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）

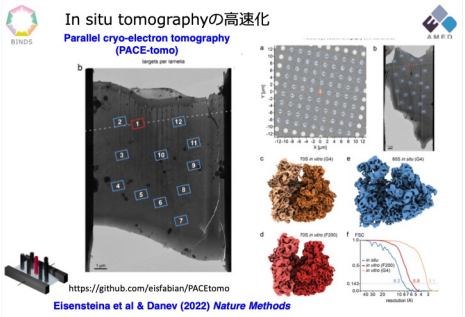
クライオ電子顕微鏡による生体高分子構造解析の支援と高分解能化・高速化・自動化を目指した高度化

実施研究者（所属・職名）
宮田　知子（大阪大学大学院生命機能研究科・准教授）、木下　実紀（大阪大学大学院生命機能研究科・特任助教）笠井　一希（大阪大学大学院生命機能研究科・特任研究員）、谷野　弘樹（大阪大学大学院薬学研究科・特任研究員）、下川　祐輝（大阪大学大学院生命機能研究科・特任研究員、大阪大学大学院薬学研究科・特任研究員）、松本　篤幸（京都大学大学院医学研究科・特定准教授）、徳久　淳師（理化学研究所計算科学研究センター・上級研究員）

Cryo-Tomographyの高度化・支援

In situ tomographyの高速化

Parallel cryo-electron tomography (PACE-tomo)



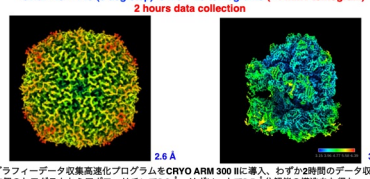
https://github.com/eisfabian/PACEtomo

Eisensteina et al & Danev (2022) *Nature Methods*

High speed tomography using image shift
Parallel cryo electron tomography (PACE-tomo)

Collaborated with Dr. Fabian and Dr. Yanagisawa at FBS 2023.08

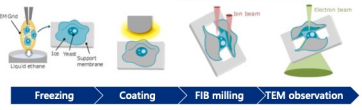
Specimen: apoferritin / Ribosome in vitreous ice
Microscope: CRYO ARM 300 II + K3
Data collection: PACEtomo
Grid: Quantifoil R1.2/1.3 (gold coated)
Grid: -48 ~ +48 (3 deg step) 5 x 5 = 25 tomograms (~4 min / tomogram)
2 hours data collection



トモグラフィーデータ収集高速化プログラムをCRYO ARM 300 IIに導入、わずか3時間のデータ収集で得た25個のトモグラムからアポフェリチンで2.6 Å、リボソームで3.5 Å分解能の構造を得た

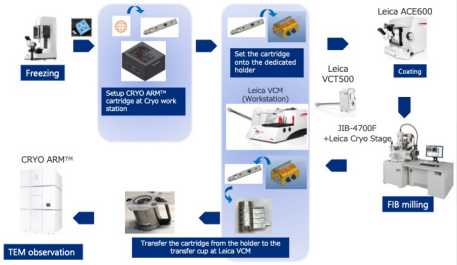
ワークフロー：Cryo FIB-SEMからCryo TEMへ



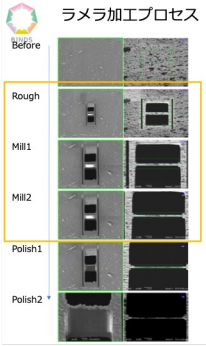


JEOL Cryo FIB-SEMからCryo ARMへのワークフロー

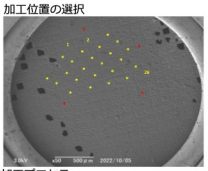
Cryo FIB/TEM workflow with CRYO ARM™



ラメラ加工プロセス



加工位置の選択

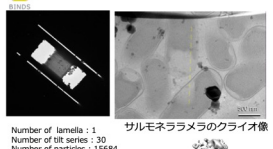


加工プロセス

	Thickness (μm)	Width (μm)	Beam (pA)	Time (min)
Rough	1.5	15	1,000	9
Mill-1	0.8	14	300	4
Mill-2	0.4	13	100	2
Polish-1	0.2	12.5	30	4
Polish-2	0.15	11.5	30	2

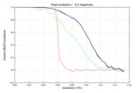
- ラフからミルまでは夜間の自動加工が可能
- ポリッシュのみマニュアル操作
- 二日で～20ラメラ作成可能

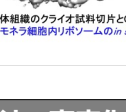
サルモネラ菌細胞内のリボソーム



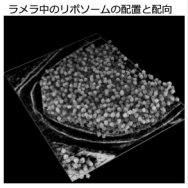
サルモネララメラのクライオ像

Number of lamella : 1
Number of tilt series : 30
Number of particles : 15684
Resolution : 8.2 Å





