構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
難波　啓一（大阪大学生命機能研究科科・特任教授）

クライオ電子顕微鏡による生体高分子構造解析の支援と高分解能化・高速化・自動化を目指した高度化

補助事業分担者（所属・職名）
浅原　時泰（大阪大学大学院薬学研究科・准教授）、奥野　恭史（京都大学大悪因医学研究科・教授）
補助事業協力者（所属・職名）
本木　創（日本電子株式会社、EM事業ユニット）

概要

➢ 目的及び内容
クライオ電子顕微鏡法のポテンシャルはまだ十分に活用し尽くされてはおらず高度化の余地が多く残されている。クライオ電子顕微鏡による構造解析法の高速化、高分解能化、自動化などの高度化を進めつつ広く国内外のアカデミアや企業の研究グループに対して研究支援を行い、生命科学と創薬科学の発展に貢献する。

➢ 支援
クライオ電子顕微鏡による生体分子の立体構造解析支援では、これまでに登録303件、未登録を含めて合計312件で、毎年予定を大幅に超えた件数の支援を実施した。支援完了件数は194件で現在も110件の支援を継続中である（支援担当：宮田、木下、笠井、牧野、谷野、串間、下川）。機能化グリッド(EG-grid)については、構造解析支援での利用60件、国内外研究機関への無償提供87件（320枚）と数多くの支援課題の成果に貢献した（遠原、谷野、下川）。
単粒子像解析による高分解能構造解析支援が大半を占めるが、トモグラフィーによる凍結細胞内構造の可視化支援も数件実施。クライオFIB-SEMにより作成した厚さ100 nm程度の凍結細胞切片のトモグラフィー観察ワークフローもほぼ確立し支援に活用（宮田、木下、串間）。

➢ 高度化
高分解能と高速データ収集の両立では通常倍率撮影で従来比2倍（毎時1,000枚）に高速化（牧野）。DE社APPOLOカメラとの組合せでは高倍率撮影で従来比1.5倍（毎時1,800枚）まで高速化を確認（牧野）。クライオFIB-SEMによる試料切片作成と高速トモグラフィーワークフローを確立し東北大に技術共有（宮田、木下）。クライオFIB-SEMによるクライオ試料切片の高速トモグラフィー・サブトモグラム平均ではサルモネラ細胞内リボソームの8.2 Å分解能*in situ*構造を論文投稿（牧野、東大吉川G、Danev Gと連携）。プレッセション電子線照明による極微結晶構造イメージングではペロブスカイト薄膜微結晶の原子配列可視化成果を論文投稿（牧野、OIST新竹Gと連携）。EG-gridでは官能基化グリッド6種、シランカップリング剤修飾グリッド6種の高機能化グラフェングリッドを開発し既存EG-gridと同程度のタンパク質粒子数密度を確認（遠原、谷野）。クライオ電顕単粒子像から最尤原子構造モデルの効率的推定のための多段階アルゴリズム構築では、別途開発した「生成AI構造Sampling法」をCryoMDM法（旧テンプレートマッチング法）で得た推定構造群に適用することで離散構造間の中間構造を生成し連続的構造変化の定量化を実現。（奥野、徳久、松本）。

BINDS-IIでの支援件数

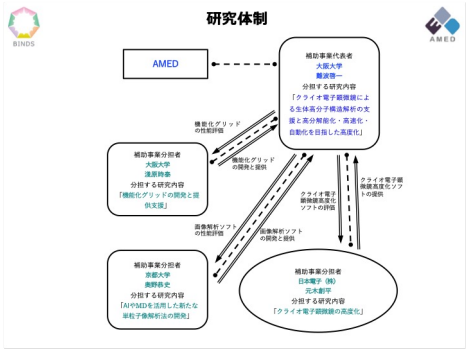
◆ 2022-23年度の構造解析支援（計277件）（難波、宮田、木下、藤田、谷野、串間、山内）
登録支援（成果公開）：152件
企業利用（成果占有）：125件（＊企業7社）
● EG-grid無償供給支援：37件（うち高機能化grid：2件）（支援登録なし）【遠原】

◆ 2024年度の構造解析支援（計86件）（難波、宮田、木下、笠井、谷野、串間、山内）
新規登録（成果公開）：42件
継続支援（成果公開）：44件
企業利用（成果占有）：20件（＊企業6社）
● EG-gridの利用による支援
EG-grid利用構造解析支援：40件（各2-4枚）
無償供給支援：9件（160枚）（支援登録なし）【遠原、谷野、下川】

◆ 2025年度の構造解析支援（計92件）（難波、宮田、木下、笠井、谷野、串間、下川）
新規登録（成果公開）：44件
継続支援（成果公開）：48件
企業利用（成果占有）：19件（＊企業3社）
● EG-gridの利用による支援
EG-grid利用構造解析支援：9件（各4枚程度）
無償供給支援：32件（150枚）（支援登録なし）【遠原、谷野、下川】

