

Macromolecular Dynamics and X-ray Crystallography

生体高分子動的構造解析学

I SPring-8 蛋白質結晶構造解析ビームラインの高度化と応用

Research and Development for SPring-8 Structural Biology Beamlines

山本雅貴・吾郷日出夫
Yamamoto, M., Ago, H.

本プロジェクトは、「あらゆる結晶の全自動構造解析の実現」を目標とした、SPring-8 構造生物学用ビームラインの高度化研究である。ここで言う全自動構造解析は、生体高分子結晶の構造解析の簡便化・迅速化・高精度化、さらに解析対象の拡大を包含する。これまでに「全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO)」と高輝度光源並びに高速検出器の相乗効果によりビームライン自動運転と X 線回折強度データの大量取得が可能となった。これを受け、大量の X 線回折強度データ並びに構造解析結果の利用と活用に関する研究開発が始まっている。具体的には、大量の構造解析結果の閲覧性向上に資する計算機プログラムの開発や、結晶毎の僅かな X 線回折強度の違いを指標とした結晶弁別により、結晶構造に多様性があるときに、それらを個別に構造解析する試みである。生体高分子結晶の結晶構造の多様性は、分子機能を背景としている可能性もあり、構造生命科学への応用も期待される。

全自動構造解析とは異なる取り組みもある。放射光での常温時分割構造解析の開発は、高輝度光源と高速検出機の相乗効果で可能となった微結晶の高速回折像測定技術を活用した開発研究であって、XFEL の時間分解能構造解析を補完し、動的な観点での生体高分子が働く仕組みの解明への貢献が期待される。これとは別に、試料の X 線損傷を管理した X 線回折実験法の開発高度化研究もある。例えば、微小結晶を多数交換しながら測定を行う Serial Synchrotron Crystallography (SSX) や大量の微小結晶を凍結固定した大型の結晶ループを回転しながら走査する Serial Synchrotron Rotation Crystallography (SS-ROX) の開発などである。また XFEL 施設である SACLA では、無損傷結晶構造が決定できる超高輝度極短パルス X 線を活用した Serial Femtosecond Rotation Crystallography (SF-ROX) の開発と利用支援をおこなっている。

II X線結晶構造解析関連応用技術開発

Development of applied technology relating to X-ray protein crystallography

山本雅貴
Yamamoto, M.

本課題は、ビームラインの効果的な運用に資する周辺技術の開発である。高輝度放射光を用いる現代の X 線結晶構造解析では、X 線損傷抑制の観点で凍結結晶の利用が基本である。しかし、繰り返し実験による凍結条件の最適化や実際の結晶凍結作業など、時間と人的資源の両方で、結晶凍結は効率の低い工程である。そこで、効率向上に向け、結晶凍結から回折計に結晶を設置するまでの自動化技術の開発を行なっている。

結晶凍結の効率化とは異なる発想で、常温測定を前提とした試料準備法の開発も進めている。具体的には、溶液交換可能なマイクロ流路に多数の結晶を固定し測定試料とする方法、結晶化で用いた SBS 規格の結晶化プレートをそのまま使用する方法などである。前者は、結晶周辺の溶媒交換の容易さから、多種類の低分子化合物との複合体構造を薬剤候補化合物の構造最適化に利用する創薬手法での使用が期待される。後者は、成長した結晶に一切手を加えないことを生かした X 線回折データ収集、例えば、環境変化に敏感な結晶の X 線回折強度測定や初期結晶化条件探索での微結晶の検出と X 線回折データ収集などでの活用が期待される。

これらとは別に、温度や水素イオン濃度といった試料環境を制御する装置やその使用法 (HAG 法) の開発も進めている。時分割構造解析を含む生体高分子構造の環境応答を調べる実験での活用が進んでいる。またビームライン組込型顕微分光装置などの開発も進めている。結晶試料の *in situ* 電子状態分光観察による反応中間体の構造解析などへの応用が期待される。また構造研究を進める上で試料の質は極めて重要であることからタンパク質の生産精製の高度化に関する研究も行っている。

Ⅲ タンパク質構造解析の新規手法開発

Research and Development for Protein Structure Analysis Methods

山本雅貴・吾郷日出夫
Yamamoto, M., Ago, H.

