

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

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「全自動 X 線回折強度データ収集パイプライン (ZOO)」による人手を介さないビームライン自動運転と高輝度光源並びに高速検出器の相乗効果により、データ爆発とも言える X 線回折強度データの大量自動取得を実現した。X 線回折強度データ取得の一層の効率向上に向けた研究開発を継続している。具体的には X 線光軸上への微結晶の精密導入、大量の構造解析結果の閲覧性向上に関わる開発等が進行中である。大量の X 線回折強度データの利用法の開拓として、X 線回折強度データの同型性に基づく結晶弁別による同型結晶間に存在する生体高分子の構造の違いを分別した構造解析の実現と構造生命科学への応用方法の検討を進めている。

全自動構造解析の実現とは方向性の異なる技術開発として、高輝度光源と高速検出機の相乗効果により可能となった微結晶の高速回折像測定技術を拡張した放射光での常温時分割構造解析の手法開発も進めている。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。

ここまで述べた技術開発の基盤の一つである高輝度放射光の利用で避けて通れない課題が X 線による試料の損傷の管理である。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。また XFEL 施設である SACLA でも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.

ビームラインの高度化研究に併せて、ビームラインの効果的な運用に資する周辺技術の開発として「結晶化した試料をビームラインで測定できる凍結結晶試料にする準備の効率化」に関わる技術開発を行なっている。放射線損傷の抑制の観点で凍結結晶の利用は高輝度放射光を用いる現代的な X 線結晶構造解析の基本である。しかし、結晶の抗凍結剤処理と凍結処理、凍結結晶試料の UniPuck への装填、回折実験結果を踏まえた抗凍結条件の最適化など人手が必要な工程からなる結晶凍結作業は、X 線結晶構造解析において人手がかかる過程の代表格である。これらの工程に含まれる結晶の凍結作業と UniPuck への装填作業の省力化に資する技術開発を行なっている。

結晶凍結作業の省力化とは発想を異にする試料準備の効率化方法として、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そのままを使用する方法などである。結晶周辺の溶媒交換の容易さに優れる前者は、多種類の低分子化合物との複合体構造解析で得られた情報から薬剤候補化合物の構造最適化をすすめる創薬手法の効率的運用への貢献が期待できる。現在、実験効率向上のためマイクロ流路の集積化を進めている。後者は、化合物の浸漬など事後の結晶修飾ができないが、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、結晶化後の環境変化に敏感な結晶の X 線回折強度測定、初期結晶化条件探索段階での視認できない微結晶の検出や X 線回折データ収集で活用が期待される。これまでに SBS 規格の結晶化プレートを回折計に設置する装置を作成し、実利用に向けた検討を進めている。

