

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 10 ミクロンオーダーサイズの微小結晶 1 個であって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、現在、試料交換ロボットによる結晶を乗せた試料ループの自動交換、X 線ビーム位置への自動結晶センタリング、許容しうる放射線損傷と期待する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・処理の実現に向けた研究を進めている。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・解析手法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、反応中間体等の多面的な構造解析による相関構造解析研究に向けた技術開発の一環として、測定時に結晶試料の電子状態の *in situ* 分光観察を行うための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 利用を促進するために、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大容量化した試料交換ロボットにより実現される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 線ビームの大きさと同様な大きさの微小結晶から放射線損傷を抑制した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、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

外国語論文

- I -1 T. Shinoda (理研), N. Shinya (理研), K. Ito (理研), Y. Ishizuka-Katsura (理研), N. Ohsawa (理研), T. Terada (理研), K. Hirata (理研), Y. Kawano (理研), M. Yamamoto, T. Tomita (東大), Y. Ishibashi (理研), Y. Hirabayashi (理研), T. Kimura-Someya (理研), M. Shirouzu (理研), S. Yokoyama (理研), “Cell-free methods to produce structurally intact mammalian membrane proteins”, *Scientific Reports* **6**, No. 30442, (2016)
- I -2 T. Shinoda (理研), N. Shinya (理研), K. Ito (理研), N. Ohsawa (理研), T. Terada (理研), K. Hirata (理研), Y. Kawano (理研), M. Yamamoto, T. Kimura-Someya (理研), S. Yokoyama (理研), M. Shirouzu (理研), “Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin”, *Scientific Reports* **6**, No. 33632, (2016)
- I -3 E. Nango (理研), S. Akiyama (CIMoS), S. Maki-Yonekura (理研), Y. Ashikawa (理研), Y. Kusakabe (NARO), E. Krayukhina (阪大), T. Maruno (阪大), S. Uchiyama (阪大), N. Nuemket (理研), K. Yonekura (理研), M. Shimizu (NARO), N. Atsumi (岡山大), N. Yasui (岡山大), T. Hikima (理研), M. Yamamoto, Y. Kobayashi (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 -4 K. Hasegawa (JASRI), K. Yamashita (理研), T. Murai (京大), N. Nuemket (JASRI), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), H. Ago, T. Nakatsu (京大), T. Kumasaka (JASRI), M. Yamamoto, “Development of a dose-limiting data collection strategy for serial synchrotron rotation crystallography”, *J. Synchrotron Rad.* **24**, 29–41 (2017).

国際会議

- I -5 M. Yamamoto, K. Hirata (理研), K. Yamashita (理研), Y. Kawano (理研), G. Ueno (理研), K. Hasegawa (JASRI), H. Okumura (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), “Protein micro-crystallography at SPring-8”, 21st Biophysics Conference, the annual meeting of the Biophysical Society of R.O.C., Hsinchu Taiwan, May (2016)
- I -6 A. Yamashita (岡山大), E. Nango (理研), S. Akiyama (CIMoS), S. Maki-Yonekura (理研), Y. Ashikawa (理研), Y. Kusakabe (NARO), E. Krayukhina (阪大), T. Maruno (阪大), S. Uchiyama (阪大), N. Nuemket (理研), K. Yonekura (理研), M. Shimizu (NARO), N. Atsumi (岡山大), N. Yasui (岡山大), T. Hikima (理研), M. Yamamoto, Y. Kobayashi (阪大), “Taste substance binding to the ligand-binding domains of T1r taste receptor

heterodimer”, 17th International Symposium on Olfaction and Taste / JASTS 50th Annual Meeting, Yokohama Japan, Jun (2016)

- I -7 M. Yamamoto, “Advanced Macromolecular Crystallography at SPring-8 and SACLA”, British Biophysical Society 2016 Biennial Meeting (BBS2016), Liverpool UK, July (2016).
- I -8 M. Yamamoto, “Structural biology at SPring-8 and SACLA”, Joint SPring-8 – MAX IV Laboratory Workshop on New Light Sources and Biological Applications, Lund Sweden, September (2016)

