

## 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



### I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業  
(プログラム名) (英語) Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間: 平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 白水 美香子  
(英語) SHIROUZU Mikako

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー  
(英語) RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research Team Leader

### II 補助事業の概要

「支援」については、クライオ電子顕微鏡解析を目指した高難度タンパク質複合体の調製と評価、および、X線結晶構造解析を目指した試料調製・結晶化について、これまでの実績と発現系のラインナップにもとづいて、それぞれのタンパク質に適した発現系を効率的に選択しつつ、合計で44件の支援を行った。

X線結晶構造解析に向けた支援としては、例えば、植物由来の小分子化合物 Rocaglamide A (RocA)、ヒト由来 eIF4A、A・Gの連続配列を持つRNA、ATPアナログである AMPPNPの4分子を含む複合体の結晶構造を決定し、RocAはeIF4AとAやGのプリン塩基によって形成されている2分子間のRNA塩基配列特異的に形成されるくぼみにはまり込んでいることを明らかにした。これは、配列特異性なしに機能するタンパク質(eIF4A)に小分子(RocA)がRNA配列特異性を付加する構造的機構を世界で初めて示したものである(Iwasaki *et al.*, **Molecular Cell** 2018)。膜タンパク質のX線結晶構造解析に向けた生産・解析支援例としては、藍藻の光合成系とは異なる光エネルギー捕集装置である2種類の微生物ロドプシンを大腸菌無細胞発現系により調製、結晶化し、SPring-8 BL-32XUにてzooシステムを用いて(構造解析領域との連携)、それぞれ1.90 Åと2.65 Å分解能で結晶構造を決定した(Hasegawa *et al.*, **Sci. Rep.** 2020)。

電顕に関する支援としては、負染色による性状評価を効率的に行い、複数の界面活性剤を試すなどグリッド作成条件を最適化しつつ、データの質が高い場合にはクライオ電顕解析により近原子分解能の立体構造を得るまでを支援した。また、80Sリボソームの60Sサブユニットと40Sサブユニットの間で進行している翻訳反応を邪魔することなくC型肝炎ウイルス(HCV)のIRESが40Sサブユニットに結合している

クライオ電子顕微鏡構造を決定することに成功し、これまで想定されていなかった方法で HCV の IRES が反応中の翻訳装置リボソームを乗っ取っていることを示せた点は画期的である (Yokoyama, *Molecular Cell* 2019)。

他にも、生産領域の胡桃坂グループとの連携で、ヌクレオソーム DNA を転写中の一連の RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) の構造をクライオ電顕単粒子解析によって決定し、RNAP II がゲノム構造の基本単位であるヌクレオソームを乗り越えて転写するメカニズムを解明した (Kujirai *et al.*, *Science* 2018)。さらに、普遍的な転写伸長因子 Elf1 と Spt4/5 を結合した RNAP II とヌクレオソームとの複合体の構造決定にも成功し、これらの因子がヌクレオソームの障壁を軽減して RNAP II の円滑な通過を促進する仕組みを初めて明らかにした (Ehara *et al.*, *Science* 2019)。Elf1 と Spt4/5 は、Pol II 表面の広い範囲に結合して Pol II と一体化し、DNA や RNA を導くトンネルを補強・再構築することで、転写伸長に特化した構造を確立しており、細胞内で稼働中の転写ファクトリーの姿が初めて明らかにされた。

「高度化」については、超分子複合体の調製技術の高度化としては、ヒト由来因子の再構成による試験管内翻訳系を用いて HCV IRES と翻訳中のヒト由来リボソームの複合体を効率よく調製し、前述したように近原子分解能で立体構造決定することに成功した。また、非天然アミノ酸を使ったクロスリンクによって複合体を安定化する技術の検討を行った。電顕技術としては、負染色による性状評価を行い、負染色試料の取得画像と画像処理の結果や、クライオグリッド調製条件と取得画像の良否の判断等のデータベース化も進めた。多種類のサンプルに対して支援課題を遂行した際、負染色法による電顕観察では単分散で良好であったのに、クライオ条件下では複合体が解離や変性している試料がよく観察された。そこで、クライオグリッド作成時に粒子が気液界面に接することが原因である可能性を考え、クライオグリッド調製時でのさまざまな界面活性剤の添加と、自作のカーボン薄膜を裏打ちしたグリッドとを組み合わせた体系的な検討を行った。後述する eIF2-eIF2B 複合体および ELMO/DOCK/Rac 複合体については、カーボン薄膜へ吸着させた上で、さらに界面活性剤を添加することで、構造解析につながった。しかし、分子量が小さい複合体については、気液界面から遠ざけるために試料を吸着させる支持膜としてカーボン膜を用いると、高いバックグラウンドによって十分なコントラストを得ることができないため、電子線を十分透過する非常に薄いグラフェンオキシサイド (GO) を用いたグリッド作製技術も改良し、支援課題に適用した。他にも、気液界面問題解消のため、液滴噴射及び液滴噴霧式の急速凍結装置と、ブロットなしでの急速凍結を可能にするためのナノワイヤグリッドの開発を進め、装置を使用したナノワイヤグリッドへの噴霧、凍結後の粒子の存在の確認を行った。さらなる装置の最適化の検討や、マイクロ流路を利用した混合系などの追加機能の検討を進めた。

電子顕微鏡解析に適した超分子複合体の調製法を高度化する際に得られた結果についていくつか紹介する。超分子複合体のクライオ電子顕微鏡測定試料を調製し、ヒト由来のリン酸化および非リン酸化型の翻訳開始因子 eIF2 について、別の翻訳開始因子である eIF2B との複合体の立体構造を決定した。構造解析の結果、eIF2 のリン酸化の有無によって、eIF2 の eIF2B へ結合する向きが大きく異なることが明らかとなった。eIF2B は 2 回対称の構造を持つが、リン酸化された eIF2 が一つでも結合すると、その反対側の eIF2B の非リン酸化 eIF2 との相互作用領域まで覆ってしまい、結合が妨げられることが明らかとなった。このように、eIF2 のリン酸化は、リン酸化された eIF2 自体の活性化を防ぐだけでなく、他の eIF2 の活性化をも防ぐ機構が備わっていることが明らかとなった (Kashiwagi *et al.*, *Science* 2019)。さらに、シチリア型シチリウバエ熱ウイルス (SFSV) の NSs タンパク質が宿主細胞内の統合的ストレス応答 (ISR) を抑制する機構を解明した。ISR は、リン酸化された翻訳開始因子 eIF2 が他の翻訳開始因子 eIF2B に結合してその活性を阻害することで引き起こされる。SFSV の NSs タンパク質は、リン酸化 eIF2 が eIF2B に結合する部位をふさぐように eIF2B に結合することで、ISR を防いでいることをクライオ電子顕微鏡単粒子解析により明らかにした。また、NSs タンパク質はウイルス感染に限らず ISR 一般を抑制し、ISR を引

き起こすストレスにさらされた神経細胞の変性を緩和する効果があることを示した (Kashiwagi, Shichino, Osaki *et al. Nat Commun*, 2021)。

また、紅色細菌由来の新規の光反応中心・集光アンテナタンパク質複合体(RC-LH1)の構造解析に成功した。構造解析領域(吉川課題)の支援により 300kV 電頭の Titan Krios にて測定を行い、その 2.8 Å のクライオ電顕構造から PufX と呼ばれるサブユニットが集光アンテナタンパク質のリング構造を開けるように配置していることが明らかとなった (Bracun, Yamagata, *et al. Science Adv.* 2021)。さらには、二量体、単量体の RC-LH1 に加えて、欠損変異株からの RC-LH1 をそれぞれクライオ電顕を用いて単粒子解析を行なった結果、PufX が二量体間の相互作用を直接担っていること、PufY と呼ばれる新規サブユニットが LH1 リングと RC 複合体間の安定化に寄与していることを明らかとし、RC-LH1 の複合体形成機構を提案した (Cao, Bracun, Yamagata, *et al. Nat. commun.* 2022)。また、がん細胞の浸潤に關与するグアニンヌクレオチド因子 DOCK5 複合体についても、構造解析領域の Titan Krios を用いて、3.8 Å のクライオ電子顕微鏡構造を決定し、DOCK5 とその結合タンパク質である ELMO1 が基質 G タンパク質 Rac1 との遷移状態複合体を安定化していることを明らかにした (Kukimoto-Niino *et al. Science Adv.* 2021)。DOCK5 の大部分を占める ARM リpeat領域の構造は全く不明であったため、クライオ電顕マップを構造単位に分割し、当課題で開発した計算手法を用いてモデルを構築・評価したものをフィッティングさせ、DOCK タンパク質の全長での構造決定に初めて成功した。

また、計算手法開発では、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析での構造モデルがない領域のモデル構築において、クライオ電顕マップからのモデル構築を容易にするための手法を開発した。まず、フラグメントアセンブリに基づく *de novo* 構造モデル生成法の開発から開始した。Evolutionary coupling 指向のコンタクトマップに基づく *de novo* モデリングアプローチを用いて、もっともらしい複数の候補モデルを生成した。次に、これらのモデルをクラスタリングし、局所的な品質評価を行い、コンセンサスに基づいて高品質な候補を選択した。信頼性高くモデル化された領域はフラグメントライブラリーに使用し、モデルを改良するために、アセンブルしてクライオ電顕マップに適合させた。また、セグメント化、予測、マッチングを含む 3 段階の実験的なクライオ電顕マップに適合する初期構造を構築するプロセスを開発した。深層学習ニューロネットワークを用いて、クライオ電顕マップを小さな領域にセグメント化し、セグメント化されたマップに収まるフラグメントの構造を予測する。予測されたこれらのフラグメントの 3D モデルを剛体として密度にあてはめ、さらに精密化することで、クライオ電顕マップに対応する初期モデルを提供した。

Support; we provided our sample production technologies; systematic protein production using the cell-based and cell-free systems, production of the proteins containing synthetic or modified amino acids, and high-throughput protein purification and crystallization. For example, two types of microbial rhodopsins, which are light energy-harvesting devices different from the photosynthetic system, from cyanobacteria were prepared by the *E. coli* cell-free synthesis system and crystallized. In collaboration with the Structural Analysis Area, we determined their crystal structures at 1.90 Å and 2.65 Å resolution, respectively, at SPring-8 BL-32XU using zoo system (Hasegawa *et al.*, *Sci. Rep.* 2020). We also prepared protein complexes and membrane proteins for cryo-electron microscopy (cryo-EM) study, with several kinds of the characterization/analysis. In total, we have supported 44 projects.

Collaboration; In collaboration with Kurumizaka's group, we determined by cryo-EM single-particle analysis a series of structures of the nucleosome-transcribing RNA polymerase II (RNAP II) and elucidated the mechanism by which RNAP II progresses through a nucleosome while removing DNA from the histone surfaces (Kujirai *et al.*, *Science* 2018). We also analyzed the cryo-EM structures of

the nucleosome-transcribing RNAPII complexed with conserved elongation factors Elf1 and Spt4/5, and revealed the mechanism by which these factors facilitate the RNAP II progression through the nucleosome by lowering the nucleosomal barriers (Ehara *et al.*, ***Science*** 2019). Furthermore, by including more factors, we obtained structural snapshots of the nucleosome passage by the RNAP II elongation complex, with deep insights into the mechanism of chromatin transcription.

Advancement: as for the advancement of supramolecular complex preparation technology, we succeeded in efficiently preparing a complex of HCV IRES and translating ribosome by using a human *in vitro* translation system, and in determining cryo-EM structure at near atomic resolution (Yokoyama, ***Molecular Cell*** 2019).

As for electron microscopy techniques, we evaluated the properties of samples by negative staining, and compiled a database of acquired images of negative-stained samples and the results of image processing, as well as the grid preparation conditions for cryo-electron microscopy and the judgement of quality of acquired cryo-EM images. When we carried out the “support” task on a wide variety of samples, we have often observed complexes that were monodisperse and showed appropriate size in negative staining electron microscopy but dissociated or denatured in cryo-EM. We considered that this was caused by protein denaturation at the air-water interface and conducted a systematic specimen screening combining the addition of various detergents and the use of grids with a self-made thin support carbon film for cryo-vitrification. For the eIF2-eIF2B complex (Kashiwagi *et al.*, ***Science*** 2019) and the ELMO/DOCK/Rac complex (Kukimoto-Niino *et al.* ***Science Adv.*** 2021), the addition of detergents and the use of carbon films-supported grids led to cryo-EM structural determination at near atomic resolution.

As for the development of computational methods, in order to facilitate the construction of models from cryo-EM maps, we have developed a three-stage process that includes segmentation, prediction and matching to build an initial structure that fits into the experimental cryo-EM map. We use deep learning neural network to segment a cryo-EM map into small regions and then to predict the structure of the fragment that would fit in the segmented map. The predicted 3D models of these fragments are fit as rigid bodies into the density and further refined to provide an initial model of the underlying structure corresponding to the cryo-EM map. We have also developed a fragment assembly based method for the generation of de novo structural models to facilitate the interpretation of cryo-EM maps. An evolutionary coupling directed contact map based de novo modeling approach was first used to generate multiple plausible candidate models. These models were then clustered and local quality assessments were conducted to select high quality candidates based on consensus. The reliably modeled regions were used to compile a fragment library. These fragments were assembled together to create improved models, which were subsequently fitted into the cryo-EM maps.