

# マウスMPO-Fab抗体複合体モデル構築ガイドライン

## ホモロジーモデルに基づく構築時の問題点

クライオ電顕マップにホモロジーモデル（例：ヒトMPO構造）を当てはめてモデルを構築する際には、配列アラインメントの不確かさやテンプレートとの構造差による初期モデルの誤りに注意が必要です<sup>1</sup>。特にループ領域や二次構造要素の長さ・位置が異なる場合、ホモロジーモデルではこれらが不正確に再現され、極端な場合はヘリックスがループ状になるなど欠落することもあります<sup>2</sup><sup>3</sup>。そのため、一度マップに粗くフィットさせた後に、密度に合わない局所領域（ずれたループや不正確なヘリックスなど）を可視的に検出し、再構築・リファインを行うことが重要です<sup>4</sup>。また、MPOは糖タンパク質であり、テンプレート構造に含まれていない糖鎖修飾が存在する可能性があります。実際、結晶構造解析では従来構造と比較して糖鎖の占有状態やヘビー鎖・ライト鎖間相互作用に差異が見出されており、これら修飾や翻訳後プロセッシングを無視するとモデル精度に影響します<sup>5</sup>。したがって、配列上のN結合型糖鎖付加部位（Asn-X-Ser/Thr配列）に注意し、マップ中に追加の密度が見られる場合は糖鎖モデルを組み込む検討をします。同様に、翻訳後のプロセッシングで除去されるペプチドや切断部位がある場合、ホモロジーモデルとの配列ずれが生じるため、対象配列（マウスMPO前駆体から成熟体への配列）を正しく適用してください。

## HEME構造の正確なモデリング

MPOの中心にはヘム補因子があり、その構造モデリングは特に慎重を要します。MPOのヘムはプロトポルフィリンIXが翻訳後修飾された特殊な誘導体で、3つの側鎖がタンパク質と共有結合していることが知られています<sup>6</sup>。具体的には、ヘムのピロール環AおよびC上のメチル基が酸化され、それぞれグルタミン酸242およびアスパラギン酸94の側鎖とエステル結合を形成し、さらに環Aのビニル基がメチオニン243の硫黄原子と共有結合（スルホニウム結合）していることが明らかになっています<sup>6</sup>。この結果、ヘム環は通常の平面形状から大きく歪んだ湾曲構造をとっており<sup>7</sup>、モデル化の際にはヘムを剛直な平面と仮定しないよう注意が必要です。これら共有結合はヘムとタンパク質を一体化させる重要な要素であり、モデル構築時にはLINK記録やカスタム残基定義を用いてヘムと該当残基（Glu242, Asp94, Met243）の共有結合を確実に取り込んでください<sup>6</sup>。他の哺乳類ペルオキシダーゼ（例えばラクトペルオキシダーゼや好酸球ペルオキシダーゼ）は2つのエステル結合のみを持ちますが、MPOではさらにユニークなスルホニウム結合を加えた3結合型である点に留意します<sup>8</sup>。モデルには既存PDBエントリのリガンド情報を活用し、この「修飾ヘム」が正しく扱われるようにします。またヘム鉄の配位環境も重視すべきです。MPOではヘム鉄の近位配位子はヒスチジン（例：ヒトMPOではHis336）が担い、これは隣接するAsn（Asn421）と水素結合して安定化されています<sup>9</sup>。遠位側には基質活性に関与するヒスチジン（His95）とアルギニン（Arg239）が存在し、過酸化水素や塩化物イオンの結合・活性化に寄与します<sup>9</sup>。これら重要残基が電子密度に合致するよう向きや位置を調整し、ヘムとの相互作用（例えばヒスチジン-鉄配位やArgの陰イオン基質への関与）が正確に再現されているか確認してください。またMPOには構造安定化のカルシウム結合部位があり（Asp96を含むループにCa<sup>2+</sup>が結合<sup>10</sup>）、ヘム近傍の活性部位構造を支えています<sup>11</sup>。モデル化時にマップ上に金属密度が認められる場合、Ca<sup>2+</sup>イオンの配置も忘れずに考慮しましょう。

## MYELOPEROXIDASEの構造的特徴

MPOの正確なモデル化には、分子全体の特徴を踏まえることが重要です。成熟MPOはヘテロ二量体（ヘビー鎖とライト鎖）が二つ結合した二量体（全体で四量体様）構造を取ります<sup>12</sup>。すなわち、一つのヘビー鎖（約467残基, 59-64 kDaの糖タンパク質部分）と一つのライト鎖（約108残基, 14 kDa）がジスルフィド結合で連結したヘテロ二量体（ヘビー-ライト）が基本単位であり、それが2組（A2B2）ジスルフィド結合で繋がって全酵素を構成します<sup>13</sup><sup>14</sup>。ヘビー鎖とライト鎖はMPO前駆体タンパク質がプロセッシング（部分タン

