

## 2.5 基礎基盤科学技術 分析・計測技術

### 2.5.1 構造解析

#### (1) 研究開発領域の定義

構造生物学は、生体分子の原子の空間的配置を決定することでそのかたちや機能を理解するための学問である。生体分子の立体構造情報は、生命の複雑な仕組みを理解するために重要なだけでなく、創薬など応用的な産業分野においても非常に有用な価値を持つ。また、生理的環境下における生体分子の振る舞いを理解する上では、*in vitro*での静的な構造情報に加え、分子構造の動的性質や細胞内における*in situ*での構造の解析が重要である。これらの情報をより高分解能、かつよりハイスループットに取得するために、クライオ電子顕微鏡、X線結晶構造解析、溶液NMRといった構造解析技術の開発が進みつつある。

#### (2) キーワード

構造生命科学、創薬、生体高分子、立体構造、ダイナミクス（動態）、原子分解能、分子量、クライオ電子顕微鏡、X線結晶構造解析、溶液NMR、単粒子解析、クライオ電子線トモグラフィー（クライオET）、FIB-SEM、電子回折法（MicroED）、X線自由電子レーザー（XFEL）、時分割解析、*in-cell* NMR、高速AFM、深層学習、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業（BINDS）

#### (3) 研究開発領域の概要

##### [本領域の意義]

生命機能のあらゆる仕組みは、タンパク質や核酸など生体分子の立体構造とその動態、つまり構成原子の立体配置とその変化にともなう分子間の情報・物質・エネルギーのやり取りで成り立っている。さらに、これら生体分子は、複雑な相互作用を形成しながら共同的に働くことで、細胞内の多種多様な機能を実現している。そのため、生命現象を理解する上で、生体分子の原子分解能レベルでの立体構造情報や、生体分子の相互作用の情報は非常に重要である。さらに、これらの情報は、医学・創薬の分野においても、基礎研究・応用研究の両面で極めて有用である。

立体構造情報を得る手法としては、従来、X線結晶構造解析や核磁気共鳴分光法（NMR）が主に用いられてきたが、単粒子解析に関連した技術開発の進展に伴いクライオ電子顕微鏡が主流となりつつある。立体構造のダイナミクスを解析する代表的な手法としては溶液NMRが用いられてきたが、最近ではX線自由電子レーザーを用いたX線結晶構造解析や単粒子解析の時分割解析、高速AFMも用いられるようになってきている。また、細胞内での*in situ*構造解析技術としては、クライオ電子顕微鏡トモグラフィーや*in-cell* NMRといった手法の開発が進む。これらの手法はいずれも相補的なものであり、解析対象や目的に応じて使用できる環境を整えるのと同時に、各測定解析技術の開発を進めていくことが求められている。

生体分子の構造解析において、これまでX線結晶解析とNMRが広く用いられてきており、特にX線結晶構造解析は構造解析における中心的な技法として長年にわたって用いられてきた。一方で、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析は、近年の技術進展によって分解能が大幅に向上したことで、構造解析の中心的な技法になりつつある。この手法では、X線結晶構造解析におけるボトルネックであった結晶化を必要とせず、また、わずか数十 $\mu$ gの水溶液試料からでも構造解析ができるという大きな利点を持つ。その結果として、こ

れまで結晶化できず、解析が困難か不可能とされていた真核生物の膜タンパク質や巨大な超分子複合体でも構造解析が可能となった。さらに、これまで単粒子構造解析では苦手であった小さい分子に関しても、位相板の使用などにより分子量10万以下のタンパク質の構造解析が報告されており、これまで以上に幅広い分子に適用可能であることが示された。こうした単粒子構造解析技術の進展が、ここ数年にわたって世界各国でクライオ電顕施設整備が急ピッチで進められた契機となっている。

生体分子の静的な立体構造情報を決定するこれらの手法に対して、溶液NMRは相補的な情報を与える手法である。溶液NMRによる解析は高分子量（おおよそ10万-20万以上）試料において困難さを伴うが、コンフォメーションのフレキシビリティや動的な平衡状態を含む生体高分子のダイナミクスを、様々な時間スケールで解析できるという大きなアドバンテージがあり、また生体高分子間の相互作用や低分子との相互作用の解析において、滴定実験が可能という長所も持つ。

細胞生物学において、クライオ電子顕微鏡は、光学顕微鏡で観察のできる細胞レベルのオーダー（数mm～数 $\mu$ m）からX線結晶構造解析で見える分子オーダー（1nm以下）の間を埋めるツールとして重要である。クライオ電子線トモグラフィーは、細胞内での立体構造をin vivoで解析する技術であり、Focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM) と呼ばれる装置によって、生体分子が細胞内で実際に働く場所での構造解析を行うこともできる。また、生細胞中の分子クラウディング環境下での生体高分子動態を解析するin-cell NMRというアプローチも注目を集めている。

構造解析技術は、世界的なパンデミックとなっているCOVID-19への迅速な対策においても大きな力を発揮している。遺伝子の同定からわずかの期間で、SARS-CoV-2ウイルスの持つ重要なタンパク質（スパイクタンパク質、RNAポリメラーゼなど）や核酸のX線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡による構造が報告された<sup>1-5)</sup>。また、クライオ電子顕微鏡でSARS-CoV-2ウイルスの粒子をそのまま撮影することで、細胞に感染するプロセスにおけるスパイクタンパク質の構造を解析した研究も報告される<sup>6)</sup>など、ワクチンの抗原設計、抗ウイルス剤のデザインなどに有用な情報を与えている。これらの事例は、クライオ電子顕微鏡の有用性とポテンシャルを示していると言えよう。

## 【研究開発の動向】

### 【クライオ電子顕微鏡】

クライオ電子顕微鏡法は、水溶液中の生体高分子を水和した状態のまま急速凍結し、非晶質の氷に包埋・固定したものを透過型電子顕微鏡で観察する手法である。手法としては1980年頃に開発されたものであるが、近年の爆発的な普及の契機となったのは、単粒子解析法の発展と、そのハイスループットな解析を可能とした電子線直接検出型のCMOSカメラ（Direct Electron Detector: DED）の登場である。単粒子解析法は、目的の生体高分子が均一に分散した凍結試料を撮像して、その中から様々な方向を向いた粒子の画像を抽出し、計算機中でそれぞれの粒子の角度を決めることで立体構造情報を再構成する方法である。写真フィルムで検出していた時代には、タンパク質の二次構造が辛うじて見える6-8 Å程度の分解能が限界であったが、高感度・高速フレームレート撮影可能なDEDの登場により、原子モデルの構築が可能な2-4 Åまで分解能が大幅に向上し、適用可能な分子量の下限も10万程度と小さな分子にまで拡張した。また、単粒子解析法による構造決定には数千枚から数万枚の電子顕微鏡像を必要とすることから、従来は構造解析に年単位の時間がかかっていたのに対し、DEDにより1か月以下までに短縮された。さらに、最新鋭のクライオ電子顕微鏡装置は自動試料交換装置、自動撮影機能などを搭載し、比較的簡単な操作でハイスループットかつ高分解能な解析が可能であり、研究者のすそ野を広げる大きな要因となっている。自動撮影装置と自動撮影ソフトを備

