

## 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  
Yamamoto, M.

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。これまでに開発した「全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO)」の実装により SPring-8 マイクロビームビームライン BL32XU では結晶試料を収めた試料ホルダー UniPuck を結晶交換ロボットに装填して以降人手を介する事なく数分単位での結晶試料の X 線回折強度データの連続収集が可能になっている。ビームラインの自動化に次いで現在結晶試料の凍結と UniPuck への収納の自動化、X 線回折強度データからの構造解析の自動化に関する研究開発を進めている。また連続自動測定で得られる大量の構造データを効率よく研究に活用するため構造解析結果の効果的なブラウジングシステムの開発を進めている。これらの自動化研究の推進で研究開発の目的の 1 つに掲げる迅速化が進み多数の構造データの取り扱いが可能になる事で、平均構造を解析する X 線結晶構造解析では無視されてきた結晶内での存在頻度の低い準安定構造を含めた結晶構成分子の構造多様性の議論が可能になる。技術開発に加え開発した技術を用いた構造解析も外部機関と協力し進めている。

## 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.

前述した X 線結晶構造解析技術の基礎研究に加え X 線結晶構造解析の応用技術に関する研究も行っている。X 線結晶構造解析を応用した創薬手法に、多種類のリガンドと目的タンパク質の複合体構造解析を実施し得られた情報でリード化合物の構造最適化を支援する手法がある。ここでは構造解析の数を左右する迅速性は手法の有効性を左右する大きな要素である。現在自動化を進めていることが示すように結晶試料凍結の工程は律速段階である。凍結工程の自動化と異なる発想として、タンパク質リガンド複合体結晶の調製と非凍結での X 線回折強度測定を同じマイクロ流路内で実施するための研究を進めている。これとは別に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）の開発も進めている。さらに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などの開発も進めている。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 放射線損傷を低減した新規解析手法の開発

Development of methods focused on radiation damage reduction

山本雅貴・吾郷日出夫  
Yamamoto, M., Ago, H.

タンパク質結晶構造解析の発展に大きく貢献した超高輝度放射光の利用では試料の放射線損傷の速やかな発生への対処が不可欠である。これまで SPring-8 のビームラインでは 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、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 SACLA では特に X 線感受性の高いタンパク質の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) を開発した。これら放射線損傷を低減した新規構造解析手法をポンプ - プロブ法やクライオトラップ法と組み合わせて使用する酵素反応の中間体構造解析なども他機関と共同で実施している。

