



JASRI



2014年11月6日

独立行政法人理化学研究所

国立大学法人大阪大学

国立大学法人京都大学

公益財団法人高輝度光科学研究センター

## 連続フェムト秒結晶構造解析のための結晶供給手法を開発

—少量の試料で多様なタンパク質の結晶構造決定が SACLA で可能に—

### 本研究成果のポイント

- 高粘度物質のグリースを用いて、結晶供給を制御した世界初の手法
- 従来の 1/10~1/100 のサンプル量でタンパク質の三次元結晶構造解析が可能
- タンパク質結晶だけでなく有機、無機物質にも応用できる

理化学研究所（理研、野依良治理事長）、大阪大学（平野俊夫総長）、京都大学（山極壽一総長）、高輝度光科学研究センター（JASRI、土肥義治理事長）は、X線自由電子レーザー（XFEL）施設「SACLA<sup>[1]</sup>」のX線レーザーを用いた「連続フェムト秒結晶構造解析（SFX）<sup>[2]</sup>」のための汎用的タンパク質結晶供給手法の開発に成功しました。これは、理研放射光科学総合研究センター（石川哲也センター長）生物試料基盤グループの菅原道泰研究員、SACLA 利用技術開拓グループの南後恵理子研究員、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）、大阪大学大学院工学研究科の溝端栄一助教、同大学蛋白質研究所の鈴木守准教授、京都大学大学院農学研究科の梶田哲哉助教、医学研究科の島村達郎特定講師、薬学研究科の潘東青 元研究員、JASRI・XFEL 研究推進室の登野健介副主幹研究員らを中心とした共同研究グループの成果です。

SACLA の X 線レーザーを用いた連続フェムト秒（1 フェムト秒は 1,000 兆分の 1 秒）の X 線結晶構造解析が実現すれば、これまで課題だった試料の放射線損傷<sup>[3]</sup>が起ることなく、ナノメートル～マイクロメートル（nm～ $\mu$ m）サイズのタンパク質の微小結晶でも結晶構造を決定できます。さらに、SFX では酵素反応に伴う一連の構造変化が起きるフェムト秒～ピコ秒（1 ピコ秒は 1 兆分の 1 秒）間の反応過程などを観察できます。しかし、タンパク質結晶を連続的に X 線レーザーの照射ポイントに供給するには液状の試料を速い流速で噴射するため、結果として大量の試料が必要であること、また、試料の組成によっては実験中に塩結晶が析出するため、タンパク質結晶の安定供給ができないという問題がありました。

共同研究グループは、タンパク質結晶を高粘度物質のグリース<sup>[4]</sup>に混ぜることで低速で試料を押し出し、少量の試料でさまざまなタンパク質の回折実験が行える手法の開発に成功しました。必要な試料が 1 mg 以下と従来の 1/10~1/100 程度であり、試料タンパク質が少量でも三次元結晶構造の決定が可能になります。今後、タンパク質に限らず、有機、無機物質といった幅広い研究分野への応用が期待できます。

本研究は、文部科学省 X 線自由電子レーザー重点戦略課題「創薬ターゲット蛋白質の迅速構造解析法の開発」（研究代表者：岩田想）、科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業（研究加速および ERATO）などの支援を受けて実施され、成果は米国の科学雑誌『*Nature Methods*』に掲載されるに先立ちオンライン版（11 月 10 日付け：日本時間 11 月 11 日）に掲載されます。

## 1. 背景

原子分解能でタンパク質の三次元結晶構造を決定するには、タンパク質結晶を用いた X 線結晶構造解析が適しています。大型放射光施設「SPring-8<sup>[5]</sup>」の放射光<sup>[6]</sup>を用いる場合、一般に約 30 マイクロメートル ( $\mu\text{m}$ ) 以上のタンパク質結晶が必要です。しかし、 $30\ \mu\text{m}$  以上のタンパク質結晶を得るのは困難で、特に創薬などの研究用途で重要なヒトを含む動物由来のタンパク質は、結晶化に使用できる十分な量を得るのが難しく、析出する結晶も回折実験に適した十分なサイズに成長しません。また、実験中にタンパク質結晶が放射線損傷を起こすことも大きな問題でした。

