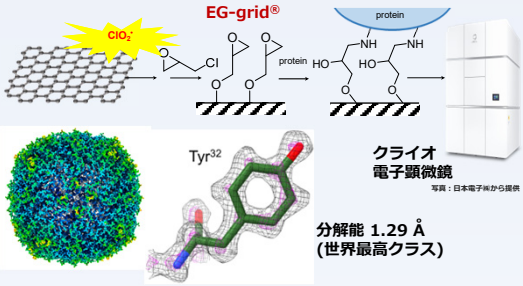
第2回JST OPERAシンポジウム

「酸化制御共創コンソーシアム」

井上 豪・大阪大学大学院薬学研究科 教授

展開２：グラフェンの酸化修飾によるクライオ電顕のツールの開発

■ EG-grid®の開発の概要



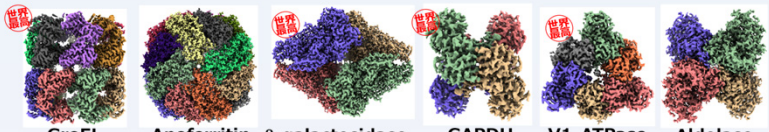
クライオ電顕（CryoEM）を用いたタンパク質の単粒子構造解析は2017年のノーベル賞の対象にもなった。結晶化が不要で、溶液状態を反映した構造を解析することができ、急速に普及しつつある．しかし、サンプル調製には未だ時間を要し、ボトルネックとなっている．

本コンソーシアムでは透明性や優れた機械的強度をもつグラフェンを、クライオ電顕に広く用いられているグリッド（Quantifoil®）上に貼り付けた状態で酸化し、導入されたヒドロキシ基に対してエピクロロヒドリン修飾を行い、タンパク質を固定化することのできる Epoxidized Graphene Grid（EG-grid®）を開発した．

EG-grid®を用いれば効率よくサンプル調製を行うことができるだけでなく、気液界面におけるタンパク質の吸着から生じる粒子の優先配向などの問題も解決することが出来ることが分かった (*Sci. Reports*, in press).

■ EG-grid®を用いて解析した構造のギャラリー

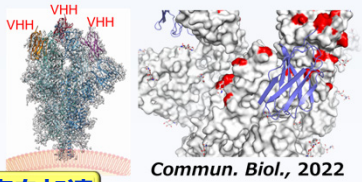
SARS-CoV-2のスパイクタンパク質と抗体の複合体では、結晶構造解析に必要なサンプル量の2000分の１の試料で済み、解析も2～3日で可能．エピトープを効率よく決定可能であり、最新の変異株であるグリフォン株やケルベロス株に対する抗体も取得済みである（未発表）．



SARS-CoV-2 スパイクタンパク質

VHH抗体複合体: 3種　データ取得後
Fab抗体複合体: 3種　2~3日で解析
変異体: 2種

新抗体の設計　BA.4/5株 (IC_{50} 0.29 μg/ml)
XBB株 (IC_{50} 0.45 μg/ml)

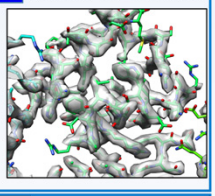


Commun. Biol., 2022

薬物探索の基盤　Gridにアポ型蛋白結合

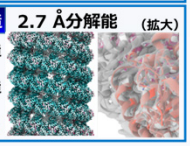
Protein X
（アポ型）
2.7 Å

分解能が1Å以上改善
薬物探索可能か調査



新規抗菌標的構造　2.7 Å分解能　(拡大)