現在のマイクロビームで扱っているミクロンサイズよりさらに小さな結晶への対応は、構造解析での一層の対象拡大に貢献する。より小さな結晶の構造解析を目標に、真空中に結晶を設置し X 線回折像を記録する技術開発を行なっている。真空中で回折実験を行うことでバックグラウンドノイズを抑制し、結晶からの微弱な回折強度の正確な測定が期待できる。

非晶質の試料について、X 線小角散乱による溶液場でのタンパク質の機能解析や X 線コヒーレント回折イメージング (Coherent X-ray Diffraction Imaging : CXDI)、クライオ電子顕微鏡による生体試料からの単粒子解析の技術開発なども進めている。

発表論文 List of Publications

- I-1 K. Hirata (理研)・S. Abe (東工大)・M. Ueno (東工大)・T. Kojima (東工大)・H. Matsuura (理研)・Y. Kawano (理研)・N. Sakai (理研)・M. Yamamoto: Protein micro-crystallography using smaller crystals than 1 μm 、日本蛋白質科学会年会 (つくば市)、

2022

- I-2 松浦滉明 (理研) ・ 平田邦生 (理研) ・ 坂井直樹 (JASRI) ・ 竹下浩平 (理研) ・ 當舎武彦 (理研) ・ 河野能顕 (理研) ・ 山本雅貴: SPring-8 MX-BLにおける自動化技術と高輝度微小ビームを駆使した構造多様性解析、日本蛋白質科学会年会 (つくば市)、2022
- I-3 松浦滉明 (理研) ・ 平田邦生 (理研) ・ 坂井直樹 (JASRI) ・ 河野能顕 (理研) ・ 山本雅貴: タンパク質の作用機序解明に迫る結晶構造解析の新たな展開、第48回生体分子科学討論会 (鳥取市)、2022
- I-4 M. Yamamoto ・ K. Hirata (理研) ・ H. Matsuura (理研) ・ N. Sakai (JASRI) ・ S. Baba (JASRI) ・ N. Mizuno (JASRI) ・ Y. Nakamura (JASRI) ・ H. Murakami (JASRI) ・ T. Kumasaka (JASRI) : Development of automated high-throughput MX beamline at SPring-8, The 72nd annual meeting of the American Crystallographic Association (ACA2022) (米国、ポートランド)、2022
- I-5 N. Sugano-Nakamura (大阪大) ・ K. Matoba (大阪大) ・ M. Hirose (大阪大) ・ N. K. Bashiruddin (東京大) ・ Y. Matsunaga (大阪大) ・ K. Yamashita (理研) ・ K. Hirata (理研) ・ M. Yamamoto ・ T. Arimori (大阪大) ・ H. Suga (東京大) ・ J. Takagi (大阪大) : De novo Fc-based receptor dimerizers differentially modulate PlexinB1 function, *Structure*, 30, 1411-1423 e4 (2022)
