

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06033

研究課題名（和文）膜タンパク質の新規構造解析技術の開発

研究課題名（英文）Development of a novel method for the structural analysis of membrane proteins

研究代表者

嶋田 睦（Shimada, Atsushi）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：70391977

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：まず開発した新技術の膜タンパク質高分解能構造解析への適用については、4つの独立したグループと共同で推進した。そのうち1つのグループでは顕著な進捗が見られ、開発した新技術がクライオ電子顕微鏡による膜タンパク質高分解能構造解析に適した手法であることを確認できた。次に複数の異なる膜タンパク質を用いた新技術の汎用性の検討に関しては、8種類の新規標的膜タンパク質からのデータ取得に成功し、本手法が汎用性の高い手法であることを確認できた。最後に、新技術を免疫染色と組み合わせた手法についても2種類の新規標的膜タンパク質からのデータ取得に成功し、良好なデータを取得するための条件検討も進捗した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した新技術は研究期間中に、膜タンパク質の高分解能解析を目指した3つのアカデミア研究者との共同研究につながっており、今後の論文発表により、さらに多くのアカデミア研究者に利用されることが期待される。今後この新技術の利用により、膜タンパク質の関与する多くの生命現象が解明されることが期待されるため、学術的意義は大きいと考えられる。さらに、研究期間中に新技術は2社の製薬企業との共同研究でも利用された。この新技術は特に創薬上の利用可能性が高いと考えられるため、今後より多くの製薬企業に利用されることで、より効率的に、より安全な医薬品の開発が進むことが期待され、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：First, we tried to achieve the high-resolution structure determination of membrane proteins with the new technology developed by this proposal in collaboration with four independent groups. In one collaboration, significant progress was achieved and proved that this new technology is suitable for the high-resolution structure determination of membrane proteins. Second, we successfully obtained data from eight new target membrane proteins using the new technology, confirming that this new technology is applicable to a wide variety of membrane proteins. Lastly, we obtained data from two new target membrane proteins using this new technology combined with immunostaining, leading to the establishment of experimental conditions to obtain good data using this technique.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：膜タンパク質 脂質二重膜 電子顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の立体構造は機能と密接に関係し、立体構造情報は目的タンパク質を阻害する薬剤の開発において薬剤デザインの良い指針となる。しかしタンパク質の構造決定は困難を伴い、多額のコストもかかる。ヒトの約 21,000 の遺伝子のうち約 30%は脂質二重膜中、あるいは脂質二重膜表面に存在する膜タンパク質をコードしている。しかし、特に脂質二重膜中に埋め込まれて存在する内在性膜タンパク質は一般の可溶性タンパク質と比べ、構造決定が困難であり (図 1)、構造決定の成功確率は低い。また内在性膜タンパク質は脂質二重膜中に存在して機能するため、脂質二重膜中での立体構造の決定が望ましいが、それはさらに困難である。また脂質二重膜中で会合体を形成して機能する膜タンパク質も多く存在するが、脂質二重膜中での膜タンパク質の会合状態の構造情報を簡便に得られる手法は研究代表者の知る限り存在していない。一方、現在創薬ターゲットとなっているタンパク質の約 60%は膜タンパク質であり、膜タンパク質の構造情報に対する社会的要請は高い。



図 1. 脂質二重膜に埋め込まれた膜タンパク質 (酵母 Oligosaccharyltransferase (OST) 複合体) の模式図

### 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景を踏まえ、既存の方法と比較して簡便に効率よく、より生体内に近い脂質二重膜中での膜タンパク質の、会合状態を含む構造情報を、困難な試料でも抽出できる新技術の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

2017 年ノーベル化学賞を授与されたクライオ電子顕微鏡法は、膜タンパク質を含めた生体高分子の構造解析の近年進展著しい手法である。研究代表者はクライオ電子顕微鏡によるデータ測定に使われる試料保持基板である電子顕微鏡用グリッド中の炭素支持膜のない孔の部分に直接脂質二重膜を張り、そこに膜タンパク質を埋め込み、脂質二重膜中での膜タンパク質の構造情報を簡便に抽出する新技術を考案し、特許出願した。この技術では、脂質二重膜中の膜タンパク質を、その会合状態の情報も含め、超解像顕微鏡よりも 10 倍以上高い、約 1 nm の分解能で簡便に電子顕微鏡によりイメージングできる (図 2)。さらに、この技術をクライオ電子顕微鏡と組み合わせることで、高分解能の三次元構造解析もできる可能性がある。

