

I SPring-8 蛋白質結晶構造解析ビームラインの高度化研究

Research and Development for SPring-8 Structural Biology Beamlines

山本雅貴・吾郷日出夫
Yamamoto, M., Ago, H.

タンパク質結晶からの高精度構造解析のために SPring-8 構造生物学用ビームラインでは、微小結晶や超分子複合体の巨大格子結晶など解析対象の拡大と構造決定の簡便・迅速化を目指したビームラインの高度化研究を進めている。微小結晶構造解析では、1 μ m 集光ビームを実現した BL32XU において微小結晶からの迅速高精度データ収集を目指して、結晶ループの自動識別ソフト (INOCC) ・回折センターデータからの自動結晶センタリングシステム (SHIKA) や測定条件の最適化システム (KUMA)、さらには複数結晶からの回折データ処理システム (KAMO) を統合した全自動パイプライン (Zoo) を構築して、2~3 ミクロンの微小タンパク質結晶からの全自動データ収集・処理の研究を進めている。これらの迅速高精度測定法により、膜タンパク質等ミクロンオーダーサイズの高難度微小結晶からの構造解析および測定・解析手法のレベル向上に努めている。また、ビームラインの回折計に組み込む顕微分光装置や室温での結晶状態を制御する湿度制御結晶マウント法 (HAG 法) の開発を進めており、反応中間体等の構造機能相関研究に向けた技術開発を進めるとともに、遠隔地からの SPring-8 利用を促進するために、リモートアクセス技術と大容量化した試料交換ロボットによる効率的なユーザー利用実験を進めている。

II 蛋白質結晶構造解析での新規解析手法の開発

Research and Development for Protein Crystallography

山本雅貴・吾郷日出夫
Yamamoto, M., Ago, H.

SPring-8 の超高輝度放射光は、タンパク質微小結晶からの構造解析やタンパク質の機能解明に向けた精密構造解析を可能にした。しかし、超高輝度放射光によるタンパク質の放射線損傷は構造解析にとって最大の障害となっている。そこで、放射線損傷を低減した回折強度測定を可能にするため、ヘリカルデータ収集法に加え、さらなる微小結晶からのデータ収集を可能にする放射光ビームラインでの serial synchrotron crystallography (SSX) の技術開発を進めている。また、X 線自由電子レーザー施設 SACLA の超高輝度極短パルス X 線を活用し、既存の放射光を使った構造解析では放射線損傷の影響が無視できないタンパク質について、分子機能を反映した無損傷結晶構造が決定できる無

損傷X線結晶構造解析法を開発するとともに、これらの新規技術を応用して酵素反応の中間体構造を捉えるためポンプ - プローブ法やクライオトラップ法による反応中間体構造解析にも取り組んでいる。

