

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.

本研究室では、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した「あらゆる結晶の全自動構造解析の実現」を目標とし、SPring-8 構造生物学用ビームラインの高度化研究を進めている。具体的には、1 μ m 集光ビーム（マイクロビーム）の安定運用を世界に先駆けて実現した SPring-8 のマイクロビームビームライン BL32XU を開発研究のプラットフォームとして、「全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO)」の高度化を進めている。ZOO は、結晶試料迅速交換、X 線ビーム位置への結晶センタリング、放射線損傷と測定分解能を考慮した最適測定条件設定と回折イメージ収集、さらに複数結晶からの回折イメージ処理までも統合した自動データ収集システムである。従来、不可能であった数ミクロンの大きさの結晶や結晶クラスターからのデータ収集などを含め、多様な性状の生体高分子結晶のデータ収集を実現している。このシステムを使った大量の 2~3 ミクロンの微小結晶からの全自動データ収集・処理による微小結晶の測定・解析レベルは世界最高水準にあり、X 線結晶構造解析における高難度ターゲットである微結晶しか与えないタンパク質の構造解析を強力に推し進めている。また ZOO を備えたマイクロビームビームライン BL45XU が SPring-8 に新設され高輝度光科学研究センターによって国内外の産学の研究者への共用利用に付されている。

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、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、反応中間体の構造解析などへの応用が期待される結晶試料の *in situ* 電子状態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、ZOO を利用したメールイン自動測定やインターネット経由でビームライン機器を操作するリモートアクセス測定など、SPring-8 の遠隔利用の促進に資する効率的なユーザー利用実験環境を構築する研究開発も行なっている。

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

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。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。

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 S. Baba (JASRI)・A. Shimada (岐阜大)・N. Mizuno (JASRI)・J. Baba・H. Ago・M. Yamamoto・T. Kumasaka (JASRI): A temperature-controlled cold-gas humidifier and its application to protein crystals with the humid-air and glue-coating method, *J Appl Crystallogr*, 52, 699-705 (2019)
- I-2 S. Ito・G. Ueno (理研)・M. Yamamoto : DeepCentering: fully automated crystal centering using deep learning for macromolecular crystallography, *J Synchrotron Radiat*, 26, 1361-1366 (2019)
- I-3 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42回日本分子生物学会年会 (福岡市), 2019
- I-4 山本雅貴・平田邦生 (理研)・山下恵太郎 (理研)・馬場清喜 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・坂井直樹 (理研)・河野能顕 (理研)・村上博則 (JASRI)・熊坂 崇 (JARI): Development of next-generation high-throughput MX beamline at SPring-8, 2019 American Crystallographic Association Annual Meeting (Covington, Kentucky, USA), 2019
- I-5 山本雅貴・平田邦生 (理研)・熊坂 崇 (JASRI): Macromolecular crystallography at SPring-8, 6th International Symposium on Diffraction Structural Biology: ISDSB2019 (豊中市), 2019

- I-6 上野 剛(理研)・仲村勇樹(JASRI)・奥村英夫(JASRI)・伊藤 翔・水野伸宏(JASRI)・引間孝明(理研)・平田邦生(理研)・河野能顕(理研)・村上博則(JASRI)・馬場清喜(JASRI)・増永拓也(JASRI)・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 33 回日本放射光学学会年会 (名古屋市), 2020
- I-7 山本雅貴：Macromolecular Crystallography Pipeline at SPring-8, 3-Way Meeting at ESRF (Grenoble, France), 2020
- II-1 C. C. Gopalasingam(リバプール大)・R. M. Johnson(リード大)・G. N. Chiduzza(リバプール大)・T. Tosha・M. Yamamoto・Y. Shiro・S. V. Antonyuk(リバプール大)・S. P. Muench(リード大)・S. S. Hasnain(リバプール大): Dimeric structures of quinol-dependent nitric oxide reductases (qNORs) revealed by cryo-electron microscopy, *Sci Adv*, 5, eaax1803 (2019)
- II-2 T. P. Halsted(リバプール大)・K. Yamashita(理研)・C. C. Gopalasingam(リバプール大)・R. T. Shenoy(リバプール大)・K. Hirata(理研)・H. Ago・G. Ueno(理研)・M. P. Blakeley(ILL)・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): Catalytically important damage-free structures of a copper nitrite reductase obtained by femtosecond X-ray laser and room-temperature neutron crystallography, *IUCrJ*, 6, 761-772 (2019)
- II-3 M. Suga(岡山大)・F. Akita(岡山大)・K. Yamashita(理研)・Y. Nakajima(岡山大)・G. Ueno(理研)・H. Li(岡山大)・T. Yamane(岡山大)・K. Hirata(理研)・Y. Umena(岡山大)・S. Yonekura(岡山大)・L. J. Yu(岡山大)・H. Murakami(JASRI)・T. Nomura(理研)・T. Kimura(神戸大)・M. Kubo(理研)・S. Baba(JASRI)・T. Kumasaka(JASRI)・K. Tono(JASRI)・M. Yabashi(理研)・H. Isobe(岡山大)・K. Yamaguchi(大阪大)・M. Yamamoto・H. Ago・J. R. Shen(岡山大): An oxyl/oxo mechanism for oxygen-oxygen coupling in PSII revealed by an x-ray free-electron laser, *Science*, 366, 334-338 (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～令和3年度)
研究課題 創薬等ライフサイエンス研究のための関連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～令和2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)
- 3 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