

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22510

研究課題名(和文)蛋白質の立体構造にタイムスタンプを付し構造遷移過程を解明する手法開発

研究課題名(英文) Development of a method to elucidate the structural transition process by adding a time stamp to the three-dimensional structure of a protein

研究代表者

清水 啓史(Hirofumi, Shimizu)

福井大学・学術研究院医学系部門・講師

研究者番号：50324158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の立体構造を決定する手法として、低温電子顕微鏡による単粒子解析法が登場し、同一溶液条件で、複数の立体構造を得ることが可能になった。得られる複数の立体構造には時系列情報が欠けているため、蛋白質の1分子構造変化を、蛋白質に取り付けた観測プローブの動きとして動画記録できるX線1分子動態計測法と融合することで、立体構造に時刻の情報を付加し、機能する際の構造変化過程の全体像を明らかにする手法の開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低温電子顕微鏡による単粒子解析法の登場によって、立体構造情報の飛躍的な増大が見込まれている。特に同一溶液条件でとりうる複数の立体構造を区別して解析できる点は、従来の結晶構造解析法にはなかった特徴である。本研究で、動態計測データとの融合が実現すれば、得られた立体構造に時系列情報を付与し、構造変化の全体像を解明できる。本研究では単粒子解析法によってKcsAカリウムチャンネルの初期構造を得た。また、対応する条件でX線1分子動態計測を行い立体構造と比較可能な動態計測データを得た。現在、条件の精密化に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：As a method for determining the three-dimensional structure of a protein, a single particle analysis method using a cryo-electron microscope has appeared, and it has become possible to obtain a plurality of three-dimensional structures under the same solution conditions. Since the obtained multiple three-dimensional structures lack time-series information, by fusing the single-molecule structure change of the protein with the X-ray single-molecule dynamics measurement method that can track the movement of the observation probe attached to the protein. We aim to develop a method for adding time information to a three-dimensional structure and clarifying the overall picture of the structural change process when it functions.

研究分野：生理学

キーワード：1分子計測 蛋白質 X線回折

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の立体構造を決定する手法として、低温電子顕微鏡による単粒子解析法(単粒子解析法)が登場し、蛋白質の立体構造情報(スナップショット)の飛躍的な増大が見込まれるようになった。単粒子解析法では、X線結晶構造解析法と比べて結晶を作製する必要がないため、同一溶液条件で複数の立体構造が得られる可能性がある。代表者が研究してきたX線1分子動態計測法は、観測プローブを用いて分子の構造変化を連続的に動画計測する手法である。単粒子解析法で得られる可能性がある、同一溶液条件での複数の立体構造に時系列情報を付加することができれば、蛋白質が機能を発揮する際の立体構造の遷移過程を実験データを元にして解明することができる。

2. 研究の目的

X線1分子動態計測法と低温電子顕微鏡による単粒子解析法を融合することによって、蛋白質の立体構造に時刻の情報を付加し、構造変化過程の全体像を明らかにする手法の開発を目指す。X線1分子動態計測法(図1)は金ナノ結晶を観測プローブとしてサブミリ秒の高い時間分解能をもち立体構造変化の遷移過程を連続的に動画計測することができる手法であるが①、②、立体構造情報を直接得ることはできない。単粒子解析法は蛋白質結晶を用いずに蛋白質の立体構造を明らかにすることができ、生理的な溶液条件で試料中に複数の立体構造が混在していても分類して別々に立体構造を明らかにすることができる手法である。しかし、同一条件で複数の立体構造が得られた場合、その時系列を明らかにすることはできない。2種の手法の利点を組み合わせることで、蛋白質の遷移過程における立体構造変化の全体像を明らかにする手法開発に挑戦する。

3. 研究の方法

単粒子解析法とX線1分子動態計測法の同一の観測対象としてKcsAカリウムイオンチャンネルを用いた。この蛋白質は細胞のイオンの通り道として細胞膜中に存在するイオンチャンネル蛋白質の1種で、カリウムイオンを選択して透過する。イオンの通り道を開閉する際に、分子中央にあるイオン透過路のまわりでねじれ運動することが予想されている。代表者はこのねじれ運動のX線1分子動態計測に成功している。本研究では、単粒子解析法を安永教授(九州工業大学)、高崎助教(大阪大学)が担当し、X線1分子動態計測を清水(福井大学)が担当して研究を遂行した。

