

2.3.4 構造解析 (生体高分子・代謝産物)

(1) 研究開発領域の定義

構造生物学は、タンパク質を始めとした生体高分子における原子の空間的配置を決定・推定することでその機能や挙動を理解するための学問である。生体高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高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幅広い分子に対してより高分解能に取得するために、クライオ電子顕微鏡、溶液NMRなどにおいて構造解析技術の開発が進みつつある。

代謝産物の構造解析技術としては、X線結晶構造解析、NMRなどが用いられるが、その解析の対象とすべき分子を自然界から効率よく探索するための技術がボトルネックとなっており、質量分析装置を用いたノンターゲット・メタボローム解析が期待されている。

(2) キーワード

構造生物学、生体高分子、代謝産物、ダイナミクス (動態)、分子量、クライオ電子顕微鏡、単粒子解析、原子分解能、クライオET、FIB-SEM、時分割解析、溶液NMR、in-cell NMR、天然変性タンパク質、分子混雑環境、LLPS、X線結晶構造解析、高速AFM、AlphaFold2、クロマトグラフィー-質量分析、マスペクトル、ノンターゲット・メタボローム解析、MicroED

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

【生体高分子】

生命機能のあらゆる仕組みは、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。タンパク質や核酸などの生体高分子は、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、生体高分子の原子分解能レベルでの立体構造情報や、生体高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。

生体高分子の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。また、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。さらに、細胞内での*in situ*構造解析技術として、クライオ電子線トモグラフィー (クライオET) 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。

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。単粒子解析は、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 μ 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つつある。こうした単粒子構造解析技術の進展を契機に、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ている。

生体高分子の立体構造情報を取得する手法としてNMRは、X線結晶解析やクライオ電子顕微鏡の単粒子解析と並び、かつ、相補的な重要な手法の一つである。溶液状態の試料を対象とする溶液NMRは、高分子量（およそ10万-20万以上）試料において困難さを伴うが、生体高分子が実際に働く環境に近い生理的環境下で計測がおこなえ、立体構造の多様性、平衡状態の遷移、過渡的な状態といった動態（動的な性質）、様々な時間領域で定量的に解析できるという大きな利点があり、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有する。溶液NMRを用いてはじめて、一定の立体構造を有しない天然変性タンパク質/領域（intrinsically disordered protein/region: IDP/IDR）や、最近では液-液相分離（liquid-liquid phase separation: LLPS）の際のタンパク質の動態解析など、興味深い生命現象の解析が可能となった。

細胞生物学において、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 μm 以上）からX線結晶構造解析で見える分子オーダー（1 nm以下）の間を埋めるツールとして重要である。クライオETは、細胞骨格やオルガネラ、ウイルス粒子などの構造体を分子オーダーの分解能で観察するのに用いられるほか、生体高分子が細胞内で実際にはたらく場所（*in situ*）での構造解析を行うこともできる。また、生細胞中の分子混雑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。

【代謝産物】

生命が作り出す代謝産物は、人類を含めたあらゆる生物の栄養源、シグナル物質、生理活性物質、生育に必要な資材など、生命活動を支える基盤となっている。例えばヒトの血液や尿には、食品から摂取した成分やそれらが腸内細菌やヒトの体内で代謝された成分が多数含まれているが、多くは構造決定がされていない未知の成分である。代謝産物の迅速な同定・構造解析を行い、その多様な代謝産物の由来や機能性を解明する技術へのニーズが、生物理解のみならず農業や食品産業、天然物創薬などの応用分野まで高まりつつある。日本は、地下資源は乏しいものの、地理的特徴から生物多様性が高く¹⁾、固有種も多いため^{2, 3)}、それら生物が作り出す代謝産物資源は豊富に潜在していることから、わが国にとって重要な技術と言える。

代謝産物の構造解析にはX線結晶構造解析、NMRなどの技術が適用できるが、タンパク質と異なり遺伝子配列情報が代謝産物の化学構造に反映されないことから、その解析対象とする新規の代謝産物を天然試料から探索する必要がある。代謝産物の多くは試料中の含有量が微量であり、解析に必要な純品を得るのに時間的・費用的に高いコストを要し、また、新規性のない結果となるリスクも伴う。このため、構造解析に値する代謝産物をいかに効率よく探索するかが大きな課題となっており、試料に含まれる代謝産物の全体像（メタボローム）を検出する技術（メタボロミクス）が期待されている。メタボローム解析は、がんのメカニズムや薬物応答などの生物応答を代謝の変動から解析することを目的として、数個から数百個の既知の成分を定量的・特異的に検出する「ターゲット分析」と、数千個から数万個にも及ぶなるべく広範囲の代謝産物を未知の成分を含めて網羅的に検出する「ノンターゲット分析」の大きく2つに分類される。本節では、構造解析対象の探索に用いられるノンターゲット・メタボローム解析を主に扱う。

【研究開発の動向】

【生体高分子】

• 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。米国Thermo Fisher Scientific社（以下TFS社）の300 kV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に限られており、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かつ高出力（200-300 kV）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、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。2022年10月の時点で、自動試料交換装置、DEDを兼ね備えた200-300 kVのクライオ電子顕微鏡は、東京大学に5台、大阪大学に5台設置されているのをはじめ、国内に20台以上設置されている。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ET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（トモグラム）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、Danev（東京大学）によって開発されたボルタ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いる。さらに、サブトモグラム平均化と呼ばれる解析手法によって、数多くのトモグラムから目的分子のみを抽出して平均化を行うことで高分解能化し、*in situ*での立体構造を解析するケースもある。試料の厚みが1 μmを超えると電子線が通らなくなるため、細胞のクライオET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200 nm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、国内でも東京大学と大阪大学、理化学研究所・横浜と播磨などに設置されている。さらに最近になり、プラズマイオンを利用した装置が開発されたことで、FIB-SEMにおいて最も問題となってきたスループットの向上が期待されており、国内における導入も待たれるところである。

