

2024 年度年次報告書
細胞の動的・高次構造体
2022 年度採択研究代表者

大出 真央

大阪大学 蛋白質研究所
助教

実験と計算の協奏による生体分子動態解析法の開発

研究成果の概要

本年度は現時点での研究計画のうち、

①MD 参照構造を用いた cryoEM 粒子像構造推定(分類)法の確立

②植物蛋白質フィトクロム B(phyB)活性型の構造解析

双方を進めたが、特に①について特に注力して研究を進めた。

①について、2022 年度に定式化したアプローチを実装し、cryoEM 粒子像一枚ずつの構造を推定するプログラムを開発した。このプログラムを用いて、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)をテストデータとして手法の検証を実施したが、検討の結果提案手法では目的とする動態解析が困難であると判断した。主な理由としては、提案手法ではコンフォメーションが混合した状態の cryoEM マップの取り扱いが困難なためであると考えられる。そこで、「粒子像一枚ずつの構造を推定する」というアプローチを変更し、「構造多型のあるマップから主要な構造を推定する」という方針で再定式化を行なった。新たな提案手法では、研究遂行者が開発した自由エネルギー地形推定法の解析理論(Oide et al., *FEBS J.*, 2020)とスパースモデリングを組み合わせることで代表構造を推定する。新提案手法の実証として、スプライソソームのテストデータ(EMPIAR-10180)から構造多型のマップを作成し解析したところ、マイナーな構造についても精度良く存在を推定することができた。今後はこれから推定構造を初期構造として三次元構造分類を行い、実際にアンサンブル中の代表構造を実験データによって可視化する。また、この方法をノンパラメトリックベイズと呼ばれる理論と組み合わせることで、状態数を指定せずにアンサンブル中の準安定状態を一度にモデリングする解析手法としての確立を目指す。前年度に実施した、MD 計算と X 線小角散乱、NMR によるマルチドメイン蛋白質の動的構造モデリングについては論文化の最終段階にあり、早急な投稿を目指している。

②については、異動先研究室でのセットアップが完了し精製および電子顕微鏡観察を再開した。その際に、これまでの精製では見られなかったプロトマー分子量 80k 程度の蛋白質が顕著に混入するようになった。発現あるいは精製中に断片化した phyB サブユニットであれば解析に大きく影響するため、インゲル消化質量分析によって同定を行なった。その結果、大腸菌が持つ薬剤耐性因子蛋白質の一種であることが明らかになった。His タグ精製の解離イミダゾール濃度がわずかに異なることを利用するか、疎水性相互作用クロマトグラフィーによって分離を行なってより高品質な精製試料を得る予定である。