パク分解) されて生じたもので、ライト鎖はN末端側の一部(補酵素結合部位近傍を含む小サブユニット)、ヘビー鎖はC末側の大部分を占めます。このプロセッシング後も**ヘビー鎖とライト鎖は共有結合(ジスルフィド結合)によって非共有的に会合**しており、モデル構築時には両鎖を別々のポリペプチド鎖として扱いつつ、対応するジスルフィド結合で連結する必要があります。MPOには多数のシステイン残基が含まれ、計**6箇所のイントラチェーン**(ヘビー鎖内に5、ライト鎖内に1)ジスルフィド結合が存在し、さらに前述のように二量体同士を繋ぐ**インターチェーン**結合が1箇所あります<sup>15</sup>。これら**計7本のジスルフィド結合**は全て保存性が高く、モデルでも全て対応付けるべきです<sup>16</sup>。特にヘビー鎖とライト鎖間、そして二量体間のジスルフィドは見落としやすいので留意してください。またヘビー鎖には**複数のN型糖鎖修飾**が付加されており、ヒトMPOでは3~5箇所(実験条件によるグリコフォーム差あり)が報告されています<sup>17</sup><sup>5</sup>。マウスMPOでも相当数の糖鎖が予想され、3.0Åマップで糖鎖の一部が識別可能な場合があります。糖鎖由来の密度は初期モデルとの不一致を生む原因となるため、事前に既知のN結合糖鎖部位(例えば配列上のNXS/Tモチーフ)を洗い出し、対応する密度があればN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)から順次モデル化することが推奨されます。既存構造では糖鎖の存在によってヘビー・ライト鎖間の相互作用様式や全体構造安定性に影響を与えることも示唆されています<sup>5</sup>。最後に、MPO特有の**ヘム共有結合**についても構造特徴の一部として留意してください。前述の通りMPOのヘム補因子はタンパク質主鎖にエステル結合(二箇所)およびスルホニウム結合(一箇所)で固定されています<sup>6</sup>。これら共有結合はペルオキシダーゼファミリーでは高度に保存され(MPO以外ではエステル2箇所のみ)<sup>8</sup>、ヘムの位置・配向を規定しています。モデル構築時にはこれら共有結合の有無を確認し、ヘムが適切に配置されるよう拘束条件を設定してください。以上のような共有結合、ジスルフィド結合、糖鎖修飾、Ca<sup>2+</sup>結合などの構造的特徴を反映させることで、MPOモデルの信頼性が大幅に向上します。

## Fab抗体との複合体解析上の注意

MPOとFab断片の複合体をクライオEMで解析する際には、抗体由来ドメインの柔軟性とそれに起因する不均一性に留意が必要です。Fabは可変部(Fv)と定常部(一定領域)との間に「肘角」と呼ばれる可動性を有し、その角度は115°~225°と大きく変動し得ます<sup>18</sup>。この柔軟性のため、抗原と直接相互作用しない**定常ドメイン**側の密度はしばしば低解像度(ぼやけ)となり、単一の剛体としては捉えにくい場合があります<sup>18</sup>。実際、多くのクライオEM解析ではFab定常部の密度が不鮮明となるため、マスク処理で定常部を除外し可変部-抗原界面の解像度を向上させる手法が取られています<sup>19</sup>。本複合体でも、MPOに結合する**Fabの可変部(抗原結合部位)**は比較的高い局所解像度が得られる一方、肘から先の定常部は分解能が劣る可能性があります。このためモデル構築時には、可変部について詳細にフィッティング・リファインを行い、定常部については必要に応じて分割した剛体フィッティングや低分解能拘束を用いるなど、柔軟性を考慮したアプローチを取ります。また、Fabの結合モード多様性にも注意が必要です。MPOは二量体構造で各ヘビー鎖に対し1分子のFabが結合し得るため、試料中には**Fab非対称結合の状態(片側のヘビー鎖にのみFabが結合)**や**複数の結合様式**が混在する可能性があります。単粒子解析ではこのような粒子間の不均一性(ヘテロジェネティ)が再構成解像度を制限する主要因となり得るため<sup>20</sup>、画像分類によってFabの占有状態や結合角度の異なるサブセットに分けて解析することが推奨されます<sup>21</sup>。例えば、一部の粒子ではFabがMPOに対して異なる角度でバインドしている場合、単一の再構成では双方の構造が重ね合わされ密度がぼやけてしまいます。この場合、マルチモデルのリファインやサブクラス平均化によって**複数の結合モード**を分離し、それぞれに対応したモデルを構築することが望ましいでしょう。さらにFab自体の**ドメイン間可動性**にも目を配り、可変部と定常部を別個に剛体フィットさせる、あるいは必要に応じて可動部分に調節可能な接続(例えば関節部分を柔軟に扱うパラメータ)を導入して、実験密度に合致するよう調整します。総じて、MPO-Fab複合体ではMPO本体の剛直なコアに対し、Fabは比較的動きやすい要素であるため、**局所解像度の差**を念頭においてモデル化戦略を採用することが重要です。

## モデルの検証と再構築のポイント

最終モデルは必ず**実空間でのリファインメント(real-space refinement)**と厳密な検証を行い、マップとの適合性と構造妥当性を確認します。リファインメントにはPhenixなどの実空間リファインツールを用い、マップに対するモデルの位置合わせとジオメトリ拘束の最適化を繰り返します。この際、過剰な最適化によ

