

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19207

研究課題名（和文）PEG化修飾を用いたクライオ電子顕微鏡のための粒子性状の改善

研究課題名（英文）Improving particle behaviors for cryo-EM analysis by PEGylation

研究代表者

大戸 梅治（Umeharu, Ohto）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・准教授

研究者番号：90451856

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）：近年、クライオ電子顕微鏡解析は構造解析の主要な方法論となりつつあるが、クライオ電顕観察に供するグリッド上での粒子の挙動を改善する段階が構造解析のボトルネックになることも多い。本研究では、タンパク質をPEG化修飾することで、クライオ電顕の凍結グリッド中の粒子の性状を改善することを目指した。試したモデルタンパク質ではいずれも、粒子の分散性の向上が認められた。本手法はクライオ電顕でのグリッド作製において、汎用性の高い有効な選択肢の1つとして広く用いられる可能性を有する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の構造情報は、生命現象を理解しその制御方法を考えるうえで、近年ますます重要になってきている。タンパク質の構造情報を実験的に得る方法として、クライオ電子顕微鏡解析が盛んに行われているが、構造解析に適したグリッドを調製する段階がボトルネックになることが多い。本研究では、タンパク質をPEG化することでグリッド上での粒子の挙動が改善することを示した。本手法は、クライオ電子顕微鏡構造解析をさらにスピードアップさせるとともに、これまで構造解析できなかつた試料についても新たな可能性を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Cryo-EM analysis has become a major methodology for protein structural analysis in recent years. However, improving behaviors of protein particles on the cryo-EM grids often poses a bottleneck in structural analysis. In this study, I aimed to improve the behaviors of protein particles on cryo-EM grid by PEGylating proteins. All of the model proteins tested showed improved particle dispersion for further structural analyses. This method could be widely used as a versatile and effective option for cryo-EM grid preparation.

研究分野：構造生物学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 化学修飾 PEG化修飾 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

近年、クライオ電子顕微鏡(クライオ電顕)は構造生物学の分野において目を見張るべき発展を遂げてきた。生体高分子の構造解析(構造決定)手法は、10年前にはほぼX結晶構造解析の一択であった。しかし、ここ数年来、これまで構造解析が困難であった巨大な分子複合体などについて次々とクライオ電子顕微鏡で構造解析がなされている。クライオ電顕では、多くのサンプルで構造解析の大きなハードルとなっていた結晶化の必要がないため、サンプル中に複数の状態があったとしても構造決定が可能な場合がある。また、サンプルをそのままの溶液状態で、アモルファス状の氷中に閉じ込めた状態で構造解析を行うため、結晶構造に比べてより溶液中の分子構造を反映した構造が得られることが期待される。

上記のように、クライオ電顕は構造解析の主要な方法論となりつつあるが、クライオ電顕観察に供するグリッド作製に関しては困難を伴うことが多い。サンプル凍結の際のアグリゲーション、変性、粒子の分散性の悪化などである。具体的には、サンプルをグリッド上にアプライ後、ろ紙を使って余分な水分を除いた後に、液体エタンで急速凍結することで、薄い氷中にサンプル粒子を閉じ込めて観察するが、その際に粒子が気液界面に接することで変性すると考えられている。グリッド上での粒子の挙動を改善するには多大な労力を要するのが一般的であり、この段階が構造解析のボトルネックになることも多い。グリッド上での粒子の挙動を改善するための方法として、グラフェンオキシドを支持膜としたグリッドの使用、界面活性剤の添加、多数回試料アプライ法、直接試料吹き付け法など様々な手法が提案されている。しかし、いずれの手法も、万能な方法でない。一般的に、グリッド作製の際に粒子がダメージを受けるか受けないかは、それぞれのタンパク質粒子の性質に依存するところが大きいため、これを改善するには、基本的には試行錯誤の検討を繰り返してそのタンパク質に適した凍結条件を探す必要がある。

2. 研究の目的

本申請課題では、クライオ電顕のグリッド上での粒子の挙動(分散性、粒子数、安定性)を改善するための手法として、サンプルを化学修飾でPEG化することの有効性を実証する。予備検討において、PEG化が粒子の分散性などを大いに改善する結果が得られており、本申請課題ではこれをより系統的に検証する。本手法は、今後、クライオ電顕におけるグリッド作製の一つのオプションとして一般的な手法になる可能性を有する。

