

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19347

研究課題名(和文)電子線トモグラフィーと結晶学を組み合わせた膜タンパク質の構造解析手法の確立

研究課題名(英文) Electron crystallographic analysis of tomographic volumes of 2D crystals of membrane proteins

研究代表者

谷 一寿 (Tani, Kazutoshi)

三重大学・医学系研究科・特任教授(研究担当)

研究者番号：20541204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：天然に近い状態の膜タンパク質の立体構造を観察することは、その生理的機能を明らかにするうえで重要な知見が得られる可能性が高い。このような構造解析としては、脂質二重膜中に再構成された膜タンパク質がシート状に整列する二次元結晶を用いた電子線結晶解析が適しているが、たとえ結晶作製に成功しても分解能が悪いことも多く電子線結晶解析に適用できない場合も多々ある。本研究では、このような従来の解析方法では歯がたたなかった結晶性のよくない二次元結晶でも、構造解析が行えるように、電子線トモグラフィーと結晶学を組み合わせた新規手法の確立ならびに評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

構造解析不可能であった結晶性の悪い二次元結晶からでも立体構造が得られるようになった意義は大きい。本手法は、三次元結晶由来の三次元再構成から平面領域を切り出すことができれば、仮想的な二次元結晶として構造解析が可能になる。このように適用範囲は、理論的には二次元結晶から三次元結晶までカバーすることができる点は有用であるが、分解能に関しては、原理上、結晶内の対象物の並び方に依存するため大幅な向上は期待できない。但し、分解能が低い場合でも、X線構造解析などで部分決定された原子モデルをフィッティングできれば、疑似的な原子モデルを作製し、変異体デザインを含めた機能発見といった目的などへ貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Observing the three-dimensional structure of a membrane protein embedded into lipids, close to natural environment, is highly likely to provide important knowledge for clarifying its physiological function. For such structural analysis, electron crystallography using a two-dimensional (2D) crystal of membrane protein is definitely suitable. Under some conditions, membrane proteins are arranged in a 2D sheet after reconstitution into a lipid bilayer. However even if the 2D crystal production is successful, the possibility of obtaining a crystal giving good diffraction is quite low. Most of them cannot be applied to electron crystallography. In this study, we established and evaluated a method that enables structural analysis of 2D crystals with poor crystallinity that were not tackled by conventional analysis methods.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 電子線結晶学 クライオトモグラフィー 二次元結晶 F型ATPase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

選択的にイオンや生体物質を輸送するチャンネルやポンプの輸送制御機構は、細胞内の物質濃度を適切な状態に維持する上で欠かせないものであり、その複雑な分子機構を理解する上で生体内環境である脂質膜内での立体構造解析は欠かせない。このような膜タンパク質の構造解析には、脂質に再構成された膜タンパク質がシート状に並ぶ二次元結晶をクライオ電子顕微鏡で観察する電子線構造解析が適している。この方法を用いて哺乳類由来のチャンネルやポンプの立体構造を解析することは、疾患の原因を分子レベルから理解することや、創薬の参考になる情報に繋がることも期待されている。しかし、これまで得られた多くの膜タンパク質由来の二次元結晶は、原子分解能に至るものが少ないだけでなく、結晶性の悪さから実像をフーリエ変換して得られる反射点の信号が微弱すぎてサンプル凍結時に生じるガラス状氷由来のバックグラウンドに埋もれて解析できない結晶も多く存在する。

近年、クライオ電子線トモグラフィーの技術が成熟してきており、自動データ収集による収集効率の向上、更に直接電子線検出器の登場による信号比の高い電子顕微鏡画像セットの記録により、分子内で繰り返し構造を有す比較的分子量の大きな生体物質の場合には近原子レベルでの観測も可能になってきた。このような分解能の向上は著しく、核膜孔複合体の構造解析 (Nature, Science誌) など注目されている例は数多くあるものの、近原子分解能に到達しない場合には膜貫通部位と脂質の密度差が小さいため両者の判別は非常に難しい。