ラメラ中のリボソームの配置と配向



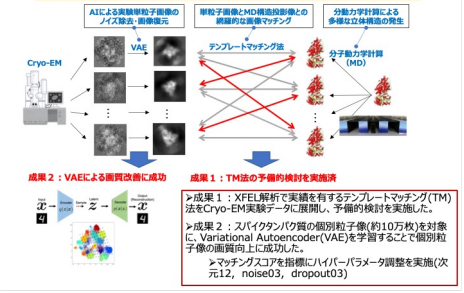
Data analysis was done and supported by Dr. Haruaki Yanagisawa (Tokyo Univ.)

クライオFIB-SEM による細胞・生体組織のクライオ試料切片とCRYO ARM 300 IIによるトモグラフィー解析のワークフローの確立し、サルモネラ細胞内リボソームの*in situ*構造で8.2 Å 分解能を達成

AIやMDを活用した新たな単粒子解析の開発

AIと分子シミュレーション技術を組合せた単粒子画像解析手法の開発

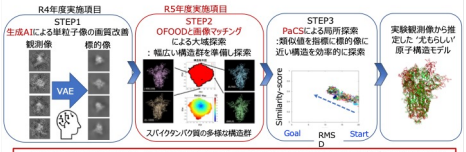
課題：通常の単粒子像解析法は、構造多様性の多くは3次元再構成の際に平均化されて、情報が失われる
本手法： AIと分子動力学計算を組合せることで個々の単粒子画像に対応する多様な立体構造を網羅的に推定



➢成果１：XFEL解析で実績を有するテンプレートマッチング(TM)法をCryo-EM実験データに展開し、予備的検討を実施した。

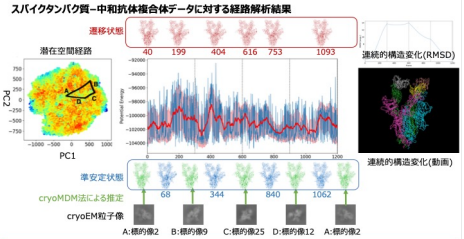
➢成果２：スパイクタンパク質の個別粒子像(約10万枚)を対象に、Variational Autoencoder(VAE)を学習することで個別粒子像の画質向上に成功した。

➢マッチングスコアを指標にハイパーパラメータ調整を実施(次元12，noise03，dropout03)



➢ 1枚の単粒子像から"尤もらしい"原子構造モデルを効率的に推定するための多段階アルゴリズムの開発を進めた。STEP2の分子動力学シミュレーションにより多様な構造群を準備する手法を開発した(R5年実施項目)。
成果1：多様な構造生成手法(OFLOOD)を「富岳」上に構築した。
成果2：スパイクタンパク質を対象にタンパク質らしさを保ちつつ多様な50万構造の生成に成功した。

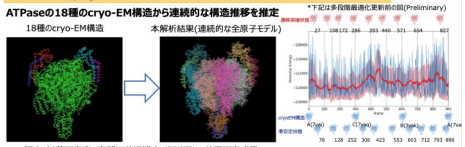
スパイクタンパク質−中和抗体複合体データに対する経路解析結果



➢ 別途開発した「生成AI構造 Sampling 法」を cryoMDM 法で得られた推定構造群に適用することで、離散的に得られた複数の構造状態を補間し、その中間構造を生成することで、構造変化の連続的な遷移を可視化することが可能となった。
➢ 本手法を前年度解析したスパイクタンパク質中和抗体複合体データに適用し、各構造状態のエネルギーが特徴を評価した。

課題：通常の単粒子像解析法では構造多様性の多くは3次元再構成の際に平均化され情報が失われる
cryoMDM法： AIと分子動力学計算を組合せることで個々の単粒子画像から構造多形を網羅的に推定
生成AI構造Sampling法：離散構造の間を繋ぐ連続的な構造モデルを生成

ATPaseの18種のcryo-EM構造から連続的な構造推移を推定



＊阪大・加藤研究室、京都工芸繊維大・岸川研との共同研究成果

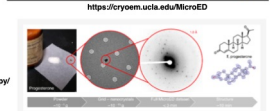
（8）cryo-EM粒子像から多様な構造状態を評価することに加え、構造状態間の連続的な構造変化を捉える技術開発
- 生成AI構造Sampling法の適用先として、前年度実施のスパイクタンパク質に加えATPaseへ展開した。
- 分子回転モータ特有の動態を捉えるため、CG-MD構造群を用いて学習を行い動態を記述する潜在空間を獲得した。
- 18種のcryo-EM離散構造を起点とし、中間状態を含む構造変化を連続的かつ全原子モデルとして 捉えることに成功した。
- 回転経路1周のポテンシャルエネルギー地形図（暫定版）を描出することで、中間状態に関する詳細な議論が可能となることが明確化される。
- ポテンシャルエネルギー地形図の精査を実施中