えたThermo Fisher Scientific社（以下TFS社、米国）の300kVクライオ電子顕微鏡Titan KRIOSが事実上世界のスタンダードとなっており、全世界で200台近く導入されている。

国内では、2000年代までは藤吉、豊島、難波らにより、膜タンパク質の二次元結晶やらせん対称性を持つフィラメント構造についての先駆的な成果が多く報告され、国内の主要な大学・研究機関にある程度の数のクライオ電子顕微鏡が設置された。しかし、当時は単粒子解析を取り入れていた研究室が限られており、単粒子解析を行なうために必要な、DED搭載で自動試料測定が可能なハイエンドのクライオ電子顕微鏡の導入が遅れた。そのため、日本は近年の構造決定の世界的潮流に大きく乗り遅れることとなったが、2018年度以降になってAMED-BINDSなどの大型予算による支援によって、ハイエンドのクライオ電子顕微鏡が次々と設置されている。2020年10月の時点で、自動試料交換装置、DEDを兼ね備えた200-300kVのクライオ電子顕微鏡は東京大学に4台、高エネルギー加速器研究機構（KEK）に1台、理化学研究所・横浜に2台、東京医科歯科大学に1台、大阪大学に5台、理化学研究所・播磨（SPring-8）に2台、OISTに2台が設置され、現在も複数のプロジェクト予算によって増設が進んでいる。これらの装置の一部は共用施設として稼働しており、主に国内の研究者が試料を持ち込んで測定できるような環境が整ってきている。

クライオ電子顕微鏡法で、もう一つ注目されている技術は、クライオ電子線トモグラフィー（クライオET）と呼ばれる手法である。この方法では、急速凍結させた試料を一定の範囲で傾斜させて連続的な傾斜像を撮影することで、細胞骨格や細胞内小器官、あるいはウイルス粒子などのような構造体を観察することができる。単粒子構造解析法に比べると、多くの電子線照射が必要となるため、一般的に分解能はナノメートルスケールのオーダーに限られるが、DEDや位相板などの使用によって分解能も徐々に向上してきており、サブトモグラム平均化と呼ばれる手法によって、数多くのトモグラムから目的分子の密度を抽出して平均化を行うことで高分解能化を目指せるケースもある。その一方で、試料の厚みが1 $\mu$ mを超えると電子線が通らなくなるため、クライオETの観察のための試料調製は一般的に難しく、細胞観察のためには、集束イオンビーム（Focused ion beam：FIB）により電子線の透過観察が可能な200nm程度の厚さに掘削する方法が用いられている。クライオ観察向け専用のFIB-SEMとしてTFS社のAquilosが販売されており、世界では50台ほどが導入され、国内でも東京大学と大阪大学、理化学研究所・横浜、理化学研究所・播磨、OISTに設置されている。

### 【X線結晶構造解析】

国内ではX線結晶構造解析の分野は歴史的に強く、SPring-8、KEKなどの大型放射光施設を複数かかえており、国内外の研究者が広く利用できるようになってきている。特にSPring-8において高度に集光した高質のビームをもつマイクロフォーカスビームラインBL32XUでは自動測定システムの開発が行われ、国内から優れた成果を多く出す要因となった。現在では同様の自動測定システムがシンクロトロン標準として広く受け入れられるようになり、特別な技術を習得せずとも誰でもタンパク結晶からの回折測定ができるようになってきている。

また、放射光施設から発展した施設として、X線自由電子レーザー（X-ray Free Electron Laser：XFEL）施設が挙げられる。フェムト秒のパルス光を用いて測定を行うことで、時分割シリアルフェムト秒X線結晶構造解析（TR-SFX）による立体構造のダイナミクス解析が可能であり、X線損傷に敏感なタンパク質が損傷を受けていない状態の構造を明らかにすることができる。さらに、非凍結の結晶を用いるため、時間分解能をもった膜タンパク質の構造解析を行うことも可能である。米国のLCLSに次いで、日本のSACLAが運用を開始して、バクテリオロドプシンや光化学系II複合体などに関して優れた成果が継続的に出ている<sup>7-9)</sup>。現在では、韓国のPAL-XFEL、スイスのSwiss FEL、ドイツのEuropean XFELなどの運用が始まっている。

## 【溶液 NMR】

希薄溶液中の比較的低分子量の生体高分子の立体構造を解析する手法は概ね確立している。一般に①スペクトルピーク割り当て、②距離情報の取得と立体構造計算の2つのステップに分けられるが、前者はFLYAソフトウェア<sup>10)</sup>、後者はCYANA<sup>11)</sup>、ARIA<sup>12)</sup>、Xplor-NIH<sup>13)</sup>などのソフトウェアにより大部分が自動化され、多くの場合比較的容易に高精度の立体構造を得ることができる。現在は、安定性や溶解度などに難があるいわゆる「解析困難な」試料や、生細胞中の試料についての解析についての技術開発が行われている。

マルチドメインタンパク質や天然変性タンパク質 (intrinsically disordered protein : IDP) のような比較的大きい分子の解析の際には、従来の立体構造解析で用いられてきた核オーバーハウザー効果 (nuclear overhauser effect : NOE) と呼ばれる約6Å以内の短距離の距離情報に加え、磁場配向材料を用いた残余双極子カップリング (residual dipolar coupling : RDC)、常磁性中心からの緩和促進効果 (paramagnetic relaxation enhancement : PRE) や擬コンタクトシフト (pseudocontact shift : PCS) といった、長距離 (~40 Å) で大域的な情報が解析に有用である。これに伴って、ランタノイド金属を利用した常磁性中心の導入法<sup>14)</sup> やRDC/PRE/PCSを用いた立体構造計算法などの基盤技術の開発も急速に進んでいる。強い常磁性効果を利用することで検出できる、特定の構造状態の存在比が低い分子状態 (レアイベント) の解析も注目されている。

他の手法では得にくく、溶液 NMR 手法に期待される情報はダイナミクスの解析であり、特にマルチドメインタンパク質やIDPsの構造アンサンブルの確率分布の導出<sup>15-17)</sup>、液液相分離 (liquid-liquid phase separation : LLPS) 下での解析<sup>18)</sup> などが注目されてきている。

In-cell NMRは2001年に大腸菌を用いて初めて提案された比較的新しい手法であるが<sup>19)</sup>、現在では様々な基盤技術開発によって、ヒト培養細胞をはじめとする各種真核細胞における解析が可能になっている。In-cell NMR研究の対象としては、①細胞内の分子クラウディング環境下での分子の動態 (排除体積効果や非特異的相互作用がコンフォメーションやフォールディング安定性や、動的平衡への影響など) の解析を目指した物理化学的な興味に基づくものと、②個別の生命現象を細胞内環境のコンテキストで理解しようとするものに大別される。

NMRシグナルの感度は磁場強度の3/2乗に比例するため、溶解度や安定性の問題から解析が困難な試料の測定には、より高磁場のNMR装置が必要となる。そういった施設は大規模であり一つの研究室で導入することは難しいため、効率よく維持・管理する中核施設が不可欠である。わが国では21世紀になって800-950MHzの高磁場NMR施設が理研と大阪大学、横浜市立大学などで整備されたが、その後は設備整備が停滞しており、継続して整備を進めている欧州・カナダや超高磁場NMRへの投資を再開した米国に加えて、最近急速に整備が進んでいる中国にも水をあげられつつある。

