

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2009

課題番号：16087210

研究課題名（和文） 電子線を用いた単粒子構造解析法の研究

研究課題名（英文） Development of single particle electron microscopy

研究代表者

佐藤 主税 (SATO CHIKARA)

独立行政法人産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・研究グループ長

研究者番号：00357146

研究成果の概要（和文）：単粒子解析法は生化学、電子顕微鏡技術、情報技術を融合したタンパク質構造の解析法である。本方法を改良して、これまでよりさらに高分解能で、より自動化された構造解析法を開発した。この方法では、新たに SA (simulated annealing) などの柔軟な情報処理を、単粒子解析法に適用している。その結果、3次元オイラー角決定の自動プログラムの作製に成功した。これらのツールを用いて、実際に人間の遺伝性疾患に深く関わり、薬のターゲットとして重要なタンパク質の構造を決定した。それは、心臓病や免疫疾患の治療に重要な Orai1、CFTR、TRPC3、TRPM2 等のイオンチャンネルであり、聴覚疾患に重要なイオンポンプ系のモーター蛋白質 Prestin、発癌阻止に重要な酸化ストレスのセンサー KEAP1、アルツハイマー症治療に重要な  $\gamma$ -secretase などである。

研究成果の概要（英文）：Single particle 3D reconstruction is a method produced by combining biochemistry, electron microscopy and image analysis. To improve the resolution and automation of single particle reconstruction (SPR), we have introduced simulated annealing (SA) to SPR, and developed it. These methods were first applied to the ion channels, such as TRPC3, TRPM2 and Orai1, then to CFTR ion pump Prestin, carcinogenesis related keap1, and further to Alzheimer disease related  $\gamma$ -secretase.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	8,300,000	0	8,300,000
2005年度	16,700,000	0	16,700,000
2006年度	15,400,000	0	15,400,000
2007年度	15,500,000	0	15,500,000
2008年度	8,400,000	0	8,400,000
2009年度	12,600,000	0	12,600,000
総計	76,900,000	0	76,900,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質、3次元構造決定、電子顕微鏡、ナノテクノロジー、画像情報処理、

## ニューラルネット、グリッドコンピューティング、クライオ電顕

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の体の中では、様々な蛋白質が相互に作用して生理機能を営んでいる。その中には結晶を作製し難いものも存在する。単体の結晶作製が可能でも、大きな複合体を形成すると難しいことも多い。それでも精製さえできれば、結晶を必要としない単粒子構造解析法を適用できる。そのため、単粒子解析はポストゲノム時代の網羅的な構造解析法として期待されている。この方法では最初に、電子顕微鏡による撮影が必要である。しかし、タンパク質は電子線照射によってダメージを受けやすいため、照射電子線量は限られる。そのため、電子顕微鏡写真はノイズに埋もれたかすかな像としてしか得ることができない。その像だけから情報処理技術により3次元構造を再構成するのが単粒子解析法である。本方法は、情報学の進展とコンピューターの性能の向上により可能になった。これまで、物理出身の研究者達により主に古典的な情報処理法の適用によって進められてきており、SA法のような最新の情報技術の適用が少なかった。本研究によって、さらにSA法にグリッド技術を組み合わせることで、これまでは適用できなかった規模の計算を可能にすることを目指した。本プロジェクトにおいて情報研究者とバイオ研究者が共に技術開発を行うことで、本手法がより使い易いものとなり、その分解能の向上が期待される。単粒子解析法は結晶化を必要としない点にも特色があり、精製されたサンプルにはすべて適用可能である。そのため、臨床薬等の結合による蛋白質の構造変化を捉えることが期待される。

(2) 日本国内での単粒子解析法の研究活性は残念ながら全体的にそれほど高くはなく、大阪大、京大、理研、九工大等に少数存在し、我々は広く連携しながら研究を行っている。反対に海外では研究熱が年々高まってきており、NIH, Imperial college, MRC, Max plank, Scripps 等に多数有力なグループが存在する。しかし Scripps 等を除いては、未だに古典的な情報理論を導入して、プログラムを構築する段階にとどまっていた。実際の解析結果に関しても我々が、200kDa と膜タンパク質で最小サイズの分子を解析した記録を持っていた。

### 2. 研究の目的

(1) 従来の単粒子構造解析法では、近年の情報処理法の実装など改良すべき点が多く、得られる構造の分解能は限られていた。そこで本研究では、近年急速に発展を遂げた SA やグリッドコンピューティングなどの情報科学技術をポストゲノムの構造決定に生かすことで、両分野の境界領域を発展させる意味も有する。グリッド技術は多くのコンピューターをシームレスにつなぐことで、膨大な計算や巨大なファイルの処理を可能にする技術であり、SA法は温度変化に応じた分子の動きを統計的に模することで、局所解が多く存在する中から最適解を見つけることを可能にする技術である。双方の融合によって、単粒子構造解析法を現在の数年を要する技術から短期間で行える技術に改良し、その分解能を高める。