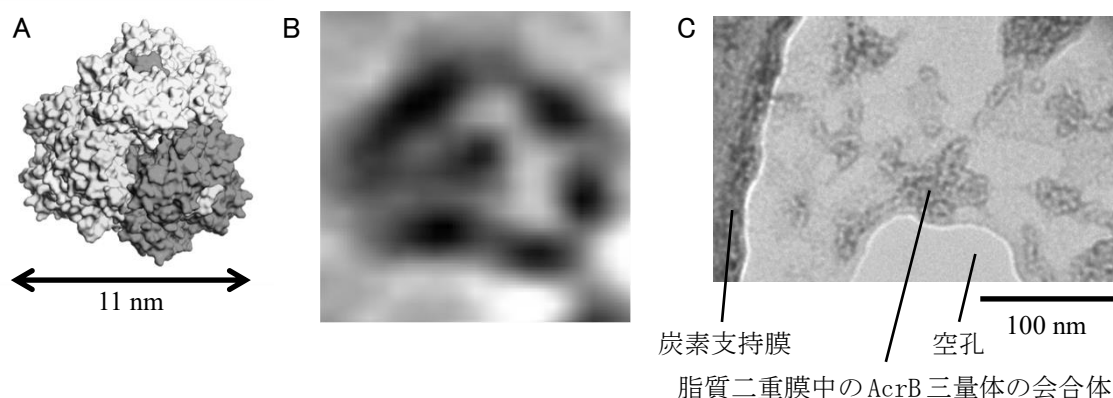


図 2. (A) AcrB 三量体の表面モデル。(B) 本研究課題で開発する手法により得た脂質二重膜に埋め込んだ AcrB タンパク質の、傾斜した一連の電子顕微鏡像 (負染色) から再構成したトモグラム断面中の AcrB 三量体に対応すると考えられる像。(C) 本研究課題で開発する手法により得た脂質二重膜に埋め込んだ AcrB タンパク質の、脂質二重膜中の AcrB 三量体の会合体に対応すると考えられる電子顕微鏡像 (負染色)。

本研究では上記の研究の目的を達成するため、以下の 3 つの項目を推進することで、この新技術のさらなる発展を目指した。

- (1) クライオ電子顕微鏡による、より高分解能での構造解析

本技術を用いて日本各地のクライオ電子顕微鏡施設や研究者と連携して、脂質二重膜中の膜タンパク質のクライオ電子顕微鏡による高分解能三次元構造解析を目指す。

(2) 複数の膜タンパク質試料を用いた本手法の汎用性の検討

複数の膜タンパク質試料を用いて、この手法によるグリッド中の脂質二重膜への組み込みと電子顕微鏡観察を行い、この手法の汎用性の検討を行う。

(3) 本手法と免疫染色を組み合わせた目的タンパク質確認手法の開発

電子顕微鏡像中に観察される脂質二重膜中の構造体が目的膜タンパク質であることの確認が外形から判断が付きにくい場合が存在する。そのため、この手法と金ナノ粒子を用いた免疫染色を組み合わせた目的タンパク質確認手法の開発を進める。

#### 4. 研究成果

(1) クライオ電子顕微鏡による高分解能構造解析に関しては、外部の 4 つのグループと複数の異なる膜タンパク質についてのデータ取得および構造解析を試みた。その結果、1 つのグループとの共同研究では顕著な進捗があり、本技術が高分解能構造解析に適した技術であることが確認できた。さらにその中間解析データから本技術の確からしさが揺るぎないものであることも確認できた（論文未発表）。他の 1 つのグループとの実験では標的膜タンパク質だと考えられる会合体の像は取得できたものの、高分解能三次元構造解析は試みる事ができなかった。これは実験に使用した脂質濃度が高すぎたためだと考えられ、適切な脂質濃度の設定が重要な要素であることが明確になった。他の 1 つのグループとの実験では、グリッドに脂質二重膜を適切に張るための条件検討に時間がかかり、期間中には適切な条件を見つけることはできなかった。そのため現在も条件検討を進めている。またもう 1 つのグループとの実験では脂質濃度が薄すぎたために適切なデータを取得できなかった。こちらに関しても今後適切な脂質濃度の検討を進める予定である。

(2) 複数の膜タンパク質試料を用いた本手法の汎用性の検討に関しては、研究期間中に 8 種類の新規標的膜タンパク質からのデータ取得に成功した。標的は複数回膜貫通型膜タンパク質である TRPM4、一回膜貫通型膜タンパク質である HER2、dysferlin、製薬企業との共同研究試料の膜タンパク質などである。モデル膜タンパク質の AcrB に関しては、これまで所属研究機関である九州大学の電子顕微鏡装置を用いてのデータ収集を行ってきたが、他の機関の異なるメーカーの電子顕微鏡装置を用いても、同様のデータが取得できることを確認した。また AcrB のタンパク質試料に関しても、異なるメーカーから購入したものを使用した場合にも同様のデータが取得できることも確認した。実験は、それぞれ異なる濃度の試料を用いて 2 回以上行い、再現性が取れたものをデータ取得の成功と定義した。HER2 については対応する抗体医薬品であるトラスツズマブやペルツズマブとの複合体のデータの取得も試みた。複数回膜貫通型膜タンパク質である CD20 など、初期のデータ取得では明瞭な像の得られていない膜タンパク質もあるが、試料濃度を上げるなどの対応を行い、今後のデータ取得につなげる予定である。CD20 に関しては、脂質二重膜から突き出ている部分が少ないために負染色試料では明瞭な像が得られていない可能性もあるため、クライオ電子顕微鏡によるデータ取得も今後試みたい。