溶液NMR装置を開発・販売している企業としてはBruker社 (ドイツ) と日本電子 (JEOL、日本) が精力的に開発研究を行っているが、特に生体高分子の解析については、高磁場NMRの開発 (1.2GHz) やcryogenic probeheadの開発を行ったBrukerが優位なシェアを誇っている。

## (4) 注目動向

### 【新展開・技術トピックス】

#### 【クライオ電子顕微鏡】

継続的な技術開発により、単粒子解析の分解能はX線結晶構造解析に近づきつつある。2020年には、干渉性の高い電子線を放射する冷陰極電界放射型電子銃 (Cold FEG)、試料で非弾性散乱した電子線を除去

するエネルギーフィルタ、ノイズ低減した最新のDED、高次収差の補正機能を持つ解析ソフトRELIONを用いた単粒子解析により、標準試料であるアポフェリチンにおいて1.22 Å という最高分解能が報告され、タンパク質に配位した水分子だけでなく、水素も見えるようになった<sup>20), 21)</sup>。これまでクライオ電子顕微鏡による構造解析の結果は「近原子分解能」と表現されることが多かったが、標準試料とはいえついに「真の原子分解能」に到達したと言える。

分子量10万以下の低分子量ターゲットの構造解析を推進するために注目される技術が、Danev（開発当時所属マックスプランク研究所、現所属東京大学医学部）により開発されたボルタ位相板（Volta Phase Plate：VPP）である。VPPの使用により、2017年にヘモグロビン（分子量6.4万：分解能3.2 Å）、2019年にストレプトアビジン（同5.2万：2.6 Å）の構造解析に成功し<sup>22-24)</sup>、X線結晶構造解析の得意な分子量に肉薄している（現時点では、試料調製や解析処理で問題が多く、分解能も劣る傾向にあるため、X線結晶構造解析に比べてメリットは小さい）。ただし、VPPによって見た目のコントラストが改善する一方で高分解能の情報は失われ、さらに最近になってVPPを使用せずとも構造を解くことができることが示されたため、現在では単粒子解析へのVPPの使用は推奨されていない。一方で、クライオETにおいては高分解能成分より低分解能成分の重要性が高く、VPPの重要性は依然高い。VPP以外の位相板として、レーザーによって電子線の位相をシフトさせる「レーザー位相板」も実証のための試験装置が作られ<sup>25)</sup>、2020年中に試験運用が始まる。この方法では高分解能情報の損失を防ぐことができるため、クライオETだけではなく単粒子解析においても優位性を示す可能性があるとして期待がされている。

単粒子解析では、複数の状態が混ざっていても計算機上でクラス分類を行うことでそれぞれの構造を明らかにすることができる。このため、タンパク質の動的な解析が可能である。後述の次世代凍結装置により凍結までの時間を制御することで、リガンドなどによる構造変化をミリ秒スケールで直接観察するような試みも行われるようになっており<sup>26)</sup>、クライオ電子顕微鏡による時分割構造解析を比較的手軽に行うことができるようになってきている。

クライオETについては、最近では、細胞中での70Sリボソーム構造を5.6 Åという高分解能で明らかにしたり<sup>27)</sup>、SARS-CoV-2のウイルス表面のスパイクタンパク質の構造多様性を明らかにしたりといった顕著な成果も目立つ<sup>6), 28), 29)</sup>。このように、生体分子が働く「その場で (in situ)」の構造を高分解能で明らかにすることができるという大きなポテンシャルがある一方で、汎用性については課題がある。専用のFIB-SEM装置がTFS社から販売されているものの、誰もが簡単に使えるといったものではなく、国内外での人材、技術交流が必要な段階である。さらには大きな構造的特徴を持っていないような標的分子ではトモグラム像から抽出すること自体が困難であるといった課題もあり、現時点では適用対象が限られている。汎用技術の実現に向けて、世界中で装置、解析プログラムの開発が進められていることから、国内でもそのような世界的情勢に離されないようにすることが重要である。

また、クライオ電子顕微鏡を利用した電子回折法（Micro Electron Diffraction：MicroED）と呼ばれる方法では、電子線の散乱能の強さを生かして、X線結晶構造解析が難しいわずか100 nmから1 μm程度の結晶からも回折データ収集が可能であることから、ペプチドや小分子化合物のような分子の構造決定に用いられるようになってきている<sup>30)</sup>。NMRでは構造決定が難しかった化合物に関しても比較的簡単に1 Åを下回る高分解能で原子座標を求めることができるようになっており、少量の試料から分子構造同定できる方法として、低分子医薬の立体構造解析を始め、化学・薬学分野での注目が高まっている。さらに、この手法をタンパク質微結晶にも拡張してX線に代わって電子線で構造解析を行う方法も徐々に用いられるようになってきているが<sup>31)</sup>、実用化のためにはさらなる技術開発が必要である。

現在、生物試料を扱うことのできるクライオ電子顕微鏡の販売、開発を行うのはTFS社、および国内企業であるJEOL社の二社に限られるが、単粒子解析向けのモデルをいち早く普及させたTFS社が世界的なシェアのほとんど(95%以上)を有し、実質的に一社独占の状態が続いている。それに対し、JEOLも凍結試料グリッドの自動装填と自動撮影が可能なクライオ電子顕微鏡CRYO ARMシリーズ(200 kV、300 kV)を2017年に販売開始した。TFSの商用機が搭載していない冷陰極電界放出型電子銃により、2019年初めには当時の世界記録である1.53 Åの分解能を達成した<sup>32)</sup>。そういった成果も背景に、国内では阪大、東京医科歯科大と理研SPring-8に、海外では米国NIH、英国グラスゴー大学とベルギーのブリュッセル自由大学、オーストラリアのクィーンズランド大学などに計10数台導入されており、徐々にその納入台数を伸ばしている。一方、TFS社も電子銃のためのモノクロメーターあるいは冷陰極電界放出型電子銃、エネルギーフィルターの開発を行ない、2020年にはTFS社の実験機を用いて前述の通り原子分解能に到達したことから、これまで以上にTFS社の独占状態が加速することも予想される。また、TFS社はFIB-SEMなども含めた開発を行なっていることから、細胞を研究対象とした光電子相関顕微鏡法(CLEM)などにも対応した製品デザインとなっていることも、生命科学分野におけるTFS社の強みである。

### 【X線結晶構造解析】

最近ではX線源の高強度化と検出器の読み出し速度の向上に伴い、通常のシンクロトロンでも常温結晶を用いたシリアル結晶構造解析が行われるようになってきた。X線自由電子レーザーがピコ秒以下のスケールの反応が得意なのに対して、シンクロトロンはナノ秒より遅い反応を見るのに適していることから、シンクロトロンとX自由電子レーザーでは異なるタイムスケールでの時分割測定が行われるようになっており、相補的に時分割測定の開発が進められている。