電子線結晶学の場合、密度差にはあまり依存せず、結晶内分子の整列状態に依存するためランダムに配置することの多い脂質分子は可視化されにくく、逆に整列した膜タンパク質分子の膜貫通部位は観測されやすいという特性を有している。また、従来の解析法では、より高い分解能情報の収集に重点が置かれるため、電子線損傷に伴い1つの二次元結晶からは1枚の画像データしか収集できないうえ、結晶格子定数を同じであると仮定して複数の結晶由来の画像データから三次元再構成を作成する必要がある。しかし、結晶性の悪い場合には結晶ごとの格子定数のばらつきも大きいいため、単一の二次元結晶から三次元再構成を得る必要があるため、従来の方法では立体構造を得ることができない。このような結晶性の良くない二次元結晶でも構造解析が行えるように、電子線トモグラフィーと電子線結晶学を組み合わせることで問題を解決できる方法を模索した。実際には、1) 電子線トモグラフィーで単二次元結晶からデータを収集し、三次元再構成を行う、2) 得られた三次元再構成から比較的結晶性の良い領域のみを三次元抽出後、仮想的な投影像を計算する、3) 仮想投影像に電子線結晶解析を適用する。以上のステップを経ることで、試料作製時のガラス状氷由来のバックグラウンドノイズも抑えられた膜タンパク質分子の三次元構造の観察が可能になると考えられた。

## 2. 研究の目的

天然の状態に近い脂質二重膜に埋まった膜タンパク質の立体構造を観察することは、その生理的機能を明らかにするうえで重要である。このような状態での構造解析には、脂質に再構成された膜タンパク質がシート状に整然と並ぶ二次元結晶を用いた電子線結晶解析が適している。しかし、これまで得られた結晶のすべてがバクテリオロドプシンや水チャンネルのように原子分解能での構造解析に至るわけではなく、多くの研究時間や努力を割いても並び方の程度(結晶性や結晶ごとの格子定数のばらつき)を改善できずに解析すら適用できないケースも数多く存在する。従来は、そのような結晶性が悪いものは構造解析をあきらめるしかなかったが、本申請で開発するクライオ電子線トモグラフィーと電子線結晶学を組み合わせた解析手法を用いれば構造解析が可能になり、脂質膜内での膜タンパク質の構造情報を取得できるようになる。こ

の方法は、電子線損傷が主原因でアミノ酸残基が可視化できるような原子分解能での構造解析が難しいことが予想されるが、X線構造解析やクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析の結果など他の手法で決定した構造情報と組み合わせることで、疑似的な原子モデルを作製することも可能であり、変異体のデザインを含め新しい機能発見へも役立てられることが期待できる。

### 3. 研究の方法

そのままでは電子線結晶学による構造解析が適用できない結晶性の悪い二次元結晶であっても、構造解析が可能となる方法を確立するため、電子線トモグラフィーと電子線結晶学を組み合わせた手法開発を遂行した。その工程は、大きく3つのパートに分けることができる(図1)

- 1) 結晶性の悪い二次元結晶の作製
- 2) クライオ電子顕微鏡を使った電子線トモグラフィー
- 3) トモグラフィーデータへの結晶構造解析適用

本研究開発においては、前述の3番目のパートがメインであり、図2で示された各プロセスのプログラム処理を完成させた。これら一群の構造解析プログラムを TomEX (Tomography and Electron Crystallography)と名付け、実際の電子線トモグラフィーデータへ適用した。その際、Christoph Gerle博士からF型ATPaseの二次元結晶を、Karen Davies博士から電子線トモグラフィーデータの提供をそれぞれ受けた。

