

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ミクロンオーダーの微小結晶からでも構造決定が可能な BL32XU において、微小結晶の全自動構造解析を目指している。現在、試料交換ロボットによる様々な微小結晶マウント条件の試料自動交換、X 線ビーム位置への自動結晶センタリング、放射線損傷と測定分解能を考慮した最適測定条件の自動設定と自動データ収集、さらには複数結晶からの回折データ自動処理システムを統合した全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (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迅速かつ高精度での全自動データ収集・処理法の研究開発を進めている。これらの迅速高精度測定法の開発により、大量のミクロンオーダーサイズ微小結晶からの測定・解析のレベル向上に努めると同時に、X 線結晶構造解析における高難度ターゲットへの応用と構造解析を推し進めている。さらに、時空間的広がりを持つ分子機能発現過程の多面的構造解析により、機能発現の構造基盤のより深い理解を目指す相関構造解析研究に向けた技術開発の一環として、反応中間体の構造解析などへの応用が期待されるタンパク質 - 基質複合体のスクリーニング法や結晶試料の電子状態の *in situ* 分光観察で用いるビームライン組込型顕微分光装置、室温で結晶内環境を制御する湿度制御結晶マウント法 (HAG 法) の開発を進めている。また、遠隔地からの SPring-8 利用の促進に、インターネット環境を利用しビームライン機器を操作するリモートアクセス技術と試料交換ロボットの大容量化により実現した効率的なユーザー利用実験環境の提供を進めている。

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、X

線ビームの大きさに比べ十分に大きな結晶の上で X 線照射位置を変更しつつ X 線回折像を収集するヘリカルデータ収集法に加え、X 線ビームと相同な大きさの微小結晶を多数交換しながら測定を行う 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、機能性構造を反映した無損傷結晶構造が決定できる serial femtosecond rotation crystallography (SF-ROX) 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の構造解析にも取り組んでいる。

発表論文 List of Publications

- I -1 M. Yamamoto, K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), K. Hasegawa (JASRI), G. Ueno (理研), H. Ago, T. Kumasaka (JASRI) : Protein microcrystallography using synchrotron radiation, *IUCrJ* 4, 529 (2017)
- I -2 H. Hirai (阪大), N. Yasui (岡大), K. Yamashita (理研), S. Tabata (阪大), M. Yamamoto, J. Takagi (阪大), T. Nogi (横市大) : Structural basis for ligand capture and release by the endocytic receptor ApoER2, *Embo Reports* 18, 982-999 (2017)
- I -3 R. Suno (京大), K.T. Kimura (京大), T. Nakane (東大), K. Yamashita (理研), J. Wang (ピッツバーグ大), T. Fujiwara (京大), Y. Yamanaka (京大), D. Im (京大), S. Horita (京大), H. Tsujimoto (京大), M. S. Tawaramoto (京大), T. Hirokawa (AIST), E. Nango (理研), K. Tono (理研), T. Kameshima (理研), T. Hatsui (理研), Y. Joti (理研), M. Yabashi (理研), K. Shimamoto (サントリー), M. Yamamoto, D. M. Rosenbaum (テキサス南西大), S. Iwata (京大), T. Shimamura (京大), T. Kobayashi (京大) : Crystal Structures of Human Orexin 2 Receptor Bound to the Subtype-Selective Antagonist EMPA, *Structure* 2018, 26, 7-19 e5.
- I -4 M. Yamamoto, "Towards the next generation of protein micro-crystallography", Second Workshop: Science at PETRA IV, DESY, Hamburg, May (2017)
- I -5 M. Yamamoto, "The Roles of High-brilliant Synchrotron Radiation in Macromolecular Crystallography", 5th Asia Pacific Protein Association Conference & 12th International Symposium of the Protein Society of Thailand, Bangsaen Thailand, July (2017).
- I -6 T. Hori (理研), T. Okuno (順天堂大), K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), Y. Kawano (理研), M. Yamamoto, M. Hato (理研), M. Nakamura (東大), T. Shimizu (東大), T. Yokomizo (順天堂大), M. Miyano (理研), S. Yokoyama (理研) : "Crystal structure of leukotriene B4 receptor BLT1", GPCR Workshop 2017, Kona USA, December (2017)
- I -7 田辺弘明 (理研), 藤井佳史 (理研), 岩部-岡田美紀 (東大), 岩部真人 (東大), 羽藤正勝 (理研), 中村祥浩 (理研), 可野邦行 (東北大), 川名浩己 (東北大), 寺田貴帆 (理研), 平田邦生 (理研), 山下恵太郎 (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), 青木淳賢 (東北大), 山内敏正 (東大), 門脇孝 (東大), 横山茂之 (理研) : イソプレノイド脂質を用いたアディポネクチン受容体の X 線結晶構造解析, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台市, 6月 (2017)
- I -8 G. S. A. Wright (リバプール大), 佐伯茜子, 引間孝明 (理研), 西園陽子 (理研), 久野玉雄 (理研), 山本雅貴, S. Antinyuk (リバプール大), S. S. Hasnain (リバプール大), 城宜嗣, 澤井仁美 : 完全な酸素センシングシステムにおける分子内および分子間のシグナル伝達機構, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台市, 6月 (2017)