時分割構造解析の観察対象は、これまではレチナールや光合成中心のような光感受性タンパク質が多く、測定タイミングをコントロールする方法としては、光照射によって直接的に化学反応を開始する光励起法が主に用いられてきたが、さらに幅広い反応を見るために新たな手法が開発されてきている。例えば、ケージド化合物を使用して光照射によって特定の化合物を遊離させる方法や、あるいは微小溶液管を使用して特定のリガンド溶液との混合から回折データ測定までの時間をコントロールする方法が開発されている<sup>33)</sup>。これらの手法はシンクロトロンによる時分割構造解析に適したタイムスケールに有効であり、組み合わせることでこれまで以上にタンパク質の動的変化に対して迫るような研究が進むと期待される。

### 【溶液NMR】

近年得られた新しい医学・生物学的知見の中で顕著なものとしては、創薬ターゲットとして重要な膜タンパク質であるGPCRのダイナミクス解析、マルチドメインタンパク質の解析、LLPSの解析を含むIDPの解析、生きた真核細胞内のタンパク質の動態解析などが挙げられる。

GPCRについては、2状態の平衡にあり、そのダイナミクスが活性発現に重要であるという重要な知見が得られている<sup>34)、35)</sup>。マルチドメインタンパク質は高等真核生物特有の複雑な活性制御を担っていると考えられ、かつドメイン間の柔らかく一時的な相互作用が活性発現に重要と考えられている。シャペロンをはじめとする生物学的に重要なマルチドメインタンパク質の溶液中での動態解析は大きなインパクトを与えつつある<sup>36)、37)</sup>。LLPSは細胞内の分子動態をとらえる新しいパラダイムとして近年注目されているが、NMR解析によって明らかになった生体高分子間の弱い相互作用がLLPS形成の制御に関与しているという知見は非常に興味深い<sup>38)、39)</sup>。IDPsは、アルツハイマー病など蛋白質のフォールディング異常に起因すると考えられる様々な疾

病の原因とされ、LLPS 形成においても重要な役割を果たしていることが明らかになり、近年注目されている。NMRに加えてX線小角散乱 (SAXS) やSingle-Molecule FRETの情報を取り入れてIDPsの構造アンサンブルを解析する試みが出てきており、非常に先駆的であると考えられる<sup>40)</sup>。真核細胞を用いた研究としては、昆虫培養細胞内の蛋白質の詳細な立体構造解析により、細胞内クラウディング環境がタンパク質の立体構造に与える影響を原子分解能で初めて示した研究が挙げられる<sup>41)</sup>。また、真核細胞内の球状タンパク質やIDPの動態とタンパク質間相互作用の解析も、ゲノム編集や特異的阻害剤を用いて解析されるようになってきた<sup>42), 43)</sup>。

先端的な溶液NMR解析を可能にする基盤技術の開発も進んでいる。特に、NMRシグナルの自動解析<sup>44)</sup>やベイズ推定を用いた立体構造解析<sup>45), 46)</sup>など、情報科学的手法の適用が急速に進みつつあるほか、常磁性NMR情報取得のためのケミカルバイオロジー的な様々な技術開発も盛んである。In-cell NMRにおいては、バイオリクター<sup>47)</sup>などの生理的条件でのNMR解析を可能にする手法も確立しつつある。

上記の3つの技術に加えて、構造解析に用いられる技術として注目される技術の1つが高速AFM (原子間力顕微鏡) である。AFMは、試料表面を走査する針が先端に付いたカンチレバーの振動の情報から試料の表面形状をイメージングする手法であるが、金沢大学・安藤らにより液中で高速に走査できる高速AFMが開発され、最高15フレーム/秒での撮影が可能となった<sup>48)</sup>。高速AFM単独では構造情報を決定できないものの生体分子の形状のダイナミクスを1分子で観察できることから、他の構造解析手法を補完する手法として、複数の安定状態を持つ分子の構造動態や二量体・三量体のような比較的単純な複合体のマクロな構造動態の観察に用いられる。また、針を介して力や剛性といった生体分子の物性を計測したり、逆に摂動を加えた時の構造変化を見たりといった、AFM特有の計測が可能である。近年ではIDPの動態観察<sup>49)</sup>や力覚センシング分子の構造の力依存性の観察<sup>50)</sup>といった事例が注目されている。微量の試料でも分子形状を直接可視化できるため、他の構造解析手法を適用する前のスクリーニング手法としての普及も期待されているが、計測に熟練を要し計測を行なえる人材に限られるという課題があった。2020年にAFM市場リーダーのBruker社より、価格が高いもののソフトウェアの使い勝手が良い高速AFMシステムが発売され、高速AFM利用のすそ野が広がる可能性がある。

さらに、計測を行なうことなく構造を予測する技術として、従来の分子動力学のような数値計算ベースの手法に加え人工知能が注目を集めている。DeepMind社が開発した深層学習モデルにより、アミノ酸配列からタンパク質立体構造を予測する精度がクライオ電子顕微鏡による解析の精度に近づいたことが報告されており<sup>51)</sup>、実験による構造解析の重要性がこれまでより低下する可能性があるため、動向を注視する必要がある。

### [注目すべき国内外のプロジェクト]

国内における放射光施設(Spring-8、KEK)やハイエンドのクライオ電子顕微鏡をはじめとした装置の整備・維持については、AMEDによる創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) 事業によって重点的に投資がされている。

医学・生命科学や創薬分野におけるクライオ電子顕微鏡法の重要性は世界各国の政府に強く認識され、ここ数年で国際的なファンディングは急速な増加を見せている。2016年に英国ロンドンに巨大研究所を設立したFrancis Crick InstituteがコアファシリティーにTitan Kriosなど最先端の装置を複数台そろえたように、各国の医学・生命科学分野で中核的な役割を果たす大学や研究機関には、最先端クライオ電子顕微鏡の導入が積極的に進められた。特に米国、中国、ドイツ、英国ではクライオ電子顕微鏡の導入が急ピッチで進み、

こういったトレンドは、他の欧州諸国や、シンガポール、台湾、韓国などでも同様である。米国、欧州の大型予算がまだ継続していることもあり、クライオ電子顕微鏡購入のための大型予算の動きは、この2年で以前に比べると落ち着いた感があるが、中国では2つの国家プロジェクトが進行しており、地域によってはまだその動きは活発である。また、各国の放射光施設（英国Diamond Light Source、米国SLAC National Accelerator Laboratory、欧州European Synchrotron Radiation Facility）に付設の共用施設として、クライオ電子顕微鏡が複数台設置されているのも特徴的である。国内でもここ2-3年で設置が進んでおり、2019年度には、AMED-BINDSにより東北大学に、文部科学省補正予算によりSpring-8に、新興感染症対策予算により京都大学にハイエンドのクライオ電子顕微鏡が導入され、BSL3施設内への導入も検討されている。

世界の主だった放射光施設では低エミッタンス化へのアップグレードが進められている。低エミッタンスの蓄積リングではより広がり少なく明るいX線の利用が可能であり、X線自由電子レーザー施設とは異なるタイムスケールでの時分割構造解析やサブミクロン結晶からの高分解能構造解析の効率化が見込まれる。Spring-8についても低エミッタンス化に向けたアップグレードの話し合いが進む一方で、アップグレードには施設の休止が必須であるため、国内での放射光施設冗長化が必要である。この一環として東北大学のSLIT-J計画では世界各地で安定運転の実績を誇る3 GeVリングを有する放射光施設が建設されつつある（タンパク結晶用のビームラインが利用可能かどうかは現段階では不明）。