発表論文 List of Publications

外国語論文

- I -1 H. Eguchi (横浜市大), M. Umemura (横浜市大), R. Kurotani (山形大), M. Fukumura (町田病院), I. Sato (横浜市大), JH. Kim (横浜市大), Y. Hoshino (横浜国大), J. Lee (横浜市大), N. Amemiya (京都大), M. Sato (横浜市大), K. Hirata (理研), J. Singh D (ORNL, USA), T. Masuda (東京大), M. Yamamoto (横浜市大), T. Urano (横浜市大), K. Yoshida (横浜市大), K. Tanigaki (横浜市大), M. Yamamoto, Sato M (横浜市大), S. Inoue (横浜国大), I. Aoki (放医研) & Y. Ishikawa (横浜市大), "A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging.", *Scientific Reports* **5**, 9194 (2015)
- I -2 AH. Teh (JASRI), M. Makino (JASRI), T. Hoshino (JASRI), S. Baba (JASRI), N. Shimizu (JASRI), M. Yamamoto, and T. Kumasaka (JASRI), "Structure of the RsbX phosphatase involved in the general stress response of *Bacillus subtilis*", *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology* **71**, 1392-1399 (2015)
- I -3 M. Shiina (横浜市大), K. Hamada (横浜市大), T. Inoue-Bungo (横浜市大), M. Shimamura (横浜市大), A. Uchiyama (横浜市大), S. Baba (横浜市大), K. Sato (横浜市大), M. Yamamoto, and K. Ogata (横浜市大), "A Novel Allosteric Mechanism on Protein-DNA Interactions underlying the Phosphorylation-Dependent Regulation of Ets1 Target Gene Expressions", *Journal of Molecular Biology* **427** (8), 1655-1669 (2015)
- I -4 E. Nango (理研), S. Akiyama (分子研), S. Maki-Yonekura (理研), Y. Ashikawa (理研), Y. Kusakabe (食品総研), E. Krayukhina (大阪大), T. Maruno (大阪大), S. Uchiyama (大阪大), N. Nuemket (岡山大), K. Yonekura (理研), M. Shimizu (食品総研), N. Atsumi (岡山大), N. Yasui (岡山大), T. Hikima (理研), M. Yamamoto, Y. Kobayashi (大阪大), A. Yamashita (岡山大), "Taste substance binding elicits conformational change of taste receptor T1r heterodimer extracellular domains", *Scientific Reports* **6**, 25745 (2016)
- I -5 H. Tanabe (理研), Y. Fujii (理研), M. Okada-Iwabu (東京大), M. Iwabu (東京大), Y. Nakamura (理研), T. Hosaka (理研), K. Motoyama (理研), M. Ikeda (理研), M. Wakiyama (理研), T. Terada (理研), N. Ohsawa (理研), M. Hato (理研), S. Ogasawara (京都大), T. Hino (京都大), T. Murata (理研), S. Iwata (京都大), K. Hirata (理研), Y. Kawano (理研), M. Yamamoto, T. Kimura-Someya (理研), M. Shirouzu (理研), T. Yamauchi (東京大), T. Kadowaki (東京大) & S. Yokoyama (理研), "Crystal structures of the human adiponectin receptors", *Nature* **520**, 312-316 (2015)
- I -6 H. Saino (青山学院大), T. Sugiyabu (青山学院大), G. Ueno (理研), M. Yamamoto, Y. Ishii (東邦大), M. Miyano (青山学院大), "Crystal Structure of OXA-58 with the Substrate-Binding Cleft in a Closed State: Insights into the Mobility and Stability of the OXA-58 Structure", *PloS one* **10**(12):e0145869, (2015).
- I -7 M. Sakaguchi, T. Kimura (理研), T. Nishida, T. Tosha (理研), H. Sugimoto (理研), Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, G. Ueno (理研), H. Murakami (JASRI), H. Ago, M. Yamamoto,

- T. Ogura, Y. Shiro, and M. Kubo (理研), “A nearly on-axis spectroscopic system for simultaneously measuring UV-visible absorption and X-ray diffraction in the SPring-8 structural genomics beamline”, *Journal of Synchrotron Radiation* **23**, 334-338 (2016)
- I-8 H. Ago, H. Adachi (岡山大), Y. Umena (岡山大), T. Tashiro (大阪市大), K. Kawakami (大阪市大), N. Kamiya (大阪市大), L. Tian (中国科学院), G. Han (中国科学院), T. Kuang (中国科学院), Z. Liu (中国科学院), F. Wang (中国科学院), H. Zou (中国科学院), I. Enami (東京理科大), M. Miyano (理研), J.R. Shen (岡山大), “Novel Features of Eukaryotic Photosystem II Revealed by Its Crystal Structure Analysis from a Red Alga.” *The Journal of biological chemistry* **291**, 5676-5687 (2016)

国際会議

- I-9 K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), Y. Kawano (理研), G. Ueno (理研), K. Hasegawa (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), M. Yamamoto, “Towards automatic data collection pipeline for membrane protein structure analyses at beamline BL32XU”, 12th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2015), New York, July (2015)
- I-10 K. Hasegawa (JASRI), H. Okumura (JASRI), S. Baba (JASRI), N. Mizuno (JASRI), H. Murakami (JASRI), K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), G. Ueno (理研), Y. Furukawa (JASRI), H. Yumoto (JASRI), Y. Senba (JASRI), H. Ohashi (JASRI), M. Yamamoto, “Upgrade of high flux MX beamline BL41XU at SPring-8”, 12th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2015), New York, July (2015)
- I-11 M. Yamamoto, K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), Y. Kawano (理研), G. Ueno (理研), K. Hasegawa (JASRI), T. Nakatsu (京都大), H. Ago, T. Kumasaka (JASRI), “Towards the next generation protein micro-crystallography at SPring-8 and SACLA”, American Crystallographic Association Annual Meeting (ACA2015), Philadelphia, July (2015)
- I-12 M. Yamamoto, K. Hasegawa (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), T. Nakatsu (京都大), H. Ago, T. Kumasaka (JASRI), “Towards the next generation protein micro-crystallography”, 9th International Workshop on X-ray Damage to Biological Crystalline Samples (RD9), Lund Sweden, March (2016)