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日本電子（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、日本電子社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。当時TFS社の商用機が搭載していなかった冷陰極電界放出型電子銃（cold FEG）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⁴⁾。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イ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年には実験機により分解能の世界記録を

1.22 Åに更新したことから^{5,6)}、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。

• 溶液NMR

溶液NMRによる生体高分子の解析では、難易度は対象系のサイズに大きく依存する。従来は、核オーバーハウザー効果(nuclear Overhauser effect: NOE)と呼ばれる約6 Å以内の短距離の距離情報が主として用いられており、希薄溶液中の比較的分子量分子の立体構造解析に関しては、手法は概ね確立している。解析過程は、①NMR信号の帰属、②NOEなどの立体構造情報の取得とこれを用いた立体構造計算、の2段階に分けられ、前者はFLYAソフトウェア⁷⁾、後者は、CYANA⁸⁾、Xplor-NIH⁹⁾などのソフトウェアを用いれば、現在では大部分の過程が自動化されており、比較的容易に高精度の立体構造を得ることができる。近年、深層学習の手法を採り入れることにより、上記過程を完全自動で迅速におこなう手法(ARTINA¹⁰⁾)も発表され、情報科学技術の利用によりデータ解析の迅速化・自動化が著しく進歩している。

よりサイズの大きな高分子量タンパク質や高分子複合体、IDP/IDRの解析においては、NOE情報よりも長距離で大域的な構造情報も必要となる。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)が、長距離(~40 Å)で大域的な情報として利用できる。常磁性中心を導入した試料の調製法や、NOE情報に加えてRDC/PRE/PCS情報も用いる立体構造計算法などの要素技術の開発も急速に進んでいる。

一方、生体高分子の動的な性質やその変化を知ることが、様々な生命現象の理解に役立つことが認識されてきたことにより、他の手法では得にくい構造ダイナミクスの解析、構造アンサンブルの分布の導出、存在比の低い分子状態(レアイベント)の検出といった、溶液NMRならではの情報が注目されている。これら情報を得るための、緩和分散(relaxation dispersion)法¹¹⁾や化学交換飽和移動(chemical exchange saturation transfer: CEST)法¹²⁾といった計測手法は、現在も開発・改良が進んでいる。また、LLPSの足場・骨格となるIDP/IDRやRNAは、単独では一定の立体構造を有しないことも多いため、LLPS形成における分子間相互作用の解析にNMRは好適な手法となっている¹³⁾。

また、安定同位体標識により選択的に、かつ、非破壊に、対象を観測できる溶液NMRの利点を活かし、生細胞中の生体高分子を解析するin-cell NMRは、構造生物学における新しい潮流として引き続き注目されている。当初大腸菌¹⁴⁾やアフリカツメガエル卵母細胞¹⁵⁾に用いられた本手法は、その後の様々な要素技術開発により、現在では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^{16,17)}。研究の方向性は、①物理化学的な興味に基づき、分子混雑する細胞内環境下において、分子拡散の制限や非特異的で過渡的な相互作用が、立体構造とその安定性や動的平衡へ及ぼす影響を解析するもの、②個別の生命現象を担う分子機構を、実際の細胞内環境において解析することで理解しようとするもの、の2つに大別される。

NMR信号の感度は磁場強度の3/2乗に比例し、複雑な生体高分子に有効ないくつかの計測法は高い磁場において効果を発揮することから^{18,19)}、安定性や溶解度などに問題があるいわゆる「解析困難な試料」の測定には、高磁場のNMR装置が必須である。効率よい高磁場装置の維持管理運営には、専門的知識・経験を備えた人材を有する中核的研究基盤が適しており、基盤として整備された高性能装置を、広く外部利用者が共用するのが一般的になりつつある。

溶液NMR装置を開発・販売している企業としてはドイツBruker社と日本電子社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(1.2 GHz)やcryogenic probeheadの開発を行ったBruker社が優位なシェアを誇っている。

その他、生体高分子の構造解析で使われる手法として、X線結晶構造解析と高速AFMがある。

X線結晶構造解析の分野は、日本は歴史的に強く、SPring-8、高エネルギー加速器研究機構 (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いる。世界の主だった放射光施設では低エミッタンス化 (高輝度化) へのアップグレードが進められている。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、かつ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。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²⁰⁻²²⁾。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。

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最高15フレーム/秒で走査できる高速AFMが開発された²³⁾。生体高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高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²⁴⁾ や力覚センシング分子の構造の力依存性の観察²⁵⁾ といった事例が注目されている。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が、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。

【代謝産物】

2000年頃から広まったメタボローム解析では、多様な物理化学的性質をもつ化合物を分離するためのクロマトグラフィー等の分離装置と、化合物の質量を高精度かつ高感度に検出できる質量分析装置 (MS) の組み合わせが主に用いられる。近年ではフーリエ変換型や飛行時間型のMSの普及により、質量誤差1~10 ppm程度の精密質量計測が可能となり、代謝産物の元素組成の推定や、既知化合物の理論質量と照合した候補化合物の絞り込みが可能となってきた。しかし、同じ質量と同じ元素組成でも立体構造が異なる異性体が存在するため、化合物の推定では、質量値のほかに、クロマトグラフィー等の分離時間や、MS装置内で化合物を開裂させて生じた複数の部分断片の質量値 (マススペクトル) などの情報が総合的に用いられる。最終的な同定には、構造が決定された精製標品と比較し、これらの特徴量が一致することを確認しなければならないが、市販で入手できる精製標品は多くて4,000種類程度であり、既知の天然物の数 (30万件程度) と比較しても圧倒的に少ない。精製標品が入手できない場合は、自ら精製や有機化学合成を行って構造決定をする必要があるため、いかに解析対象として見込みのある代謝産物を絞り込むかがメタボロミクスの大きな課題となっている。