現存する最高磁場の1.2GHz NMR装置は2020年に導入が開始された（欧州に3台）が、韓国も1.2GHz装置の導入を既に決定している。日本では理研を中心に1.3 GHz装置の開発が進められているが、いまだに実機の完成には至っていない。

その他、構造解析を用いた研究や構造解析の技術開発を行なうプロジェクトとして、以下のような事例が挙げられる。

- ・ JST-CREST「細胞内ダイナミクス」は、細胞内の高次構造体のダイナミクス解析による細胞システム理解やそのための基盤技術開発を目指すプロジェクトで、構造生物学全般に関わっている。
- ・ 新学術領域「高速分子動画」では、X線自由電子レーザーによる時分割構造解析の適用拡大のための技術開発を行なっている。
- ・ 生体高分子のNMR解析に関わる国内のプロジェクトとしては、膜タンパク質のin situ機能解明を目指した特別推進研究（代表：嶋田・理化学研究所）のほか、新学術領域研究「生命金属科学」（代表：津本・東京大学）も溶液NMR解析やin-cell NMR解析を重要なトピックの一つとして掲げている。
- ・ 国際的には生体高分子のNMR解析データの統合と革新を目指した英国のCCPN (common computational project for NMR)<sup>52)</sup> や、欧州のネットワーク型の統合構造生物学研究基盤 (INSTRUCT)<sup>53)</sup> を始めとするいくつかの比較的大規模なプロジェクトが進行している。
- ・ NMR装置開発としては、JST未来社会創造事業 大規模プロジェクト型の「高温超電導線材接合技術の超高磁場NMRと鉄道電線への社会実装」が進行中で、1.3GHz NMR用のマグネット開発を行なっている。

## (5) 科学技術的課題

### 【クライオ電子顕微鏡】

クライオ電子顕微鏡装置は高解像度化と撮影の自動化・高速化が進んだが、より汎用な計測解析技術とな

るためには、急速凍結による試料グリッド調製法の再現性の低さが技術的なボトルネックとなっている。観察試料の凍結には、グリッドと呼ばれる金属片の上に小孔の開いた、カーボン膜がコートされたホルダーを使うのが一般的である。観察試料を含む水溶液をこれらの上に滴下した後に、余計な水分を濾紙で吸い取ることで、薄い非晶質の氷の中に目的の分子が均一に分散した凍結試料を作製する。TFS社のVitrobot、あるいはLeica社のEM GPといった装置はこの過程を半自動で行うことができるが、氷薄膜を適切な薄さに制御することが難しく、試料凍結の際に気液界面でタンパク質や核酸が変性してしまうことも多いため、再現よく観察試料を調製することは難しい。変性を防ぐために薄層のグラフェン膜で気液界面を覆う方法も開発され、そのためのグリッドが市販されるようになってきている。さらに最近では、試料溶液の微小液滴を特殊なグリッドに噴霧して急速に凍結させることで凍結時間と試料の厚みを適切にコントロールしようという試みがされている。このような次世代型の試料凍結装置としてTTP Labtech社のChameleon、CryoSol社のVitroJetなどの商用機が販売されるようになったが、いずれも数千万円と非常に高価なことから、共用施設における設置が望まれる。現在の世界での導入実績は、Chameleonが10台ほど、VitroJetが2台ほどである。

クライオ電子顕微鏡の動作を駆動する自動撮影ソフトの高度化や簡易化も、技術の汎用化のための重要なポイントである。電子顕微鏡装置や検出器の技術進展により撮影効率が大幅に向上したのに対し、撮影に適した場所はいまだに人の目で決めて判断する必要があるため、良質のデータを取得するためには一定の熟練が必要である。AIなどを活用しグリッドのスクリーニングからデータ収集までの完全自動化を目指した開発が進められてはいるが、現状では実用化に至っていない。撮影したデータから単粒子解析を行なうプログラムには、RELION、CryoSPARC、cisTEM、SPHIREなど、教育機関であれば無償で使用できるものが多く出ている。いずれのプログラムも黎明期と比べると格段に使いやすくなっており、学生でも数日のトレーニングで一通りの操作ができるが、X線結晶構造解析のプログラムに比べると操作性などの面で改善の余地がある。また、効率よくデータ収集を行うためには、測定しながらon-the-fly処理によるデータ解析を行うことで測定中のデータの質を迅速に評価することが有効であるが、そのためには一定の人的、資金的リソースを整える必要がある。さらに、クライオ電子顕微鏡により決定された立体構造を適正に評価する手法もまだ確立されているとは言えない。クライオ電子顕微鏡によって撮影された生の原画像データのパブリックデータベースEMPIARへの登録と開示が推進されており、指数関数的に増加する膨大な原画像データの経済的なアーカイブ法の構築は課題であるが、蓄積されたデータと計算機科学により解析の妥当性の検証が進むと期待される。クライオ電子顕微鏡による構造解析支援の受託研究も盛んになっているため、撮影したデータを直接クラウド上に保存し、そのまま遠隔で解析できるサービスの展開も予想される。

クライオ電子顕微鏡装置に関しては、近原子分解能の構造解析を可能にするハイエンド製品は海外メーカーであるTFS社の独占状態で、健全な技術開発競争による今後一層の技術進歩が停滞するだけでなく、国内におけるサービス体制、メンテナンスコストの面でも大きな問題となる可能性がある。国内メーカーであるJEOL社が2017年にCRYO ARMを販売開始したものの、国内および欧州や中国によろやく10数台が導入されているばかりで、まだまだTFS社に追いつく体制を構築できないでいる。日本は地理的な不利なども目立ち、技術開発の面でやや置いて行かれている傾向にある。日本としては、世界の構造生物学の潮流に遅れないようTFS社の最新鋭機の導入を加速すると同時に、撮像・解析技術の一層の高度化や周辺技術の開発にもバランス良く投資することが望まれる。また、ハイエンド機の価格が高止まりしているのに対し、クライオ電子顕微鏡の利用のすそ野を広げる上で、試料スクリーニングを主な目的とした低加速電圧の廉価版クライオ電子顕微鏡の開発を望む声が挙がっており、そのような装置の実現性、発展性に関しても注視が必要である。

### 【X線結晶構造解析】

クライオ電子顕微鏡による単粒子解析あるいはMicroEDの登場によって相対的な重要度は下がってきているものの、分子量が小さいタンパク質などに関してはX線結晶構造解析がいまだに第一の選択肢となる。特にスループットの面ではX線結晶構造解析は圧倒的に優位性をもつため、fragment based drug discovery (FBDD) のような用途など、製薬企業などにおいては継続的な需要がある。また、次世代放射光源における低エミッタンス化のメリットは、主に極微結晶からの回折にあると考えられる。サブミクロン結晶からの高分解能構造解析の効率化が見込まれることで、薬剤ソーキングによるFBDDの高効率化、あるいは常温のシリアル結晶測定による時分割結晶解析の飛躍的進歩が見込まれる。さらに、輝度の向上だけでなく、理想的特性をもつアンジュレータ放射を生かして、エネルギーの広がりを持ったピンクビームと呼ばれるX線の利用も見込まれる。