国内会議

- I-13 田辺弘明 (理研)・元山かん奈 (理研)・池田眞理子 (理研)・脇山素明 (理研)・寺田貴帆 (理研)・大沢登 (理研)・保坂俊彰 (理研)・羽藤正勝 (理研)・藤井佳史 (理研)・中村祥浩 (理研)・小笠原諭 (京都大)・日野智也 (京都大)・村田武士 (京都大)・岩田想 (京都大)・岩部岡田美紀 (東京大)・岩部真人 (東京大)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理研)・山本雅貴・染谷友美 (理研)・白水美香子 (理研)・山内敏正 (東京大)・門脇孝 (東京大)・横山茂之 (理研) : アディポネクチン受容体の X 線結晶構造解析, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 徳島市, 6 月 (2015)
- I-14 熊坂崇 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・宮野菜央 (JASRI)・河村高志 (神戸大)・松本篤幸 (神戸大)・山本雅貴・片岡徹 (神戸大)・島 扶美 (神戸大) : 試料雰囲気湿度調整による Ras タンパク質の結晶内構造転移, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 徳島市, 6 月 (2015)
- I-15 松本篤幸 (神戸大)・宮野菜央 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・Liao Jingling (神戸大)・竹田あずさ (神戸大)・山本雅貴・熊坂崇 (JASRI)・片岡徹 (神戸大)・島扶美 (神戸大) : GTP 結

合型 H-Ras の State 1 結晶構造情報に基づく立体構造遷移機構の解明, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 徳島市, 6 月 (2015)

- I-16 長谷川和也 (JASRI)・奥村英夫 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・平田邦生 (理研)・山下恵太郎 (理研)・上野剛 (理研)・吾郷日出夫・中津亨 (京都大)・山本雅貴・熊坂崇 (JASRI) : SPring-8 タンパク質結晶解析ビームライン BL41XU の現状, 平成 27 年度日本結晶学会年会及び総会, 大阪府, 10 月 (2015)
- I-17 佐伯茜子・引間 孝明 (理研)・G.S.A. Wright (リバプール大)・S. Antonyuk (リバプール大)・山本雅貴・S.S. Hasnain (リバプール大)・城宜嗣・澤井仁美 : 酸素センサータンパク質のリガンド結合に伴う構造変化, 第 88 回日本生化学会大会, 神戸市, 12 月 (2015)
- I-18 田辺弘明 (理研)・藤井佳史 (理研)・岩部-岡田美紀 (東京大)・岩部真人 (東京大)・中村祥浩 (理研)・保坂俊彰 (理研)・元山かん奈 (理研)・池田真理子 (理研)・脇山素明 (理研)・寺田貴帆 (理研)・大沢登 (理研)・羽藤正勝 (理研)・小笠原諭 (京都大)・日野智也 (京都大)・村田武士 (京都大)・岩田想 (京都大)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理研)・山本雅貴・染谷友美 (理研)・白水美香子 (理研)・山内敏正 (東京大)・門脇孝 (東京大)・横山茂之 (理研) : アディポネクチン受容体の X 線結晶構造解析, 第 88 回日本生化学会大会, 神戸市, 12 月 (2015)
- I-19 平田邦生 (理研)・山本雅貴 : PDIS・解析領域 : タンパク質結晶構造解析の技術支援の取り組みについて, 第 88 回日本生化学会大会, 神戸市, 12 月 (2015)
- I-20 奥村英夫 (JASRI)・河野能顕 (理研)・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴 : SPring-8 MXBL 顕微分光測定装置の開発, 第 28 回放射光学会年会, 柏市, 1 月 (2016)
- I-21 馬場清喜 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・ニパワソ ヌアムケット (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・奥村英夫 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・上野剛 (理研)・山本雅貴・熊坂崇 (JASRI) : SPring-8 BL38B1 の現状と高度化, 第 28 回放射光学会年会, 柏市, 1 月 (2016)
- I-22 長谷川和也 (JASRI)・奥村英夫 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・平田邦生 (理研)・山本雅貴・熊坂崇 (JASRI) : 高エネルギー X 線を用いたタンパク質結晶回折データ測定環境の構築, 第 28 回放射光学会年会, 柏市, 1 月 (2016)
- I-23 平田邦生 (理研)・上野剛 (理研)・山下恵太郎 (理研)・河野能顕 (理研)・長谷川和也 (JASRI)・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴 : 微小結晶からの回折データ自動収集システムの開発, 第 28 回放射光学会年会, 柏市, 1 月 (2016)
- I-24 山下恵太郎 (理研)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理研)・上野剛 (理研)・長谷川和也 (JASRI)・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴 : 微小結晶のための回折データ自動処理システムの開発, 第 28 回放射光学会年会, 柏市, 1 月 (2016)
- I-25 上野剛 (理研)・仲村勇樹 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・奥村英夫 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・引間孝明 (理研)・平田邦生 (理研)・山下恵太郎 (理研)・河野能顕 (理研)・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴 : 理研構造ゲノムビームライン I & II の現状, 第 28 回放射光学会年会, 柏市, 1 月 (2016)