るoverfittingを防ぐため、**ハーフマップ検証**を取り入れることが推奨されます（片方の半数データマップに対してモデルをリファインし、もう一方のマップでモデル-マップ相関を算出する手法）。モデルとマップの相関を評価する指標として**マップ-モデル相関係数(FSC)**が有用であり、FSC曲線で0.5となる解像度などを確認してモデルの説明力を判断します<sup>22</sup>。全体的にモデルがマップによく適合していれば、高い相関と適切なFSC分解能値が得られるはずですが<sup>23</sup>。加えて**EMRingerスコア**などの指標で側鎖の配向が密度と合致しているかを検証します。EMRingerスコアは3Å程度のマップで側鎖の立体配置を評価する指標で、十分にリファインされた構造では+1.0以上の値を示すことが期待されます<sup>24</sup>。このスコアが低い場合、側鎖の向きが不適切である可能性があるため、再度密度に照らして側鎖の回転異性を調整してください。またモデルのジオメトリ品質も**MolProbityスコア**やラムチャンドランプロットで確認し、二重結合や芳香環の平面性、共有結合部位の距離・角度が妥当かチェックします。特に共有結合したヘム周辺は通常の幾何拘束から外れる部分もあるため、適切なカスタム拘束を入れつつ、幾何学的異常値が出ていないか確認してください。加えて、**局所的なコンフォメーション多様性**への対処も重要です。高分解能のマップでは一部の側鎖やループに複数のコンフォメーションが示唆される場合があり、そのような場合にはモデル中に**代替コンフォメーション**を導入することも検討します<sup>25</sup>。現在ではqFitなどのアルゴリズムや手動モデリングにより、単一のモデル中に複数の適合するコンフォメーションを表現することも可能です<sup>25</sup>。ただし、クライオEMマップではX線結晶構造ほど明確に二重の原子位置を識別できないことが多いため、密度が説明できる範囲で主要なコンフォメーションをモデル化し、曖昧な部分は占有率を調整するかモデルから除外する判断も必要です。最後に、モデルと実験データの整合性を総合評価する**検証指標**（例えばマップ-モデルFSC曲線、局所相関係数マップ、Qスコア分布<sup>26</sup>）を確認し、全体として過不足のないモデルになっているか吟味します。これらの検証工程を経て問題が見つかった場合、局所的にモデルを修正・再構築し再度リファインを行います。特にFabとの複合体モデルでは、可動性の高い領域でモデル偏差が生じやすいため、必要に応じてその部分だけ剛体として扱い再フィットする、もしくはマルチボディ精密化を行うといった対策も検討してください。以上のように、実空間リファインと包括的な検証指標によってモデルの妥当性を確認しつつ、コンフォメーションの不確実さが残る領域には慎重な対応を取ることが、高品質なMPO-Fab複合体構造モデルの完成につながります。

---

1 2 3 4 Building and Refining Protein Models within Cryo-electron Microscopy Density Maps Based on Homology Modeling and Multi-scale Structure Refinement - PMC

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2860449/>

5 RCSB PDB - 3F9P: Crystal structure of myeloperoxidase from human leukocytes

<https://www.rcsb.org/structure/3F9P>

6 7 8 RCSB PDB - 1MHL: CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN MYELOPEROXIDASE ISOFORM C CRYSTALLIZED IN SPACE GROUP P2(1) AT PH 5.5 AND 20 DEG C

<https://www.rcsb.org/structure/1MHL>

9 10 12 13 15 16 17 RCSB PDB - 1MYP: X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF CANINE MYELOPEROXIDASE AT 3 ANGSTROMS RESOLUTION

<https://www.rcsb.org/structure/1MYP>

11 Myeloperoxidase - Wikipedia

<https://en.wikipedia.org/wiki/Myeloperoxidase>

14 MPO ELISA - Mercodia

<https://www.mercodia.com/products/mpo-elisa/>

18 19 | Cryo-EM structures of Nav1.7-7A9 Fab and CD20-RTX Fab complexes. (A... | Download Scientific Diagram

[https://www.researchgate.net/figure/Cryo-EM-structures-of-Nav17-7A9-Fab-and-CD20-RTX-Fab-complexes-A-and-B-Composite\\_fig1\\_380557009](https://www.researchgate.net/figure/Cryo-EM-structures-of-Nav17-7A9-Fab-and-CD20-RTX-Fab-complexes-A-and-B-Composite_fig1_380557009)

- 20 Exploring conformational modes of macromolecular assemblies by ...  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2764000/>
- 21 Cryo-EM structures reveal native GABAA receptor assemblies and ...  
<https://www.nature.com/articles/s41586-023-06556-w>
- 22 23 Single particle cryo-EM map and model validation: It's not crystal clear  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X24001453>
- 24 EMRinger: Side-chain-directed model and map validation for 3D ...  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4589481/>
- 25 Automated multiconformer model building for X-ray crystallography ...  
<https://elifesciences.org/articles/90606>
- 26 (IUCr) Validation, analysis and annotation of cryo-EM structures  
<https://journals.iucr.org/paper?qr5001>