このように、シンクロトロンのような大型施設の持つ重要性はいまだに大きく、これまでと同様に共通施設としての基盤整備を行うことは国際的な競争力を保つためにも重要である。一方で、近年のクライオ電子顕微鏡の急速な普及と成果、解析対象の広がりを考えると、大きな投資が必要なシンクロトロンに対し、限られた予算をどこまで投入するかは日本に限らず難しい問題である。X線とMicroEDでそれぞれ得意とする対象を見出していくなど、シンクロトロンとクライオ電子顕微鏡の最適な組み合わせとバランスを考えていくことは重要であろう。また、COVID-19の影響でユーザー自身が放射光施設に訪れることなくリモートで測定することが増えたことで、人材的な停滞も課題として挙がりつつある。

### 【溶液NMR】

まず測定に関する技術として、ハードウェア面では、より高磁場のNMR磁石の開発や、高分子解析のための動的核偏極法 (dynamic nuclear polarization: DNP) の積極的な利用などが考えられる。ソフトウェア面としては、情報科学的なアプローチとの効率的な統合による迅速なNMR測定技術の開発が希求される。実際、最近の技術開発により、ソフトウェア面だけでこれまで実質3~5倍の感度上昇を達成しているが、まだ伸び代があり今後の進展が大いに期待される。

データ解析に関する課題としては、同様に情報科学的なアプローチを積極的に取り入れた開発研究が期待され、少ない情報から正確で精密な立体構造を算出する方法や、構造アンサンブルを統計的に取り扱うための手法の開発などが重要であると考えられる。その際には、ベイズ推定などの情報科学的なアプローチとの効率的な統合や、スーパーコンピューターを用いたシミュレーション研究との緊密な連携が必須となるであろう。

In-cell NMR解析を適用する標本については、生物学的に意味のある解析を達成するために、幹細胞や初代培養細胞、疾病の背景を持つ細胞を用いた「もっとリアルなin situ解析」の必要性が唱えられ始めている。ヒト由来の様々な細胞を用いたin-cell NMR解析が実現すれば、ヒト培養細胞を用いたin-cell NMRによる薬剤スクリーニングや、疾病予測や毒性・薬効性の個別評価などが実現する可能性がある。

### (6) その他の課題

クライオ電子顕微鏡の台頭によって、構造生物学における構図は大きな変化を見せているが、構造解析の技術はいずれもが相補的であり、何か一つだけに置き換えられるものではない。たとえば時分割構造解析を例に挙げても、X線自由電子レーザー、シンクロトロン、電子顕微鏡でそれぞれ得意とするところが異なる。したがって、国内の構造生物学全体のレベルを維持するためには、それぞれ異なる階層での支援が必要である。シンクロトロンのような大型施設と比較すると、クライオ電子顕微鏡は規模が小さく、各大学、研究所に設置

することができるが、導入のための費用は6-10億円、年間の維持費用だけでも数千万円かかるため、共通施設での運用が望ましい。そのような共通施設を長期的に効率よく運用するためには、長期間で安定した人的、資金的な投資が必要である。

シンクロトロン、電子顕微鏡、NMRなど高額装置の共用施設としての運用を考えるうえで、高度に専門的な知識と技術をもったスタッフの安定な雇用は非常に重要な要素である。海外ではそのような専門スタッフとしてのキャリアパスがある程度確立しているのに対して、国内ではそのような道筋を描くことは難しく、一時的な大型予算で高価な装置を購入してもそれを適切に管理できる人材がおらず、結果的に非効率な運用がされているケースが見受けられる。これは構造生物に限った話ではなく、他の分野も含めて日本固有の問題であり、大学や研究所において流動的な人件費捻出ができるような仕組みが必要である。特にクライオ電子顕微鏡の管理、運用業務を適切に行うことのできる人材は国際的にも限られており、世界的な奪い合いとなっている。海外の研究室でポスドクを経験して帰国する研究者は、最先端の技術を国内に還元するという非常に重要な役割を持つ一方で、日本は研究環境、給与待遇などの面で不利な面が多く、海外からの人材の流入はあまり期待できないことから、国内での人材育成に注力する必要がある。共用のクライオ電子顕微鏡施設の整備が進んだことで、国内からもNature、Science誌などを含む一流紙に掲載されるような成果が徐々に出るようになり、クライオ電子顕微鏡分野での研究者育成が進んできていることをうかがわせるが、好循環を回す上では継続的なサポートが重要である。特に、実際に管理業務を行うことになるポスドク、助教レベルの研究者に対する、キャリアパスも含めたサポートが必要となる。

また、日本は欧州に比べてネットワーク形成が遅れており、新しく開発した革新的な技術が速やかにコミュニティに広まりにくい構造になっている。例えばNMRでは、基礎研究と製薬企業とのネットワークは形成されつつあるが、真核細胞を用いたin-cell NMR研究に求められる、疾病に関連する各種ヒト細胞の取り扱いに実績のある医学系の研究機関やバイオバンクとの連携はまだ進んでおらず、今後鋭意推進していく必要がある。

COVID-19拡大期に導入された地域間移動の制限は、これまで地理的にカバーしきれていなかった地域を中心に、装置や技術へのアクセスを困難にしてしまった。このため、産学問わず研究基盤の地域格差を産み出しつつある。したがって、国内拠点の追加による地域の中核となる拠点の整備は急務となっている。さらに、「新常態」時代において研究を継続させるためには、遠隔利用や自動化技術の活用も重要な課題であり、これらに関する強化も望まれる。

### (7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>構造生物学全般で見ると、AMED-BINDS事業を始め継続的にファンディングが展開されており、日本の競争力は決して劣っておらず世界的にトップクラスの結果も発信されている。</li> <li>クライオ電子顕微鏡に限ると、欧米と比較して数年の遅れがある。設備はある程度整ってきており、今後は人的投資が求められる。特にクライオETに関しては人材不足が目立つ。</li> </ul>