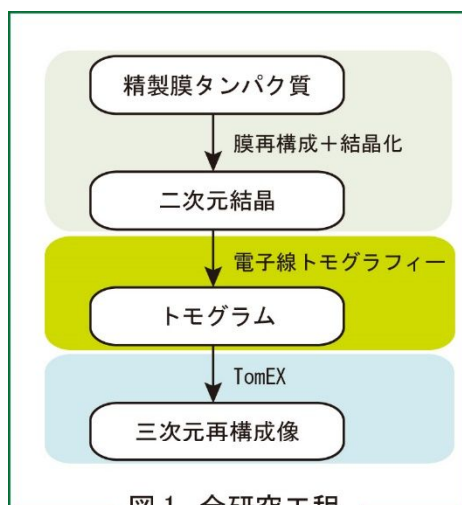


図1. 全研究工程

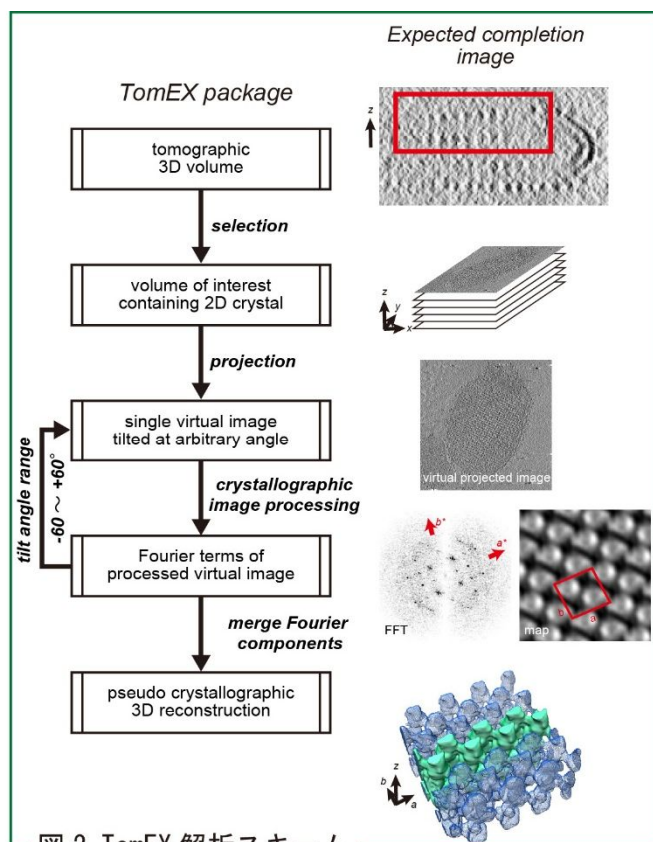


図2. TomEX 解析スキーム

### 4. 研究成果

牛ミトコンドリア由来F1Fo-ATPaseの2層型の二次元結晶に対してTomEXを適用し、電子線トモグラフィーで決定した三次元再構成から、1層に相当する部分を三次元的に切り出して構造解析を行った(図3左端)。このような切り出しによって、氷包埋時のガラス状氷を極力排除できるためバックグラウンドを抑えることができ、かつ比較的良好な二次元結晶領域を選択したこ

とで、実際の実験像のフーリエ変換では反射点を確認できなかったものが(図3A)、TomEXを適用後の仮想非傾斜投映像のフーリエ変換からは、図3(B)のように反射点を確認することができるようになった。同様に仮想的な傾斜投映像も計算し、電子線結晶学の画像解析を適用することで、F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPaseのデンシティマップを得ることに成功した。得られたデンシティマップより、二次元結晶内では2層のF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPaseを含む脂質膜がup-side-downの状態と並んでいることがわかった(図4)。また、単粒子構造解析で7.4 分解能で決定された牛ミトコンドリア由来F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPaseのモデル(一部のサブユニットのみモデリング。Protein Data Bank ID:5ARA)をフィットさせたところ、相関係数 0.880と相関も高いため、開発した決定方法がうまく機能していることを確認できた(図4)。