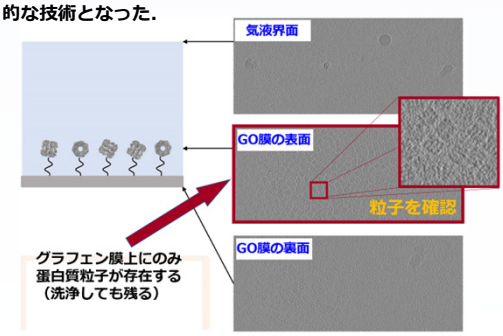
モノマーのX線構造
↓
フィラメントの構造解析は初
（１回のグリド調製）



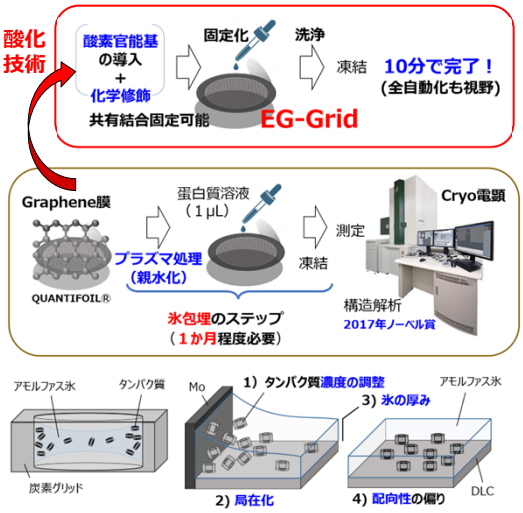
創薬研究を加速

■ 有用性-1：サンプル調製の時間の短縮

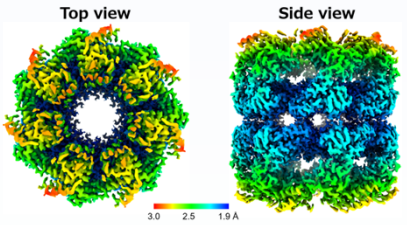
EG-grid®ではグラフェン膜上にタンパク質を固定化できることから洗浄できることから、濃度調節や気液界面へのタンパク質の吸着の問題を一気に解決できる画期的な技術となった．

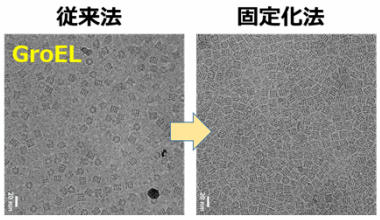


従来法では、目的とするタンパク質同士が重ならないよう粒子を程よく分散させる必要があり、濃度調節に時間を要した．また、疎水性の高いタンパク質が気液界面に吸着されることは不可避であり、疎水性の高い面を気液界面の方向に向けた粒子画像ばかりが得られるという優先配向の問題もあった．



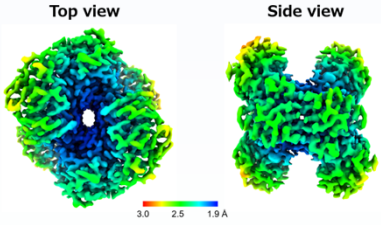
■ 有用性-２：大幅な効率化（気液界面における優先配向の回避による効率化）

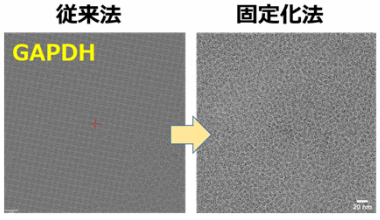




	従来法	固定化法
画像数	5,614	504
有効な粒子の割合 (%)	18.8	88.9
画像あたり有効な粒子数	37.5	314.5
分解能 (Å)	2.07	1.98

10倍の効率化





	従来法	固定化法
画像数	4,415	241
有効な粒子数	813,828	88,731
画像あたり有効な粒子数	184.3	368.2
分解能 (Å)	2.3	2.15

20倍の効率化

■ 今後の展望：

EG-grid®については販売の要望が強い．OI機構と連携して調整中である．一方、サンプル調製とデータ収集の自動化も視野入れた装置開発も進めたい．

なお、一連の応用化研究については下記の記事や、日本MA-T工業会のHPを参考にされたい．（https://matjapan.jp/）

JST News （R3年8月号）「特集2」）
https://www.jst.go.jp/pr/jst-news/backnumber/2021/202108/index.html

日経BPの宮田満氏のツイート

日本MA-T工業会

◆ポスター内容や共同研究等について問合せ：
担当者：井上 豪
E-mail: t_inoue@phs.osaka-u.ac.jp
住　所：吹田市山田丘1－6 大阪大学大学院薬学研究科 生体構造機能分析分野
電　話：06-6879-8205
HP　：https://yakubun.jp