2.5

俯瞰区分と研究開発領域  
 基礎・計測技術  
 基礎・計測技術

	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 技術の開発について、放射光施設に関しては高レベルの技術を有するが、他の領域では立ち遅れている。</li> <li>・ クライオ電子顕微鏡に関してはJEOLとの共同開発に期待がされるが、TFS社の圧倒的なシェアと競争力を前にして、やや苦しい状況にある。創薬への支援として、AMED-BINDSの産学に対する支援の他、産総研のバイオメディシナル情報研究センターをはじめとするSBDD (Structure-Based Drug Discovery) を志向した大小のプロジェクトが長期間にわたって展開されている。NMR解析は、中分子創薬における構造解析、細胞内を含めた蛋白質間相互作用解析の主要なツールとしても位置づけられ、製薬会社 (中外など) においてin-cell NMR研究の実施を検討中。</li> </ul>
米国	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ クライオ電子顕微鏡が大学や放射光施設に多く設置され、共同利用装置としての運営が功を奏して多くの成果が出ている。</li> <li>・ 米国・カナダに主要大学・研究機関に有力な生体系NMRの研究グループが存在し、長期にわたってこの領域を牽引している。特にIDPやマルチドメインタンパク質のアンサンプル解析やLLPS研究において、先駆的な成果が出ている。</li> </ul>
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ APSやLCLSでは次世代放射光施設、X線自由電子レーザーなどの開発が行われている。</li> <li>・ レーザー位相板や、直接検出器 (Gatan社K3カメラ) の開発、あるいは解析プログラムの開発なども多く行われており、それに伴って実験手法的にも多くの新しい試みがなされている。</li> <li>・ ファイザー、Genentech他製薬会社数社がクライオ電子顕微鏡を導入し製薬開発に利用中。NMRを主要なツールとして創薬に利用する研究が産学双方で展開されている。また、疾患メカニズムの解明からNMRを用いた創薬を志向したプロジェクトも進められている (トロント大学のKRAS Initiative<sup>54)</sup> など)。</li> </ul>
欧州	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 次世代放射光施設の先駆けとして、ESRFが2020年夏からの運用を開始した。</li> <li>・ クライオ電子顕微鏡に関しては、各国で独自に施設整備を行っている。英国では放射光施設Diamond Light Sourceにクライオ電子顕微鏡の共同利用拠点として、ウェットな実験を行う研究室も含んだeBICを設立。ドイツのMax Planck研究所では、クライオ電子顕微鏡だけでなく光学顕微鏡を含めた細胞イメージング研究の拠点としてのイメージングセンターの整備を進めている。</li> <li>・ 英国・ドイツ・スイスを中心に、主要大学・研究機関に有力な生体系NMRの研究グループが存在しており、北米に並んで長期にわたってこの領域を牽引している。</li> </ul>
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ オランダにクライオ電子顕微鏡の研究拠点を置くTFS社は、英国のLMB、ドイツのMaxPlanck研究所などと密接に連携しつつ多くの開発を進めている。また、これら二つの研究所は歴史的に電子顕微鏡分野に強く、独自の試料凍結グリッド、解析プログラムなどを含めて、ソフト、ハード両面の開発が行われている。</li> <li>・ 高磁場NMR装置の開発でBruker社が業界を牽引している。</li> <li>・ ケンブリッジ大学とAstraZeneca等5つの製薬会社がCambridge Pharmaceutical Cryo-EM Consortiumを設立。</li> <li>・ 欧州の製薬企業 (Roche、Novartis、GSK、Sanofi) はNMR活用に積極的で、大学・研究機関と積極的に共同研究を進めており、企業におけるNMRを用いた創薬研究と、アカデミアにおける創薬を志向したNMR方法論的研究の広がり結びついている。</li> </ul>

中国	基礎研究	◎	↗	放射光施設が少なかったこともあり、クライオ電子顕微鏡が大量に国内に設置され、多くの成果を生んでいる。清華大学、生物物理学研究所、上海国立蛋白質科学センター等、有力大学・国研の共同利用拠点だけでなく、各地方の主要大学にも複数台設置してあるところが多い。
	応用研究・開発	△	↗	現状、技術開発で顕著な成果は報告されていないが、クライオ電子顕微鏡関連の消耗品サプライヤーなども多く出てきており、大学では細胞を研究対象とした装置開発なども進められている。
韓国	基礎研究	△	→	世界的な情勢に応じた投資がされている。クライオ電子顕微鏡に関してはKBSIに設置された共用施設による成果が徐々に出てきている。
	応用研究・開発	△	→	際立った開発力はないが、PAL-XFELなど、世界の最先端の技術を追う姿勢を見せている。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDSの調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

### 関連する他の研究開発領域

- ・バイオイメージング（ナノテク・材料分野 2.2.4）
- ・ナノ・オペランド計測（ナノテク・材料分野 2.6.3）

### 参考・引用文献

- 1) D. Wrapp et al., “Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation”, *Science* 367, no. 6483 (2020) : 1260-1263. doi : 10.1126/science.abb2507
- 2) J. Lan et al., “Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor”, *Nature* 581 (2020) : 215-220. doi : 10.1038/s41586-020-2180-5
- 3) J. Shang et al., “Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2”, *Nature* 581 (2020) : 221-224. doi : 10.1038/s41586-020-2179-y
- 4) A. C. Walls et al., “Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein”, *Cell* 181, no. 2 (2020) : 281-292.e6. doi : 10.1016/j.cell.2020.02.058
- 5) Y. Gao et al., “Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus”, *Science* 368, no. 6492 (2020) : 779-782. doi : 10.1126/science.abb7498
- 6) H. Yao et al., “Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus”, *Cell* 183, no. 3 (2020) : 730-738.e13. doi : 10.1016/j.cell.2020.09.018
- 7) E. Nango et al., “A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin”, *Science* 354, no. 6319 (2016) : 1552-1557. doi : 10.1126/science.aah3497
- 8) M. Suga et al., “Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII

- caught by XFEL”, *Nature* 543, no. 7643 (2017) : 131-135. doi : 10.1038/nature21400
- 9) M. Suga et al., “An oxy/oxo mechanism for oxygen-oxygen coupling in PSII revealed by an x-ray free-electron laser”, *Science* 366, no. 6463 (2019) : 334-338. doi : 10.1126/science.aax6998
- 10) E. Schmidt and P. Güntert, “A new algorithm for reliable and general NMR resonance assignment”, *J Am Chem Soc* 134, no. 30 (2012) : 12817-12829. doi : 10.1021/ja305091n
- 11) P. Güntert and L. Buchner, “Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA”, *J Biomol NMR* 62, no. 4 (2015) : 453-471. doi : 10.1007/s10858-015-9924-9
- 12) J. P. Linge, S. I. O'Donoghue and M. Nilges, “Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA”, *Methods Enzym* 339 (2001) : 71-90. doi : 10.1016/S0076-6879 (01) 39310-2
- 13) C. D. Schwieters et al., “The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package”, *Magnet Resonance* 160, no. 1 (2003) : 65-73. doi : 10.1016/S1090-7807 (02) 00014-9
- 14) G. Otting, “Prospects for lanthanides in structural biology by NMR”, *J biomol NMR* 42, no. 1 (2008) : 1-9. doi : 10.1007/s10858-008-9256-0
- 15) J. A. Marsh et al., “Improved structural characterizations of the drkN SH3 domain unfolded state suggest a compact ensemble with native-like and non-native structure”, *J Mol Biol* 367, no. 5 (2007) : 1494-1510. doi : 10.1016/j.jmb.2007.01.038
- 16) L. Salmon et al., “NMR characterization of long-range order in intrinsically disordered proteins”, *J Am Chem Soc* 132, no. 24 (2010) : 8407-8418. doi : 10.1021/ja101645g
- 17) W. Liu et al., “A Method for Determining Structure Ensemble of Large Disordered Protein : Application to a Mechanosensing Protein”, *J Am Chem Soc* 140, no. 36 (2018) : 11276-11285. doi : 10.1021/jacs.8b04792
- 18) Y. Shin and C. P. Brangwynne, “Liquid phase condensation in cell physiology and disease”, *Science* 357, no. 6357 (2012) : eaaf4382. doi : 10.1126/science.aaf4382
- 19) Z. Serber et al., “High-resolution macromolecular NMR spectroscopy inside living cells”, *J Am Chem Soc* 123, no. 10 (2001) : 2446-2447. doi : 10.1021/ja0057528
- 20) T. Nakane et al., “Single-particle cryo-EM at atomic resolution”, *Nature* 587, no. 7832 (2020) : 152-156. doi : 10.1038/s41586-020-2829-0
- 21) K. M. Yip et al., “Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM”, *Nature* 587, no. 7832 (2020) : 157-161. doi : 10.1038/s41586-020-2833-4
- 22) M. Khoshouei et al., “Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate”, *Nat Commun* 8 (2017) : 16099. doi : 10.1038/ncomms16099
- 23) X. Fan et al., “Single particle cryo-EM reconstruction of 52 kDa streptavidin at 3.2 Angstrom resolution”, *Nat Commun* 10 (2017) : 2386. doi : 10.1038/s41467-019-10368-w
- 24) Y. Han et al., “High-yield monolayer graphene grids for near-atomic resolution cryoelectron microscopy”, *Proc Natl Acad Sci USA* 117, no. 2 (2020) : 1009-1014. doi : 10.1073/pnas.1919114117
- 25) O. Schwartz et al., “Laser phase plate for transmission electron microscopy”, *Nat Methods* 16, no. 19 (2019) : 1016-1020. doi : 10.1038/s41592-019-0552-2