- I -9 田辺弘明 (理研), 藤井佳史 (理研), 岩部-岡田美紀 (東大), 岩部真人 (東大), 羽藤正勝 (理研), 可野邦行 (東北大), 川名裕己 (東北大), 中村祥浩 (理研), 寺田貴帆 (理研), 平田邦生 (理研), 山下恵太郎 (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), 青木淳賢 (東北大), 山内敏正 (東大), 門脇孝 (東大), 横山茂之 (理研): イソプレノイド脂質を用いたアディポネクチン受容体のX線結晶構造解析, 平成29年度 膜タンパク質研究会, 淡路島, 10月 (2017) I-7 山本雅貴: 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォーム, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 12月 (2017)
- I -10 山本雅貴: 生命機能に迫る相関構造解析における結晶構造解析, 第30回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, つくば市, 1月 (2018)
- II -1 T. Tosha (理研), T. Nomura (理研), T. Nishida, N. Saeki, K. Okubayashi, R. Yamagiwa, M. Sugahara (理研), T. Nakane (東京大), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), T. Kimura (神戸大), T. Hisano (理研), K. Muramoto, H. Sawai, H. Takeda, E. Mizohata (阪大), A. Yamashita (理研), Y. Kanematsu (広島市大), Y. Takano (広島市大), E. Nango (理研), R. Tanaka (理研), O. Nureki (東大), O. Shoji (名大), Y. Ikemoto (JASRI), H. Murakami (JASRI), S. Owada (理研), K. Tono (JASRI), M. Yabashi (理研), M. Yamamoto, H. Ago, S. Iwata (京大), H. Sugimoto (理研), Y. Shiro, M. Kubo (理研): Capturing an initial intermediate during the P450_{nor} enzymatic reaction using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate, *Nature Comm.* 8, 1585 (2017)
- II -2 K. Yamashita (理研), N. Kuwabara (KEK), T. Nakane (東大), T. Murai (京大), E. Mizohata (大阪大), M. Sugahara (理研), D. Pan (京大), T. Masuda (京大), M. Suzuk (大大), T. Sato (京大), A. Kodan (京大), T. Yamaguchi (京大), E. Nango (理研), T. Tanaka (理研), K. Tono (JASRI), Y. Joti (JASRI), T. Kameshima (JASRI), T. Hatsui (理研), M. Yabashi (理研) H. Many (東京健康長寿C), T. Endo (東京健康長寿C), R. Kato (KEK), T. Senda (KEK), H. Kato (京都大), S. Iwata (京大), H. Ago, M. Yamamoto, F. Yumoto (KEK), T. Nakatsua (京大): Experimental phase determination with selenomethionine or mercury-derivatization in serial femtosecond crystallography, *IUCrJ* 4, 639-647 (2017)
- II -3 T.P. Halsted (リバプール大), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), H. Ago, G. Ueno (理研), T. Tosha (理研), R.R. Eady (リバプール大), S.V. Antonyuk (リバプール大), M. Yamamoto, S.S. Hasnain (リバプール大): An unprecedented dioxygen species revealed by serial femtosecond rotation crystallography in copper nitrite reductase, *IUCrJ* 5, 22 (2018)
- II -4 M. Oide (慶應大), K. Okajima (慶應大), H. Nakagami (理研), T. Kato (阪大), S. Y. Sekiguchi (慶應大), T. Oroguchi (慶應大), T. Hikima (理研), M. Yamamoto, M. Nakasako (慶應大): Blue light-excited LOV1 and LOV2 domains cooperatively regulate the kinase activity of full-length phototropin2 from Arabidopsis, *J. Biol. Chem.* 293, 963-972 (2018)
- II -5 A. Shimada, M. Kubo (理研), S. Baba (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), T. Nomura (理研), T. Kimura (神戸大), K. Shinzawa-Itoh, J. Baba, K. Hatano, Y. Eto, A. Miyamoto, H. Murakami (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), S. Owada (理研), K. Tono (JASRI), M. Yabashi (JASRI), Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, M. Sakaguchi, T. Ogura, R. Komiya (慶応大), J. Yan (慶応大), E. Yamashita (阪大), M. Yamamoto, H. Ago, S. Yoshikawa, T. Tsukihara: A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase. *Sci Adv* 3, e1603042 (2017)

- II-6 M. Yamamoto, H. Ago, K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), G. Ueno (理研), M. Kubo (理研), S. Baba (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), A. Simada, K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, M. Suga (岡大), F. Akita (岡大), J.-R. Shen (岡大), “Fixed target serial crystallography at SACLA”, 2017 American Crystallographic Association Annual Meeting, New Orleans USA, May (2017)
- II-7 M. Kubo (理研), A. Shimada, S. Baba (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto, K. Shinzawa-Itoh, H. Ago, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, “Observation of water-channel opening of cytochrome c oxidase by time-resolved XFEL crystallography.”, 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress and 11th European Biophysics Congress, Edinburgh UK, July (2017)
- II-8 M. Kubo (理研), A. Shimada, S. Baba (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto, K. Shinzawa-Itoh, H. Ago, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, “Time-resolved XFEL crystallography and spectroscopy of cytochrome c oxidase.”, 24th Congress & General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr 2017), Hyderabad India, August (2017)
- II-9 山本雅貴 : Towards the next generation protein micro-crystallography at SPring-8 and SACLA, 第55回日本生物物理学会年会, 熊本市, 9月 (2017)
- II-10 吾郷日出夫, 島田敦広, 久保稔 (理研), 馬場清喜 (JASRI), 山下恵太郎 (理研), 平田邦生 (理研), 上野剛 (理研), 山本雅貴 : X線自由電子レーザーを光源とするフェムト秒X線結晶構造解析, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 12月 (2017)

大学院生命理学研究科

博士後期過程

伊藤翔 : タンパク質 - 基質複合体の構造解析を加速させるスクリーニング系の構築

科学研究費補助金等

- 1 (国研) 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (平成29~33年度)
研究課題 創薬等ライフサイエンス研究のための相関構造解析プラットフォームによる支援と高度化
研究代表者 山本雅貴
- 2 (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