3. 研究の方法

本研究では、タンパク質の表面に存在するリジン残基またはN末端アミノ酸のアミノ基、またはシステイン残基、をターゲットにした化学修飾法を用いてタンパク質をPEG化する。このための化学修飾試薬は様々なものが市販されており比較的安価に購入可能である。例えばMethyl-PEG4-NHS ester(4単位のPEGが付加)、Methyl-PEG8-NHS ester(8単位のPEGが付加)が容易に入手できる。基本的にはPEG化試薬とタンパク質試料を混合しインキュベート後に反応を停止させ、ゲルろ過または限外ろ過膜などで余分な試薬を除く。

4. 研究成果

(1) PEG化の有効性を複数のタンパク質で検証する。

PEG化によりクライオ電顕において粒子の性状が改善するかどうか、複数のタンパク質で検証した。具体的には、 β -amylase、alcohol dehydrogenase (ADH)、NOD2、IgGについて、未修飾とPEG化修飾した試料を同条件でグリッドを作製し、クライオ電顕で観察した(図1)。その結果、いずれのタンパク質においても、PEG化した試料は未修飾の試料よりも良好な粒子密度および分散性を示した。さらに、2D解析を行い評価したところ、 β -amylase、ADH、NOD2については、未修飾の試料では明瞭な2D像が得られなかったが、PEG化修飾した試料については、明瞭な2D像が得られた。さらに、 β -amylase、ADH、NOD2について、Titan Kriosを用いてそれぞれ350枚、330枚、890枚の比較的小さなデータセットを取得し、構造解析を進めた。その結果、 β -amylase、ADH、NOD2についてそれぞれ分解能2.3 Å、3.3 Å、3.7 Åにおいて十分モデリング可能な質の三次元密度マップを得ることができた。いずれも、未修飾では粒子が氷中に入らない(β -amylase)粒子が変性している(ADH)粒子がアグリゲーションしている(NOD2)などの問題があったが、PEG化修飾することでこれらの問題を解決することに成功している。

