

# 2023年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」 調査研究報告書(公開版)

【研究題目】細胞表面での分子動態解析のための多角的構造解析プラットフォームの構築

【整理番号】TK23-021

【代表機関】東北大学

【調査研究代表者(氏名)】田中 良和

【TIA 内連携機関：連携機関代表者】

東京大学：佐々木裕次

産業技術総合研究所：三尾和弘

筑波大学：原田隆平

高エネルギー加速器研究機構：守屋俊夫

【TIA 外連携機関】

東京農工大学

ミュンスター大学

【報告書作成者】 田中良和

【報告書作成年月日】2024年4月20日

【連携推進(具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等)】

細胞の動態変化の多くは、細胞表面に存在する受容体タンパク質に分子が結合することにより開始する。そのため、細胞動態の詳細な理解には、細胞表面で起きるタンパク質の動的な構造解析が鍵となる。本研究では、細胞表面で起こるイベントの例として、二重特異性抗体によるがん細胞と免疫細胞の架橋反応に着目し、この現象を多角的な手法により解明することを通して、細胞上の分子動態を原子レベルで記述する方法の確立をめざす。具体的には、低活性型と高活性型の2種類のがん二重特異性抗体に焦点を当て、がん細胞受容体(EGFR)、がん二重特異性抗体、免疫細胞受容体(CD3)の3者間の相互作用を、クライオ電顕を基軸に多角的な視点で明らかにすることをめざした。

【調査研究内容(実験等中心に背景・課題と実行された課題解決の内容と結果)】

本研究では、まず、細胞表面受容体の動態とそれにより引き起こされる細胞動態を解明するための要素技術の構築に取り組んだ。具体的には、クライオ電顕データを用いたタンパク質のダイナミクス解析のための画像処理ワークフローの確立を目指した。そのために、千葉大学・村田研究室からご提供いただいたV型ATPase全体構造のデータセットを用いて、フレキシビリティを考慮した構造解析アルゴリズムであるcryoDRGN、RELION DynaMight、cryoSPARC 3D Variability Analysis (3DVA)を検証した。これら三つのアルゴリズムでは、ほぼ同様のダイナミクス解析結果を得ることが

できた。特に、フォーカス処理を前もって行うことで、分子モーターとして回転するリング状の構造である Vo 部分と ATP 加水分解によって回転エネルギーを生成する V1 部分、それぞれのダイナミクス構造を原子座標モデル構築可能な近原子分解能で得ることができた。しかし、どのアルゴリズムを用いても Vo 部分と V1 部分の両方を同時に近原子分解能で決定することができないことがわかった。また、深層学習ベースのアルゴリズムである cryoDRGN と

RELION DynaMight は、処理手順が複雑、処理時間が長い、フォーカス処理ができない、等の問題があることがわかった。そこで、これらの問題がない cryoSPARC 3DVA を採用し、ワークフローに組み込むことを決めた。現在、それぞれの部分構造のダイナミクス解析の結果を関連づける方法を複数考案し、これらのアイディアの検証を進めている（図 1）。