外国語論文

- II-1 K. Yamashita (理研), DQ. Pan (京都大), T. Okuda (京都大), M. Sugahara (理研), A. Kodan (京都大), T. Yamaguchi (京都大), T. Murai (京都大), K. Gomi (キッコーマン), N. Kajiyama (キッコーマン), E. Mizohata (大阪大), M. Suzuki (大阪大), E. Nango (理研), K. Tono (JASRI), Y. Joti (JASRI), T. Kameshima (JASRI), J. Park

(理研), C. Song (理研), T. Hatsui (JASRI), M. Yabashi (JASRI), S. Iwata (理研), H. Kato (京都大), H. Ago, M. Yamamoto, and T. Nakatsu (京都大), "An isomorphous replacement method for efficient de novo phasing for serial femtosecond crystallography", Scientific Reports 14017 (2015)

国際会議

- II-2 H. Ago, K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), M. Yamamoto, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, S. Yoshimawa, M. Suga (岡山大), F. Akita (岡山大), JR. Shen (岡山大), "Development of a method of femtosecond crystallography enabling the determination of high-resolution native structures of huge proteins", Gordon research conference/ 2015 X-ray Science, Easton, MA, July (2015)
- II-3 H. Ago, K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), M. Yamamoto, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, S. Yoshimawa, M. Suga (岡山大), F. Akita (岡山大), JR. Shen (岡山大) "High-resolution native structure analyses of supramacromolecular complexes susceptible to radiation damage", 29th European Crystallographic Meeting, Rovinj, Croatia, Aug (2015)
- II-4 H. Ago, "Development of a femtosecond crystallography enabling damage free high resolution crystal structure determination", The 2nd joint symposium of Universiti Putra Malaysia & University of Hyogo, Harima, Oct (2015)
- II-5 M. Yamamoto, H. Ago, K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, S. Yoshimawa, M. Suga (岡山大), F. Akita (岡山大), JR. Shen (岡山大), "Determination of damage-free crystal structure of X-ray sensitive proteins using SACLA", 11th International Congress of Plant Molecular (IPMB2015), Iguas Brazill, Dec. (2015)

