーリンリピート)が8つタンデムに存在する。このリピートの一単位(第3リピート)の結晶構造が岩崎の所属する研究室の禾らによって解かれた。さらに高次構造を求めるため、このうち3番目から6番目のリーリンリピートからなる断片を発現精製した試料をネガティブ染色にて観察した。この断片は、受容体に結合することが報告されている。単粒子トモグラフィー法を適用したが、今回はさらに二軸での撮影を行い、データ欠損領域を抑えた。その結果、わずか10個の粒子から(単粒子解析では、通常4000〜30,000個の粒子を使用する)ドメイン一つ一つが区別できるほどの三次元像を得ることができた。第3リピートの原子分解能立体構造を4つのドメインにあてはめたところ、互いに平行移動の関係にあることがわかった(図23)。非常に珍しい配向だが、第5リピートと第6リピート断片のつながった結晶構造が同研究室より報告され、このあてはめが正しいことが証明された(原著論文発表 [8])。

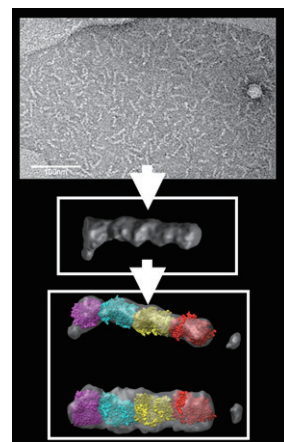


図23:リーリンの単粒子トモグラフィー解析と原子分解能ドメインのあてはめ結果

D. PprA(岩崎)

DNA 修復促進タンパク質 PprA は、本プロジェクトの代表研究者らが所属する日本原子力研究開発機構で単離同定されたタンパク質である。このタンパク質は、放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* の放射線抵抗性を生み出す因子のひとつと考えられている。単体の分子量が 31kDa と小さいことから、ランダムユニカルティルト法を用いて初期構造を測定した。

ランダムコニカルティルト法は、カーボン膜への分子の吸着方向に嗜好性がある場合には利用できる方法である。ただし、対称性のない生体分子の場合には、非傾斜像と傾斜像のペアを4000個以上の粒子数が含まれるまで撮影しなければならない上に、生体分子がランダムにカーボン膜へ吸着している場合には本方法はうまくいかない。PprA は多量体を形成することから対称性をもつので、コモンライン法により初期構造を求めることもできた。コモンライン法は、中央断面定理を用いて単粒子解析用のデータから初期構造を得る方法で、初期構造のためにあらためてデータを取り直す必要がない。しかし、ノイズに影響されやすく、対称性がない分子では間違った構造を与えてしまうことが多い。これらの手法により、PprA の初期構造生成がうまくいった。

E. クランプとクランプローダー(真柳、鈴木)

DNAは生物一個体のすべての情報を保存する分子であり、遺伝とはこの分子がもつ情報を次世代に写すことに他ならない。DNA の情報を写す行為は細胞分裂の際にも起こる。DNA の複製は、DNA ポリメラーゼによって行われる。DNA ポリメラーゼが DNA と相互作用し、DNA を連続的に正しく複製するためには、DNA ポリメラーゼを DNA につなぎ止める分子が必要である。クランプとよばれるこの分子は、環状構造をしており、DNA を完全に取り囲んでいる。クランプと強く相互作用した DNA ポリメラーゼは、DNA の近傍に常に存在しながら、DNA 上を移動することができ、連続して複製を実行することができるようになる。環状構造のクランプを DNA に装着する生体分子がクランプローダーであり、クランプとクランプローダーの複合体は、DNA 複製装置には欠かせない生体超分子である。

クランプとクランプローダーおよび DNA の複合体を構築し、ネガティブ染色した資料を用いて単粒子解析を行った。その結果 DNA を含むすべての要素分子の構造を低分解能で明らかにすることができた(図24)。えられた構造からは、クランプが上下に開いていることがはじめて明らかになった(図24上)。本構造が発表されるまでは、クランプローダーがクランプをどのように変形しているかは明らかになっていなかった。本グループの解析結果は、クランプが左右ではなく上下に開くことを明らかにできたことが重要である(原著論文発表 [3])。

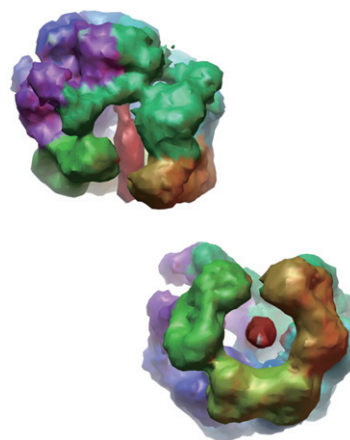


図24:クランプ、クランプローダー、およびDNAから構成される複製生体超分子の単粒子解析結果。

(2)研究成果の今後期待される効果

単粒子トモグラフィーの開発により、信頼性のある初期構造を素早く手に入れることができるようになった。これにより単粒子解析法の信頼性が高まり、結晶化の困難なタンパク質や大きな構造変化が発生するタンパク質の構造解析への普及が進むものと考えられる。

ここで構造を明らかにできたいずれの分子もが医学薬学的に重要であり、ここでの成果が同

分野に貢献することが期待できる。

4 研究参加者

①研究グループ名:生体超分子バイオインフォマティクス研究グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
由良 敬	日本原子力研究開発機構・システム計算科学センター	研究副主幹	相互作用部位推定	平成 16 年 10 月～平成 20 年 3 月
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	画像フィッティング	平成 16 年 10 月～平成 20 年 3 月
米谷佳晃	科学技術振興機構	CREST 研究員	精密化手法開発における長距離相互作用の取扱い	平成 17 年 10 月～平成 19 年 3 月
楫 和子	科学技術振興機構	CREST 事務員	事務整理	平成 16 年 12 月～平成 20 年 3 月