- 26) V. P. Dandey et al., “Time-resolved cryo-EM using Spotiton”, *Nat Methods* 17 (2020) : 897-900. doi : 10.1038/s41592-020-0925-6
- 27) F. J. O’Reilly et al., “In-cell architecture of an actively transcribing-translating expressome”, *Science* 369, no. 6503 (2020) : 554-557. doi : 10.1126/science.abb3758
- 28) B. Turoňová et al., “In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges”, *Science* 370, no. 6513 (2020) : 203-208. doi : 10.1126/science.abd5223
- 29) Z. Ke et al., “Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions”, *Nature* 588, no. 7838 (2020) : 498-502. doi : 10.1038/s41586-020-2665-2
- 30) B. L. Nannenga et al., “High-resolution structure determination by continuous-rotation data collection in MicroED”, *Nat. Methods* 11, no. 9 (2014) : 927-930. doi : 10.1038/nmeth.3043
- 31) D. Shi et al., “Three-dimensional electron crystallography of protein microcrystals”, *elife* 2 (2013) : e01345. doi : 10.7554/elife.01345
- 32) T. Kato et al., “CryoTEM with a Cold Field Emission Gun That Moves Structural Biology into a New Stage”, *Microsc. Microanal.* 25 (S2) (2019) : 998-999. doi : 10.1017/S1431927619005725
- 33) T. Tosha et al., “Capturing an initial intermediate during the P450<sub>nor</sub> enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate”, *Nat. Commun.* 8, no. 1585 (2017) : 1-9. doi : 10.1038/s41467-017-01702-1
- 34) Y. Shiraishi et al., “Phosphorylation-induced conformation of  $\beta$  2-adrenoceptor related to arrestin recruitment revealed by NMR”, *Nat Commun* 9, no. 1 (2018) : 194. doi : 10.1038/s41467-017-02632-8
- 35) S. Imai et al., “Structural equilibrium underlying ligand-dependent activation of  $\beta$  2-adrenoreceptor”, *Nat Chem Biol* 16, no. 4 (2020) : 430-439. doi : 10.1038/s41589-019-0457-5
- 36) K. Weinhäupl et al., “Structural basis of membrane protein chaperoning through the mitochondrial intermembrane space”, *Cell* 175, no. 5 (2018) : 1365-1379.e25. doi : 10.1016/j.cell.2018.10.039
- 37) Y. Jiang, P. Rossi and C. G. Kalodimos, “Structural basis for client recognition and activity of Hsp40 chaperones”, *Science* 365, no. 6459 (2019) : 1313-1319. doi : 10.1126/science.aax1280
- 38) T. Yoshizawa et al., “Nuclear import receptor inhibits phase separation of FUS through binding to multiple sites”, *Cell* 173, no. 3 (2018) : 693-705.e22. doi : 10.1016/j.cell.2018.03.003
- 39) T. H. Kim et al., “Phospho-dependent phase separation of FMRP and CAPRIN1 recapitulates regulation of translation and deadenylation”, *Science* 365, no. 6455 (2019) : 825-829. doi : 10.1126/science.aax4240
- 40) G. -N. Gomes et al., “Conformational ensembles of an intrinsically disordered protein consistent with NMR, SAXS and single-molecule FRET”, *J Am Chem Soc* 142. no. 37 (2020) : 15697-15710. doi : 10.1021/jacs.0c02088

2.5

俯瞰区分と研究開発領域  
 基礎・計測技術  
 基礎・計測技術

- 41) T. Tanaka et al., “High - Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells”, *Angewandte Chemie International Edition* 58, no. 22 (2019) : 7284-7288. doi : 10.1002/anie.201900840
- 42) B. M. Burmann et al., “Regulation of  $\alpha$ -synuclein by chaperones in mammalian cells”, *Nature* 577, no. 7788 (2020) : 127-132. doi : 10.1038/s41586-019-1808-9
- 43) Q. Zhao et al., “Real-Time In-Cell NMR Reveals the Intracellular Modulation of GTP-Bound Levels of RAS”, *Cell Rep* 32, no. 8 (2020) : 108074. doi : 10.1016/j.celrep.2020.108074
- 44) E. Schmidt and P. Güntert, “A new algorithm for reliable and general NMR resonance assignment”, *Journal of the American Chemical Society* 134, no. 30 (2012) : 12817-12829. doi : 10.1021/ja305091n
- 45) W. Rieping, M. Habeck and M. Nilges, “Inferential structure determination”, *Science* 309, no. 5732 (2005) : 303-306. doi : 10.1126/science.1110428
- 46) T. Ikeya et al., “Improved in-cell structure determination of proteins at near-physiological concentration”, *Sci Rep* 6 (2016) : 38312. doi : 10.1038/srep38312
- 47) S. Kubo et al., “A gel-encapsulated bioreactor system for NMR studies of protein-protein interactions in living mammalian cells”, *Angew Chem* 52, no. 4 (2013) : 1208-1211. doi : 10.1002/ange.201207243
- 48) 安藤敏夫「高速AFMの現状と将来展望」『顕微鏡』54巻2号 (2019) : 56-61. doi : 10.11410/kenbikyo.54.2\_56
- 49) N. Kodera et al., “Structural and dynamics analysis of intrinsically disordered proteins by high-speed atomic force microscopy”, *Nat. Nanotechnol.* (2020) : in press. doi : 10.1038/s41565-020-00798-9
- 50) Y. -C. Lin et al., “Force-induced conformational changes in PIEZO1”, *Nature* 573, no. 7773 (2019) : 230-234. doi : 10.1038/s41586-019-1499-2
- 51) E. Callaway, “‘It will change everything’: DeepMind’s AI makes gigantic leap in solving protein structures” *Nature*, 2020, doi : 10.1038/d41586-020-03348-4
- 52) <https://www.ccpn.ac.uk/> (2021年2月1日アクセス)
- 53) <https://www.structuralbiology.eu> (2021年2月1日アクセス)
- 54) <https://www.cancer.gov/research/key-initiatives/ras> (2021年2月1日アクセス)