MicroED とプレセッション照明によるイメージング法の高度化と連携

MicroED (Micro Electron Diffraction)

Protonic NanoMachine

電子線結晶解析法
Electron crystallography
- 数100 nm以下の小さくて薄い３次元結晶の電子線回折により
- 低分子の粉末結晶では0.5 Å近くの高分解能立体構造解析が可能



https://cryoem.ucla.edu/MicroED



https://www.thermofisher.com/blog/microscopy/a-new-era-for-determining-small-molecule-structure-determination/

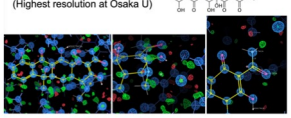
The process of applying MicroED to small molecule structural analysis via ChemRxiv

MicroED by Inter-unit Collaboration with Prof. Kurisu at IPR

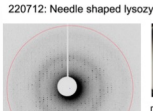
For both small molecules and proteins

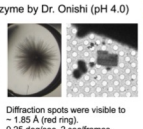


Tetracycline at 0.55 Å
(Highest resolution at Osaka U)



220712: Needle shaped lysozyme by Dr. Onishi (pH 4.0)





Diffraction spots were visible to ~ 1.85 Å (red ring).
0.25 deg/sec, 2 sec/frames
~ 0.17 e/Å²/deg, D = 2465 mm
30 deg/crystal (various start angles)

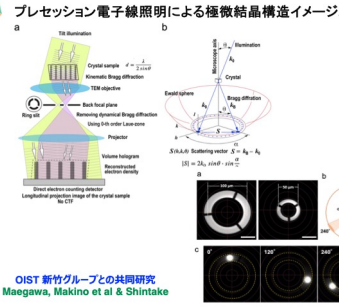
CRYO ARM 300 II+ TVIPS TemCam-XF416 automated data collection by SerialEM



Nakane, Makino et al (2022)

CRYO ARM 300 IIを活用したマイクロEDによる高速自動データ収集法とデータ解析法を確立し、低分子化合物やタンパク質の極微小結晶の構造解析ワークフローを確立した。

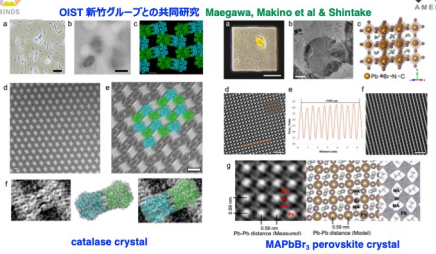
プレセッション電子線照明による極微結晶構造イメージング法



OIST 新竹グループとの共同研究
Maegawa, Makino et al & Shintake

プレセッション電子線照明による極微結晶構造イメージング例

OIST 新竹グループとの共同研究　Maegawa, Makino et al & Shintake



OISTの新竹教授らとの共同研究では、プレセッション電子線照明による極微結晶構造イメージング法を開発しペロブスカイト薄膜結晶の原子配列を可視化した

Acknowledgements for Funding

Molecular Dynamic Assembly Project, ERATO, JRDC (1986-1992)
Protonic NanoMachine Project, ERATO, JST (1997-2002)
Dynamic NanoMachine Project, ICORP, JST (2002-2007)
最化制御共創コンソーシアム, OPERA (2019-2024)

Panasonic パナソニック先端技術研究所（松下電器産業(株)国際研究所）（1992-1997）

科研費 KAKENHI
特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」（2004-2009）
基盤S「極低温電子顕微鏡による細胞べん毛モーターとタンパク質輸送装置の像構造解析」（2009-2013）
特別推進「クライオ電子顕微鏡による生体分子モーターの構造と機能の解明」（2013-2019）

国立研究開発法人日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development
創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム「クライオ電子顕微鏡法による生体分子構造解析の高分解能化と効率化」（2017-2021）
「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」（2022-2026）

医療研究開発革新基盤創成事業（CiCLE）「タンパク質構造解析のハイスループット化へ向けた装置開発」（2017-2021）代表機関：日本電子株式会社

JEOL 日本電子YOKOGUSHI協働研究所 (2018-2026)

演題代表者：難波啓一
演題発表に関連し、発表者に開示すべきCOI関係にある企業はありません