②研究グループ名:生体超分子シミュレーション研究グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
石田 恒	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	精密化手法開発	平成 16 年 10 月～平成 20 年 3 月
松本 淳	日本原子力研究開発機構・システム計算科学センター	研究員	基準振動解析法開発	平成 16 年 10 月～平成 20 年 3 月
堤 遊	科学技術振興機構	CREST 研究員	精密化手法開発	平成 17 年 4 月～平成 18 年 11 月

③研究グループ名:生体超分子電子顕微鏡像測定研究グループ

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
岩崎憲治	大阪大学・蛋白質研究所	准教授	電顕像データ取得	平成 16 年 10 月～平成 20 年 3 月
真柳浩太	生物分子工学研究所・構造解析研究部	主任研究員	電顕像データ取得	平成 16 年 10 月～平成 17 年 9 月
鈴木博文	科学技術振興機構	CREST 研究員	電顕像データ取得	平成 17 年 10 月～平成 18 年 5 月

永井里奈	科学技術振興 機構	C R E S T 研究員	電顕像データ取得	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
------	--------------	------------------	----------	-----------------------------

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
宮下 治 (アリゾナ大学・助教授)	超分子構成要素タンパク質の構造変化を推定する手法に関して話し合うため。	日本原子力研究開発機構・システム計算科学センター内	平成 17 年 11 月 2 日～12 月 12 日
Steven J. Hayward (英国東アングリア大学・上級講師)	生体超分子構造の要素タンパク質間界面構造の詳細な分類を共同で行い、要素タンパク質構造あてはめの際に必要なあてはまり度を測定する基準構築を試みるため。	日本原子力研究開発機構・システム計算科学センター内	平成 19 年 2 月 25 日～4 月 6 日

6 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 11 件)

- [1] O.T.P. Kim, K. Yura, N. Go and T. Harumoto, Newly sequenced eRF1s from ciliates: the diversity of stop codon usage and the molecular surfaces that are important for stop codon interactions. *Gene*, **346**, 277-286 (2005).
- [2] S. Metsugi, A. Uenoyama, J. Adan-Kubo, M. Miyata, K. Yura, H. Kono and N. Go, Sequence analysis of the gliding protein Gli349 in *Mycoplasma mobile*. *BIOPHYSICS*, **1**, 33-43 (2005).
- [3] T. Miyata, H. Suzuki, T. Oyama, K. Mayanagi, Y. Ishino and K. Morikawa, Open clamp structure in the clamp-loading complex visualized by electron microscopic image analysis. *PNAS*, **102**, 13795-13800 (2005).
- [4] K. Iwasaki, K. Mitsuoka, Y. Fujiyoshi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, K. Sekiguchi and T. Yamada, Electron tomography reveals diverse conformations of integrin α IIb β 3 in the active state. *J. Struct. Biol.*, **150**, 259-267 (2005).
- [5] J. Goto, T. Yasunaga, R. Nagai, A. Matsumoto, K. Yura, J. Takagi and K. Iwasaki, Toward the elucidation of the pathway of integrin conformational changes. *Modern Scientific Instruments, Supplementary*, 65-66 (2006).
- [6] O.T.P. Kim, K. Yura and N. Go, Amino acid residue doublet propensity in the protein-RNA interface and its application to RNA interface prediction. *Nucl. Acids Res.*, **34**, 6450-6460 (2006).
- [7] K. Iwasaki, Single particle analysis and electron tomography. *Int. J. Nanotechnology*, **3**, 480-491(2006).

- [8] T. Nogi, N. Yasui, M. Hattori, K. Iwasaki and J. Takagi, Structure of a signaling-competent reelin fragment revealed by X-ray crystallography and electron tomography. *EMBO J.*, **25**, 3675-3683 (2006).
- [9] Y. Yonetani, Liquid water simulation: A critical examination of cutoff length. *J.Chem. Phys.*, **124**, 204501 (2006).
- [10] N. Fukuhara, N. Go and T. Kawabata, Prediction of interacting proteins from homology-modeled complex structures using sequence and structure scores. *BIOPHYSICS*, **3**, 13-26 (2007).
- [11] K. Kato, H. Tanaka, T. Sumizawa, M. Yoshimura, E. Yamashita, K. Iwasaki and T. Tsukihara, *Acta Crys. D*, in press.

(2) その他の著作物（総説、書籍など）

- [1] 岩崎憲治, 宮澤淳夫, クライオ電子顕微鏡法と X 線結晶構造解析のハイブリッドアプローチによって提案されたイノシトール三リン酸受容体の Ca^{2+} 放出のメカニズム. *生物物理*, **45**, 192-197 (2005)
- [2] 鈴木博文, 宮田知子, 真柳浩太, 石野良純, 大山拓次, 森川耿右, DNA にクランプをはめ込むしくみー単粒子解析で見えた生き生きとした姿. *生物物理*, **46**, 345-348 (2006)
- [3] 米谷佳晃, 生体分子シミュレーションにおける長距離相互作用の扱いについて. 分子シミュレーション研究会会誌 “アンサンブル”, **8**, 33-36 (2006)
- [4] Y. Yonetani, On the treatment of long-range electrostatic interactions in biomolecular simulations. "Frontiers of Computational Science" (eds. Y. Kaneda, H. Kawamura and M. Sasai), Springer, 209-214 (2007)