- I-6 松浦滉明 (理研) ・ 平田邦生 (理研) ・ 中山 楓 ・ 坂井直樹 (JASRI) ・ 河野能顕 (理研) ・ 山本雅貴: 回折データ分類による XRD ベースの構造多型解析、令和4年度新学術領域「高速分子動画」シンポジウム (淡路市)、2022
- I-7 平田邦生 (理研) ・ 松浦滉明 (理研) ・ 坂井直樹 (理研) ・ 河野能顕 (理研) ・ 山本雅貴: タンパク質結晶構造解析のデータ収集・解析トリビア、日本結晶学会年会 (西宮市)、2022
- I-8 松浦滉明 (理研) ・ 平田邦生 (理研) ・ 坂井直樹 (理研) ・ 河野能顕 (理研) ・ 山本雅貴: 階層的クラスタリングを用いた構造多型解析の現状、日本結晶学会年会 (西宮市)、2022
- I-9 松浦滉明 (理研) ・ 平田邦生 (理研) ・ 坂井直樹 (JASRI) ・ 河野能顕 (理研) ・ 山本雅貴: 多数の結晶を利用したタンパク質の構造多型解析、日本放射光学会年会 (草津市)、2023
- I-10 上野剛 (理研) ・ 奥村英夫 (JASRI) ・ 仲村勇樹 (JASRI) ・ 坂井直樹 (JASRI) ・ 河村高志 (JASRI) ・ 平田邦生 (理研) ・ 吾郷日出夫 ・ 河野能顕 (理研) ・ 松浦滉明 (理研) ・ 村上博則 (JASRI) ・ 増永拓也 (JASRI) ・ 馬場清喜 (JASRI) ・ 水野伸宏 (JASRI) ・ 長谷川和也 (JASRI) ・ 熊坂崇 (JASRI) ・ 山本雅貴: 理研構造ゲノムビームライン II の現状、日本放射光学会年会 (草津市)、2023
- I-11 平田邦生 (理研) ・ 安部 聡 (東工大) ・ 田中潤子 (東工大) ・ 小島摩利子 (東工大) ・ 上野隆史 (東工大) ・ 河野能顕 (理研) ・ 松浦滉明 (理研) ・ 山本雅貴: 600 nm サイズのタンパク質結晶から高分解能構造解析、日本放射光学会年会 (草津市)、2023
- I-12 H.-E. Lee (東工大) ・ T. Okumura (高知大) ・ H. Ooka (理研) ・ K. Adachi (理研) ・ T. Hikima (理研) ・ K. Hirata (理研) ・ Y. Kawano (理研) ・ H. Matsuura (理研) ・ Masak. Yamamoto ・ Masah. Yamamoto (JAMSTEC) ・ A. Yamaguchi (東工大) ・ J.-E. Lee (理研) ・ K. T. Nam (ソウル大) ・ Y. Ohara (JAMSTEC) ・ D. Hashizume (理研) ・ S. E. McGlynn (東工大) ・ R. Nakamura (理研) : Selective Ion Transport in Hierarchical Deep-sea Hydrothermal Vents, 11TH ELSI SYMPOSIUM THE LIVING UNIVERSE (東京), 2023
- I-13 山本雅貴: どうするタンパク質結晶構造解析 —生体高分子構造研究における X 線結晶学—、