解析対象を絞り込むアプローチとして、化合物の構造情報を反映したマススペクトル情報が古くから活用されており、多数の精製標品のマススペクトルをライブラリー化して化合物の簡易的な同定 (推定) に用いられてきた。揮発性成分の分析に適したガスクロマトグラフィー (GC) -MSは、再現性が高く装置間のバラつきも少ないのに対し、生物が作り出す多様な水溶性・脂溶性成分の分離に適した液体クロマトグラフィー (LC) -MSやキャピラリー電気泳動 (CE) -MSでは装置条件によって差が大きいという課題があったことから、様々な条件で得られた精製標品のマススペクトルを広く収集・公開するデータベースMassBankが京都大学の西

岡により開発された²⁶⁾。世界標準のライブラリーとしてMassBankや米国スクリプス研究所のMETLINなどが提供されているほか、各質量分析メーカーが提供するライブラリーもあり、その選択肢と登録化合物の数は近年大幅に拡大されつつある。

マススペクトルは、元の化学構造を推定するための情報としても利用され、2010年頃から推定のための情報処理技術が精力的に開発されている。ライブラリーとして提供されている精製標品のマススペクトルと個々の化学構造の関連性を機械学習によりモデル化する方法や、原子間の結合エネルギーを計算し開裂しやすい構造を推定する方法、特定の化合物群について経験的な開裂ルールを適用する方法などが考案されてきた。特に質量分析による開裂（フラグメンテーション）の法則性については、愛知教育大学の中田らが確立した基礎理論をベースとしたソフトウェアMS-FINDERが、東京農工大学の津川らにより開発され、世界的に活用されている²⁷⁾。さらに、従来のアプローチでは難しかった、全く新規な化学構造を持つ未知化合物の予測に対しては、マススペクトルの類似度から既知化合物の代謝物や修飾物であるかを解析するMolecular Networkingという手法が開発され²⁸⁾、米国のGlobal Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) というコミュニティがウェブサイトとしてサービスを提供している。

ゲノム科学分野と同様に、世界中で得られたメタボローム解析データを国際コンソーシアムに集積し、共有する取り組み行われている。米国NIHのMetabolomics Workbench、欧州EBIのMetaboLightsが2012年頃から運営されており、2020年からは日本のDDBJでもMetaboBankの運用が始まった。また、GNPSにより、精製標品以外の生体・食品・環境試料等で観測されたマススペクトルと比較できるシステムMASSTが2019年に開発され²⁹⁾、さらに、マススペクトルの試料の特異性から、着目すべき未知化合物のマススペクトルを探索できる取り組みも開始した (ReDU)³⁰⁾。しかし、異なる装置条件間でのデータの比較が難しいという宿命的な特性から、集積された非精製標品のメタボロームデータを試料横断的に大規模に再利用して知識発見に至ったという例は、現在のところ報告されていない。

代謝産物の構造解析には、X線結晶構造解析とNMRに加え、東京大学の藤田らが開発した結晶スポンジ法や電子顕微鏡を利用した電子回折法 (Micro Electron Diffraction: MicroED) が適用される。結晶スポンジ法は、直径0.5–1 nmの細孔が規則的に並ぶ格子状結晶である結晶スポンジを用い、細孔に目的化合物を吸収させてX線結晶構造解析を行なう手法で、数 μg 以下の極少量の試料から構造決定が可能である。MicroED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。NMRでは構造決定の難しかったような化合物に関しても比較的簡単に1 Åを超え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・薬学分野で注目が高まっている。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

【生体高分子】

• クライオ電子顕微鏡

単粒子解析の分解能は、継続的な技術開発により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^{5, 6)}。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、標準試料とはいえずに「真の原子分解能」に到達したと言える。さらに、電子線回折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³¹⁾、小分子化合物などに比べると分解能は低く、実用

化のためにはさらなる技術開発が必要である。

分子量10万以下の低分子量ターゲットでも構造解析を行うための技術開発も進む。ボルタ位相板の使用により、X線結晶構造解析の得意な分子量に肉薄した結果も報告されている^{32, 33)}。高分解能の情報が失われるという難点があり、最近ではボルタ位相板を使用せずとも、ヘモグロビンやストレプトアビジンのような分子量5~6万程度の分子の構造を解くことができることが示されたことから³⁴⁾、現在では単粒子解析への使用は推奨されていない。それ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³⁵⁾、2020年に試験運用が始まった。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。

クライオ電子顕微鏡がより汎用な計測解析技術となるための技術的なボトルネックの1つが、急速凍結による試料グリッド調製法の再現性の低さであったが、近年改良が進んでいる。観察試料の凍結は、観察試料を含む水溶液をグリッド(専用ホルダー)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かった。それに対し、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、そういった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、試料の厚みを適切にコントロールする、TTP Labtech社のChameleon、CryoSol社のVitroJetなどの次世代型の試料凍結装置が販売されるようになった。いずれも数千万円と非常に高価なことから、国内においても共用施設における設置が望まれる。

また、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³⁶⁾、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。

これらの技術的な進展を背景に、クライオ電子顕微鏡による構造解析の対象は、より生体内に近い状態の分子構造へとシフトしてきている。たとえば、単粒子構造解析においても、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を用いたりするなど試料調製の工夫によって、線虫やマウスの生体で形成されるタンパク質複合体の構造解析を行った報告も見かけるようになってきた³⁷⁻⁴⁰⁾。クライオETについては、高分解能化が進んでおり、生体内で生じる分子や分子間相互作用を直接可視化できるようになっている。最近では、細胞中でのリボソーム構造を3-4 Åという高分解能で明らかにして翻訳過程における複数ステップの構造変化を明らかにしたり⁴¹⁻⁴³⁾、SARS-CoV2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⁴⁴⁻⁴⁶⁾。一方で、クライオETの汎用性については課題があったものの、TFS社から販売されている専用のFIB-SEM装置の改良が進み、クライオETを適用した細胞内での構造解析の報告が増えてきている。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。

