



SACLA の得意とする X 線波長でタンパク質微結晶の新規構造解析に成功

概要

中津亨 京都大学大学院薬学研究科准教授、山下恵太郎 理化学研究所基礎科学特別研究員、岩田想 理化学研究所グループディレクター（京都大学医学研究科教授）、中根崇智 東京大学大学院理学系研究科特任助教、溝端栄一 大阪大学大学院工学研究科講師、登野健介 高輝度光科学研究センターチームリーダー、湯本史明 高エネルギー加速器研究機構特任准教授による合同研究チームは、SACLA¹の非常に強力な高エネルギー（短波長）X 線を用い、常温においてセレノメチオニンを導入した ACG と Stem という二種類のタンパク質の μm サイズの結晶から構造を決定することに成功しました。SACLA や米国の LCLS と



Stem の微結晶

いった強力な XFEL 施設の整備に伴い、 μm サイズの結晶を用いたタンパク質構造解析も行われてきましたが、既に類似のタンパク質の構造が判明しているタンパク質の解析例が多く、構造が全く不明なタンパク質の解析はあまり行われてきませんでした。

現在世界で稼働している XFEL 施設の一つである SACLA は、SPring-8 のような放射光施設に比べ約 10 億倍明るい X 線を 1 秒間に最大 60 回、100 兆分の 1 秒以下のパルスで出力することができます。したがって、従来は超低温で行われていた μm サイズの構造解析が常温で行えるようになってきました。

今回、研究グループでは、立体構造が未知である場合において、原子の異常分散効果のみを用いて構造解析する単波長異常分散法（Single-wavelength Anomalous Diffraction, 以下 SAD 法）を用いて、2 種類のタンパク質の微結晶から構造決定を行いました。SAD 法では一般的にメチオニンというアミノ酸を、解析の目印となるセレンを含むセレノメチオニンに置き換えたタンパク質結晶を用います。SACLA は、セレン原子の異常分散効果を利用した SAD 法に必須の約 13 keV という高いエネルギーの X 線を安定に発生させることができるように設計されています。今回は SACLA の特徴をうまく活かしてセレンがどこに位置しているのかがはっきりと確かめることができました。そのため、最少でわずか 13,000 枚の X 線回折イメージから構造解析可能なデータセットを取得できました。今後 SACLA を使うことで新規タンパク質微結晶の迅速な X 線結晶構造解析が可能であることを示唆する結果です。

本研究の成果は、英国の科学雑誌 *IUCrJ* に平成 29 年 8 月 10 日にオンライン出版されました。

¹ 理化学研究所と高輝度光科学研究センター（JASRI）による日本初の X 線自由電子レーザー（XFEL : X-ray Free-Electron Laser）施設。加速器の中で電子の固まりを正確な制御の下で一斉に振動させ、0.1 ナノメートル以下という世界最短波長の X 線レーザーを発振する。

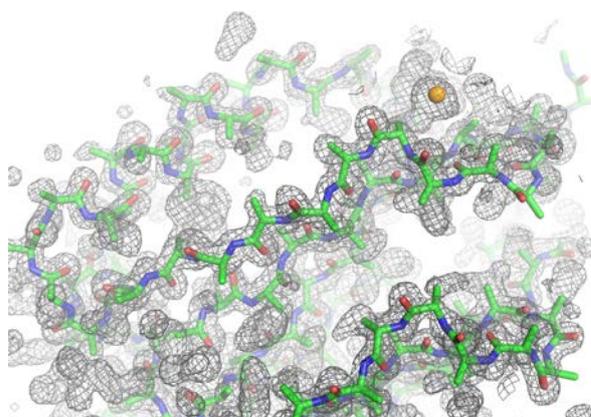
背景

XFEL 光は従来の放射光施設からの X 線に比べると非常に輝度が高いことから、これまで解析が困難であった膜タンパク質に代表される創薬のターゲットタンパク質の構造解析への適用が期待されています。SACLA では硫黄、銅などの異常分散効果を用いた SAD 法による構造決定が行われてきましたが、必要な回折イメージの枚数が多かったり特殊な金属元素の導入が必要であったりするなどの問題がありました。

アミノ酸の一部をセレノメチオニンに入れ替える手法はタンパク質の構造決定において代表的なものであり、多くの研究者の間でノウハウが蓄積されています。加えて SACLA はセレンの異常分散効果を最大限に得る高エネルギー X 線を安定に出力できることが大きな特徴です。そこで本研究では SACLA の高エネルギー XFEL 光を用い、効率良く新規タンパク質の立体構造を決定することに成功しました。