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 22 件、国際会議 3 件)

- [1] 岩崎憲治^{1,2} (1.大阪大学蛋白質研究所 2.科学技術振興機構 CREST) 単粒子解析法で明らかになった T4 ファージキャプシドの成長過程. 微生物の構造・機能の顕微科学的解析談話会, 日本女子大学, 平成 17 年 6 月 4 日.
- [2] 由良 敬^{1,2} (1.日本原子力研究所計算科学技術推進センター 2.科学技術振興機構 CREST) 立体構造情報を取り込んだタンパク質機能推定ーDNA修復関連タンパク質を中心にー. 第 5 回日本蛋白質科学学会年会, 福岡国際会議場, 平成 17 年 6 月 30 日～7 月 2 日.
- [3] 岩崎憲治^{1,2} (1.大阪大学蛋白質研究所 2.科学技術振興機構 CREST) 電子顕微鏡による生体高分子の構造解析, 第 18 回バイオメディカル分析科学シンポジウム. グランシップ (静岡県コンベンションセンター), 平成 17 年 8 月 5 日.
- [4] 由良 敬^{1,2} (1.日本原子力研究所計算科学技術推進センター 2.科学技術振興機構 CREST) 分子進化的視点から捉える電子顕微鏡三次元像. 日本顕微鏡学会生体構造解析分科会 2005 年度研究討論会, 九州工業大学飯塚キャンパス, 平成 17 年 9 月 21 日～22 日.
- [5] 石田 恒^{1,2} (1.日本原子力研究所中性子利用研究センター 2.科学技術振興機構 CREST) 分子シミュレーションを利用した生体超分子構造の電子顕微鏡へのフィッ

ディング. 日本顕微鏡学会生体構造解析分科会 2005 年度研究討論会, 九州工業大学飯塚キャンパス, 平成 17 年 9 月 21 日～22 日.

- [6] 鈴木博文¹, 宮田知子², 大山拓次², 真柳浩太², 石野良純³, 森川耿右² (1. 科学技術振興機構 CREST 2. 生物分子工学研究所構造解析研究部 3. 九州大学農学研究院) DNA-蛋白質複合体の単粒子解析. 第 50 回日本顕微鏡学会シンポジウムー顕微鏡学による次世代への挑戦ー, 九州大学医学部地区百年講堂, 平成 17 年 11 月 1 日～2 日.
- [7] 岩崎憲治^{1,3}, 松本麻里子¹, 永井里奈², 高木淳一¹ (1. 大阪大学蛋白質研究所 2. 理化学研究所播磨研究所 3. 科学技術振興機構 CREST) 電子線トモグラフィーを用いた生体高分子の構造解析. 第 50 回日本顕微鏡学会シンポジウムー顕微鏡学による次世代への挑戦ー, 九州大学医学部地区百年講堂, 平成 17 年 11 月 1 日～2 日.
- [8] 岩崎憲治^{1,2} (1. 大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST) 蛋白質のトモグラフィー, 日本顕微鏡学会関西支部特別講演会 平成 17 年度生理学研究研究所研究会「位相差断層電子顕微鏡の医学的・生物学的応用」共催, ソフトマテリアルの無染色像の観察ー見えないものを観る. 岡崎コンファレンスセンター, 平成 18 年 1 月 26 日～27 日.
- [9] K.Iwasaki^{1,2}, A.Matsumoto^{2,3}, K.Yura^{2,3}, T.Goto¹, T.Yasunaga¹, R.Nagai⁴, J.Takagi¹ (1. Inst. for Protein Res., Osaka Univ. 2. CREST, JST 3. Quantum Bioinformatics Team, CCSE. Japan Atomic Energy Agency 4. RIKEN) The elucidation of the pathway of integrin conformational changes. Natural Science Foundation of China and Japan Society for the Promotion of Science, The Third China-Japan Joint Seminar on Atomic Level Characterization, Xiamen (Amoy), China, March 6-10, 2006.
- [10] 由良 敬^{1,2} (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST) 生体超分子の構成分子にみられる相互作用の特徴. 大阪大学蛋白質研究セミナー「生体分子構造情報の時間軸への展開による生命機能の解読」, 大阪大学蛋白質研究所, 平成 18 年 3 月 22 日～23 日.
- [11] 由良 敬^{1,2} (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST) 生体超分子構成タンパク質にみられる相互作用の様式. 第 6 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「タンパク質相互作用のバイオフィオマティクス: ネットワークから超分子複合体まで」, 国立京都国際会館, 平成 18 年 4 月 24 日～26 日.
- [12] 鈴木博文¹, 宮田知子², 大山拓次³, 真柳浩太⁴, 石野良純⁵, 森川耿右³ (1. 科学技術振興機構 CREST, 2. 大阪大学大学院生命機能, 3. 大阪大学蛋白質研究所, 4. 長浜バイオ大 生命情報, 5. 九州大学大学院農学部) DNA 複製に関わる AAA⁺タンパク質複合体の電子顕微鏡構造解析. 第 6 回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「AAA⁺タンパク質の高次構造と作用のダイナミクス」, 国立京都国際会館, 平成 18 年 4 月 24 日～26 日.
- [13] 岩崎憲治^{1,2} (1. 大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST) 単粒子トモグラフィー法によるインテグリンの構造解析. 第 27 回癌研究会癌研究所蛋白創製研究部, 東京, 平成 18 年 5 月 29 日.
- [14] K.Iwasaki^{1,2} (1. Inst. for Protein Res., Osaka Univ. 2. CREST, JST) Single particle

tomography. 21st Century COE of Biological Science, Institute for Protein Research, Osaka University, International Frontier of Membrane Research Program of OIB Okazaki and IPR Osaka Japan/UK Bilateral JST Program for Biotechnology, Osaka Univ., Japan, Nov. 7-8, 2006.