◆ 2026年度の構造解析支援（計175件）（難波、宮田、木下、笠井、谷野、下川）
新規登録（成果公開）：65件
継続支援（成果公開）：110件
企業利用（成果占有）：6件（＊企業3社）
● EG-gridの利用による支援
EG-grid利用構造解析支援：11件（各4枚程度）
無償供給支援：32件（150枚）（支援登録なし）【遠原、谷野、下川】

研究体制

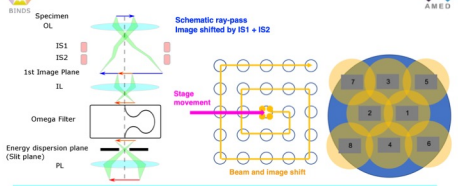


連携

難波Gは、阪大蛋白研の栗栖Gとマイクロ ED微結晶構造解析で、阪大院薬学の辻川Gと Fast Track Project2課題の構造解析で(うち1課題では筑波大の岩崎Gと試料作成で)、東大院医学の吉川Gおよび Danev Gとトモグラムデータ収集高速化による*in situ*構造解析でそれぞれユニット間連携し、OISTの新竹Gとプレッセション電子線照明による極微結晶構造イメージング法の開発で事業間連携した。奥野Gは阪大蛋白研の加藤Gと実験-シミュレーション-AIが融合する手法の開発を目的にユニット間連携した。

単粒子解析の高度化・支援

Multi-hole multi-shot imaging by beam tilt and image shift



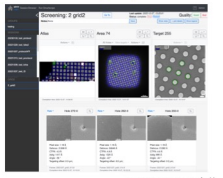
1,000 images/day (2017) -> 7,000 images/day (2019) -> 22,000 images/day (2020)
Makino, Fukumura, Kato, Motoki (2020)

SmartScope

SmartScopeとはSerialEMをベースに動くwebブラウザインターフェースを備えた完全自動化ソフトウェア
Jonathan Bouvette et al (2022) Automated systematic evaluation of cryo-EM specimens with SmartScope. eLife 11:e80047
https://doi.org/10.7554/eLife.80047

・github + dockerで配布
・見やすいGUI
・AIによるスクエア、ホール検出
・multi-grid対応
・tilt 撮影対応
・拡張性あり

TFS製の装置では運用実績あり
JEOLでは2024後半に入って
Generate:Biomedicines やVIBでsmartscopeの運用実績が報告され、EUのCRYOARMオーナーズミーティングではゲスト招待発表したJonathanいわく「TFSと90%は同じ」
しかし、バグがあり阪大では最近ようやく動くようになった

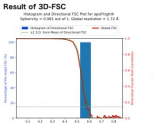


SmartScopeのHPより

High throughput & high-resolution challenge 2nd @2025

Microscope: CRYO ARM 300 II
Accelerating voltage: 300 [kV]
Cs: 2.7 mm
Spot & Angle: 2,1 (Koehler)
Detector: DE Apollo *
Magnification: 150 k
Pixel size: 0.572 [Å/pix]
Electron dose: ~30 [e-/Å^2]
# of frames: 29
Exposure time: 0.47 [sec]
Defocus range: 0.5-1.0 [μm]
Data collection: 7x7x7
Acquisition time per movie: 1.7 sec/movie

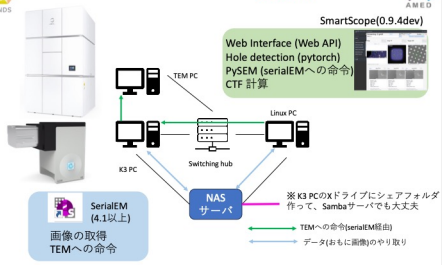




Number of images for apoferritin @ 1.72 Å:
Total data collection time: ~3.5 hours 6209 movies
Number of particle images for 3D reconstruction: 502,311
Data acquisition speed: 1,820 movies/hour
using SerialEM+Virtual TEM Controller
(JEOL France Dr. Bart 作成)
Data analysis by Relion4

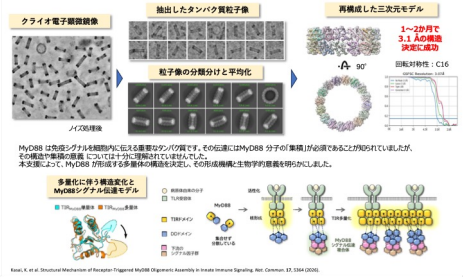
1,820枚×22時間 = 40,040枚／日
◆ 40,000 movies/dayは従来比1.5倍速
Gatan社K3カメラでの通常倍率撮影でも毎時1,000枚を達成
◆ 22,000 movies/dayは従来比2.0倍速

SmartScopeの構築環境@阪大（by牧野）



支援課題例
免疫制御タンパク質MyD88の多量化機構を解明

クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析



MyD88 は免疫シグナルを細胞内に伝える重要なタンパク質です。その伝達にはMyD88 分子の「集積」が必須であることが知られていましたが、その構造や集積の意義 については十分に理解されていませんでした。
本支援によって、MyD88 が形成する多量体の構造を決定し、その形成機構と生物学的意義を明らかにしました。



Kosai, K. et al. Structural Mechanism of Receptor-Triggered MyD88 Oligomeric Assembly in Innate Immune Signaling. Mol. Commun. 37, 5364 (2026).