• 溶液 NMR

溶液 NMRによる新しい知見の発見として顕著なものとしては、LLPSの解析を含むIDP/IDの解析、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^{47, 48)}、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。

LLPSの解析では、NMR情報にくわえて、X線小角散乱(SAXS)や1分子FRET(smFRET)の情報を組み合わせることにより、構造アンサンブルの定量的な解析がなされ⁴⁹⁾、分子動力学シミュレーション(MD)との組合せによりLLPS形成機構のモデルが提唱される⁵⁰⁾など、他手法との統合的解析が進んでいる。

真核細胞内の生体高分子の構造動態解析では、神経変性疾患原因タンパク質の細胞膜脂質表面への結合の解析⁵¹⁾や解糖系酵素に内在する解糖流量をタンパク質レベルで制御する機構の解明にも活用され⁵²⁾、細胞内での薬剤との相互作用解析⁵³⁾もなされるようになってきた。また、in-cell NMR法はこれまでタンパク質解析への活用が先行してきたが、近年RNA⁵⁴⁾やDNA⁵⁵⁾といった核酸も解析対象となっており、様々な知見が得られるようになってきている。

以上のような先端的な溶液NMR解析を可能にする要素技術の開発も進み、深層学習を採り入れた信号帰属と構造計算の完全自動化¹⁰⁾等情報科学的手法の適用が進みつつあるほか、in-cell NMRにおいては、細胞内へのタンパク質導入法の新たな開発⁵⁶⁻⁵⁸⁾などが引き続きおこなわれている。

さらに近年、超高磁場磁石や超高速試料回転など装置技術の進展により、固体NMRの信号分解能が著しく向上したことにより、半固体や固体状態にある生体高分子、特に膜タンパク質や繊維状タンパク質の解析への適用が進んでいる⁵⁹⁾。

1 GHz以上の超高磁場NMRの整備に関しては、継続的に設備整備を進める欧州・カナダや、NSFによる中規模研究設備支援プロジェクトにより1.1-1.2 GHz級装置の導入が進みつつある米国に加えて、韓国や最近急速に設備整備が進む中国に対しても、日本は大きく出遅れている。現存する最高磁場のNMR装置(1.2 GHz)は2020年に導入が開始され欧州に8台が導入済みであり、今後欧州に4台、米国に1台、韓国に1台がそれぞれ導入予定であるが、日本では、アカデミアだけではなく産業界からも強い要望がある⁶⁰⁾ものの導入計画はいまのところない。

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AIが注目を集めている。DeepMind社が開発した、深層学習モデルを利用した構造予測プログラムAlphaFold2の登場とその能力は、構造生物学研究を大きく変化させる潜在力を有している。AlphaFold2や後発の類似プログラムの登場によって、実験的に構造決定に至っていなかった無数の生体分子に関しても、簡単に構造情報が取得できるようになっており、すでにUniProtのようなデータベース上ではアミノ酸配列と並んで公開されるようになってきている。しかしながら、これらの予測構造はいまだに精度の面で問題があり、タンパク質の取りうる構造変化に関する情報も限定的であることから、実験的に決定された構造との乖離も指摘されている⁶¹⁾。実験的に得られたNMR情報を取り込むことにより予測精度が向上することも示されており⁶²⁾、予測情報と実験情報を統合した立体構造解析手法は今後の進展が大いに期待される。また、NMRでは、構造ダイナミクスの解析、構造アンサンブルの分布の導出、レアイベントの検出といった、様々な生命現象の理解に役立つ生体高分子の動的な性質やその変化に関する情報を得られるため、構造予測法と相補的な関係にあり、これまで難しかった立体構造情報と動的情報の統合的な解析手法の開発が大いに期待される。

【代謝産物】

構造解析の対象とする代謝産物を探索する上では、世界中の異なる装置条件で取得したデータを集積・共有するのではなく、中央集約的に比較可能なデータを生産することが重要であるとの認識が広がりつつある。集約的なデータ整備とその活用について、FoodMASSTやXMRsの報告が近年なされている。

• FoodMASS

マススペクトルにおける装置条件依存性の課題に対処するため、一つの分析手法を定めて約3,600の様々な食品を分析したデータセットを準備し、マススペクトルの試料特異性を評価できるシステムを米国GNPS⁶³⁾が構築した。

• XMR

マススペクトル情報を利用するもう一つの課題は、比較に使用できる信頼のおけるマススペクトル情報を、試料に含まれるすべての検出化合物について、特に検出強度の低い化合物まで網羅的に得ることが難しい点である。そこで、マススペクトルだけではなく、より網羅的に確実に計測が可能な、化合物の開裂前の質量を

比較する手法が、櫻井（国立遺伝学研究所）らにより提唱されている（万物メタボロームレポジトリファミリー、XMRs）⁶⁴。

構造解析技術では、X線構造解析やNMRと補完的な手法であるMicroEDが注目を集めている。これまでは従来の透過型電子顕微鏡が用いられてきたが、MicroEDの解析に特化した装置XtaLAB Synergy-EDが日本電子社とリガク社により共同開発され、構造解析の効率向上が期待される。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

ハイエンドのクライオ電子顕微鏡や高性能NMRをはじめとした共用装置の整備・維持は、AMEDによる「生命科学・創薬研究支援基盤事業（BINDS）」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、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。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。クライオ電子顕微鏡購入のための大型予算の動きは、以前に比べると落ち着いた感があるが、地域によってはまだその動きは活発である。また、国内でもここ2-3年で設置が進んでおり、生理研にcold FEG搭載のKriosが設置されたほか、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た。北海道大学においては、世界的に見ても珍しいBSL3施設内への導入もなされた。これらの施設においては、ユーザーを含めたコミュニティ形成の核となり、ユーザーと施設の相互のレベル向上につながるような運用が求められる。