- [15] 由良 敬^{1,2} (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST) タンパク質立体構造情報と分子進化情報にもとづく RNA 結合部位の推定. 学友会シンポジウム「バイオインフォマティックスの基礎とフロンティア」, 国立感染症研究所(東京), 平成 19 年 3 月 20 日.
- [16] 岩崎憲治^{1,2}, 禾 晃和¹, 安井典久¹, 北尾公英¹, 後藤龍珀³, 安永卓生³, 高木淳一¹ (1.大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 九州工業大学) 電子線トモグラフィ・単粒子解析・X 線結晶構造解析によるハイブリッド構造解析. 日本顕微鏡学会第 63 回学術講演会, 朱鷺メッセ(新潟), 平成 19 年 5 月 20 日～22 日.
- [17] 岩崎憲治^{1,2}, 片山寿美枝¹, 高木淳一¹, 松本 淳^{2,3}, 由良 敬^{2,3}, 安永卓生⁴, 伊藤喜子⁵. (1.大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST 3 日本原子力研究開発機構 4 九州工業大学 5 ライカマイクロシステム) クライオ 3D:マクロ分子の構造解析. 日本顕微鏡学会第 63 回学術講演会, 朱鷺メッセ(新潟), 平成 19 年 5 月 20 日～22 日.
- [18] 岩崎憲治^{1,2}, 安永卓生³, 片山寿美枝¹, Taiyun Wei⁴, 大村敏博⁴, 永井里奈², 高木淳一¹. (1.大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST 3.九州工業大学 4. 中央農業総合研究センター), 電子線トモグラフィ. 第 7 回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 平成 19 年 5 月 24 日～26 日.
- [19] 由良 敬^{1,2} (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST) 生体超分子の原子分解能構造情報を得るための生体分子相互作用面の予測, 理研シンポジウム 計算機と生物学, 理化学研究所鈴木梅太郎ホール(埼玉), 平成 19 年 6 月 29 日.
- [20] 岩崎憲治^{1,2} (1.大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST) 電子顕微鏡イメージング法の現状と未来. 第 4 回放射光学会若手ワークショップ, Spring-8 放射光普及棟(播磨), 平成 19 年 8 月 6 日～7 日.
- [21] K. Iwasaki^{1,2} (1. Inst. for Protein Res., Osaka Univ. 2. CREST, JST) Electron microscopy imaging of extracellular proteins. 2007 Annual Meeting, Korea Society of Microscopy, Korea Research Institute of Standards and Science, Daejeon, Korea, Nov. 14-16, 2007.
- [22] 由良 敬^{1,2,3}, Oanh Kim⁴, 郷 信広³ (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 日本原子力研究開発機構量子生命フロンティア 4. 奈良女子大学理学部) タンパク質立体構造情報と分子進化情報にもとづく生体高分子相互作用部位の推定. 第 45 回日本生物物理学会年会, パシフィコ横浜, 平成 19 年 12 月 21 日～23 日.
- [23] 岩崎憲治^{1,2} (1.大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST) 電子顕微鏡イメージングの現状と展望. 第 3 回プロテオミクス・構造生物学講演会, 岡崎コンファレンスセンター, 平成 20 年 1 月 13 日.
- [24] 岩崎憲治^{1,2} (1.大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST) 分子分解能電子顕微鏡イメージング. ERL サイエンス研究会 1, 高エネルギー加速器研究機構(筑

波), 平成 20 年 3 月 16 日~17 日.

- [25] 由良 敬^{1,2} (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST) タンパク質の立体構造にもとづく相互作用構造の推定. 日本薬学会第 128 年会, パシフィコ横浜, 平成 20 年 3 月 26 日~28 日.

② 口頭発表 (国内会議 2 件、国際会議 1 件)

- [1] 宮田知子¹, 鈴木博文^{1,2}, 大山拓次¹, 真柳浩太¹, 石野良純³, 森川耿右¹ (1. 生物分子工学研究所構造解析研究部 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 九州大学農学研究院) 電子顕微鏡単粒子解析によってとらえた DNA クランプはめ込み複合体中のクランプ開環構造. 第 28 回日本分子生物学会年会ワークショップ「タンパク質構造から展開する DNA 複製システムのダイナミクス」, シーホークホテル福岡, 平成 17 年 12 月 7 日~10 日.
- [2] 才川直哉^{1,2}, 鈴木博文^{1,2}, 秋山芳展^{2,3}, 伊藤維昭^{2,3}, 木村能章^{1,2} (1. 生物分子工学研究所構造解析研究部 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 京都大学ウィルス研究所) 大腸菌 FtsH プロテアーゼの電子顕微鏡構造解. 第 28 回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞機能のキープレイヤー AAA⁺タンパク質の世界」, シーホークホテル福岡, 平成 17 年 12 月 7 日~10 日.
- [3] Y. Yonetani¹, N.Go^{2,3} (1. 科学技術振興機構 CREST 2. 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門 3. 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科) On the treatment of long-range electrostatic interactions in biomolecular simulations. International Symposium on Frontiers of Computational Science 2005, 名古屋大学野依記念学術交流館, 平成 17 年 12 月 12 日~13 日.