研究手法・成果

本研究グループはタンパク質結晶構造決定の目印としてセレンを用いました。構造決定のためにタンパク質を大量に作成する際、本来はメチオニンの硫黄原子がセレンに置換されたセレノメチオニンを導入し、セレンが結合したタンパク質を作成します。次にセレンを導入した Stem と ACG という 2 種類のタンパク質の μm サイズの微結晶を作成し、XFEL 光を用いてセレンの異常分散効果を得ました。SACLA が生み出す XFEL



SAD法による Stem の初期電子密度図

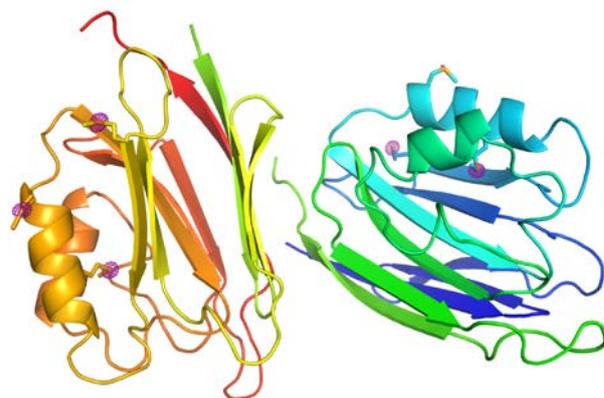
光は非常に明るく結晶を損傷させてしまうため 1 つの結晶に対して 1 枚のイメージデータしか測定できません。そのためインジェクターから連続的に押し出される結晶へ X 線を順次照射する手法で測定を行いました。この方法により、Stem では 13,000 枚、ACG は 60,000 枚のイメージデータを収集し、構造を決定することに成功しました。最少約 1 万枚のイメージデータで構造決定できたことにより、標準的な実験条件において約 1 時間の測定で新規タンパク質の立体構造を決定できることが示されました。

これに加えて既に 2015 年に構造決定の目印として水銀を用いて立体構造を決定した LRE というタンパク質についても最新の技術を用いてデータ処理を行いました。その結果、11,000 枚のデータで立体構造を決定することができました。

波及効果、今後の予定

今回実証した手法は多くのタンパク質に適用できる非常に汎用性が高い方法です。生命の維持に関わり創薬のターゲットになっているにもかかわらず大きな結晶を作成することが困難な膜タンパク質にも適用できると考えられます。

しかし、今回の方法は1つの結晶から1枚の回折イメージしか測定できないシリアルフェムト秒構造解析で行うため、まだ正確なX線回折強度の情報が効率よく引き出すことができていないと考えられます。今後、より正確な強度データを見積もる方法を開発していくことにより、構造決定できるまでの処理枚数をさらに減らしていくことが課題でしょう。



Stem タンパク質の立体構造

研究プロジェクトについて

本研究は文部科学省 X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題「創薬ターゲット蛋白質の迅速構造解析法の開発」、科学研究費助成事業挑戦的萌芽研究「創薬ターゲットの構造解析実現を目指した XFEL 光による新規構造決定法の開発」などの支援を受け実施されました。

研究メンバーについて

京都大学大学院薬学研究科中津亨准教授、村井智洋大学院生、潘東青元研究員、加藤博章教授、理化学研究所放射光科学総合研究センタービームライン基盤研究部山下恵太郎基礎科学特別研究員、東京大学大学院理学系研究科中根崇智特任助教、高エネルギー加速器研究機構(KEK)物質構造科学研究所構造生物学研究センター桑原直之研究員、湯本史明特任准教授、大阪大学大学院工学研究科溝端栄一講師、同蛋白質研究所鈴木守准教授、理化学研究所放射光科学総合研究センターSACLA 利用技術開拓グループ岩田想グループディレクター（京都大学大学院医学研究科教授）、高輝度光科学研究センターXFEL 利用研究推進室登野健介チームリーダー等による合同研究チームにより行われました。

論文タイトルと著者

タイトル Experimental phase determination with selenomethionine or mercury-derivatization in serial femtosecond crystallography

著者 Yamashita, K.; Kuwabara, N.; Nakane, T.; Murai, T.; Mizohata, E.; Sugahara, M.; Pan, D.; Masuda, T.; Suzuki, M.; Sato, T.; Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nango, E.; Tanaka, T.; Tono, K.; Joti, Y.; Kameshima, T.; Hatsui, T.; Yabashi, M.; Many, H.; Endo, T.; Kato, R.; Senda, T.; Kato, H.; Iwata, S.; Ago, H.; Yamamoto, M.; Yumoto, F.; Nakatsu, T.

掲載誌 *IUCrJ*