NMRについては、共用施策で先行する欧州で欧州委員会が先導する形で基盤のネットワーク化（分散的研究基盤の形成）が進み、統合的構造生物学研究組織「Instruct」を主体としたプロジェクトを通じて、生命科学分野の研究課題に対して、高性能NMR装置を含む多数の先端的研究設備の共用が進む。日本でも基盤のネットワーク化が進み、AMED-BINDSのほか、文部科学省「先端研究基盤共用促進事業」の支援を受けた「NMRプラットフォーム」が科学分野全般に対して先端的NMR研究設備を共用している。一方、中国、韓国、カナダでは少数拠点への集中的投資・整備を進めている。米国では、中規模研究設備（2,000万-7,000万ドルレンジ）の重要性が再認識され投資が再開された結果、小規模ながらも基盤間のネットワーク形成が進みつつあるが、他国と比べて拠点形成の動きは依然として弱い。

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、1.3 GHz NMR用のマグネット開発を行なっている。

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国内外のプロジェクトとして、以下のような事例が挙げられる。

- ・2020年初頭より流行したCOVID-19パンデミックに対応して、全世界的に大小数多くのプロジェクトに対して緊急的なファンディングがなされた。NMR領域では、例えば欧州Horizon-2020フレームワーク下のiNEXT-Discoveryプロジェクトを活用し、18ヶ国の研究者が参加したCOVID19-NMR project⁶⁵が推進されている。
- ・英国のCCPN (common computational project for NMR)⁶⁶は、生体高分子のNMR解析データの統合と革新を目指したプロジェクトである
- ・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: 嶋田一夫・理化学研究所) のほか、新学術領域研究「生命金属科学」(代表: 津本浩平・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。

(5) 科学技術的課題

【生体高分子】

• クライオ電子顕微鏡

クライオ電子顕微鏡の汎用化のための重要なポイントが、顕微鏡動作を駆動する自動撮影ソフトの高度化や簡易化である。特に、撮影に適した場所はいまだに人の目で決めて判断しており、良質のデータを得るためには一定の熟練が必要である。AIなどを活用した自動化の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が、操作性などの面では改善の余地がある。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。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により決定された立体構造を適性に評価する手法もまだ確立されていない。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。日本としては、世界の構造生物科学の潮流に遅れないよう TFS 社の最新鋭機の導入を継続すると同時に、国内メーカーの競争力に資するような撮像・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。

• 溶液 NMR

NMR 測定に関して科学技術、研究開発上の課題としては、ハードウェア面では、まず、引き続きより高磁場の NMR 磁石の開発と、同技術を活用した磁石の小型化があげられる。また、動的核偏極法 (dynamic nuclear polarization: DNP) の積極的な利用により、特に生体高分子の溶液 NMR の感度上昇の達成が求められている。ソフトウェア面では、情報科学的な手法の積極的な活用により、迅速な測定の実現や従来困難だった情報の抽出が望まれる。前者に関しては、計測法自体の技術向上のみならず、最適な実験パラメータの導出など実験計画的アプローチの寄与も大きい。実際、近年、情報科学手法によるデータ処理法の導入 (不均一サンプリング法) により、従来長時間を要した多次元 NMR 測定は大幅に短縮されているが、今後も発展の余地が残されている。

今後注目される研究対象の1つは、核酸、とくに RNA である。IDP/IDR 同様に RNA が単独では一定の立体構造を有しないことも多いため、LLPS 形成における分子間相互作用の解析にとって NMR は適した手法であるのに加え、対 COVID-19 ワクチンとして mRNA ワクチンが有効性を示したことも理由である。

生細胞中 (特に真核細胞中) の NMR 解析は依然として注目度の高い研究対象である。特に、細胞レベルより上位の組織・臓器レベルでの解析と繋がることで生物学的に意味のある情報を得るためには、幹細胞や初代培養細胞、疾病の背景を持つ細胞、さらにはオルガノイドを用いた「よりリアルな系での *in situ* 解析」が必要であり、今後の展開が大いに注目される。個体差、民族差、国家・地域差と疾病発症メカニズムの関係、遺伝的要因や環境要因の寄与を分子レベルで理解することを実現する潜在力があり、医薬品開発にも貢献しうる可能性があり、今後も大いに期待される。

国内において NMR を用いた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、製薬業界からは

更なる強化を求める声があり⁶⁰⁾、欧州 Instructのような医学系の研究機関やバイオバンクとの拠点間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。

【代謝産物】

構造解析すべき代謝産物候補を効率よく探索するための中央集権的なデータ整備に向けた、FoodMASSTやXMRsのような取り組みは近年始まったばかりであり、このような比較可能なデータセットが各国独自の生物素材等を用いて構築されることが必要である。そのためには、(1) 限定した条件を定め比較可能なデータを安定して生産することに特化し、(2) 試料の多様性を積極的に増やすことができる、これまでにはない新しい分析拠点の整備が必要である。わが国のメタボローム解析のファシリティーは、アカデミアでは各分析装置を所有する大学の研究室や共同利用施設が散在し、民間では香り分析、一次代謝分析、脂質解析、ノンターゲット解析、MSイメージングなど、各目的に特化した受託分析サービスが10社程度存在している状況である。したがって、個別的分析ニーズに応えることはできるが、新しい分析拠点の機能は十分に果たせない。新しい分析拠点は、こうした国内の個別ファシリティーや構造解析技術と相補的に機能し、相乗的に化合物の利活用と技術水準の向上効果が見込まれることから、XMRsを大規模に拡大するようなデータ生産拠点の整備が今後重要である。米国では、FoodMASSTを構築したカリフォルニア大学ロサンゼルス校(UCLA)のコミュニティが、今後のデータ拡大をけん引する有力な候補である。中国では、MetWare社というベンチャー企業が、様々な分析装置を備えたメタボローム解析の拠点として成長しており、近年の論文で頻繁に登場するようになった。蓄積したデータを一般公開していないが、解析候補の探索に十分な機能を果たしている可能性がある。