X 線自由電子レーザー (XFEL : X-ray Free-Electron Laser) は、SPring-8 の放射光より 10 億倍も明るいため、ナノメートル～マイクロメートル ( $\text{nm}\sim\mu\text{m}$ ) サイズのタンパク質の微小結晶でも構造解析ができます。現在、稼働中の XFEL 施設は、理研の「SACLA」と米国の SLAC 国立加速器研究所の「LCLS (Linac Coherent Light Source)」があり、また世界各国で XFEL 施設の建設計画が進行中です。

SACLA の 10 フェムト秒という超短時間での X 線レーザーの照射により、タンパク質が壊れる前に微小結晶の回折イメージを検出できます。この XFEL の特性を利用した主なタンパク質の構造決定法として、連続フェムト秒結晶構造解析 (SFX : Serial Femtosecond Crystallography) が注目されています (図 1a)。SFX では、主にジェットインジェクターと呼ばれる装置から噴出した多数の微小結晶を含む液体に X 線レーザーを照射し、各結晶からの回折データを連続的に収集します。SFX は常温で実験を行えるため、従来の低温条件下 (100 K 程度) で行う回折実験とは異なり、生理条件 (生体内) に近い構造を得ることができます。

しかし、タンパク質結晶を連続的に X 線レーザーの照射ポイントに供給するには、大量の試料が必要であること、試料の組成によっては実験中に塩結晶が析出することが問題でした。

## 2. 研究手法と成果

生体膜を構成している膜タンパク質<sup>[7]</sup>に対して SFX を行う場合、主に脂質キュービック相 (LCP : Lipidic Cubic Phase) 法<sup>[8]</sup>と呼ばれる結晶化が用いられます。LCP の高粘度環境下にあるタンパク質結晶をそのまま LCP インジェクターからゆっくり押し出すことで、非常に少量の試料でデータを収集できます。しかし、全てのタンパク質結晶を LCP 法で得るのは困難であり、LCP 法以外の結晶化法から得た結晶でも簡単に測定できる手法の開発が望まれていました。

そこで共同研究グループは、高粘度物質と微小結晶を混ぜ合わせることで、結晶を X 線レーザーの照射ポイントに安定して供給できる手法を検討しました。その高粘度物質に必要なとされる条件として、①タンパク質結晶と混合しても結晶に損傷を与えない物質②高濃度の塩や高粘度の試薬を含む微小結晶溶液と混合してもインジェクターから安定に試料を流せる③高粘度物質由来のノイズの発生が少なく、かつ高粘度物質内で微小結晶が凝集せず均一に分散してノズルの目詰まりを起こさないことなどが求められます。

共同研究グループは、それらの条件を満たす高粘度物質を検討した結果、タンパク質結晶のキャリア媒体として「グリース」が利用できることが分かりました。これをインジェクターに充填して測定する方法 (グリースマトリックス法) を開発しました

(図 1b)。今回、リゾチーム、グルコースイソメラーゼ、ソーマチン、および脂肪酸結合タンパク質 (FABP3) の 4 種類の水溶性タンパク質の結晶 (約 7~30  $\mu\text{m}$ ) から、結晶構造の評価に十分な回折分解能 2 オングストローム ( $\text{\AA}$ :  $1\text{\AA}$  は 100 億分の 1m) 以上の回折データの収集に成功し、結晶構造を決定しました。一例としてリゾチームの結晶構造を図 2 に示します。SFX 実験で使用した各試料タンパク質は 1 mg 以下であり、従来の方法に比べ 1/10~1/100 の少量化に成功しました。