(2) これらの技術を用いて実際にイオンチャネル・ポンプ・プロテアーゼ・受容体センサーなど人間の疾患や薬に重要なタンパク質の構造を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 電子顕微鏡画像の解析技術の開発。単粒子構造解析において、試料作製や電子顕微鏡画像撮影と並んで構造解析の成否を決めるのが、画像データの解析である。画像解析過程には、画像内粒子像の位置合わせ、画像の分類、画像間の3次元角度(オイラー角)決め、さらには画像からの3次元再構成などの処理がある。その中でも、精度的に最も難しいのは、オイラー角の決定である。そのために、新たなオイラー角決定法を開発する。柔軟な情報処理を導入し、さらにグリッド技術を用いた並列計算プログラムを構築する。オイラー角決定の処理は、画像データ毎にある程度独立に行えるために、位置あわせアルゴリズム自体の高速化と共に並列計算による処理速度の向上を期待することができる。

(2) 解析対象としては主に、哺乳類のイオンチャンネルタンパク質を用いる。これらタンパク質は、一般に精製の過程において非常に活性を失いやすい。三尾・佐藤によるこれらの蛋白質の精製と電気生理的な活性の測定をさらに高効率なものにするために、電気生理のシステムを整備し、イオンチャンネルを通る極めて微弱な電流を容易に測定できるようにする。このことで、タンパク質の活性の測定を容易にする。さらに、生化学的手法を駆使して、これらタンパク質ごとに精製法を開発・確立してゆく。これらの技術課題の解決を通じて単粒子解析法の効率を高め、生理機能解明や新薬開発における重要性にもかかわらず構造解明が遅れていたイオンチャンネル類の構造を明らかにしてゆく。

### 4. 研究成果

(1) 電子線単粒子解析法は電子顕微鏡法と画像情報学とを組み合わせた方法であり、我々は特に情報学的開発に力を入れ、様々な蛋白質の構造を決定した。その中には、従来法では難しかった対称性が低い分子の構造も含まれる。本方法では、画像ごとのオイラー角を決定するために、画像の1次元投影であるシノグラムに頼らない。その代わりに2次元画像をそのまま用いて角度をランダムに仮定して、そこから3次元構造を繰り返し作製し評価することで、画像間の相対3次元角度を決定する。すなわち最初に画像は球の表面上にランダムに貼り付けられ、そこから3次元構造を中心に作製する。この時点では相対オイラー角が合っていないため、中心の構造は良くない。しかし、球上での画像の配置を様々に変えて最適化することで、やがて中心に正しい構造が形成される。本方法では計算途中でLocal minimumから脱出する必要があるが、そのためにはSA法を用いた。このアルゴリズム全体はcho-correlation法と名づけられた。そこでは、従来のシノグラム法と違って2次元データを1次元に圧縮する必要がないため、ノイズも圧縮されることによる精度の低下がない。そのため、オイラー角の決定精度が飛躍的に向上した。その結果、分解能が以下に述べる様に向上した。

(2) 我々は音や味覚を始め、様々な刺激に応じて細胞膜でCaイオンを透過させて、細胞内へと刺激を伝えている。そこで主役として活躍するのがTRP channel群である。これらは、情報伝達物質との結合により、分子内にイオン通路を開いてCaイオンを導入し、細胞内部へと情報を伝達する。その中でもTRPC3は、最も典型的なTRPチャンネルに分類され、脳の可塑性・心筋の興奮制御など様々な生理活動に深く関わる。我々はその構造を

クライオ画像から 9.9 の分解能で解明した。その構造は中心のタンクとそれを取り巻くアンテナよりなり、TRPC3 が様々のタンパク質と結合する合理的な構造と思われる。さらに TRPC3 チャンネルに喘息治療薬ピラゾール化合物が結合する位置を決定した。

(3) TRP チャンネル中でも、特に温度や酸化ストレスのセンサーである TRPM2 は注目されている。このチャンネルを精製・負染色電顕撮影・単粒子画像解析を行った。その結果、TRPC3 と似た隙間だらけの膨れあがったベル型 2 重入れ子構造を持つことを解明した。解明された三次元構造では、張り出した構造が 3 次元的な結合スペースをつくり出し、様々な制御タンパク質を同時に結合し、TRPM2 が多様な刺激のセンサーであることを可能にしている。さらには酸化ストレスを感知する酵素部位 NUDT9-H ドメインは、ベルから細胞内に突き出ている突起と考察された。本チャンネルは、特に糖尿病の発症機構と深く関連することが知られており、更なる高分解能での構造解明を目指したい。