国内会議

- II-6 菅倫寛 (岡山大)・秋田総理 (岡山大)・平田邦生 (理研)・上野剛 (理研)・村上博則 (JASRI)・中島芳樹 (岡山大)・清水哲哉 (岡山大)・山下恵太郎 (理研)・山本雅貴・吾郷日出夫・沈建仁：フェムト秒 X 線レーザーを用いた光化学系 II 複合体の 1.95Å 分解能での無損傷結晶構造解析, 第15回日本蛋白質科学会年会, 徳島市, 6月 (2015)
- II-7 平田邦生 (理研)・伊藤-新澤恭子・吾郷日出夫：X 線自由電子レーザーを用いたチトクロム酸化酵素の 1.9 Å 無損構造解析, 第15回日本蛋白質科学会年会, 徳島市, 6月 (2015)
- II-8 西田拓真・當舎武彦 (理研)・坂口美幸・木村哲就 (理研)・柳澤幸子・上野剛 (理研)・村上博則 (理研)・山本雅貴・小倉尚志・城宜嗣・久保稔 (理研)：ケージド NO を用いた脱窒カビ由来 NO 還元酵素結晶における反応中間体の調製, 第15回日本蛋白質科学会年会, 徳島市, 6月 (2015)
- II-9 山下恵太郎 (理研)・潘東青 (京都大)・長谷川和也 (JASRI)・菅原道泰 (理研)・村井智 (京都大)・小段篤史 (京都大)・溝端栄一 (大阪大)・鈴木守 (大阪大)・榊田哲哉 (京都大)・平田邦生 (理研)・加藤博章 (京都大)・吾郷日出夫・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴・中津亨 (京都大)：シリアル結晶学における重原子誘導体を用いた位相決定, 平成27年度日本結晶学会年会及び総会, 大阪府, 10月 (2015)
- II-10 上野剛 (理研)・平田邦生 (理研)・吾郷日出夫・村上博則 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・島田敦広・熊坂崇 (JASRI)・伊藤-新澤恭子・吉川信也・月原富武・山本雅貴：常温嫌気結晶試料の動的構造解析へ向けた自動サンプルチェンジャーSPACEの高度化, 平成27年度日本結晶

学会年会及び総会, 大阪府, 10月 (2015)

- II-11 西田拓真・當舎武彦 (理研)・杉本宏 (理研)・木村哲就 (理研)・平田邦生 (理研)・上野剛 (理研)・吾郷日出夫・山本雅貴・城宜嗣・久保稔 (理研) : SACLAを用いた脱窒カビ由来NO還元酵素の基質結合型無損傷X線結晶構造解析, 平成27年度日本結晶学会年会及び総会, 大阪府, 10月 (2015)
- II-12 山下恵太郎 (理研)・潘東青 (京都大)・菅原道泰 (理研)・吾郷日出夫・山本雅貴・中津亨 (京都大) : 重原子誘導体を利用したシリアルフェムト秒結晶学による新規構造決定, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢市, 9月 (2015)
- II-13 吾郷日出夫・平田邦生 (理研)・上野剛 (理研)・山本雅貴・伊藤新澤恭子・月原富武・吉川信也・菅倫寛 (岡山大)・秋田総理 (岡山大)・沈建仁 (岡山大) : 巨大タンパク質の高分解能・無損傷結晶構造解析が可能なフェムト秒X線結晶構造解析法の開発, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢市, 9月 (2015)
- II-14 菅倫寛 (岡山大)・秋田総理 (岡山大)・平田邦生 (理研)・上野剛 (理研)・村上博則 (JASRI)・中島芳樹 (岡山大)・清水哲哉 (岡山大)・山下恵太郎 (理研)・山本雅貴・吾郷日出夫・沈建仁 (岡山大) : X線自由電子レーザーによって明らかにされた光化学系 II 複合体の 1.95\AA 分解能での無損傷構造, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢市, 9月 (2015)
- II-15 山本雅貴 : SACLA による無損傷X線結晶構造解析, 第53回日本生物物理学会年会, 金沢市, 9月 (2015)

科学研究費補助金等

- 1 文部科学省 創薬等支援技術基盤プラットフォーム (平成24~28年度)
研究課題 創薬等支援のためのタンパク質立体構造解析総合技術基盤プラットフォームによる支援と高度化
研究分担者 山本雅貴
- 2 文部科学省 X線自由電子レーザー重点戦略研究課題 (平成24~28年度)
研究課題 SACLAにおける低温X線回折イメージング実験の展開と標準化 (クライオ試料固定照射装置の半自動化とイメージング実験)
研究分担者 山本雅貴
- 3 文部科学省 X線自由電子レーザー重点戦略研究課題 (平成24~28年度)
研究課題 無損傷・動的結晶構造解析による生体エネルギー変換過程の可視化
研究代表者 吾郷日出夫
- 4 (独) 日本学術振興会 科学研究費助成事業基盤研究 (B) (平成27~29年度)
研究課題 脂質性情報伝達物質を産生する膜タンパク質の脂溶性分子認識機構の解明
研究代表者 吾郷日出夫