(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。たとえばダイナミクス解析を例に挙げても、クライオ電子顕微鏡、X線自由電子レーザー、NMR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、共用拠点での運用が望ましい。

また、代謝産物においても、共用拠点が重要である。代謝産物の構造解析を進めるためには、探索のためのデータ生産拠点に加えて、天然物精製と構造解析を実施できる機関との円滑な連携体制の構築が必要である。特に、代謝産物の構造解析は、新規の化合物であることが明らかでない場合は、精製および構造決定にかかる研究予算(民間に委託する場合は数百万円レベル)の確保が難しく、また構造解析に必要な装置の導入・維持もコストが大きい。この点が新規な代謝産物の構造決定における最大の律速ともいえる。したがって理想的には、その後の精製および構造解析の機能が探索のためのデータ生産拠点と一体化したものと整備されることが望ましい。

そのような共用拠点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。特に、高度に専門的な知識と技術をもったスタッフの安定な確保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い。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。資金面では、シンクロトロンのような大型施設の持つ重要性や国際的な競争力への影響はいまだに大きい一方で、他の手法における解析対象の広がりや普及状況を考えると、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。また、COVID-19パンデミックによる地域間移動の制限は、拠点から遠い地域を中心として、

先端的な装置や技術への物理的なアクセスを困難にしてしまい、先端装置への地域間アクセス格差という課題を顕在化させた。拠点の更なる整備による地域中核拠点の形成が重要であるとともに、COVID-19後の新たな常態に適した新たな利用方法（遠隔利用や自動化技術活用）の強化も必要となる。

アジアを中心とした需要増加に対して、製造設備の障害による稼働停止と海上輸送の停滞により近年常態化していたヘリウム供給不足と価格高騰は、COVID-19パンデミックとロシアのウクライナ侵攻によりさらに状況が悪化し、その解消には長期間を要すると想定されている。超電導磁石に必須なヘリウム状況の悪化は、NMR領域にとって極めて深刻である。中核的拠点の多くはヘリウムガス液化能力を備えており、ヘリウム危機への対応力を有することからも、とくに高磁場NMR装置の活用における中核的拠点の果たす役割はさらに大きくなっている。

代謝産物から解析の対象とすべき分子を探索する上では、これまで述べてきた探索技術の開発に加えて、多様な試料を入手するための、学会や産業界等との連携も重要である。

(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"> ・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。 ・[クライオ電子顕微鏡] 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。 ・[溶液NMR] 膜タンパク質（特にGPCR）の解析やin-cell NMRにおいて世界を牽引するような研究成果が報告されている。 ・[ノンターゲット・メタボローム] MS-FINDERソフト、XMRsデータベースなど、世界をけん引する成果が上がっている。
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> ・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。 ・[クライオ電子顕微鏡] 日本電子社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。 ・[溶液NMR] NMR解析は、中分子創薬における構造解析、細胞内を含めたタンパク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（中外やエーザイなど）においても、NMR解析を積極的に活用している。
米国	基礎研究	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> ・[クライオ電子顕微鏡] 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。 ・[溶液NMR] 主要大学・研究機関に有力な生体系NMR研究グループが存在し、IDP/IDRの解析やレイイベントの検出法、LLPSのNMR研究で世界を牽引している。また、細胞内環境下のタンパク質の物性を解析している有力なグループがある。 ・[ノンターゲット・メタボローム] GNPSコンソーシアムにおいて、マススペクトルを中心に未知化合物解明の基盤技術の進展が大きい。
	応用研究・開発	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> ・[クライオ電子顕微鏡] 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。 ・Pfizer、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。 ・[溶液NMR] NMRを主要なツールとして、Fragment-based drug discovery (FBDD) など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 Initiative⁶⁷⁾など）。

2.3 俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

欧州	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・[クライオ電子顕微鏡] 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に共同利用拠点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。 ・[溶液NMR] 主要国の主要大学・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。他の構造解析手法との統合的解析やin-cell NMRに関する要素技術開発を精力的に進めるグループがある。「Instruct」を中核としてNMR拠点の組織化・ネットワーク化が進み、また、最高性能蔵置(1.2 GHz)の導入が多数進んでいる。 ・[ノンターゲット・メタボローム] ドイツにおいてマスペクトルによる構造予測ソフトウェアの改良が続けられている
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> ・[クライオ電子顕微鏡] オランダにクライオ電子顕微鏡の研究拠点をおく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。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ソフト、ハード両面の開発が行われている。 ・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。 ・[溶液NMR] ハードウェア面の開発で業界を牽引するBruker社の拠点がスイスにあり、大学・研究機関との積極的な共同研究により、技術の加速を牽引している。 ・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いる。 ・[ノンターゲット・メタボローム] 植物・微生物由来の天然物や、それらを人工的に修飾した化合物を大規模に精製・販売する企業(AlytiCon Discovery社)などがあり、構造解析後の化合物の活用に有利である。
中国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・[クライオ電子顕微鏡] 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、上海国立タンパク質科学センター等、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。 ・[溶液NMR] 一定数のアクティブなNMR研究グループが存在している。数力所の中核拠点の拡充が進む。 ・[ノンターゲット・メタボローム] 植物分野で、生薬の産地判別、品質評価などのマーカー化合物探索などでの活用が近年多い。
	応用研究・開発	△	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・[クライオ電子顕微鏡] 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。 ・[ノンターゲット・メタボローム] ベンチャー企業(MetWare社)が国内の分析ニーズの受け皿となる拠点として機能している。
韓国	基礎研究	△	→	<ul style="list-style-type: none"> ・[クライオ電子顕微鏡] 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。 ・[溶液NMR] 一定数のアクティブなNMR研究グループが存在している。少数の中核拠点への集中投資が進む。最高性能蔵置(1.2 GHz)の導入が決まっている。
	応用研究・開発	×	→	<ul style="list-style-type: none"> ・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