③ ポスター発表 (国内会議 12 件、国際会議 16 件)

- [1] 由良 敬^{1,2}, 石田 恒^{2,3}, 松本 淳^{2,3}, 川端 猛^{2,4}, 真柳浩太^{2,5}, 岩崎憲治^{2,6} (1. 日本原子力研究所計算科学技術推進センター、2. 独立行政法人科学技術振興機構 CREST、3. 日本原子力研究所中性子利用研センター、4. 奈良先端科学技術大学院大学バイオインフォマティクス人材養成ユニット 5. 生物分子工学研究所構造解析研究部 6. 大阪大学超高压電子顕微鏡センター) 低分解能生体超分子像からの原子構造構築技法. 開発プロジェクト分子研研究会, 分子科学研究所岡崎コンファレンスセンター, 平成 16 年 12 月 20 日~21 日.
- [2] 川端 猛^{1,3}, 由良 敬^{2,3}, 郷 信広^{1,4} (1. 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 2. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 3. 科学技術振興機構 CREST 4. 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部部門) 混合正規分布モデルを用いた低解像度の蛋白質立体構造の高速重ね合わせ計算. 第 43 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 平成 17 年 11 月 23 日~25 日.
- [3] OTP. Kim¹, 由良 敬^{1,2}, 郷 信広^{3,4} (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 4. 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部部門) 立体構造にもとづくタンパク質-RNA 相互作用面のデータベース解析. 第 43 回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 平成 17 年 11 月 23 日~25 日.
- [4] 由良 敬^{1,2}, 石田 恒^{2,3}, 岩崎憲治^{2,4}, 川端 猛^{2,5}, 堤 遊², 松本 淳^{1,2}, 真柳浩太⁶ (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部部門 4. 大阪大学蛋白質研究所 5.

奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 6.生物分子工学研究所構造解析研究部) 低分解能生体超分子像からの原子構造構築技法の開発—知識ベースによるアプローチ. 第43回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 平成17年11月23日~25日.

- [5] 才川直哉^{1,2}, 鈴木博文^{1,2}, 秋山芳展^{2,3}, 伊藤維昭^{2,3}, 木村能章^{1,2} (1. 生物分子工学研究所構造解析研究部 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 京都大学ウィルス研究所) 電子顕微鏡による大腸菌 FtsH プロテアーゼの構造解析. 第43回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 平成17年11月23日~25日.
- [6] 宮地希代子¹, 目野高嗣¹, 松永藤彦¹, 梶村直子², 鈴木博文^{2,3}, 森川耿右², 石野良純¹ (1. 九州大学大学院農学部 2. 生物分子工学研究所構造解析研究部 3. 科学技術振興機構 CREST) *Pyrococcus furiosus* DNA 複製開始因子 Cdc6/Orc1 の機能解析. 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 平成17年12月7日~10日.
- [7] 安井典久¹, 禾 晃和¹, 服部光治³, 岩崎憲治^{1,2}, 高木淳一¹ (1. 大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 名古屋市立大薬学研究科), リーリングナルの構造的基盤: 受容体結合部位とその立体構造決定. 第6回日本蛋白質科学会年会, 国立京都国際会館, 平成18年4月24日~26日.
- [8] 米谷佳晃 (科学技術振興機構 CREST) 生体シミュレーションにおける長距離相互作用の扱いについて. 第6回日本蛋白質科学会年会, 国立京都国際会館, 平成18年4月24日~26日.
- [9] N.Yasui¹, T. Nogi¹, M. Hattori¹, K.Iwasaki^{1,2}, J.Takagi¹ (1. Inst. for Protein Res., Osaka Univ. 2. CREST, JST) Molecular dissection of the interaction between Reelin and its receptor ApoER2. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, June 18-23, 2006.
- [10] OTP. Kim¹, K.Yura^{1,2}, N.Go³ (1. Quantum Bioinformatics Team, CCSE. Japan Atomic Energy Agency 2. CREST, JST 3. Computational Biology Group, Quantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency) Structure-based bioinformatics analyses and a prediction method of protein-RNA interfaces. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, June 18-23, 2006.
- [11] H. Suzuki¹, T. Miyata², T. Oyama², K. Mayanagi⁴, Y. Ishino⁵, K. Morikawa³ (1. CREST, JST 2. Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University 3. Institute for Protein Research, Osaka University 4. Institute for Bioinformatics Research and Development 5. Faculty of Agriculture, Kyushu University) Clamp-loading mechanism onto DNA revealed by electron microscopy and single particle image analysis. 20th IUBMB International Congress for Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto Japan, June 18-23, 2006.
- [12] 安井典久¹, 禾 晃和¹, 服部光治³, 岩崎憲治^{1,2}, 高木淳一¹ (1. 大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 名古屋市立大薬学研究科) Structure basis for reelin signaling: Determination of receptor-binding site and its three-dimensional structure. 第29回日本神経科学会大会, 国立京都国際会館, 平成18年6月19日~21日.
- [13] K. Iwasaki^{1,2}, R. Nagai², A. Matsumoto^{2,3}, K. Yura^{2,3}, T. Goto⁴, T. Yasunaga⁴ and J. Takagi¹ (1. Institute for Protein Research, Osaka University 2. CREST, JST 3. Quantum Bioinformatics Team, CCSE. Japan Atomic Energy Agency 4. Kyusyu Institute of

Technology) The pathway of conformational changes of cell adhesion protein, Integrin. Gordon Research Conference on Three Dimensional Electron Microscopy, IL Ciocco, Italy, June 25-30, 2006.