### Ⅳ 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. Ihara (理研)・M. Hato (理研)・T. Nakane (東大)・K. Yamashita (東大)・T. Kimura-Someya (理研)・T. Hosaka (理研)・Y. Ishizuka-Katsura (理研)・R. Tanaka (理研)・T. Tanaka (理研)・M. Sugahara (理研)・K. Hirata (理研)・M. Yamamoto・O. Nureki (東大)・K. Tono (JASRI)・E. Nango (理研)・S. Iwata (京大)・M. Shirouzu (理研) : Isoprenoid-chained lipid EROCO17+4: a new matrix for membrane protein crystallization and a crystal delivery medium in serial femtosecond crystallography., *Sci Rep*, 10, 19305 (2020)
- I-2 S. Ito・A. Senoo (東大)・A. Nagatoishi (東大)・M. Ohue (東工大)・M. Yamamoto・K. Tsumoto (東大)・N. Wakui (長岡高専) : Structural basis for the binding mechanism of human serum albumin complexed with cyclic peptide Dalbavancin., *J Med Chem*, 63, 14045-14053 (2020)
- I-3 山本雅貴 : 生命機能に迫るSPring-8/SACLAの構造生命科学研究所、マイクロ固体フォトリニクス研究会 第10回 「ユビキタス・パワーレーザー」 専門委員会(岡崎)、2020
- I-4 平田邦生 (理研)・小林 周 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (理研)・山本雅貴 : SPring-8におけるタンパク質結晶自動凍結装置の開発、日本結晶学会年 (オンライン)、2020
- I-5 山本雅貴 : 創薬を目指したSPring-8/SACLAの構造生物学研究所、大阪大学ナノ理工学人材育成産学コンソーシアム令和2年度第2回ナノ理工学情報交流会 (豊中市)、2020
- I-6 平田邦生 (理研)・小林 周 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (理研)・山本雅貴 : 協働ロボットを利用した高速結晶凍結システムの開発、日本放射光学会年会 (オンライン)、2021
- I-7 上野 剛 (理研)・奥村英夫 (JASRI)・伊藤 翔・仲村勇樹 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理研)・引間孝明 (理研)・増永拓也 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・河村高志 (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I&IIの現状、日本放射光学会年会 (オンライン)、2021
- I-8 山本雅貴 : コロナの時代の放射光構造生物学、第38回コロイド・界面技術シンポジウム (オンライン)、2021
- I-9 山本雅貴 : 創薬を目指したSPring-8/SACLAの構造生物学研究所、第68回応用物理学会春季学術講演会 (オンライン)、2021
- II-1 Y. Nakamura (JASRI)・S. Baba (JASRI)・N. Mizuno (JASRI)・T. Irie (JASRI)・G. Ueno (理研)・K. Hirata (理研)・S. Ito・K. Hasegawa (JASRI)・M. Yamamoto・T. Kumasaka (JASRI) : Computer-controlled liquid-nitrogen drizzling device for removing frost from cryopreserved crystals., *Acta Cryst*, F76, 616-622 (2020)
- II-2 M. Maeki (北大)・S. Ito・R. Takeda (北大)・G. Ueno (理研)・A. Ishida (北大)・H. Tani (北大)・M. Yamamoto・M. Tokeshi (北大) : Room-temperature crystallography using a microfluidic protein crystal array device and its application to protein-ligand complex structure analysis., *Chem Sci*, 11, 9072-9087 (2020)
- II-3 K. Yoshimi (東大)・K. Takeshita (理研)・S. Yamayoshi (東大)・S. Shibumura (C4U)・Y. Yamauchi (東大)・M. Yamamoto・H. Yotsuyanagi (東大)・Y. Kawaoka (東大)・T. Mashimo (東大) : Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3., *medRxiv*, DOI: 10.1101/2020.06.02.20119875 (2020)
- II-4 坂井直樹 (理研)・松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・山本雅貴 : SPring-8におけるリガンドスクリーニングパイプラインの開発、日本結晶学会年会 (オンライン)、2020
- III-1 K. Hasegawa (JASRI)・S. Baba (JASRI)・T. Kawamura (JASRI)・M. Yamamoto・T.

- Kumasaka (JASRI) : Evaluation of the data-collection strategy for room-temperature micro-crystallography studied by serial synchrotron rotation crystallography combined with the humid air and glue-coating method., *Acta Cryst*, D77, 300-312 (2021)
- III-2 S.L. Rose (リバプール大)・S.V. Antonyuk (リバプール大)・D. Sasaki (リバプール大)・K. Yamashita (東大)・K. Hirata (理研)・G. Ueno (理研)・H. Ago・R.R. Eady (リバプール大)・T. Toshiya・M. Yamamoto・S.S. Hasnain (リバプール大) : An unprecedented insight into the catalytic mechanism of copper nitrite reductase from atomic-resolution and damage-free structures, *Sci Adv*, 7, eabd8523 (2021)
- IV-1 S. Tojo (住友大日本製薬)・Z. Zhang (東大)・H. Matsui (住友大日本製薬)・M. Tahara (住友大日本製薬)・M. Ikeguchi (横市大)・M. Kochi (住友大日本製薬)・M. Kamada (住友大日本製薬)・H. Shigematsu (理研)・A. Tsutsumi (東大)・N. Adachi (KEK)・T. Shibata (東大)・M. Yamamoto・M. Kikkawa (東大)・T. Senda (KEK)・Y. Isobe (住友大日本製薬)・U. Ohto (東大)・T. Shimizu (東大) : Structural analysis reveals TLR7 dynamics underlying antagonism., *Nat Commun*, 11, 5204 (2020)
- IV-2 S. Nojima (京大)・Y. Fujita (京大)・K.T. Kimura (京大)・N. Nomura (京大)・R. Suno (京大)・K. Morimoto (京大)・M. Yamamoto・T. Noda (京大)・S. Iwata (京大)・H. Shigematsu (理研)・T. Kobayashi (京大) : Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G Protein., *Structure*, 29, 252-260 (2020)
- IV-3 山本雅貴 : CryoEM/bioSAXS/XFEL、第59回Spring-8 先端利用技術ワークショップ/大阪大学蛋白質研究所セミナー (オンライン)、2021

## 生命科学専攻

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~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