2.3

俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

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) C. Marchese, "Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept", *Global Ecology and Conservation* 3 (2015) : 297-309. doi: 10.1016/j.gecco.2014.12.008
- 2) 平成25年版 環境白書/循環型社会白書/生物多様性白書 <https://www.env.go.jp/policy/hakusyo/h25/pdf.html> (2023年2月16日アクセス)
- 3) 野中健一「離島大国『日本』における微生物創薬の現状と可能性」『化学と生物』57巻2号 (2019) : 108-114. doi: 10.1271/kagakutoseibutsu.57.108
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) E. Schmidt and P. Güntert, "A new algorithm for reliable and general NMR resonance assignment", *J. Am. Chem. Soc.* 134, 30 (2012) : 12817-12829. doi: 10.1021/ja305091n
- 8) P. Güntert and L. Buchner, "Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA", *J. Biomol. NMR* 62 (2015) : 453-471. doi: 10.1007/s10858-015-9924-9
- 9) J. P. Linge, S. I. O'donoghue and M. Nilges, "Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA", *Methods in Enzymology* 339 (2001) : 71-90. doi: 10.1016/s0076-6879 (01) 39310-2
- 10) P. Klukowski, R. Riek and P. Güntert, "Rapid protein assignments and structures from raw NMR spectra with the deep learning technique ARTINA", *Nat. Commun.* 13 (2022) : 6151. doi: 10.1038/s41467-022-33879-5
- 11) J. P. Loria, M. Rance and A. G. Palmer, "A Relaxation-Compensated Carr – Purcell – Meiboom – Gill Sequence for Characterizing Chemical Exchange by NMR Spectroscopy", *J. Am. Chem. Soc.* 121, 10 (1999) : 2331-2332. doi: 10.1021/ja983961a
- 12) P. Vallurupalli, G. Bouvignies and L. E. Kay, "Studying "invisible" excited protein states in slow exchange with a major state conformation", *J. Am. Chem. Soc.* 134, 19 (2012) : 8148-8161. doi: 10.1021/ja3001419
- 13) A. C. Murthy et al., "Molecular interactions underlying liquid-liquid phase separation of the FUS low-complexity domain", *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26 (2019) : 637-648. doi: 10.1038/s41594-019-0250-x
- 14) Z. Serber et al., "High-resolution macromolecular NMR spectroscopy inside living cells", *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10 (2001) : 2446-2447. doi: 10.1021/ja0057528
- 15) T. Sakai et al., "In-cell NMR spectroscopy of proteins inside *Xenopus laevis* oocytes", *J. Biomol. NMR* 36 (2006) : 179-188. doi: 10.1007/s10858-006-9079-9
- 16) E. Luchinat, M. Cremonini and L. Banci, "Radio Signals from Live Cells: The Coming of Age of In-Cell Solution NMR", *Chem. Rev.* 122, 10 (2022) : 9267-9306. doi: 10.1021/acs.

chemrev.1c00790

- 17) F. X. Theillet and E. Luchinat, "In-cell NMR: Why and how?" *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 132-133 (2022) : 1-112. doi: 10.1016/j.pnmrs.2022.04.002
- 18) K. Pervushin et al., "Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 23 (1997) : 12366-12371. doi: 10.1073/pnas.94.23.12366
- 19) K. Takeuchi et al. "Nitrogen detected TROSY at high field yields high resolution and sensitivity for protein NMR", *J. Biomol. NMR* 63 (2015) : 323-331. doi: 10.1007/s10858-015-9991-y
- 20) 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
- 21) 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
- 22) M. Suga et al., "An oxyl/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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) H. Horai et al., "MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences", *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) : 703-714. doi: 10.1002/jms.1777
- 27) H. Tsugawa et al., "Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software", *Anal. Chem.* 88 (2016) : 7946-7958. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00770
- 28) M. Wang et al., "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking", *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) : 828-837. doi: 10.1038/nbt.3597
- 29) M. Wang, et al., "Mass spectrometry searches using MASST", *Nat. Biotechnol.* 38 (2020) : 23-26. doi: 10.1038/s41587-019-0375-9
- 30) A. K. Jarmusch et al., "ReDU: a framework to find and reanalyze public mass spectrometry data", *Nat. Methods* 17 (2020) : 901-904. doi: 10.1038/s41592-020-0916-7
- 31) K. Yonekura, T. Ishikawa and S. M. Yonekura, "A new cryo-EM system for electron 3D crystallography by eEFD", *J. Struct. Biol.* 206, 2 (2019) : 243-253. doi: 10.1016/j.jsb.2019.03.009
- 32) M. Khoshouei et al., "Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate", *Nature Communications* 8 (2017) : 16099. doi: 10.1038/ncomms16099
- 33) X. Fan et al., "Single particle cryo-EM reconstruction of 52 kDa streptavidin at 3.2 Å resolution", *Nature Communications* 10 (2017) : 2386. doi: 10.1038/s41467-019-