- 日本結晶学会誌、65, 55-63 (2023)
- II-1 Z. Ren (神戸大)・M. Nishimura (神戸大)・L. H. Tjan (神戸大)・K. Furukawa (神戸大)・Y. Kurahashi (神戸大)・S. Sutandhio (神戸大)・K. Aoki (神戸大)・N. Hasegawa (神戸大)・J. Arii (神戸大)・K. Uto (神戸大)・K. Matsui (神戸大)・I. Sato (神戸大)・J. Saegusa (神戸大)・N. Godai・K. Takeshita (理研)・M. Yamamoto・T. Nagashima (兵庫県健康財団)・Y. Mori (神戸大): Large-scale serosurveillance of COVID-19 in Japan: Acquisition of neutralizing antibodies for Delta but not for Omicron and requirement of booster vaccination to overcome the Omicron's outbreak, *PLoS One*, 17, e0266270 (2022)
- II-2 H. Okumura (JASRI)・N. Sakai (JASRI)・H. Murakami (JASRI)・N. Mizuno (JASRI)・Y. Nakamura (JASRI)・G. Ueno (理研)・T. Masunaga (JASRI)・T. Kawamura (JASRI)・S. Baba (JASRI)・K. Hasegawa (JASRI)・M. Yamamoto・T. Kumasaka (JASRI) : In situ crystal data-collection and ligand-screening system at SPring-8, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 78, 241-251 (2022)
- II-3 上野剛 (理研)・舟久保智瑛 (北海道大)・真栄城正寿 (北海道大)・小西真晶 (リガク)・一町田由貴 (北海道大)・坂井直樹 (理研)・山本雅貴: 化合物スクリーニングに向けたマイクロ流路デバイス開発、日本蛋白質科学会年会 (つくば市)、2022
- II-4 S. L. Rose (リバプール大)・S. Baba (JASRI)・H. Okumura (JASRI)・S. V. Antonyuk (リバプール大)・D. Sasaki (リバプール大)・T. M. Hedison (マンチェスター大)・M. Shanmugam (マンチェスター大)・D. J. Heyes (マンチェスター大)・N. S. Scrutton (マンチェスター大)・T. Kumasaka (JASRI)・T. Tosha (理研)・R. R. Eady (リバプール大)・M. Yamamoto・S. S. Hasnain (リバプール大) : Single crystal spectroscopy and multiple structures from one crystal (MSOX) define catalysis in copper nitrite reductases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119, e2205664119 (2022)
- III-1 H. Matsuura (理研)・H. Ago・K. Hirata (理研)・G. Ueno (理研)・A. Suzuki (北海道大)・M. Yamamoto: Development of in-vacuum diffractometer for micro-crystallography at SPring-8, *Molecular Movie International Symposium 2022* (横浜市) , 2022
- III-2 J. Asami (東京大)・K. T. Kimura (京都大)・Y. Fujita-Fujiharu (京都大)・H. Ishida (東京大)・Z. Zhang (東京大)・Y. Nomura (京都大)・K. Liu (京都大)・T. Uemura (京都大)・Y. Sato (京都大)・M. Ono (京都大)・M. Yamamoto・T. Noda (京都大)・H. Shigematsu (理研)・D. Drew (ストックホルム大)・S. Iwata (京都大)・T. Shimizu (東京大)・N. Nomura (京都大)・U. Ohto (東京大) : Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP, *Nature*, 606, 1021-1026 (2022)
- III-3 山本雅貴: 生命科学と創薬研究に向けた相関構造解析プラットフォーム、令和4年度 BINDS シンポジウム (東京)、2022
- III-4 K. Yoshimi (東京大)・K. Takeshita (理研)・N. Kodera (金沢大)・S. Shibumura (C4U)・Y. Yamauchi (東京大)・M. Omatsu・K. Umeda (金沢大)・Y. Kunihiro (金沢大)・M. Yamamoto・T. Mashimo (東京大) : Dynamic mechanisms of CRISPR interference by *Escherichia coli* CRISPR-Cas3, *Nat Commun*, 13, 4917 (2022)
- III-5 C.C. Gopalasingam (理研)・H. Egami・K. Fukumoto・M. Sakaue・H. Shigematsu (理研)・M. Yamamoto・T. Tosha (理研)・K. Muramoto・Y. Shiro: CryoEM Structure of Monomeric qNOR from a Bacterial Pathogen Uncovers Key Structural and Functional

Rationalizations for Superior Nitric Oxide Detoxification in Dimeric qNOR, 10th Asian Bioinorganic Chemistry Conference (神戸市) , 2022

- III-6 K. Sakaniwa (東京大)・A. Fujimura (東京大)・T. Shibata (東京大)・H. Shigematsu (理研)・T. Ekimoto (横浜市大)・M. Yamamoto・M. Ikeguchi (横浜市大)・K. Miyake (東京大)・U. Ohto (東京大)・T. Shimizu (東京大) : TLR3 forms a laterally aligned multimeric complex along double-stranded RNA for efficient signal transduction, Nat Commun, 14, 164 (2023)

生命科学専攻

博士前期過程

尾松美音

五代乃々花

大恵千翔

科学研究費補助金等

- 1 (国研) 日本医療研究開発機構 生命科学・創薬研究支援基盤事業 (令和4年度～令和8年度)
研究課題 生命科学と創薬研究に向けた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 科学研究費補助金 (令和元～5年度) 新学術領域研究 (研究領域提案型) 課題番号: 19H05783
研究領域 高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と分子制御への応用
領域代表 岩田 想
研究課題 動的構造解析に資する固定ターゲット微小結晶構造解析法の開発
研究代表者 山本雅貴