- [14] N. Yasui¹, T. Nogi¹, M. Hattori¹, K. Iwasaki^{1,2} and J. Takagi¹, (1. Inst. for Protein Res., Osaka Univ. 2. CREST, JST) Structural basis for Reelin signaling: Determination of receptor-binding site and its three-dimensional structure. 20th Annual Symposium of The Protein Society, Manchester Grand Hyatt Hotel, San Diego, USA, Aug. 5-9, 2006.
- [15] K. Iwasaki^{1,2}, A. Matsumoto^{2,3}, K. Yura^{2,3}, T. Goto⁴, T. Yasunaga⁴, R. Nagai² and J. Takagi¹ (1. Inst. for Protein Res., Osaka Univ. 2. CREST, JST 3. Quantum Bioinformatics Team, CCSE. Japan Atomic Energy Agency 4. Kyusyu Institute of Technology) The Pathway of Conformational Changes of Cell Adhesion Protein, Integrin. 16th International Microscopy Congress, Sapporo Convention Center, Japan, September 3-8, 2006.
- [16] H. Ishida^{1,2}, A. Matsumoto^{2,3}, Y. Tsutsumi² and K. Yura^{2,3} (1. Computational Biology Group, Quantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency 2. CREST, JST 3. Quantum Bioinformatics Team, CCSE. Japan Atomic Energy Agency) Conformational Analysis of the structure of ribosome fit into electron microscopy density maps with normal mode analysis and molecular dynamics simulations. 16th International Microscopy Congress, Sapporo Convention Center, September 3-8, 2006.
- [17] A. Takaoka¹, M. Ogasawara², M. Tomita², N. Tsuchiya³, K. Iwasaki^{4,5}, R-J. Feng¹, N. Kajimura¹ and H. Mori¹ (1. Research Center for ultra-HVEM, Osaka University 2. Hitachi High-Technologies 3. AD Science Co. 4. CREST, JST 5. Institute for Protein Research, Osaka University) Optimization of Electron Energy in Tomography for Sample Conditions -Development of 300kv IVEM Specially Designed for 3D Observation-. 16th International Microscopy Congress, Sapporo Convention Center, Japan, September 3-8, 2006.
- [18] N. Kajimura³, H. Suzuki^{1,2}, K. Mayanagi⁴, Y. Ishino⁵ and K. Morikawa³ (1. Department of Structural Biology, Biomolecular Engineering Research Institute 2. CREST, JST 3. Institute for Protein Research, Osaka University 4. Nagahama Institute of Bio-Science and Technology 5. Faculty of Agriculture, Kyusyu University) Single-Particle Analysis of the Cdc6/Orc1 DNA Replication Origin Binding Protein. 16th International Microscopy Congress, Sapporo Convention Center, September 3-8, 2006.
- [19] Y. Tsutsumi¹, H. Ishida^{1,2}, A. Matsumoto^{1,3}, K. Yura^{1,3} (1. 科学技術振興機構 CREST 2. 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門 3. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター) Comparative analysis of ribosome atomic structures deduced computationally from EM images and X-ray structures. 第44回日本生物物理学会年会/第5回東アジア生物物理学会議, 沖縄コンベンションセンター, 平成18年11月12日～16日.
- [20] T. Kawabata^{1,2}, K. Yura^{2,3} (1. 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター) Multiple protein docking guided by low-resolution image of complex using Gaussian mixture model. 第44回日本生物物理学会年会/第5回東アジア生物物理学会議, 沖縄コンベンションセンター, 平成18年11月12日～16日.
- [21] O.T.P. Kim¹, K. Yura^{1,2}, N. Go³ (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門) Computational analyses of amino acid residue propensity in protein-RNA interfaces and

prediction methods for the interfaces. 第44回日本生物物理学会年会/第5回東アジア生物物理学会議, 沖縄コンベンションセンター, 平成18年11月12日～16日.

- [22] H. Ishida^{1,2}, Y. Tsutsumi², A. Matsumoto^{2,3} and K.Yura^{2,3} (1. Computational Biology Group, Quantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency 2. CREST, JST 3. Quantum Bioinformatics Team, CCSE. Japan Atomic Energy Agency) Comparative analysis of ribosome atomic structures deduced computationally from EM images and X-ray structures. Biophysical Society 51st Annual Meeting, Baltimore, USA, March 3-7, 2007.
- [23] A. Matsumoto^{1,2}, Y. Tsutsumi², K.Yura^{1,2} and H. Ishida^{2,3} (1. Quantum Bioinformatics Team, CCSE. Japan Atomic Energy Agency 2. CREST, JST 3. Computational Biology Group, Quantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency) Structural analysis of ribosome based on the elastic network normal mode analysis. Biophysical Society 51st Annual Meeting, Baltimore, USA, March 3-7, 2007
- [24] T. Kawabata^{1,2}, K.Yura^{2,3} (1. NAIST 2. CREST, JST 3. Quantum Bioinformatics Team, CCSE, Japan Atomic Energy Agency) Multiple Protein Docking Guided By Low-resolution Image of Complex Using Gaussian Mixture Model. VII European Symposium of The Protein Society, Stockholm/Uppsala, Sweden, May 12-16, 2007
- [25] 岩崎憲治^{1,2}, 片山寿美枝¹, Wei Taiyun³, 大村敏博³, 安永卓生⁴, 高木淳一¹ (1. 大阪大学蛋白質研究所 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 中央農業総合研究センター 4. 九州工業大学) A new imaging method using electron beam tomography. 化学血清療法研究所主催第5回 Aso International Meeting, ホテルグリーンピア南阿蘇, 平成19年5月17日～19日.
- [26] 片山寿美枝¹, Wei Taiyun², 大村敏博², 高木淳一¹, 岩崎憲治^{1,3} (1. 大阪大学蛋白質研究所 2. 中央農業総合研究センター 3. 科学技術振興機構 CREST) イネ萎縮ウイルス (RDV) を内包する Pns10 チューブルの立体構造. 仙台国際センター, 平成19年5月24日～26日.
- [27] 川端 猛^{1,2}, 由良 敬^{2,3} (1. 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター) 混合正規分布モデルを用いた複合体低解像度3次元画像への単量体モデルの重ね合わせ計算-対称的な配置拘束の導入-. 第45回日本生物物理学会年会, パシフィコ横浜, 平成19年12月21日～23日.
- [28] 松本 淳^{1,2}, 鎌田徹治³, 高木淳一⁴, 岩崎憲治^{2,4}, 由良 敬^{1,2} (1. 日本原子力研究開発機構システム計算科学センター 2. 科学技術振興機構 CREST 3. 慶應義塾大学医学部 4. 大阪大学蛋白質研究所) Elastic network model の基準振動解析によるインテグリンの構造変化の解析. 第45回日本生物物理学会年会, パシフィコ横浜, 平成19年12月21日～23日.