(3) 本手法と免疫染色と組み合わせた目的タンパク質確認手法の開発に関しては、一回膜貫通型膜タンパク質である HER2 について、対応する抗体医薬品を一次抗体として、金ナノ粒子標識二次抗体により免疫染色を行い、HER2 が脂質二重膜に埋め込まれていることを確認した。また他の共同研究試料の一回膜貫通型膜タンパク質についても同様の解析を行い、免疫染色により目的タンパク質を確認できることを検証した。免疫染色での確認には、コントロールの条件に対して 10 倍以上の金ナノ粒子が観察されることを基準とした。また実験の過程で、脂質膜の状態への影響を最小限にする、本手法に適した免疫染色のプロトコルを確立した。

また研究期間中に本課題で開発を進めた新技術の知的財産権の確保も進めた。まず日本国内で一発特許査定により特許登録された後、各国移行に向けた PCT 出願を行った。その後、韓国、オーストラリアで特許登録された後、米国で許可通知を受領した。これらの国々では全ての請求項が許可されたが、これは開発した新技術の革新性、独自性を支持するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Xiling Han, Nobuo Maita, Atsushi Shimada, Daisuke Kohda	4. 巻 31
2. 論文標題 Effects of targeting signal mutations in a mitochondrial presequence on the spatial distribution of the conformational ensemble in the binding site of Tom20	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4433
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.4433	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 Kong Sam-Geun, Yamazaki Yosuke, Shimada Atsushi, Kijima Saku T, Hirose Keiko, Katoh Kaoru, Ahn Jeongsu, Song Hyun-Geun, Han Jae-Woo, Higa Takeshi, Takano Akira, Nakamura Yuki, Suetsugu Noriyuki, Kohda Daisuke, Uyeda Taro Q P, Wada Masamitsu	4. 巻 36
2. 論文標題 CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING 1 is a plant-specific actin polymerization factor regulating chloroplast movement	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 1159 ~ 1181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koad320	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湯通堂 紀子、嶋田 睦
2. 発表標題 脂質二重膜中の膜タンパク質の迅速高分解能イメージングパイプライン
3. 学会等名 第11回TR推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 嶋田 睦
2. 発表標題 脂質二重膜中での高次タンパク質集合のイメージング
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 膜タンパク質分析用基板、膜タンパク質分析用基板の製造方法、膜タンパク質の分析方法及び膜タンパク質分析用グリッド	発明者 嶋田 睦	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/039829	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 膜タンパク質分析用基板、膜タンパク質分析用基板の製造方法、膜タンパク質の分析方法及び膜タンパク質分析用グリッド	発明者 嶋田 睦	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、18/193357	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 膜タンパク質分析用基板、膜タンパク質分析用基板の製造方法、膜タンパク質の分析方法及び膜タンパク質分析用グリッド	発明者 嶋田 睦	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、21886325.6	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 膜タンパク質分析用基板、膜タンパク質分析用基板の製造方法、膜タンパク質の分析方法及び膜タンパク質分析用グリッド	発明者 嶋田 睦	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、202180064225.1	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 膜タンパク質分析用基板、膜タンパク質分析用基板の製造方法、膜タンパク質の分析方法及び膜タンパク質分析用グリッド	発明者 嶋田 睦	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021372121	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計3件

産業財産権の名称 膜タンパク質分析用基板、膜タンパク質分析用基板の製造方法、膜タンパク質の分析方法及び膜タンパク質分析用グリッド	発明者 嶋田 睦	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、10-258880	取得年 2023年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 膜タンパク質分析用基板、膜タンパク質分析用基板の製造方法、膜タンパク質の分析方法及び膜タンパク質分析用グリッド	発明者 嶋田 睦	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021372121	取得年 2024年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 膜タンパク質分析用基板、膜タンパク質分析用基板の製造方法、膜タンパク質の分析方法及び膜タンパク質分析用グリッド	発明者 嶋田 睦	権利者 国立大学法人九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許第7046409号	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

#### 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
---------	---------