つぎに、本研究の中心命題である、二重特異性抗体についての実験データを得るために、EGFR-二重特異性抗体-CD3 複合体の調製の系を構築した。3 者複合体を混合してゲル濾過して得た 3 者複合体をネガティブ染色法により粒子の性状を評価したところ、いずれも凝集のない均質な粒子が確認できた。そこで、クライオ電顕単粒子解析を実施したところ、EGFR-二重特異性抗体複合体の構造は得られるものの、CD3 の部分の構造は得られなかった。そこで、3 者の混合比率や条件を調整したところ、3 者複合体の像を得ることができた。得られた電顕画像を用いて 3 次元構造を構築したところ、EGFR-二重特異性抗体-CD3 の複合体の構造を得ることができた（図 2）。局所分解能に大きなばらつきがでたことから、分解能の高かった EGFR-抗体の部分は 1 残基ごとにモデル構築し、一方、分解能の低い抗体-CD3 の領域は、既知の X 線結晶構造を rigid body フィッティングすることで構造を構築した。いずれの複合体も、湾曲した構造を形成していた。低活性型と高活性型の 2 種類の構造を比較したところ、湾曲する方向が大きく異なることがわかった。それによって、EGFR と CD3 の相対位置に大きな違いが確認された。次に、各ドメインの運動性についての知見を得るために、上記の V 型 ATPase を用いた検証において最も良好な成績を与えた cryoSPARC 3DVA を用いて、ドメインの運動性についての知見を得た。その結果、二重特異性抗体内で、抗体同士を連結するヒンジ領域を中心に、EGFR-抗体と、抗体-CD3 が 30 度程度の動きをすることがわかった。得られた知見と、膜貫通領域を含む EGFR や CD3 の構造と比較することで、高活性型の二重特異性抗体は細胞同士を立体障害なく接触させることができるのに対し、低活性型の二重特異性抗体は CD3 と結合すると二重特異性抗体自体が免疫細胞の脂質二重膜と立体障害を起こし、これにより、細胞同士を効率よく連結させることができないということがわかった。さらにドメイン同士の運動性も加わり、細胞障害活性に違いが生じているものと考えられる。

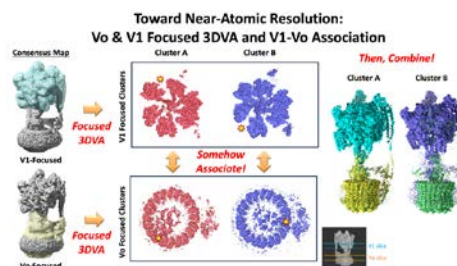


図 1. V 型 ATPase 全体構造のダイナミクス解析の結果と手法の概要

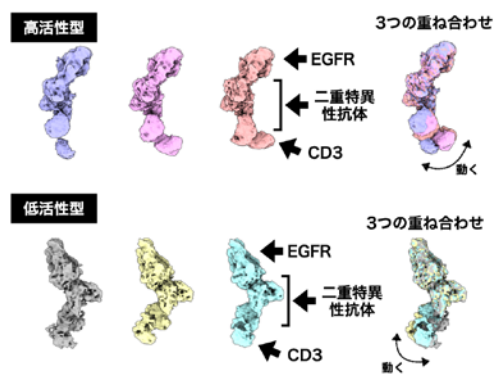


図 2. 高活性型（上）と低活性型（下）の二重特異性抗体の抗原複合体の構造比較

立体構造から得られたこれらの知見は過去に得られている生化学的知見や細胞生物学的知見とも一致しており、本研究にてクライオ電顕を基軸に多角的手法にて二重特異性抗体の分子特性が適切に細胞上でのイベントを記述できていると言える。

さらに、X線1分子追跡(DXT)法による細胞上でのダイナミクス解析に関する技術の高度化を行なった。SARS-CoV-2 Sタンパク質とヒトACE2受容体を用いて、結合ダイナミクスとサブタイプによる運動性の違いを解析した。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質、アルファ: B.1.1.7、デルタ: B.1.617、オミクロン: B.1.1.529 をターゲットとし、ACE2受容体との相互作用機構を中心に解析を行った。ACE2受容体結合の有無にかかわらず最大の3次元分子内運動は、オミクロンバリエーションで観察された(=40 mrad<sup>2</sup>/ms)。一方最小の動き(=20 mrad<sup>2</sup>/ms)は、アルファバリエーションで観察された(Sasaki et al., Biochem Biophys Rep, in press)。