### 3. 今後の期待

SACLA の 10 フェムト秒という超短時間での X 線レーザーの照射を用いた SFX により、酵素反応などに伴う一連の構造変化が起きるフェムト秒~ピコ秒間の反応過程などの観察が可能になります。また、本研究で開発したグリースによる結晶供給を用いた SFX は、タンパク質結晶のみを研究対象として限定するものではなく、有機、無機物質を問わず幅広い研究分野への応用が期待できます。

原論文情報：

Michihiro Sugahara, Eiichi Mizohata, Eriko Nango, Mamoru Suzuki, Tomoyuki Tanaka, Tetsuya Masuda, Rie Tanaka, Tatsuro Shimamura, Yoshiki Tanaka, Chiyo Suno, Kentaro Ihara, Dongqing Pan, Keisuke Kakinouchi, Shigeru Sugiyama, Michio Murata, Tsuyoshi Inoue, Kensuke Tono, Changyong Song, Jaehyun Park, Takashi Kameshima, Takaki Hatsui, Yasumasa Joti, Makina Yabashi, So Iwata, "Grease matrix as a versatile carrier of proteins for serial crystallography", *Nature Methods*, 2014, doi: 10.1038/nmeth.3172.

## <補足説明>

### [1] SACLA

理研と高輝度光科学研究センター (JASRI) が共同で建設した日本初の 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、その電子の固まりから X 線レーザーを発生させる X 線発生装置。2006 年度から 5 年間の計画で建設・整備を進めた国家基幹技術の 1 つ。2011 年 3 月に完成し、Spring-8 Angstrom Compact free-electron LAser の頭文字を取って SACLA と命名された。

### [2] 連続フェムト秒結晶構造解析 (SFX)

多数の微結晶を含む液体などをインジェクターから噴出しながら、X 線レーザーを照射し結晶構造を解析する手法。配向の異なる多数の微小結晶からの回折データを連続的に収集する。SFX は、Serial Femtosecond Crystallography の略。

### [3] 放射線損傷

X 線の持つエネルギーによって、X 線と相互作用した分子が壊れること。X 線との相互作用で分子が壊れる場合だけでなく、分子が壊れる過程で生じる電子や、壊れた分子から生成する反応性の高い分子が観察対象の分子と化学反応する場合もある。一般的にタンパク質結晶の放射線損傷は、X 線と水の相互作用をきっかけに、X 線照射後ピコ秒の時間スケ

ールで水から生成する反応性の高い分子がタンパク質と化学反応することで起きる。

#### [4] グリース

液体の潤滑油に増稠（ぞうちょう）剤を加えることでゼリー状にしたもの。各種機械の潤滑剤として広く利用されている。

#### [5] SPring-8

兵庫県播磨科学公園都市にある世界最高の放射光を生み出す理研の大型放射光施設。その運転管理と利用者支援は高輝度光科学研究センター（JASRI）が行っている。SPring-8の名前は Super Photon ring 8 GeV に由来する。

#### [6] 放射光

相対論的な荷電粒子（電子や陽電子）が磁場で曲げられるとき、その進行方向に放射される電磁波。放射光は明るく、指向性が高く、また光の偏光特性を自由に変えられるなどの優れた特徴を持つ。

#### [7] 膜タンパク質

生体膜を構成しているタンパク質で、全ゲノムをコードするタンパク質の3分の1を占める。生体膜の表面にあるタンパク質と内部に埋もれたタンパク質がある。生体膜の表面に付着しているものを膜表在性タンパク質、内部に埋もれているものを膜内在性タンパク質と呼ぶ。外界からの刺激に反応する受容体、イオンポンプなどの輸送体など、環境からの刺激を強く受けるタンパク質であるため、創薬の重要なターゲットとされ、高効率な構造・機能解析法の創出が待たれている。