国内会議

- I -9 山下恵太郎 (理研)・平田邦生 (理研)・安田伸広 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・松本直記・島田敦広・伊藤・新澤恭子・月原富武・山本雅貴 : 放射光ピンクビームを用いたタンパク質結晶X線回折データ収集に関する検討,平成28年度日本結晶学会年会,水戸市, 11月 (2016)
- I -10 奥村英夫 (JASRI)・河野能顕 (理研)・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴 : SPring-8 MXBLオンライン顕微分光測定装置の開発,平成28年度日本結晶学会年会,水戸市, 11月 (2016)
- I -11 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 : PX ビームラインにおける回折データ自動処理・構造決定システムの開発, 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,神戸市, 1月 (2017)
- I -12 上野剛 (理研)・仲村勇樹 (JASRI)・奥村英夫 (JASRI)・河野能顕 (理研)・水野伸宏 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・引間孝明 (理研)・長谷川和也 (JASRI)・平田邦生 (理研)・山下恵太郎 (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30回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム,神戸市, 1月 (2017)
- I -13 馬場清喜 (JASRI)・奥村英夫 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・ニパワン ヌアムケット (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・水野伸宏 (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30回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム,神戸市, 1月 (2017)
- I -14 平田邦生 (理研)・河野能顕 (理研)・山下恵太郎 (理研)・上野剛 (理研)・長谷川和也 (JASRI)・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴 : 微小結晶構造解析ビームラインBL32XUの現状, 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,神戸市, 1月 (2017)
- I -15 山下栄樹 (阪大)・東浦彰史 (阪大)・吉村政人 (NSRRC)・長谷川和也 (JASRI)・熊坂崇 (JASRI)・古川行人 (JASRI)・大端通 (JASRI)・上野剛 (理研)・山本雅貴・吉川信也・月原富武・中川敦史 (阪大) : SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (大阪大学蛋白質研究所) BL44XUの現状, 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,神戸市, 1月 (2017)
- I -16 河野能顕 (理研)・奥村英夫 (JASRI)・上野剛 (理研)・熊坂崇 (JASRI)・山本雅貴 : SPring-8 MXBL オンライン顕微分光装置の開発, 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,神戸市, 1月 (2017)

外国語論文

- II -1 M. Suga (岡山大) , F. Akita (岡山大) , M. Sugahara (理研) , M. Kubo (理研) , Y. Nakajima (岡山大) , T. Nakane (東大) , K. Yamashita (理研) , Y. Umena (岡山大) , M. Nakabayashi (岡山大) , T. Yamane (岡山大) , T. Nakano (岡山大) , M. Suzuki (阪大) , T. Masuda (京

大), S. Inoue (東大), T. Kimura (神戸大), T. Nomura (理研), S. Yonekura (岡山大), L.-J. Yu (岡山大), T. Sakamoto (岡山大), T. Motomura (岡山大), J.-H. Chen (岡山大), Y. Kato (名大), T. Noguchi (名大), K. Tono (JASRI), Y. Joti (JASRI), T. Kameshima (JASRI), T. Hatsui (理研), E. Nango (理研), R. Tanaka (理研), H. Naitow (理研), Y. Matsuura (理研), A. Yamashita (理研), M. Yamamoto, O. Nureki (東大), M. Yabashi (JASRI), T. Ishikawa (理研), S. Iwata (京大) & J.-R. Shen (岡山大), “Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL”, *Nature* **543**, 131, (2017)

国際会議

- II-2 H. Ago, K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), M. Yamamoto, K. Itho-Shinzawa, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, M. Suga (岡山大), F. Akita (岡山大), J.-R. Shen (岡山大), “Native structure analysis of large metalloproteins using femtosecond crystallography”, Science@FELs 2016, Trieste Italy, September (2016)
- II-3 K. Yamashita (理研), K. Hasegawa (JASRI), D. Pan (京大), T. Murai (京大), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), T. Nakatsu (京大), H. Ago, T. Kumasaka (JASRI), M. Yamamoto, “Experimental phasing with serial crystallography at XFEL and synchrotron radiation” 30th European Crystallographic Meeting (ECM30), Basel Swiss, August (2016)
- II-4 M. Yamamoto, H. Ago, K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), K. Shinzawa-Itoh, T. Tsukihara, S. Yoshikawa, M. Suga (岡山大), F. Akita (岡山大), J.-R. Shen (岡山大), “Determination of Radiation Damage Free Crystal Structure of X-ray Sensitive Proteins using SACLA”, UNIST-XFEL Science Workshop, XFEL Opportunities, Ulsan Korea, September (2016)

国内会議

- II-5 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無損傷構造解析, 第15回日本蛋白質科学会年会, 徳島市, 6月 (2016)
- II-6 秋田総理 (岡山大)・菅倫寛 (岡山大)・山下恵太郎 (理研)・上野剛 (理研)・村上博則 (JASRI)・中島芳樹 (岡山大)・梅名泰史 (岡山大)・平田邦生 (理研)・久保稔 (理研)・長谷川和也 (JASRI)・山本雅貴・吾郷日出夫・沈建仁 (岡山大) : Structural analysis of photosystem II to reveal the mechanism of light-induced water-splitting, 第54回日本生物物理学会大会, つくば市, 11月 (2016)
- II-7 上野剛 (理研)・島田敦広・山下栄樹 (阪大)・長谷川和也 (JASRI)・熊坂崇 (JASRI)・伊藤・新澤恭子・吉川信也・月原富武・山本雅貴 : 高エネルギーX線を利用した休止酸化型チトクロム酸化酵素の低損傷構造解析, 平成28年度日本結晶学会年会, 水戸市, 11月 (2016)
- II-8 大出真央 (慶應大)・岡島公司 (慶應大)・嘉祥寺谷幸子 (大阪府大)・高山裕貴 (理研)・荳口友隆 (慶應大)・引間孝明 (理研)・山本雅貴・中迫雅由 (慶應大) : X線小角散乱法を用いたシロイヌナズナ phototropin1 の構造及び機能研究, 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, 神戸市, 1月 (2017)

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