

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・吾郷日出夫
Yamamoto, M., Ago, H.

本プロジェクトと次項II「X線結晶構造解析関連応用技術開発」は、「あらゆる結晶の全自動構造解析の実現」を目的として行う研究であって、ここで言う全自動構造解析は、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する。

プロジェクトIは、SPring-8 構造生物学用ビームラインの高度化研究である。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)」と高輝度光源および高速検出器の相乗効果によりビームライン自動運転とX線回折強度データの大量取得が可能となった。これを受け、大量に得られるX線回折強度データと構造解析結果の利活用に関する研究開発が始まっている。具体的には、大量の構造解析結果の閲覧性向上に資する計算機プログラムの開発や、結晶毎の僅かなX線回折強度の違いを指標とした結晶弁別により、結晶内でも見られる構造の多様性を個別に構造解析する試みである。生体高分子結晶の結晶構造の多様性は、分子機能を背景としている可能性もあり、構造生命科学への応用も期待される。

全自動構造解析以外にも、X線損傷を管理したX線回折実験法の開発高度化研究にも取り組んでおり、微小結晶を迅速に多数交換しながら測定を行うSerial Synchrotron Crystallography (SSX) や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)の開発などを進めている。またX線自由電子レーザー(XFEL)施設であるSACLAでは、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。これらとは別に、XFELの主要な応用対象である常温時分割構造解析を放射光でも実施可能にするための開発も行っている。

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.

本プロジェクトは、ビームラインの効果的な運用に資するビームライン周辺技術の開発である。具体例の一つは、効果的なビームライン運用上に向けた、結晶凍結から回折計に結晶を設置するま

での自動化技術の開発である。高輝度放射光を用いる現代の X 線結晶構造解析では、X 線損傷抑制の観点で凍結結晶の利用が基本である一方で、凍結条件の最適化実験や実際の結晶凍結作業の工程が時間と人的資源の両面で X 線結晶構造解析の律速となっている。これら工程の改善が効率的なビームライン運用につながる。

結晶凍結の効率化とは異なる発想で、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をそのまま使用する方法などである。前者は、結晶周辺の溶媒交換の容易さから、多種類の低分子化合物との複合体構造を薬剤候補化合物の構造最適化に利用する創薬手法での使用が期待される。後者は、結晶に一切手を加えない X 線回折データ収集法であり、例えば、環境変化に敏感な結晶の X 線回折強度測定や初期結晶化条件探索での微結晶の検出と X 線回折データ収集などでの活用が期待される。

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その使用法 (HAG 法) の開発も進めている。時分割構造解析を含む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。また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。結晶試料の *in situ* 電子状態分光観察による反応中間体の構造解析などへの応用が期待される。また構造研究を進める上で試料の品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解析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、真空中に結晶を保持し X 線回折像を記録する真空回折計の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、極小さな結晶からでも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 Imaizumi R., Matsuura H., Yanai T., Takeshita K., Misawa S., Yamaguchi H., Sakai N., Miyagi-Inoue Y., Suenaga-Hiromori M., Waki T., Kataoka K., Nakayama T., Yamamoto M., Takahashi S., Yamashita S. : Structural-Functional Correlations between Unique N-terminal Region and C-terminal Conserved Motif in Short-chain cis-Prenyltransferase