#### [8] 脂質キュービック相(LCP:Lipidic Cubic Phase)法

脂質二重層にタンパク質を再構成させた状態で結晶化を行う方法。

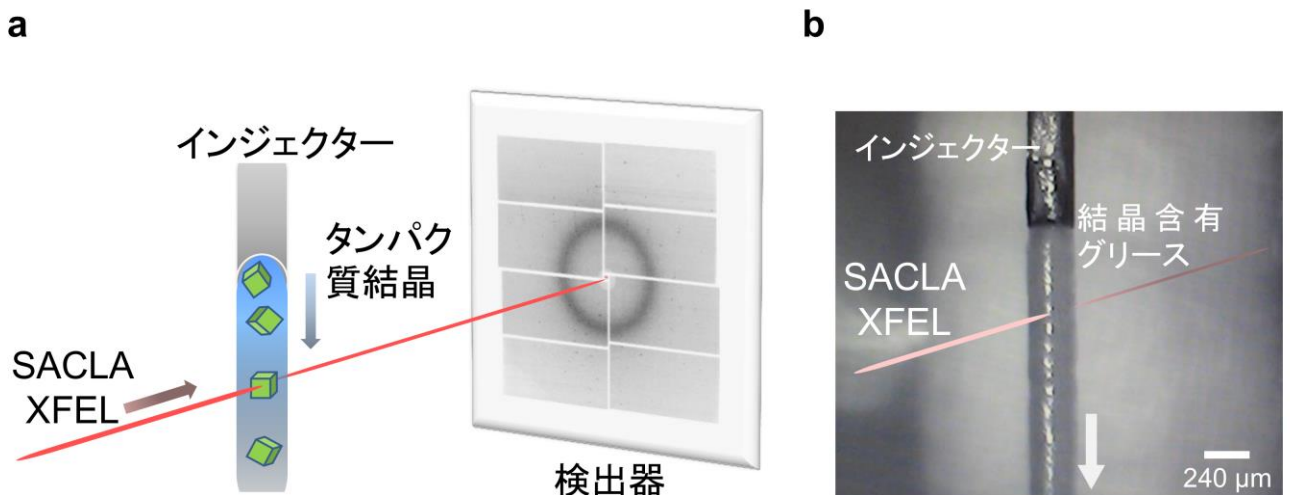


図1 連続フェムト秒結晶構造解析(SFX)とグリースマトリックス法

- (a) SFX 概念図。X線レーザーの照射ポイントにタンパク質結晶を供給する。  
(b) タンパク質結晶含有グリースをインジェクターから押し出した際の写真。

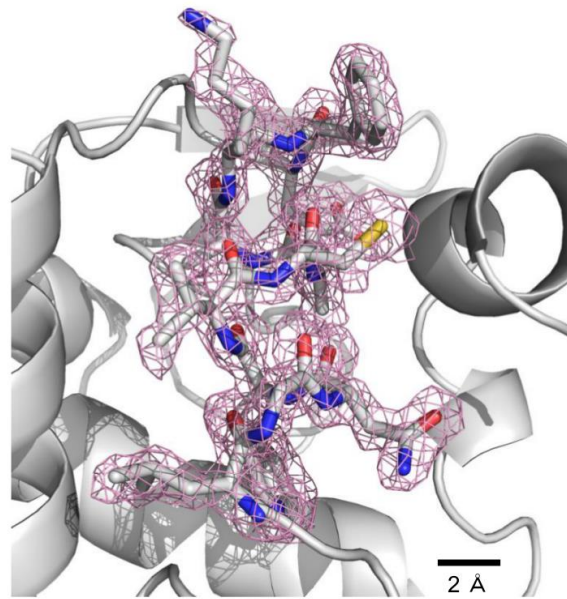


図 2 SFX により決定したリゾチームのタンパク質結晶構造

図中のピンク色のメッシュは電子密度、メッシュ内スティックモデルの青色は窒素原子、赤色は酸素原子、灰色は炭素原子、および黄色は硫黄原子を示す。