BINDS支援によるクライオ電子顕微鏡構造解析の分解能分布

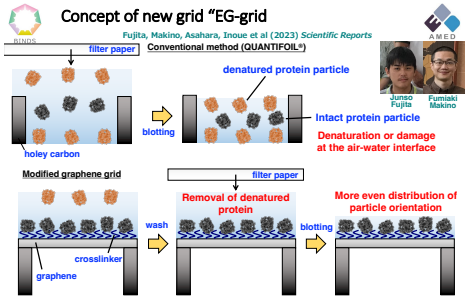
2026年8月

データ収集支援： 30-40%
構造解析支援 ： 60-70%
＊うち10%程度は試料精製条件探索も支援

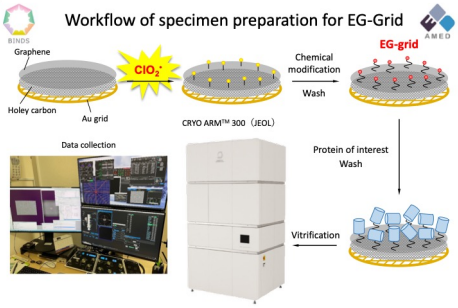
機能化グリッド開発と提供支援

Concept of new grid “EG-grid

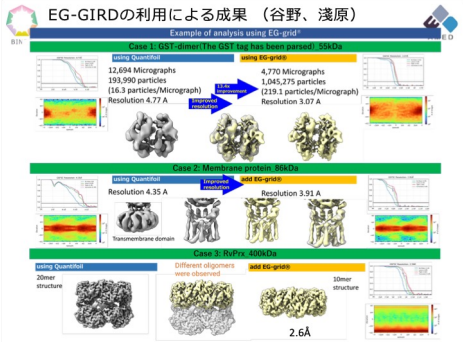
Fujita, Makino, Asahara, Inoue et al (2023) *Scientific Reports*



Workflow of specimen preparation for EG-Grid



EG-GIRDの利用による成果 （谷野、浅原）

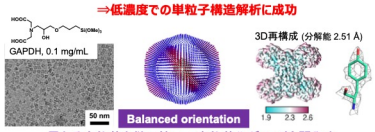


特異的タグ付きタンパク質のグリッド上吸着精製を可能にする高機能化EG-gridの開発

1）シランカップリング固定化法



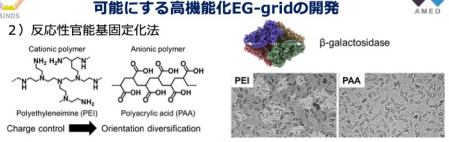
成果 1：多様な官能基を簡便かつ自在にGPグリッド上に導入可能に
官能基群の拡充
⇒低濃度での単粒子構造解析に成功

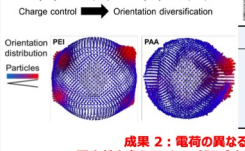


異なる官能基を併せ持つ二官能基化グリッドも開発中

特異的タグ付きタンパク質のグリッド上吸着精製を可能にする高機能化EG-gridの開発

2）反応性官能基固定化法



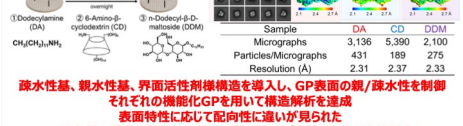


GP sample	PEI	PAA	PEI+PAA
Micrographs	1275	525	1800
Particles/ Micrographs	257	75	198
Resolution (Å)	2.50	3.08	2.40

成果 2：電荷の異なるポリマーの固定化
⇒配向性を変えることで、組み合わせによる分解能の向上を達成

特異的タグ付きタンパク質のグリッド上吸着精製を可能にする高機能化EG-gridの開発

高反応性官能基を基盤とした各種機能化ユニットの導入



Sample	DA	CD	DDM
Micrographs	3,136	5,390	2,100
Particles/Micrographs	431	189	275
Resolution (Å)	2.31	2.37	2.33

疎水性基、親水性基、界面活性剤様構造を導入し、GP表面の親/疎水性を制御
それぞれの機能化GPを用いて構造解析を達成
表面特性に応じて配向性に違いが見られた
⇒配向性の問題を改善できる可能性、膜タンパク質への適用を検討中