KcsAカリウムイオンチャンネルは溶液のpHによって開閉が制御される。中性pHではイオン透過路は閉じた状態にあり、酸性状態では開閉を繰り返すことが1分子電流計測の

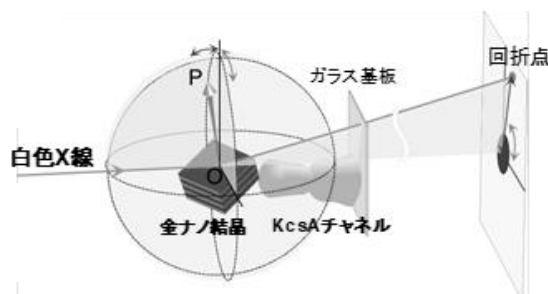


図1 X線1分子動態計測法の模式図
ガラス基板に固定した蛋白質に金ナノ結晶を取り付け、蛋白質の動きを金ナノ結晶からの回折点の運動として動画計測する(H.Shimizu., Cell (2008))。

結果から示唆されている。この分子の動きを、中性、酸性それぞれの溶液条件で、X線1分子動態計測法によって計測した。また、単粒子解析法によって、それぞれの溶液条件での単粒子構造解析を行った。

4. 研究成果

下記の点について検討を行った。

単粒子解析法

(1) 試料調製方法の検討

低温電子顕微鏡による単粒子解析法では、精製した蛋白質試料を水中に急速凍結し、凍結した試料を液体窒素温度に冷却した状態で電子顕微鏡を用いて観察する(図2)。このとき、蛋白質分子ができるだけ水中で分散していること、氷が薄層(50 nm~)であること、の2つがよい3次元像を得るため

に必要である。本研究で使用した KcsA チャンネルは、細胞膜中に存在する膜蛋白質であり、界面活性剤を利用して精製する。精製する際の界面活性剤の種類・条件を検討し、薄層水中に分散性よく KcsA チャンネルが分散する条件を決定した。中性、酸性の両方で試料を作製し、双方とも構造解析に資する試料作製を行った。

(2) 単粒子構造解析

(1) で作製した試料を用いて電子顕微鏡像を得た。中性、酸性それぞれで分子の画像データ(10万分子~)を取得し、それぞれ数万分子からなる3次元構造を得た。さらなる立体構造の分解能向上のため、解析方法の検討や初期画像データ数の向上を図っている。KcsA チャンネルは分子サイズが小さく、単粒子構造解析の対象として挑戦的な分子のひとつであるが、よい結果を得ている。初期データを第57回日本生物物理学会、日本顕微鏡学会生体解析分科会、第61回日本顕微鏡学会九州支部集合・学術講演会に報告した。

X線1分子動態計測法

X線1分子動態計測法では、蛋白質の立体構造変化をその遷移過程を含めて動画計測することができる。単粒子解析法との比較検討のため、動態計測の溶液条件を検討した。中性、酸性条件下で KcsA チャンネルの1分子動態計測を行い、画像データから蛋白質の動きを意味する、回折点の運動を抽出・解析した。その結果、単粒子構造解析で得られた立体構造に相当すると考えられる KcsA チャンネル分子の運動を計測することに成功した。1分子動態計測と単粒子構造解析の対応関係を明らかにするため、より精緻な条件設定を行い、動態計測データの取得を行っている。得られた動態観測データは、日本生理学会、生理研研究会、中部生理学会に報告した。

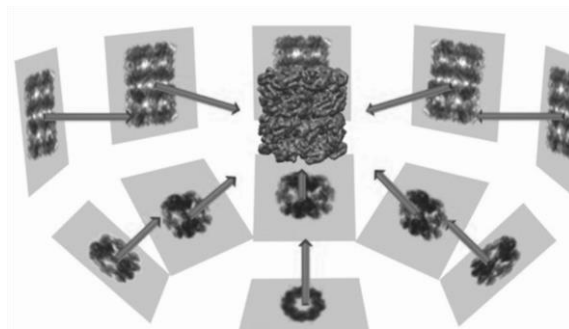


図2 低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析法
液中でランダムな方向を向いている蛋白質の
電子顕微鏡像から立体構造を再構成する。
*J.Comput. Chem Jpn, Vol17, No1(2018)*より改変