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使用法 (HAG 法) の開発も進めている。外部トリガーによる構造変化を追跡する時分割構造解析を含めた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。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 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 H. Kwon (Bristol 大)・J. Basran (Leicester 大)・C. Pathak (Leicester 大)・M. Hussain (Leicester 大)・S. L. Freeman (Bristol 大)・A. J. Fielding (Liverpool John Moores 大)・A. J. Bailey (Bristol 大)・N. Stefanou (Bristol 大)・H. A. Sparkes (Bristol 大)・T. Tosha (理研)・K. Yamashita (MRC)・K. Hirata (理研)・H. Murakami (JASRI)・G. Ueno (理研)・H. Ago・K. Tono (JASRI)・M. Yamamoto・H. Sawai・Y. Shiro・H. Sugimoto (理研)・E. L. Raven (Bristol 大)・P. C. E. Moody (Leicester 大) : XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II, *Angew Chem Int Ed Engl*, 60, 14578-14585 (2021)
- I-2 T. Nomura・T. Kimura (神戸大)・Y. Kanematsu (広島市大)・D. Yamada・K. Yamashita (理研)・K. Hirata (理研)・G. Ueno (理研)・H. Murakami (JASRI)・T. Hisano (理研)・R. Yamagiwa・H. Takeda・C. Gopalasingam・R. Kousaka・S. Yanagisawa・O. Shoji (名古屋大)・T. Kumasaka (JASRI)・M. Yamamoto・Y. Takano (広島市大)・H. Sugimoto (理研)・T. Tosha (理研)・M. Kubo・Y. Shiro : Short-lived intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118, (2021)
- I-3 S. Baba (JASRI)・H. Matsuura (理研)・T. Kawamura (JASRI)・N. Sakai (理研)・Y. Nakamura (JASRI)・Y. Kawano (理研)・N. Mizuno (JASRI)・T. Kumasaka (JASRI)・M. Yamamoto・K. Hirata (理研) : Guidelines for de novo phasing using multiple small-wedge data collection, *J Synchrotron Radiat*, 28, 1284-1295 (2021)
- I-4 Y. Saijo-Hamano (神戸大)・A. A. Sherif (大阪大)・A. Pradipta (大阪大)・M. Sasai (大阪大)・N. Sakai (理研)・Y. Sakihama (神戸大)・M. Yamamoto・D. M. Standley (大阪大)・R. Nitta (神戸大) : Structural basis of membrane recognition of *Toxoplasma gondii* vacuole by Irgb6, *Life Sci Alliance*, 5, (2022)
- I-5 R. Kutsukawa (東北大)・R. Imaizumi (金沢大)・M. Suenaga-Hiromori (東北大)・K. Takeshita (理研)・N. Sakai (理研)・S. Misawa (金沢大)・M. Yamamoto・H. Yamaguchi (住友ゴム)・Y. Miyagi-Inoue (住友ゴム)・T. Waki (東北大)・K. Kataoka (金沢大)・T. Nakayama (東北大)・S. Yamashita (金沢大)・S. Takahashi (東北大) : Structure-based engineering of a short-chain cis-prenyltransferase to biosynthesize nonnatural all-cis-polyisoprenoids : molecular mechanisms for primer substrate recognition and ultimate product chain-length determination, *FEBS J*, (2022)
- I-6 Y. Kamitsukasa (東大)・K. Nakano (東大)・K. Murakami (東大)・K. Hirata (理研)・M. Yamamoto・T. Shimizu (東大)・U. Ohto (東大) : The structure of NLRP9 reveals a unique C-terminal region with putative regulatory function, *FEBS Lett*, 596, 876-885 (2022)
- I-7 K. Yoshimi (東京大)・K. Takeshita (理研)・S. Yamayoshi (東京大)・S. Shibumura (C4U)・Y. Yamauchi (東京大)・M. Yamamoto・H. Yotsuyanagi (東京大)・Y. Kawaoka (Wisconsin-Madison 大)・T. Mashimo (東京大) : CRISPR-Cas3-based diagnostics for SARS-CoV-2 and influenza virus, *iScience*, 25, 103830 (2022)
- I-8 山本雅貴・平田邦生 (理研)・長谷川和也 (JASRI) : SPring-8 のタンパク質結晶構造解析、日本結晶学会誌、64、2-9 (2022)
- I-9 平田邦生 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・河野能顕 (理研)・馬場清喜