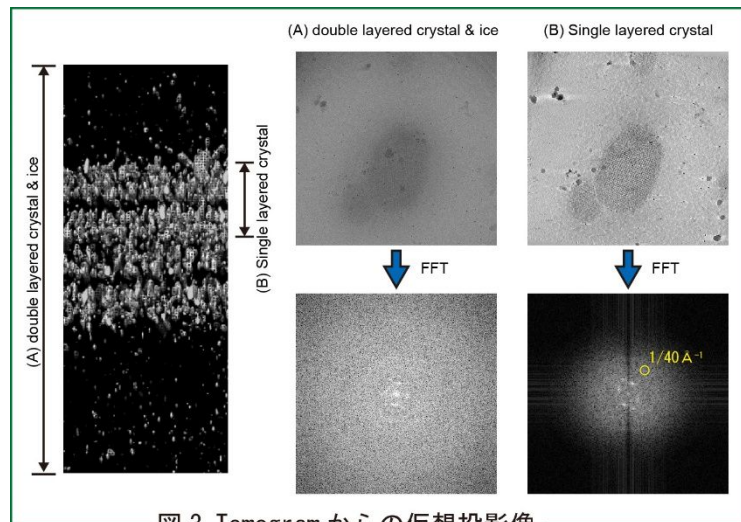


図 3. Tomogram からの仮想投影像

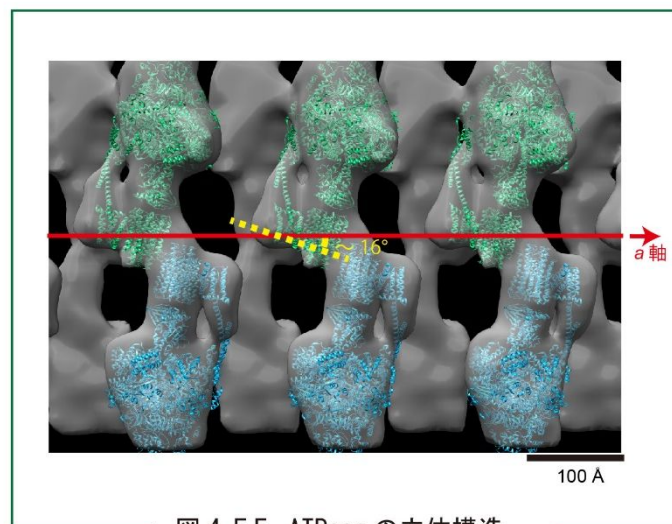


図 4. F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase の立体構造

二次元結晶の a 軸に沿って表示、膜を横から見た状態に相当する。灰色：デンシティマップ。リボンモデル：F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase (PDB: 5ARA) 同じ脂質層内のモデルは同色で表示。各貫通領域は a 軸から 16° 傾いている。

今回作製した電子線トモグラフィーと結晶学を組み合わせた新規構造解析手法(TomEX)は、これまでの電子線結晶学の手法では解析できないような二次元結晶からでも三次元再構成を得られるだけでなく、さらに電子線が透過できる程度の厚みをもつ微小な三次元結晶へも応用が可能である。例えば、膜に再構成された状態で積層したような膜タンパク質の三次元微結晶の場合、結晶成長がうまくいかず積層数が場所により異なることがある。そのような場合でも、電子線トモグラフィーで三次元再構成を計算し、最も結晶性のよさそうな部分を三次元的に1層相当を

抜き出すことで、仮想的な二次元結晶を作り出して TomEX を適用すれば構造解析することも可能である。

本研究は、理論的には二次元結晶から三次元結晶まで幅広くカバーできる可能性を示せたものの、使用している二次元結晶の並び方に依存するため分解能の大幅な向上は難しい。ただし、これまで解析できずに捨てられてきた結晶からでも膜タンパク質の構造情報を取り出すことができるため、構造解析の分野だけでなく、立体構造に基づいた膜タンパク質の機能相関研究へも貢献できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Doi Tomoko, Kikuta Kohei, Tani Kazutoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of Critical Residues in the Extracellular and Transmembrane Domains of the Endothelin Type B Receptor for Propagation of the Endothelin-1 Signal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Burendei Batuujin, Shinozaki Ruriko, Watanabe Masakatsu, Terada Tohru, Tani Kazutoshi, Fujiyoshi Yoshinori, Oshima Atsunori	4. 巻 6
2. 論文標題 Cryo-EM structures of undocked innexin-6 hemichannels in phospholipids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax3157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aax3157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Hiroki, Kamegawa Akiko, Nakata Kunio, Kashiwagi Tatsuki, Mizukoshi Toshimi, Fujiyoshi Yoshinori, Tani Kazutoshi	4. 巻 205
2. 論文標題 Structural insights into thermostabilization of leucine dehydrogenase from its atomic structure by cryo-electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Structural Biology	6. 最初と最後の頁 11～21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jsb.2018.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Hiroshi, Tani Kazutoshi, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 1397
2. 論文標題 Crystal structures of claudins: insights into their intermolecular interactions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 25～34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.13371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe Kazuhiro, Shimokawa Jun, Naito Mao, Munson Keith, Vagin Olga, Sachs George, Suzuki Hiroshi, Tani Kazutoshi, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 7
2. 論文標題 The cryo-EM structure of gastric H <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase with bound BYK99, a high-affinity member of K <sup>+</sup> -competitive, imidazo[1,2-a]pyridine inhibitors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06698-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shihoya Wataru, Nishizawa Tomohiro, Yamashita Keitaro, Inoue Asuka, Hirata Kunio, Kadji Francois Marie Ngako, Okuta Akiko, Tani Kazutoshi, Aoki Junken, Fujiyoshi Yoshinori, Doi Tomoko, Nureki Osamu	4. 巻 24
2. 論文標題 X-ray structures of endothelin ETB receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 758 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nsmb.3450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 土井 知子、谷 一寿	4. 巻 262
2. 論文標題 エンドセリンの受容体初期活性化機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 812-813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷一寿
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いた蛋白質の立体構造決定へ向けた技術開発と応用
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷一寿
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡によるタンパク質構造解析とその展開
3. 学会等名 スマートセルイノベーション研究センター講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷 一寿
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で分子構造を観る、構造情報を活かす
3. 学会等名 先端医療センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷 一寿
2. 発表標題 創薬へ向けたクライオ電子顕微鏡による膜タンパク質の構造研究
3. 学会等名 2017 BIOVIA Forum（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----