(4)特許出願

①国内出願 (0 件)

②海外出願 (0 件)

(5)受賞等

①受賞 なし

②新聞報道 なし

③その他 なし

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成16年10月12日	CREST 研究の立ち上げに際して	日本原子力研究所関西研究所	6名	予算打ち合わせと研究分担について
平成16年12月16日	最新情報交換	京都テルサ第3セミナー室	6名	バイオインフォマティクスによる予測の現状と電子顕微鏡で得られているデータの報告
平成16年12月22日	ターゲットの生体超分子について	大阪大学超高压電子顕微鏡センター	3名	インテグリンの生物学的意味の議論
平成17年5月12日	研究チーム会議	生物分子工学研究所	4名	クランプ・クランプローダ構造の解析について
平成17年5月18日	研究チーム会議	大阪大学蛋白質研究所	3名	COP9の構造の解析について
平成17年7月19日	ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ間交流セミナー	日本原子力研究所関西研究所	18名	CREST 研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」の池口氏(横浜市立大学)と情報交換
平成17年11月14日	研究チーム会議	大阪大学蛋白質研究所	5名	クランプ・クランプローダ構造の解析進捗状況について
平成18年8月21日	研究チーム会議	日本原子力研究開発機構内会議室	15名	マドリード自由大学バイオテクノロジーセンターのホセ・マリア・カルロス先生を招待し、生体超分子電子顕微鏡像のデータフォーマット統一の動向と最新のあてはめ結果の議論を行った。
平成18年11月8日	研究チーム会議	日本原子力研究開発機構内会議室	12名	フランス国立大学科学研究センターのパスカル・アウフフィンガー先生を招待し、生体超分子におけるタンパク質とRNAとの相互作用面の構造についての議論を行った。

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

A. 文部科学省科学研究費補助金・基盤研究(C)(由良敬)

本プロジェクトでは、要素タンパク質間相互作用の予測が重要な課題のひとつであった。その研究を通して、超分子を形成しないタンパク質の相互作用を推定することの重要性が見えてきたとともに、要素タンパク質間相互作用を推定する方法と同じ方法で、超分子を形成しないタンパク質の相互作用も推定できる可能性が出てきた。そこでタンパク質一般の相互作用面と相互作用の組みを推定する研究を独立の課題として、文部科学省科学研究費補助金・基盤研究(C)に応募したところ、平成19年度から2年間の研究として採択された。

B. 文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム・基本的な生命の解明(岩崎憲治)

本プロジェクトにおいて、電子顕微鏡による生体分子単粒子解析の方法と、データの解析方法を向上させることができた。ここで蓄積した技術、特に単粒子トモグラフィーの技術開発により、細胞外に存在する可変性のタンパク質構造解析の道が開けた。そこで細胞接着装置を構成するタンパク質の総合的な研究展開として、「文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム・基本的な生命の解明」に応募したところ、平成19年度より5年間の研究として採択された。

C. 文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム・情報プラットフォーム(由良敬)

本プロジェクトにおいて、要素タンパク質のホモロジーモデリングの手法を多用した。プロジェクト開始時点では、ホモロジーモデリングの手法はほぼ完成していると考え、この手法を改良することは視野に入れていなかったが、プロジェクト期間での利用を通して、解決しなければならない問題点とその解決方法の案が見えてきた。そこで、タンパク質複合体のホモロジーモデリングの手法を改良する研究課題として、「文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム・情報プラットフォーム」に応募したところ、平成19年度より3年間の研究として採択された。

(2)実用化に向けた展開

技術移転や実用化に向けた展開には到達しなかった。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1)領域内の活動とその効果

領域会議の場で別チームの研究代表者より、共同での研究展開のお話はあったが、本チームの研究開発時期との調整がうまくつかず、共同研究までは発展できなかった。

(2)領域横断的活動とその効果

JST個人型研究さがけとの交流により、大阪市立大学大学院理学研究科宮田真人氏(さがけ研究者)のマイコプラズマ滑走運動の研究を、日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門河野秀俊氏(さがけ研究者)とともにお手伝いすることができた(原著発表論文 [2])。病原性株も含まれるマイコプラズマは自発的に移動(運動)をすることができるが、その分子メカニズムは明らかにされていない。宮田氏は運動に関係するタンパク質の遺伝子と、タンパク質の二次元電子顕微鏡像を得ることに成功していたが、両情報を有機的に結合することができていなかった。本プロジェクトによるバイオインフォマティクス技術とあてはめ技術および河野氏のバイオインフォマティクス技術を融合することで、両情報をつなぐことに成功した。