またDXT技術を用いて脳型ニ

コチン性アセチルコリン受容体である $\alpha 7$ 受容体(nAChR  $\alpha 7$ )の分子動態を解析した。リガンドなし、アセチルコリン、イベルメクチン、およびそれら両方を用いて、nAChR  $\alpha 7$ の振れと傾斜運動を回折X線追跡法で解析した。その結果、アセチルコリン存在下ではnAChR  $\alpha 7$ が時計回りに捻れ、チャンネルが一時的に開き、アセチルコリン存在下では脱感作状態に移行し、イベルメクチンの存在下ではチャンネルが開かず反時計回りに捻れることが示された(図3)。アセチルコリンに結合したnAChR  $\alpha 7$ の構造的遷移が、5つの $\alpha 7$ サブユニットの集合的な捻れによると考え、1つまたは複数のサブユニットの構造変化と移動をもたらし、その結果、傾斜運動が表れる可能性があると考えられた。中枢神経系および免疫細胞に局在し、アルツハイマー病や統合失調症の標的治療研究に有望であると考えられた(Yang, Eur Biophys J. 2024)。これらの知見は、本研究の中心命題である二重特異性抗体による細胞同士の架橋現象の解析にも応用可能な基盤技術であり、今後、DXTとクライオ電顕による知見を統合しながら、さらに詳細に解析を進める予定である。

#### 【今後の活動予定】

今年度の研究では、クライオ電顕のデータからの動的挙動の解析と、DXTによる細胞上での分子動態の解析に関する知見を得ることができた。今後は、これらの基盤技術に、クライオ電子線トモグラフィーなどの細胞のin situ解析の手法を通して、細胞上での実際の構造を明らかにしたい。今年度、ミュンスター大学との連携により、FIB-SEMを用いて細胞を切断する手法についての連携基盤を構築することができた。今年度に構築した国内外の連携基盤を利用し、上記の研究を推進していきたい。

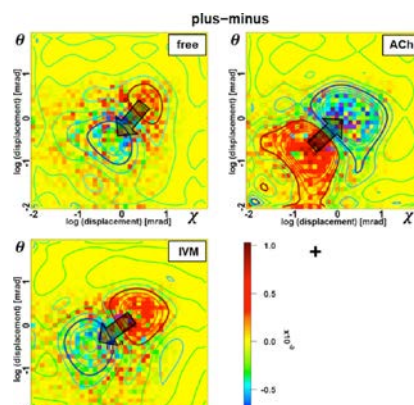


図3. nAChR  $\alpha 7$ 分子動態の差分2D運動マップ

アセチルコリン、イベルメクチン添加時の $\chi$ 軸回転運動の比較マップ。赤色の領域は正、青色の領域は負の $\chi$ 運動領域を示す。

【SDGs17 目標について、調査研究成果について、貢献ができると思われる項目があれば、最大3つまで☑をご記載下さい。】

研究成果に関連する SDGs 目標がある。

関連する SDGs 目標は無い

1 <input type="checkbox"/> 貧困をなくそう	2 <input type="checkbox"/> 飢餓をゼロに
3 <input checked="" type="checkbox"/> すべての人に健康と福祉	4 <input checked="" type="checkbox"/> 質の高い教育をみんなに
5 <input type="checkbox"/> ジェンダー平等を実現しよう	6 <input type="checkbox"/> 安全な水とトイレを世界中に
7 <input type="checkbox"/> エネルギーをみんなに、そしてクリーンに	8 <input type="checkbox"/> 働きがいも経済成長も
9 <input checked="" type="checkbox"/> 産業と技術革新の基盤を作ろう	10 <input type="checkbox"/> 人や国の不平等をなくそう
11 <input type="checkbox"/> 住み続けられるまちづくりを	12 <input type="checkbox"/> つくる責任、つかう責任
13 <input type="checkbox"/> 気候変動に具体的な対策を	14 <input type="checkbox"/> 海の豊かさを守ろう
15 <input type="checkbox"/> 陸の豊かさを守ろう	16 <input type="checkbox"/> 平和と公正をすべての人に
17 <input type="checkbox"/> パートナリーシップで目標を達成しよう	

以上