<引用文献>

- ① H.Shimizu.,*et.al.* Global twisting motion of single molecular KcsA potassium channel upon gating. *Cell* 132 67-78 2008
- ② H.Shimizu., Diffracted X-ray tracking method for recording single-molecule protein motions *BBA General Subjects* 1864 129361 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Hirofumi	4. 巻 1864
2. 論文標題 Diffracted X-ray tracking method for recording single-molecule protein motions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.05.004	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 馬水 信弥, 田中 康太郎, 安永 卓生	4. 巻 55(3)
2. 論文標題 単粒子解析におけるタンパク質構造分類のための深層学習アプローチの動向	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 104-108
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 -

1. 著者名 安永 卓生	4. 巻 55(3)
2. 論文標題 顕微鏡学における新たな鏡としての機械学習	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 103-103
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 -

1. 著者名 安永 卓生, 田中康太郎, 岩崎 彩夏, 塚本 崇文, 本多 康久	4. 巻 56(1)
2. 論文標題 巨大システムとしてのクライオ電子顕微鏡法の自動化から自動化への展開	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 43-47
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10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hirofumi Shimizu, Takuya Kobayashi, Masayuki Iwamoto, Kentaro Kajiwara, Nagomi Kurebayashi, Haruo Ogawa, Takashi Murayama.
2. 発表標題 SINGLE-MOLECULE TWISTING MOTIONS DURING GATING OF THE HUMAN TRPV1 CHANNEL RECORDED WITH SUB-MILLISECOND TIME RESOLUTION.
3. 学会等名 64th Annual Meeting of Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroko Takasaki, Hirofumi Shimizu, Takuo Yasunaga
2. 発表標題 Structural Analysis of KcsA by Cryo-EM Single Particle Analysis
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroko Takasaki, Hirofumi Shimizu, Takuo Yasunaga.
2. 発表標題 Structural analysis of KcsA potassium channel by Cryo-EM.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会生体解析分科会 Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen Preparation Techniques (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高崎寛子, 清水啓史, 安永卓生.
2. 発表標題 「クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いたKcsAの構造解析。」
3. 学会等名 第61回日本顕微鏡学会九州支部集合・学術講演会,
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水啓史
2. 発表標題 「X線1分子動態計測法に適する新たなターゲット分子の探索」
3. 学会等名 第4回イオンチャネル研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikkei Yamauchi, Tomoki Tabuchi, Yoshikazu Hirai, Masayuki Iwamoto, Toshiyuki Tsuchiya, Hirofumi Shimizu, and Osamu Tabata
2. 発表標題 Microfabricated Solution Chamber for High Resolution Diffracted X-ray Tracking Method to Observe Ion Channel Gating Motion
3. 学会等名 Transducers 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内一慶, 田淵友樹, 平井義和, 岩本真幸, 土屋智由, 清水啓史, 田畑修
2. 発表標題 「イオンチャネルの開閉機構観察のための高解像度X線一分子動態計測用溶液チャンバの開発」
3. 学会等名 CHEMINAS39
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水啓史
2. 発表標題 X線1分子動態計測法の開発
3. 学会等名 第67回中部生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水啓史
2. 発表標題 イオンチャネル構造遷移過程のX線1分子動画計測
3. 学会等名 生理研研究会「イオンチャネルと生体膜のダイナミクス：構造生物学の先にあるもの」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimizu Hirofumi, Kobayashi Takuya, Iwamoto Masayuki, Kajiwara Kentaro, Kurebayashi Nagomi, Ogawa Haruo, Murayama Takashi
2. 発表標題 Single-Molecule Fluctuations and Conformational Changes of the Human Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channel Recorded using Diffracted X-ray Tracking
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学統合生理学 研究内容 https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/integrative/researches/

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
研究分担者	安永 卓生 (Yasunaga Takuo) (60251394)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授 (17104)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	高崎 寛子 (Takasaki Hiroko)	大阪大学・蛋白質研究所・助教	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関