- (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・熊坂 崇 (JASRI)・山本雅貴 :
SPring-8 ビームラインにおけるタンパク質結晶からの自動データ収集の現状、第 21 回日本
蛋白質科学会年会 (online)、2021
- I-10 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 :
階層的クラスタリングを用いた回折データの分類と構造多型の解析、第 21 回日本蛋白質科学
会年会 (Online)、2021
- I-11 長谷川和也 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増
永拓也 (JASRI)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : 時分割構造解析に向けた SPring-8
BL41UX の高度化構想、日本結晶学会令和 3 年度年会 (Online)、2021
- I-12 馬場清喜 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・奥
村英夫 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・坂井直
樹 (JASRI)・松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) :
SPring-8 BL45XU で実現する高効率・高精度自動測定、日本結晶学会令和 3 年度年会
(Online)、2021
- I-13 平田邦生 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・竹下浩平 (理研)・當舎武彦 (理
研)・榛葉幹治・山本雅貴 : SPring-8 ZOO システム 次の一手、日本結晶学会令和 3 年度年
会 (Online)、2021
- I-14 松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理研)・山本雅貴 :
構造多型解析に向けた回折データ分類の検討、日本結晶学会令和 3 年度年会 (Online)、2021
- I-15 H. Ago : Time resolved x-ray crystal structure analysis of photolysis of CO bound
cytochrome *c* oxidase, Pacificchem 2021 (Online), 2021
- I-16 上野 剛 (理研)・小西真晶(リガク)・吾郷日出夫・奥村英夫 (JASRI)・河村高志 (JASRI)
・坂井直樹 (理研)・竹下浩平 (理研)・引間孝明 (理研)・平田邦生 (理研)・河野能顕 (理
研)・松浦滉明 (理研)・仲村勇樹 (JASRI)・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、第 35 回日本放射光学会年会 放射光科学合同
シンポジウム (Online)、2022
- I-17 馬場清喜 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・奥
村英夫 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・坂井直
樹 (JASRI)・松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : 共用
タンパク質結晶回折ビームライン BL45XU における自動測定の現状、第 35 回日本放射光学
会年会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022
- I-18 平田邦生 (理研)・松浦滉明 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・竹下浩平 (理研)・當舎武彦 (理
研)・榛葉幹治・山本雅貴 : SPring-8 ZOO システム 次の一手、第 35 回日本放射光学会年
会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022
- I-19 長谷川和也 (JASRI)・馬場清喜 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・増永
拓也 (JASRI)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : 動的構造解析に向けた SPring-8 BL41XU
の高度化構想、第 35 回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022
- I-20 水野伸宏 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・上野 剛 (理研)・山本雅
貴・熊坂 崇 (JASRI) : SPring-8 タンパク質結晶回折ビームライン新遠隔測定システム、
第 35 回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022

- II-1 Y. Kawano (理研)・M. Hikita (KEK)・N. Matsugaki (KEK)・M. Yamamoto・T. Senda (KEK) : A crystal-processing machine using a deep-ultraviolet laser : application to long-wavelength native SAD experiments, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 78, 88-95 (2022)
- II-2 坂井直樹 (JASRI)・竹下浩平 (理研)・松浦滉明 (理研)・平田邦生 (理研)・山本雅貴 : 理研 SPring-8 におけるハイスループットリガンドスクリーニングパイプラインの開発、第 21 回日本蛋白質科学会年会 (online)、2021
- II-3 五代乃々花・竹下浩平 (理研)・坂井直樹 (JASRI)・上野 剛 (理研)・伊藤 翔 (リガク)・吾郷日出夫・山本雅貴 : ヒスタミンメチルトランスフェラーゼの SAM 結合に依存する構造変化を伴う活性化メカニズムへの構造的洞察、第 21 回日本蛋白質科学会年会 (online)、2021
- II-4 上野 剛 (理研)・真栄城正寿 (北海道大)・竹田怜央 (北海道大)・伊藤 翔 (リガク)・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、日本結晶学会令和 3 年度年会 (Online)、2021
- II-5 奥村英夫 (JASRI)・坂井直樹 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・上野 剛 (理研)・馬場清喜 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・山本雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : SPring-8 PX-BL における結晶化プレート in situ 回折測定と化合物スクリーニングシステムの開発、日本結晶学会令和 3 年度年会 (Online)、2021
- II-6 奥村英夫 (JASRI)・坂井直樹 (JASRI)・村上博則 (JASRI)・水野伸宏 (JASRI)・増永拓也 (JASRI)・仲村勇樹 (JASRI)・上野 剛 (理研)・馬場清喜 (JASRI)・河村高志 (JASRI)・長谷川和也 (JASRI)・山本 雅貴・熊坂 崇 (JASRI) : SPring-8 PX-BL における結晶化プレート in situ 回折測定と化合物スクリーニングシステムの開発、第 35 回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム (Online)、2022
- III-1 松浦滉明 (理研)・小林 周 (理研)・鈴木明大 (北海道大)・平田邦生 (理研)・上野 剛 (理研)・吾郷日出夫・山本雅貴 : サブミクロン結晶からの構造決定を目指した微小結晶解析基盤の開発、令和三年度新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム (淡路市)、2021

生命科学専攻

博士前期過程

尾松美音 : クリスピーキャス 3 の機能メカニズムの解明を目指した構造生物学研究

五代乃々花 : ヒスタミンメチルトランスフェラーゼ阻害剤の開発を目指したハイスループット複合体構造解析スクリーニング手法の構築

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 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