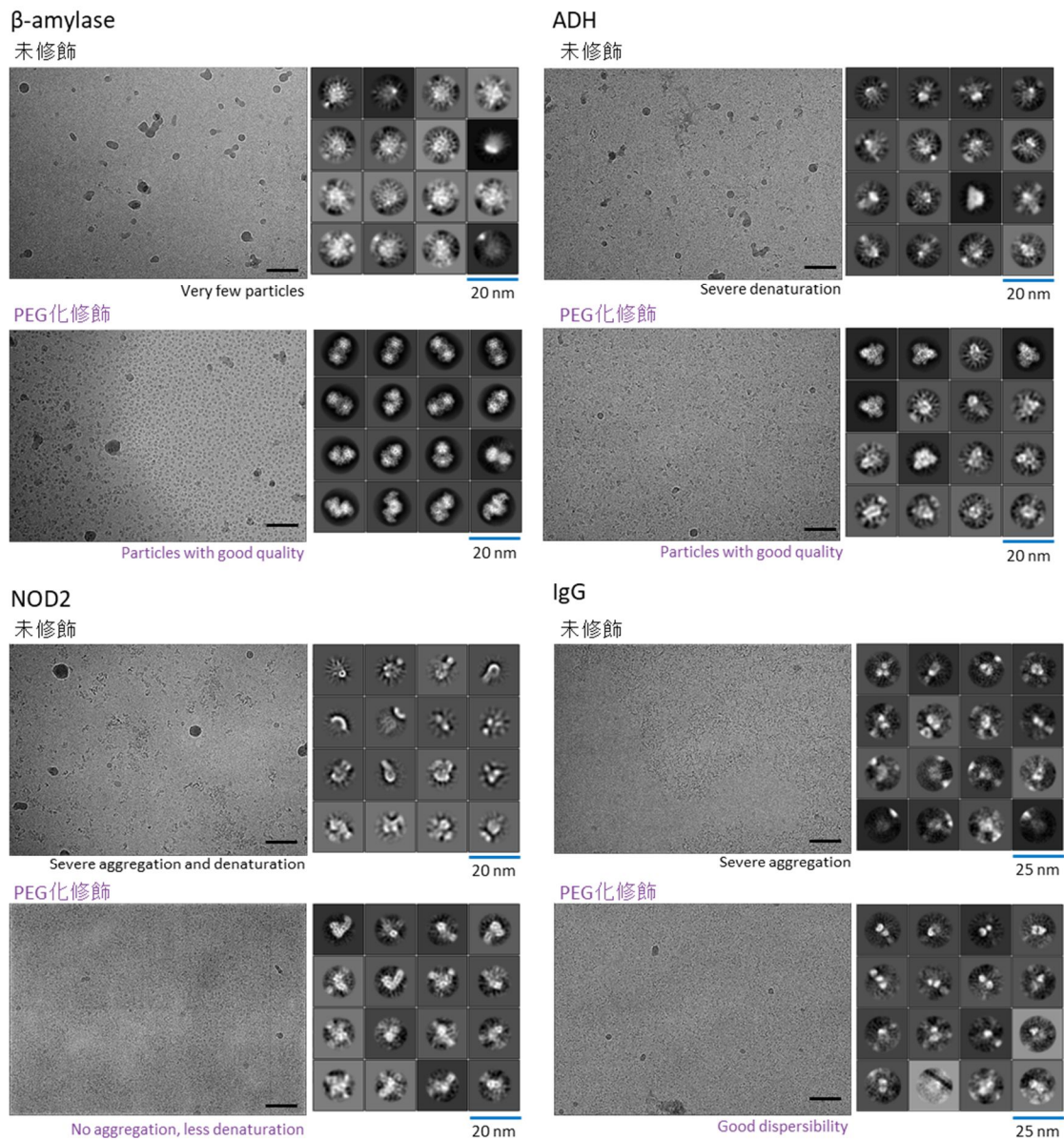


図 1 . 各種タンパク質の未修飾および PEG 化修飾した試料のクライオ電顕像

(2) PEG 化による構造への影響を検討する

PEG 化修飾により、タンパク質の三次元構造にどのような影響があるかを検討した。具体的には、apoferritin や β -galactosidase などのモデルタンパク質について PEG 化の有無により構造にどのような影響が出るかを検証した。それぞれ、未修飾、および PEG 単位 4 つの PEG 化試薬 (PEG4) または PEG 単位 8 つの PEG 化試薬 (PEG8) を用いて PEG 化修飾した試料について、50 ~ 100 枚程度の比較的小さなデータセットを取得して構造解析を行った。その結果、apoferritin については分解能 2.6 ~ 3.0 Å で、 β -galactosidase については分解能 3.1 ~ 3.3 Å の三次元密度マップが得られた (図 2)。いずれも十分な質の密度マップであった。PEG 化によりタンパク質表面の一部のループ領域が disorder する傾向が見られたが、今回用いた PEG 化試薬濃度 (1 ~ 4 mM) においてはそれほど重大な影響はなかった。また、apoferritin と β -galactosidase のデータセットの中で、PEG 化修飾した試料が最も高分解能を示した。これは、PEG 化修飾により、粒子の密度や分散性が向上したためであると考えられる。

