



JASRI

京都大学
理化学研究所

高輝度光科学研究センター

SACLA の X 線自由電子レーザーを用いた 新規タンパク質立体構造決定に世界で初めて成功

京都大学大学院薬学研究科中津亨准教授・潘東青元研究員・村井智洋大学院生・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・吾郷日出夫専任研究員・山本雅貴部長、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）、理化学研究所放射光科学総合研究センターXFEL 研究開発部門ビームライン研究開発グループ矢橋牧名グループディレクター、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は、非常に強力な X 線を発する X 線自由電子レーザー（XFEL）施設 SACLA において、世界で初めて立体構造がわかっていないタンパク質の立体構造を、 μm サイズの微結晶を用いて決定することに成功しました。

世界に 2 つしかない XFEL 施設（SACLA と米国の LCLS）は SPring-8 のような放射光施設に比べ 10 億倍程度の X 線の輝度があります。そのため、これまで不可能であった数 μm サイズのタンパク質微結晶での立体構造決定が行われるようになってきました。しかしながら、構造決定できるものは、すでに立体構造が明らかになっている構造を用いたものに限られていました。

そこで合同研究チームは、立体構造未知であるルシフェリン再生酵素というタンパク質の数 μm サイズの微結晶をまず作成しました。その後、SACLA においてデータ収集を行い、異常分散効果を利用した重原子同型置換（SIRAS）法により立体構造を明らかにしました。

SACLA は LCLS にはない特徴として高エネルギーの X 線が利用できます。そこで今回の SACLA における測定では 12.6keV という非常に高い X 線エネルギーを用いると、タンパク質の立体構造決定でよく利用されている水銀の異常

分散効果が観測でき、構造決定がより容易になります。しかも SACLA では X 線エネルギーが安定していることから、ごくわずかな異常分散効果を精度良く観測することでできたため、立体構造決定に大変寄与しました。またこれまで不可能と考えられていた μm サイズの微結晶から得られたわずか 20,000 枚の X 線イメージ、すなわちデータ測定時間にして約 2 時間という短時間での解析が可能であることが明らかになりました。このことは、今後の新規タンパク質結晶の X 線結晶構造解析が SACLA において、現実的なものであることを示しています。

本研究の成果は、英国の科学雑誌「Scientific Reports」に平成 27 年 9 月 11 日にオンライン出版されます。

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」（研究代表者：理化学研究所 岩田想、研究分担者：京都大学 加藤博章）、科学研究費挑戦的萌芽研究「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」（研究代表者：中津亨）などの支援を受けて実施されました。また本研究の構造決定に用いたルシフェリン再生酵素の利用にあたり、キッコーマン株式会社研究開発本部五味恵子チームリーダー、研究開発推進部梶山直樹部長のご協力を得ました。

1. 背景

XFEL 光は X 線の輝度が既存の放射光施設に比べ非常に強いことから、これまで解析できなかった創薬ターゲットとなっている膜タンパク質の立体構造解析の実現が期待されています。日本の XFEL 施設である SACLA ではすでに数 μm のタンパク質微結晶を使い、連続フェムト秒結晶構造解析 (SFX)によって測定ができるようになってきています。SFX を用いることで通常 SPring-8 でデータ収集が困難だったそのような微結晶からデータ収集することができ、結晶の最適化に必要な数ヶ月から数年単位の時間を短縮することができるようになります。しかしながら、SFX で収集したデータを用いたタンパク質の立体構造決定を行うにはすでによく似た立体構造が明らかになっているタンパク質を使って構造決定する分子置換法にかぎられてきました。そこで SACLA の XFEL 光を用いて、構造未知のタンパク質の微結晶から新規立体構造を決定する手法の開発が求められていました。

XFEL を用いた新規タンパク質構造解析に向けた取り組みとして、2014 年に

Barends らはアメリカの XFEL 施設である LCLS でリゾチーム結晶にガドリニウムを結合させて単波長異常分散 (SAD) 法による構造決定を行いました。LCLS では 9.5keV までの X 線エネルギーしか使えなかったことから、通常タンパク質の構造決定では利用しないガドリニウムが使用されました。この構造決定では 60,000 枚もの X 線回折イメージが必要となり、データ収集に非常に時間がかかることが示されていました。

そこで、本研究では SACLA でしか使用できない高エネルギー XFEL 光を用いて、新規タンパク質の立体構造決定を行う方法の開発に加え、効率よく行う方法の開発を試みました。

2. 研究内容と成果

SACLA での SFX 実験を行うために、まずルシフェリン再生酵素の大量の微結晶を沈殿剤として PEG3350 を用いて作成しました。その際、構造決定を行うために水銀をタンパク質に結合させた結晶もあわせて作成しました。SACLA でデータ測定する際には、水銀の異常分散効果を測定できるように SACLA の X 線エネルギーは 12.6 keV に設定し、2015 年に理研の菅原らにより開発されたグリースマトリックス法を用いて SFX データ測定を行いました。その結果、結晶化によって得られたそのままの微結晶である Native 結晶の X 線回折像を約 10,000 枚、得られた微結晶を酸化水銀の溶液に浸けて水銀を結合させた水銀誘導体結晶について約 85,000 枚を撮影することができました。まず水銀誘導体結晶のみを用いた単波長異常分散 (SAD) 法での構造決定を試みましたが、現状の解析方法では精度が不十分のため成功しませんでした。しかしながら、Native 結晶と水銀誘導体結晶の両方を用いる水銀の異常分散効果を利用した重原子同型置換 (SIRAS) 法によって、それぞれ 10,000 枚のイメージから 1.7 Å 分解能で、構造未知の新規タンパク質の立体構造を決定できることが判明しました。このようにわずか 20,000 枚のデータ収集で構造決定できるということは、SACLA において約 2 時間で新規構造決定のための測定が可能であるということを示しています。今のところ世界に 2 つしかない XFEL 施設で測定時間を短縮できるということは、実験を行う上で非常に重要なことです。

3. 今後の期待と展望

今回、本研究チームが成功した手法はすべてのタンパク質に適用できる汎用

性の高い手法です。したがって、大きな結晶になりにくく、生命の維持に関わっており、創薬のターゲットとなっている膜タンパク質の解明にも適用できます。今回の実験からわずかながら水銀の異常分散効果も測定できていることから、今後はより簡便な単波長異常分散（SAD）法での構造解析の確立もめざします。さら水銀よりもより汎用性が高いセレンを使った SAD 法による解析も行っていく予定です。これにより、これまでは困難であった創薬ターゲット膜タンパク質の構造解析がより簡便に行えるようになり、創薬への応用が期待されます。