

## 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、解析対象の拡大と簡便かつ迅速化な構造決定を目指したビームラインの高度化研究を進めている。具体的には、1 $\mu$ m 集光ビームの安定運用を世界に先駆けて実現した BL32XU を中心に、結晶の大きさや単結晶か単結晶の集合体であるかといった結晶の性状に関係無く、あらゆる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試料自動交換迅速化、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による自動回折イメージ収集、さらに複数結晶からの回折イメージ自動処理システムまでも統合した「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、主に、微小タンパク質結晶の高精度構造解析に不可欠な、大量の 2~3 ミクロンの微小結晶からの全自動データ収集・処理法の研究開発を進めている。この研究開発により、ミクロンオーダーの微小結晶の測定・解析のレベル向上に努めると同時に、微結晶しか与えない X 線結晶構造解析における高難度ターゲットタンパク質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関連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-リガンド複合体結晶の高効率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、幅広い温度範囲で結晶内環境を制御する温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 蛋白質構造解析での新規解析手法の開発

Research and Development for Protein Structure Analysis Methods

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)、特に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 では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。一方、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) 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), K. Yamashita (理研), G. Ueno (理研), Y. Kawano (理研), K. Hasegawa (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), M. Yamamoto : ZOO: an automatic data-collection system for high-throughput structure analysis in protein microcrystallography, *Acta Cryst. SecD* 75, 138-150 (2019).
- I -2 K. Morimoto (京都大), R. Suno (京都大), Y. Hotta (京都大), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto, S. Narumiya (京都大), S. Iwata (京都大), T. Kobayashi (京都大) : Crystal structure of the endogenous agonist-bound prostanoid receptor EP3, *Nat Chem Biol*. 15, 8-10 (2019).
- I -3 R. Suno (京都大), S. Lee (Beckman Res. Inst. of the City of Hope), S. Maeda (Stanford 大), S. Yasuda (千葉大), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), S. Horita (京都大), M. S. Tawaramoto (京都大), H. Tsujimoto (京都大), T. Murata (千葉大), M. Kinoshita (京都大), M. Yamamoto, B. K. Kobilka (Stanford 大), N. Vaidehi (Beckman Res. Inst. of the City of Hope), S. Iwata (京都大), T. Kobayashi (京都大) : Structural insights into the subtype-selective antagonist binding to the M2 muscarinic receptor, *Nat Chem Biol*. 14,1150-1158 (2018).
- I -4 K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto: KAMO: towards automated data processing for microcrystals, *Acta Cryst. SecD* 74, 441-449 (2018).
- I -5 T. Murakawa (大阪医科大), S. Baba (JASRI), Y. Kawano (理研), H. Hayashi (大阪医科大), T. Yano (大阪医科大), T. Kumasaka (JASRI), M. Yamamoto, K. Tanizawa (大阪大), T. Okajima (大阪大) : In crystallo thermodynamic analysis of conformational change of the topaquinone cofactor in bacterial copper amine oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 135-140 (2019).
- I -6 S. Basu (PSI), V. Olieric (PSI), F. Leonarski (PSI), N. Matsugaki (KEK/PF), Y. Kawano (理研), T. Tomizaki (PSI), C. Y. Huang (PSI), Y. Yamada (KEK/PF), L. Vera (PSI), N.

- Olieric(PSI), J. Basquin (MPI), J. Wojdyla (PSI), O. Bunk (PSI), K. Diederichs (Konstanz 大), M. Yamamoto, M. Wang (PSI) : Long-wavelength native-SAD phasing: opportunities and challenges, *IUCrJ*. 6, 373-386 (2019).
- I -7 M. Yamamoto, K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), K. Hasegawa (JASRI), T. Kumasaka (JASRI): “Challenges to high-throughput protein micro-crystallography at SPring-8”, Synchrotron Radiation Instrumentation 2018. Taipei Taiwan, June (2018).
- I -8 M. Yamamoto: “Development of beamlines for protein microcrystallography at SPring-8” 50 years of Synchrotron Radiation in the UK and its global impact (UKSR50), Liverpool UK, June (2018).
- I -9 山本雅貴: “小宇宙・生命の働きに迫る超高分解能顕微鏡 SPring-8”、日本天文学会市民公開講座、姫路、9月 (2018).
- I -10 山本雅貴、平田邦生 (理研): “放射光ビームラインにおける自動データ収集の現在と将来”、Photon Factory シンポジウム、つくば、9月 (2018).
- I -11 平田邦生 (理研)、河野能顕 (理研)、上野剛 (理研)、山下恵太郎 (理研)、村上博則 (JASRI)、熊坂崇 (JASRI)、山本雅貴: “LCP結晶から効率よくデータ収集を行う手法開発”、日本放射光学会、福岡、1月 (2019).
- II -1 A. Kobayashi (理研), Y. Takayama, K. Okajima (慶應大), M. Oide (慶應大), T. Yamamoto (慶應大), Y. Sekiguchi (慶應大), T. Oroguchi (慶應大), M. Nakasako (慶應大), Y. Kohmura (理研), M. Yamamoto, T. Hoshi (理学相原精機), Y. Torizuka (理学相原精機): Diffraction apparatus and procedure in tomography X-ray diffraction imaging for biological cells at cryogenic temperature using synchrotron X-ray radiation, *J. Synchrotron Rad.* 25, 1803-1818 (2018).
- II -2 G. S. A. Wright (Liverpool 大), A. Saeki, T. Hikima (理研), Y. Nishizono, T. Hisano (理研), M. Kamaya, K. Nukina, H. Nishitani, H. Nakamura (理研), M. Yamamoto, S. V. Antonyuk (Liverpool 大), S. S. Hasnain (Liverpool 大), Y. Shiro, H. Sawai: Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system, *Sci. Signal.* 11, eaaq0825 (2018).
- II -3 M. Yamamoto, K. Hasegawa (JASRI), K. Yamashita (理研), S. Baba (JASRI), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), H. Ago, T. Kumasaka (JASRI): “Serial crystallography at SPring-8 and SACLA”, ACA meeting, Toronto Canada, July (2018).
- II -4 G. Ueno (理研), A. Shimada (岐阜大), E. Yamashita (大阪大), K. Hasegawa (JASRI), T. Kumasaka (JASRI), K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Tsukihara, M. Yamamoto: “Low-dose X-ray structure of Cytochrome c Oxidase utilizing high-energy X-ray”, 10th International Workshop on Radiation Damage to Biological Samples, Brookhaven USA, (2018).
- II -5 T. Kumasaka (JASRI), K. Hasegawa (JASRI), S. Baba (JASRI), T. Kawamura (JASRI), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), M. Yamamoto: “Development of fixed-target serial synchrotron crystallography at room temperature in SPring-8”, AsCA 2018, Auckland New Zealand, December (2018).
- II -6 山本雅貴: “生命機能に迫る相関構造解析の最前線”、量子生命科学研究会第2回学術集会、東京、5月 (2018).

- II-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”、第56回日本生物物理学会年会、岡山、9月（2018）.
- II-8 山本雅貴：“生命機能に迫る放射光構造生命科学研究”，産総研中国センター・国際シンポジウム「SDGsの推進に資する化学技術と材料／タンパク質構造解析が切り拓く低環境負荷社会」、広島、2月（2019）.

## 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 (国研)日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業（平成30～32年度）  
研究課題 最新の構造解析技術を活用したGPCR創薬のための技術基盤の構築  
研究代表者 小林拓也（研究分担 山本雅貴）