また、JST戦略的国際科学技術協力推進事業における対英国バイオナノテクノロジー分野との交流により、日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門 石田恒氏(国際科学技術協力推進事業研究代表者)が展開する「生体超分子を構成するタンパク質の構造変化研究」と協力することができた。

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

現在、電子顕微鏡イメージングにより得られた三次元構造への原子分解能立体構造のあてはめは、タンパク質の重要な性質である「一本鎖のポリペプチド」と「分子進化の産物」をほとんど無視したやり方で行われている。これらが無視した手法では、生体中では不可能な構造も導出してしまう場合があるため、正しい原子分解能の生体超分子構造がえられる確証がない。本プロジェクトで開発したあてはめ技法では、アミノ酸配列の連続性と相互作用界面の性質を考慮に入れたあてはめを実現しており、その結果として得られる原子分解能構造の信頼性は従来の結果よりも高いことが期待される。この期待のもとに、本プロジェクト終了後は、このあてはめ技法をさまざまなタンパク質の構造解析に使用し、方法の普及をはかる予定である。例えば、細胞外環境に存在する生体分子は、未成熟細胞の分化を制御している。再生医療が重要視されている今日、これら分子の構造情報を提供することは、分野の発展の基盤として重要であると考えている。

(2)社会・経済の発展が期待される成果

本プロジェクトでは、近年発展してきた電子顕微鏡単粒子解析を用いて、分子生物学の基礎である生体分子の詳細な立体構造情報を導出する計算技術の開発を目的とした。本プロジェクトの成果は基礎科学に位置づけられるため、成果が直接社会的な価値の向上をもたらすことはむずかしいと思われる。しかし、本プロジェクトによる開発技術を洗練させることで、間接的に社会に影響を及ぼす時が来ることを期待する。

11 結び

本プロジェクトでは、低分解能生体超分子像に原子分解能要素分子構造をあてはめて、高分解能生体超分子構造を導出する技法を3年間で開発し、電子顕微鏡による構造解析を行っている研究者に使ってもらえるソフトウェアの開発を試みることをめざした。3年間の研究期間を終えてみると、技法開発の目途がほぼたったところで期限がきてしまい、ソフトウェアの開発まではできなかった。技法開発も完成したとはいえず、まだまだやるべきことが残ってしまった。プロジェクト立案当初の読みの甘さを反省する次第である。

技法開発の段階で、あてはめの実行には予想以上の計算機能力が必要であることが判明し、普通のPCで利用できるソフトウェアの開発は困難であることがほぼ明らかになった。本プロジェクトにおいて、あてはめ初期構造形成には膨大なコンピュータメモリを利用する場合もあり、あてはめ構造の最適化には並列大型コンピュータが必要であった。よって第2番目の目標の実現には、これか

らのコンピュータ能力の発展を待たなければならない。

本プロジェクトで得られた技術は、いずれもが利用価値が高くこれからの発展が十分期待できるものと考えられる。低分解能生体超分子像への要素分子剛体あてはめ技術には、今までにないアイデアが含まれており、これからの利用が期待される。要素分子の相互作用面推定は、生体超分子の領域をすでに越え、世界中の構造生物学研究者が使いはじめている。基準振動解析の手法を応用してタンパク質の活性型を推定する技術は、一部の細胞生物学者らに驚きとともに受け入れられはじめている。単粒子トモグラフィ法は単粒子解析の新しい方法として受け入れられはじめ、これからの発展が期待できる。本プロジェクトにおける個々の技術開発は、うまくいったと考えている。これらの技術をくみ上げて統合技術にまでもっていくことができなかったところが、本プロジェクトの未達成事項として残ってしまった。本プロジェクトの研究期間は終了してしまうが、プロジェクトメンバー間での共同研究は引き続き継続し、本プロジェクトで開発した技法を組み上げた統合技術の開発を試みる。

本プロジェクトの研究代表者を3年間務めさせていただいたが、研究代表者として痛感したことは以下の2点である。第1は、プロジェクトメンバーに対してプロジェクトにおいてやるべきことを明確に伝えることの困難さである。本プロジェクトでは技法の開発を目的としたが、技法の開発のみで終わっては、技法が利用されることなく技法開発の意味がなくなってしまう。また技法は適用事例があってはじめて生きてくるものであり、また技法の問題点は適用事例のなかから見出されるものである。技法開発の細かいことに埋没してしまうことは、大局的に見て有意義ではない。この理解のうえで、研究代表者は生物学的に重要な問題への技法適用を促し続けたが、理解を得られるまでにかなりの時間を費やしてしまった。第2は、若手研究者育成の困難さである。本プロジェクトで実現しようとした技法開発に必要な知識は、現在の大学の教育カリキュラムから見ると非常に多岐に渡っており、そのためにむずかしい分野に見えてしまう。そのような状況であったために、本プロジェクトに参加してくれる若手研究員を見出すことは困難を極めた。さらに、本プロジェクトに参加している研究員すべてが「地方」に研究拠点を置いていることが、困難さに拍車をかけることとなった。研究期間を通して4名の博士研究員に参加してもらえたが、この人数は当初計画の半数であった。本プロジェクトのような学際的な分野を切り開くには、大学に身をおき時間をかけて研究者を育てる必要があることを痛感した次第である。

以下に、本プロジェクトに参加してくれた方々の写真を掲載しプロジェクトに協力してくれたことに感謝を示す。また本プロジェクトで購入またはリースし、計算を実行した物品の写真もここに掲載する。

最後に、本プロジェクトの推進にご支援とご助言を下された、研究総括の相澤益男先生と雀部博之先生に感謝いたします。