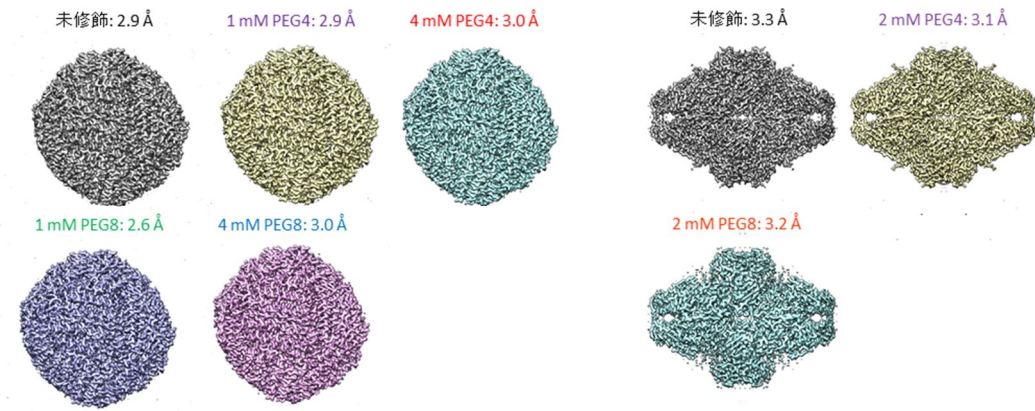


図2 . apoferritin (左) と β -galactosidase (右) の未修飾および PEG 化修飾した試料のクライオ電顕密度マップ

PEG 化法は、多くのタンパク質に存在するリジン残基(またはシステイン残基)をターゲットにするためほとんど全てのタンパク質に適用可能である。さらに、方法が容易で、PEG 化の修飾度合いも容易に調節可能である。また市販の試薬を用いるので誰でも実行可能である。タンパク質表面を PEG で「マスク」することで、凍結時の気液界面との相互作用および粒子間の相互作用などの悪影響が減少することが期待され、これはどんなタンパク質にも適用可能であろうと考えられる。本手法はクライオ電顕でのグリッド作製における、汎用性の高い有効な選択肢の1つとして広く用いられる可能性を有し、クライオ電顕構造解析をさらにスピードアップさせる可能性を有する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Deguchi Atsuko, Watanabe-Takahashi Miho, Mishima Taishi, Omori Tsutomu, Ohto Umeharu, Arashiki Nobuto, Nakamura Fumio, Nishikawa Kiyotaka, Maru Yoshiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Novel multivalent S100A8 inhibitory peptides attenuate tumor progression and metastasis by inhibiting the TLR4-dependent pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 1 - 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-023-00604-3	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 Sakaniwa Kentaro, Fujimura Akiko, Shibata Takuma, Shigematsu Hideki, Ekimoto Toru, Yamamoto Masaki, Ikeguchi Mitsunori, Miyake Kensuke, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 TLR3 forms a laterally aligned multimeric complex along double-stranded RNA for efficient signal transduction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-35844-2	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 Ohto Umeharu	4. 巻 13
2. 論文標題 Activation and regulation mechanisms of NOD-like receptors based on structural biology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 953530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.953530	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 Zhang Zhikuan, Nomura Norimichi, Muramoto Yukiko, Ekimoto Toru, Uemura Tomoko, Liu Kehong, Yui Moeko, Kono Nozomu, Aoki Junken, Ikeguchi Mitsunori, Noda Takeshi, Iwata So, Ohto Umeharu, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-32019-3	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 Koutsogiannaki Sophia, Bu Weiming, Maisat Wiriya, Manzor Mariel, Zhang Zhikuan, Ohto Umeharu, Eckenhoff Roderic G., Yuki Koichi	4. 巻 36
2. 論文標題 Propofol directly binds to and inhibits <scp>TLR7</scp>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202200312R	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

1. 著者名 Asami Jinta, Kimura Kanako Terakado, Fujita-Fujiharu Yoko, Ishida Hanako, Zhang Zhikuan, Nomura Yayoi, Liu Kehong, Uemura Tomoko, Sato Yumi, Ono Masatsugu, Yamamoto Masaki, Noda Takeshi, Shigematsu Hideki, Drew David, Iwata So, Shimizu Toshiyuki, Nomura Norimichi, Ohto Umeharu	4. 巻 606
2. 論文標題 Structure of the?bile acid transporter?and HBV receptor NTCP	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04845-4	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

1. 著者名 Ohto Umeharu, Kamitsukasa Yukie, Ishida Hanako, Zhang Zhikuan, Murakami Karin, Hirama Chie, Maekawa Sakiko, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Structural basis for the oligomerization-mediated regulation of NLRP3 inflammasome activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2121353119	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 Kamitsukasa Yukie, Nakano Kenji, Murakami Karin, Hirata Kunio, Yamamoto Masaki, Shimizu Toshiyuki, Ohto Umeharu	4. 巻 596
2. 論文標題 The structure of NLRP9 reveals a unique C terminal region with putative regulatory function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 876 ~ 885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14302	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 Yang Yi, Csakai Adam, Jiang Shuangshuang, Smith Christina, Tanji Hiromi, Huang Jian, Jones Torey, Sakaniwa Kentaro, Broadwell Lindsey, Shi Chengrui, Soti Subada, Ohto Umeharu, Fang Yaohui, Shen Shu, Deng Fei, Shimizu Toshiyuki, Yin Hang	4. 巻 12
2. 論文標題 Tetrasubstituted imidazoles as incognito Toll-like receptor 8?a(anta)gonists	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4351-4351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24536-4	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 Zhang Zhikuan, Shigematsu Hideki, Shimizu Toshiyuki, Ohto Umeharu	4. 巻 29
2. 論文標題 Improving particle quality in cryo-EM analysis using a PEGylation method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1192 ~ 1199.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2021.05.004	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ https://kouzou.f.u-tokyo.ac.jp/
--

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
---------	---------