- from *Tomato, Chembiochem*, 25(7), e202300796 (2024)
- I-2 Matsuura H., Sakai N., Toma-Fukai S., Muraki N., Hayama K., Kamikubo H., Aono S., Kawano Y., Yamamoto M., Hirata K. : Elucidating polymorphs of crystal structures by intensity-based hierarchical clustering analysis of multiple diffraction data sets, *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 79(Pt 10), 909-924 (2023)
- I-3 Yanai T., Takahashi Y., Katsumura E., Sakai N., Takeshita K., Imaizumi R., Matsuura H., Hongo S., Waki T., Takahashi S., Yamamoto M., Kataoka K., Nakayama T., Yamashita S. : Structural insights into a bacterial beta-glucosidase capable of degrading sesaminol triglucoside to produce sesaminol: toward the understanding of the aglycone recognition mechanism by the C-terminal lid domain, *J Biochem*, 174(4), 335-344 (2023)
- I-4 松浦滉明、坂井直樹、河野能顕、山本雅貴、平田邦生 : タンパク質 X線結晶構造解析におけるビッグデータ化と構造生物学における新たな展開、*放射光*、36(5), 232-242 (2023)
- I-5 Ando R., Shimozono S., Ago H., Takagi M., Sugiyama M., Kurokawa H., Hirano M., Niino Y., Ueno G., Ishidate F., Fujiwara T., Okada Y., Yamamoto M., Miyawaki A. : StayGold variants for molecular fusion and membrane-targeting applications, *Nat Methods*, (2023)
- I-6 Tsutsumi E., Niwa S., Takeda R., Sakamoto N., Okatsu K., Fukai S., Ago H., Nagao S., Sekiguchi H., Takeda K. : Structure of a putative immature form of a Rieske-type iron-sulfur protein in complex with zinc chloride, *Commun Chem*, 6(1), 190 (2023)
- I-7 Lee Hye-Eun · Okumura Tomoyo · Ooka Hideshi · Adachi Kiyohiro · Hikima Takaaki · Hirata Kunio · Kawano Yoshiaki · Matsuura Hiroaki · Yamamoto Masaki · Yamamoto Masahiro · Yamaguchi Akira · Lee Ji-Eun · Nam Ki Tae · Ohara Yasuhiko · Hashizume Daisuke · McGlynn Shawn · Nakamura Ryuhei : Power Generation in Hierarchical Alkaline Hydrothermal Vents, *Water-Rock Interaction WRI17* (仙台), 2023, (Oral)
- II-1 Ueno Go · Kobayashi Kotori · Maeki Masatoshi · Sakai Naoki · Matsuura Hiroaki · Kawamura Takashi · Kumasaka Takashi · Yamamoto Masaki : Development of a new microfluidic device aiming at ligand screening with protein crystallography、*Twenty-Sixth Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (Melbourne/Austraria)*, 2023, (Poster)
- II-2 上野 剛 · 小林ことり · 真栄城正寿 · 西岡晶子 · 坂井直樹 · 河村高志 · 松浦滉明 · 竹下浩平 · 吾郷日出夫 · 熊坂 崇 · 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の開発、*第 37 回日本放射光学会年会 (姫路)*、2024、(口頭)
- II-3 小林ことり · 上野 剛 · 真栄城正寿 · 西岡晶子 · 坂井直樹 · 河村高志 · 松浦滉明 · 竹下浩平 · 山本雅貴 : マイクロ流路デバイスを用いた化合物スクリーニング系の構築、*第 23 回日本蛋白質科学会年会 (名古屋)*、2023、(ポスター)
- III-1 Matsuura Hiroaki · Ago Hideo · Kobayashi Amane · Ueno Go · Hirata Kunio · Suzuki Akihiro · Yamamoto Masaki : Development of an in-vacuum diffractometer for protein micro-crystallography、*Molecular Movie International Symposium 2023 (淡路市)*, 2023, (Poster)
- III-2 松浦滉明 · 吾郷日出夫 · 上野 剛 · 平田邦生 · 鈴木明大 · 山本雅貴 : 極微小結晶からの構造解析に向けた真空回折計の開発、*令和 5 年(2023 年)度日本結晶学会年会 (宇部市)*、2023、(口頭)

- III-3 松浦滉明・吾郷日出夫・小林 周・上野 剛・平田邦生・鈴木明大・山本雅貴：極微小結晶からの高感度計測のための真空回折計の開発、第 37 回日本放射光学会年会（姫路市）、2024、（口頭）

生命科学専攻

博士前期過程

大恵千翔

小林ことり

中山 楓

馬場匠望

科学研究費補助金等

- 1 (国研) 日本医療研究開発機構 生命科学・創薬研究支援基盤事業 (令和4年度～令和8年度)
研究課題 生命科学と創薬研究に向けた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