10368-w

- 34) Y. Han et al., "High-yield monolayer graphene grids for near-atomic resolution cryoelectron microscopy", PNAS 117, no. 2 (2020) : 1009-1014. doi: 10.1073/pnas.1919114117
- 35) O. Schwartz et al., "Laser phase plate for transmission electron microscopy", Nature Methods 16, no. 19 (2019) : 1016-1020. doi: 10.1038/s41592-019-0552-2
- 36) V. P. Dandey et al., "Time-resolved cryo-EM using Spotiton", Nature Methods 17 (2020) : 897-900. doi: 10.1038/s41592-020-0925-6
- 37) F. Vallese et al., "Architecture of the human erythrocyte ankyrin-1 complex" Nat. Struct. Mol. Biol. 29 (2022) : 706-718. doi: 10.1038/s41594-022-00792-w
- 38) X. Xia, S. Liu and Z. H. Zhou, "Structure, dynamics and assembly of the ankyrin complex on human red blood cell membrane", Nat. Struct. Mol. Biol. 29 (2022), 698-705. doi: 10.1038/s41594-022-00779-7
- 39) S. Lin et al., "Structure of a mammalian sperm cation channel complex", Nature 595 (2021) : 746-750. doi: 10.1038/s41586-021-03742-6
- 40) H. Jeong et al., "Structures of the TMC-1 complex illuminate mechanosensory transduction", Nature 610 (2022) : 796-803. doi: 10.1038/s41586-022-05314-8
- 41) 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
- 42) L. Xue et al., "Visualizing translation dynamics at atomic detail inside a bacterial cell", Nature 610 (2022), 205-211. doi: 10.1038/s41586-022-05255-2
- 43) M. Gemmer et al., "Visualization of translation and protein biogenesis at the ER membrane", Nature 614 (2023), 160-167. doi: 10.1038/s41586-022-05638-5
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) Y. Shiraishi et al., "Biphasic activation of beta-arrestin 1 upon interaction with a GPCR revealed by methyl-TROSY NMR", Nat. Commun. 12 (2021) : 7158. doi: 10.1038/s41467-021-27482-3
- 48) S. Kaneko et al., "Activation mechanism of the μ -opioid receptor by an allosteric modulator", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 119, 16 (2022) : e2121918119. doi: 10.1073/pnas.2121918119
- 49) S. Naudi-Fabra et al., "Quantitative Description of Intrinsically Disordered Proteins Using Single-Molecule FRET, NMR, and SAXS", J. Am. Chem. Soc. 143, 48 (2021) : 20109-20121. doi: 10.1021/jacs.1c06264
- 50) E. W. Martin et al., "Valence and patterning of aromatic residues determine the phase behavior of prion-like domains", Science 367, 6478 (2020) : 694-699. doi: 10.1126/science.aaw8653
- 51) R. S. Jacob et al., " α -Synuclein plasma membrane localization correlates with cellular phosphatidylinositol polyphosphate levels", eLife 10 (2021) : e61951. doi: 10.7554/eLife.61951

- 52) H. Yagi et al., "Molecular mechanism of glycolytic flux control intrinsic to human phosphoglycerate kinase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 50 (2021) : e2112986118. doi: 10.1073/pnas.2112986118
- 53) E. Luchinat et al., "Determination of intracellular protein-ligand binding affinity by competition binding in-cell NMR", *Acta. Crystallogr. D Struct. Biol.* 77 (2021) : 1270-1281. doi: 10.1107/S2059798321009037
- 54) P. Broft et al., "In-Cell NMR Spectroscopy of Functional Riboswitch Aptamers in Eukaryotic Cells", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 60, 2 (2021) : 865-872. doi: 10.1002/anie.202007184
- 55) T. Sakamoto et al. "Detection of parallel and antiparallel DNA triplex structures in living human cells using in-cell NMR", *Chem. Commun.* 57 (2021) : 6364-6367. doi: 10.1039/d1cc01761f
- 56) B. Zhang et al., "High-Efficient and Dosage-Controllable Intracellular Cargo Delivery through Electrochemical Metal-Organic Hybrid Nanogates", *Small Science* 1, 12 (2021) : 2100069. doi: 10.1002/smsc.202100069
- 57) F. Torricella et al., "Protein delivery to living cells by thermal stimulation for biophysical investigation", *Sci. Rep.* 12 (2022) : 17190. doi: 10.1038/s41598-022-21103-9
- 58) J. A. Gerez et al., "Protein structure determination in human cells by in-cell NMR and a reporter system to optimize protein delivery or transexpression", *Commun. Biol.* 5 (2022) : 1322. doi: 10.1038/s42003-022-04251-6
- 59) S. Ahlawat et al., "Solid-State NMR: Methods for Biological Solids", *Chem. Rev.* 122, 10 (2022) : 9643-9737. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00852
- 60) 製薬協 政策提言 2021 (2021) : 18-20. https://www.jpma.or.jp/vision/lofurc0000001as7-att/policy_recommendations2021.pdf (2023年2月16日アクセス)
- 61) T. C. Thomas C. Terwilliger et al, "AlphaFold predictions: great hypotheses but no match for experiment", *bioRxiv* (2022) : 517405. doi: 10.1101/2022.11.21.517405
- 62) Y. J. Huang, et al., "Assessment of prediction methods for protein structures determined by NMR in CASP14: Impact of AlphaFold2", *Proteins* 89, 12 (2021) : 1959. doi: 10.1002/prot.26246
- 63) K. A. West et al., "foodMASST a mass spectrometry search tool for foods and beverages", *npj Sci. Food* 6 (2022) : 22. doi: 10.1038/s41538-022-00137-3
- 64) Sakurai et al., "The Thing Metabolome Repository family (XMRs) : comparable untargeted metabolome databases for analyzing sample-specific unknown metabolites", *Nuc. Acids. Res.* 51, D1 (2022) : 660-677. doi: 10.1093/nar/gkac1058
- 65) <https://covid19-nmr.de> (2023年2月16日アクセス)
- 66) <https://www.ccpn.ac.uk/> (2023年2月16日アクセス)
- 67) <https://www.cancer.gov/research/key-initiatives/ras> (2023年2月16日アクセス)

2.3