(4) 心筋細胞内での小胞体からの Ca 放出に重要な TRIC チャンネルの構造を解明した。その構造は 3 両体で 99 kDa であり、これまでの膜タンパク質での構造解析の最小記録である。

(5) 我々の内耳において音の増幅をおこなうイオンポンプ系のモーター蛋白質 Prestin の構造をつきとめた。内耳蝸牛に存在する外有毛細胞は細胞膜電位の変化に応じてその細胞長を周期的に変化させ、その動きを使って基底膜の振動増幅すなわち音シグナルの増強を行う。その周期振動はマイクロセカンドレベル ( $\approx 20\text{kHz}$ ) と、これまで知られている

モータータンパクの中でも最も早い動きである。その分子実体は近年プレスチンであると同定された。これは陰イオントランスポーター-SLC26 ファミリーに属する、12 回膜貫通型の膜タンパク質であった。その後、本遺伝子の変異による難聴患者や、ノックアウトマウスにおける聴覚障害が確認されている。本研究ではプレスチンを精製し、負染色電子顕微鏡観察の単粒子構造解析により立体構造を解明した。プレスチンは全体として弾丸型の分子であり、電圧変化に応じて Cl<sup>-</sup> イオンが行き来すると思われる空隙をその内部に確認することができた。プレスチン分子の 20kHz にも達する高速運動の機構は、この殻状分子内にイオンを閉じ込める構造にあると思われる。本研究を聴覚の分子レベルでの理解と治療に役立てたい。

(6) 酸化ストレスのセンサーである Keap1 は、単体でも結晶を形成しないが、DC ドメインのみだと結晶を形成する。そこから、X 線により解析された構造は  $\beta$ -プロペラであった。我々は Keap1 全蛋白構造を解明するために、全タンパク質の精製に成功し、負染色して撮影し、さらに単粒子解析を行った。この 2 量体蛋白質は全体としてサクランボ状の形をしていた。その 2 つの房にはそれぞれ中心に小さな穴が上下に貫通しており、これが DC ドメイン  $\beta$ -プロペラの数 径の穴に一致することがわかる。さらにその周囲を取り囲んでいるサクランボの実の膨らみ部分に、酸化ストレスを感知する SH 基が存在して中の DC を制御することも推察された。

(7) 非興奮細胞でも情報伝達に重要なイオンチャンネルが存在する。免疫機構に必須な Orai1 の構造を突き止めた。細胞質側に突起を持ち、STIM との直接結合すると思われる。

(8) 遺伝子変異によって嚢胞性線維症を発生させる CFTR の構造を解明した。その細胞質には、ATP 分子を導入する通路と思われる穴が観察された。

(9) この他にも、我々の体内で細胞外プロテアーゼ阻害により癌の転移を阻止する Reck の構造が土鈴状であることを解明した。

(10) 溶液中で細胞を観察できる大気圧走査型電子顕微鏡 (ASEM) を開発した。精製さえできれば単粒子解析法が可能であるが、不安定な超分子複合体は、精製すら受け付けられないことも多い。そのため、電子顕微鏡と半導体製造超薄膜技術の融合により、体の組織や細胞を乾燥させずに、固定するだけで液中で直接観察できる走査電子顕微鏡を開発した。ここでは、薄膜で真空と細胞とを隔離することで、8nm の高分解能観察を達成し、更に蛍光光学顕微鏡での同視野観察を実現している。

この大気圧に保持した試料を観察できる倒立型の走査電子顕微鏡 ASEM は、電子線を透過する耐圧薄膜 SiN を備えた細胞培養ディッシュを用いる。従来必要であった試料を真空中で撮影する為の前処理 (数時間 ~ 数日以上に及ぶ脱水・乾燥等) は不要となり、これに伴う試料の変形・変性の恐れも回避できる。また薄膜上方に光学顕微鏡も配置しており、蛍光染色による細胞内ダイナミクスの観察と固定後に SEM による高分解能観察が可能になる。ディッシュは開放系であり、薬を作用させたり、ウイルス感染させた後で固定し、高分解能観察することが可能である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 28 件)

T.Ogura, K.I.Tong, K.Mio, Y.Maruyama, H.Kurokawa, C.Sato, M.Yamamoto.

Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 査読有, 107, 2010, 2842-2847

H.Nishiyama, M.Suga, T.Ogura, Y.Maruyama, M.Koizumi, K.Mio, S.Kitamura, C.Sato. Atmospheric scanning electron microscope observes cells and tissues in open medium through silicon nitride film. J Struct. Biol. 査読有, 169, 2010, 438-449

Y.Maruyama, T.Ogura, K.Mio, K.Kato, T.Kaneko, S.Kiyonaka, Y.Mori, and C.Sato. Tetrameric orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain. J. Biol. Chem. 査読有, 284(20), 2009, 13676-13685

S.Kiyonaka, K.Kato, M.Nishida, K.Mio, T.Numaga, Y.Sawaguchi, T.Yoshida, M.Wakamori, E.Mori, T.Numata, M.Ishii, H.Takemoto, A.Ojida, K.Watanabe, A.Uemura, H.Kurose, T.Morii, T.Kobayashi, Y.Sato, C.Sato, I.Hamachi, and Y.Mori. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. PNAS, 査読有, 106(13), 2009, 5400-5405

K.Mio, T.Ogura, M.Mio, H. Shimizu, T.C. Hwang, C.Sato, Y. Sohma. (2008) Three-dimensional reconstruction of Human CFTR chloride channel revealed an ellipsoidal structure with orifices beneath the putative transmembrane domain. J. Biol. Chem. 査読有, 283(44), 2008, 30300-30310

K.Mio, Y.Kubo, T.Ogura, T.Yamamoto, F.Arisaka, C.Sato. The motor protein prestin is a bullet-shaped molecule with inner cavities. J. Biol. Chem. 査読有, 283(2), 2008, 1137-1145

Y.Maruyama, T.Ogura, K.Mio, S.Kiyonaka, K.Kato, Y.Mori, C.Sato. Three-dimensional reconstruction using transmission EM reveals a swollen, bell-shaped structure of TRPM2 cation channel. J. Biol. Chem. 査読有, 282(51), 2007, 36961-36970

M.Yazawa, C.Ferrante, J.Feng, K.Mio, T.Ogura, M.Zhang, P-H.Lin, Z.Pan, S.Komazaki, K.Kato, M.Nishi, X.Zhao, N.Weisleder, C.Sato, J.Ma, & H.Takeshima. TRIC channels are essential

for Ca<sup>2+</sup> handling in intracellular stores. Nature, 査読有, 448(7149), 2007, 78-82

T.Ogura and C.Sato. A fully automatic 3D reconstruction method using simulated annealing enables accurate posterioric angular assignment of protein projections. J. Struct. Biol. 査読有, 156, 2006, 371-386  
〔学会発表〕(計 35 件)

C.Sato,ら The Atmospheric Sem Observes Nuclei in the Surface Level of Tissue Without Thin-Sectioning. The American Society for Cell Biology 49th Annual Meeting, 2009/12/08, サンディエゴ

C.Sato,ら Three-dimensional structures of ion channels revealed by electron microscopy: sodium, TRP, CFTR and Orai1 channels. Neuroscience 2009. シカゴ. 2009/10/21

M. Kawata,ら Maximum likelihood approach for picking-up process in single particle analysis. 第46回日本生物物理学会年会、福岡市、2008/12/05

K.Mio,ら 単粒子解析による TRP channel family 間での構造比較. Structure of TRP channels revealed by single particle analysis using EM images. 第46回日本生物物理学会年会、福岡市、2008/12/03

T.Ogura,ら The 3D structure of ion channels, sensors and receptors revealed by electron microscopy. International Conference of Physiological Sciences and 11th International Symposium on Molecular Medicine, Crete, Greece, 2008/10/09

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 画像処理システム、画像処理方法、プログラムおよび記録媒体

発明者: 川田 正晃、佐藤 主税

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2008-289005

出願年月日: 2008/11/11

国内外の別: 国内

名称: 構造推定システム、構造推定方法およびプログラム

発明者: 川田 正晃、佐藤 主税

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許

米国公開番号: US-2010-0067809-A1

公開年月日: 2010/03/18

国内外の別: 国外

取得状況 (計 2 件)

名称: 構造推定システム、構造推定方法およびプログラム

発明者: 川田 正晃、佐藤 主税

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 4171919

取得年月日: 2008/8/22

国内外の別: 国内

名称: 電子顕微鏡観察像の画像処理方法および画像処理プログラム並びに記録媒体

発明者: 小椋 俊彦、佐藤 主税、藤吉 好則

権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 3968421

取得年月日: 2007/6/15

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/neurosci/japanese/group/kouzouseiri.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 主税 (SATO CHIKARA)

独立行政法人産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・研究グループ長

研究者番号: 00357146

(2) 研究分担者

川田 正晃 (KAWATA MASAOKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・情報技術研究部門・主任研究員

研究者番号: 20356843

小椋俊彦 (OGURA TOSHIHIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・脳神経情報研究部門・主任研究員

研究者番号: 70371028

三尾和弘 (MIO KAZUHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報センター・主任研究員

研究者番号: 40470041

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: