構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
吉川　雅英（東京大学大学院医学系研究科・教授）

クライオ電子顕微鏡を活用したタンパク質等の構造解析による支援と高度化

補助事業分担者（所属・職名）
Radostin Danev（東京大学大学院医学系研究科・教授）、伊藤弓弦（東京大学大学院理学系研究科・准教授）、滝沢由政（東京大学定量生命科学研究所・准教授）

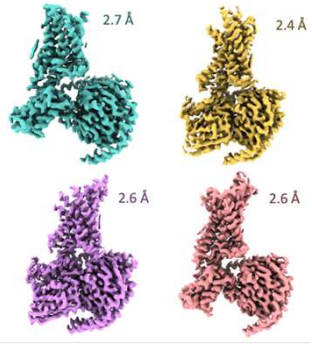
高度化における研究背景・目的

近年、クライオ電顕では高分解能化が進む一方、**高価な300 kV装置への依存**、**preferred orientation**、**細胞内試料の厚み制約**などが大きな課題となっている。
本プロジェクトでは、より多くの研究者が先端解析を利用できるよう、**200 kV装置による高分解能化**、**トモグラフィーの高効率化・高解像度化**、**Cryo-FIB-SEM/Volume EM/CLEMの実装**を目指した。
さらに、中分解能構造と計算予測を統合することで、細胞内で未知タンパク質を同定できる基盤の確立を目的とした。

高度化の成果

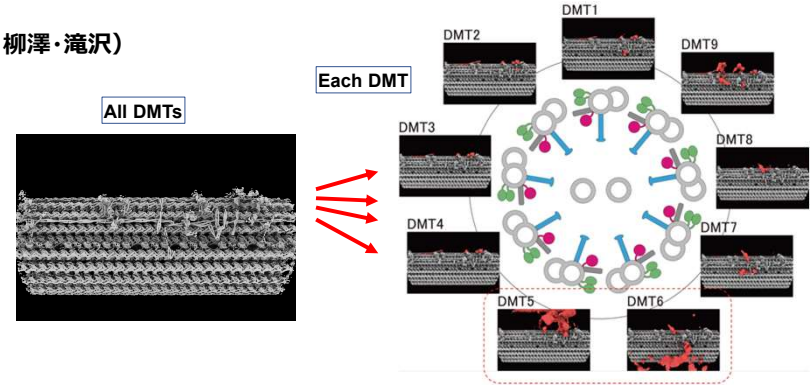
① 研究開発項目１：単粒子解析の高効率・高解像度化 (担当：ダネフ)
200 kV（キロボルト）のクライオ電子顕微鏡を用いて、これまで高価な300 kV装置でしか到達できなかった「原子分解能」での構造解析に成功した。これまで、クライオ電子顕微鏡による原子分解能（一般に1.2 Å以下とされる）の達成には、大がかりで非常に高価な300 kVの装置が必要だった。
一方、200 kVの装置は比較的安価で普及しているが、高分解能解析においては300 kV装置に劣ると考えられてた。そこで、本研究では、AMED/BINDSで導入されたCRYO ARM 200 IIをアップグレードし、その性能を評価し、コスト効率の高い構造解析プラットフォームとしての可能性を検証した。テスト試料としてアポフェリチンを用い、以下の優れた解像度を達成した。（右図参照）





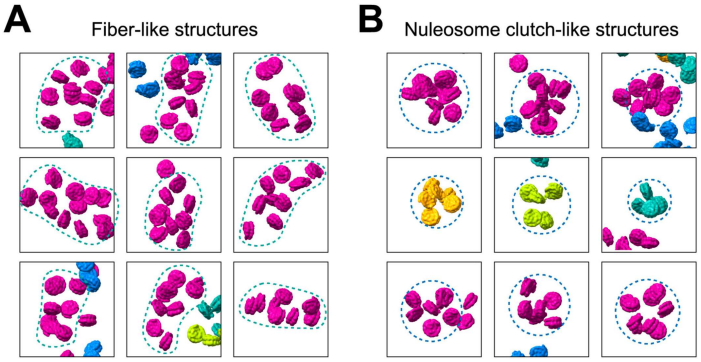
②研究開発項目２：トモグラフィー技術の高度化（担当：吉川・山口・柳澤・滝沢）

繊毛・鞭毛タンパク質のCyroETによる構造解析とビジュアルプロテオミクスによるたんぱく質同定（吉川・山口）
ゼブラフィッシュの精子鞭毛は、9＋2と呼ばれる微小管とダイニン等、600種類にものぼる多数のタンパク質で構成されている。しかし、9つのダブレット微小管の非対称を決定するタンパク質は同定されていなかった。そこで、我々は、cryo-ETによる大規模なデータ収集を行い、6～7オングストロームでそれぞれのダブレット微小管の構造を決定することに成功した（右図、論文準備中）。現在、この構造に対して、インシリコ解析ユニットの富井グループと共同で構造予測した鞭毛タンパク質を当てはめるスクリーニングを行っており、既に5～6の新たな非対称性を決めるタンパク質を同定している。（右図参照）



③研究開発項目3：核内タンパク質複合体を標的とするFIB-SEMおよびクライオ電子線トモグラフィーによる構造解析（担当：滝沢・吉川）

トモグラフィーのためには試料の厚さは100～300 nm程度の厚さにする事が必要である。これまで、主に生化学的手法を用いて細胞内の構造（例えば、繊毛、鞭毛など）を取り出して観察してきたが、生化学的な方法で保つことができない構造、例えばオートファジー、ゴルジ体などが多数あった。この問題を解決するために、Cryo-FIB-SEMによる試料作成、クライオ電顕によるトモグラフィー観察というワークフローを確立した。（右図参照）



今後の発展

単粒子解析の自動化・リモート化
解析手法の開発（構造多型）

トモグラフィー
分子 → 細胞 → 組織
AI-based structural predictionとのマッチング・タンパク質同定
Cryo-Lift-out

Volume EMによる細胞・組織レベルの電顕構造
人材育成（アカデミア、製薬企業）

数多くの施設の維持・管理