

# 微小タンパク質結晶からの効率的な構造解析法

## －凍結した試料を回転させる「SS-ROX 法」を確立、汎用化へ－

### 要旨

理化学研究所（理研）放射光科学総合研究センター生命系放射光利用システム開発ユニットの山下恵太郎基礎科学特別研究員、山本雅貴ユニットリーダー、高輝度光科学研究センター タンパク質結晶解析推進室の長谷川和也チームリーダー、熊坂崇室長代理、京都大学大学院薬学研究科の中津亨准教授らの共同研究グループ<sup>※</sup>は、放射光を利用して数マイクロメートル（ $\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$  は 100 万分の 1 メートル）程度の微小タンパク質結晶から効率よく回折データを得る「Serial Synchrotron Rotation Crystallography (SS-ROX) 法」の測定技術を確立しました。

タンパク質 X 線結晶構造解析法<sup>[1]</sup>は高い分解能で生体分子の構造を決める最も一般的な方法ですが、まだ解析されていない重要なタンパク質の多くは、現在、サイズが大きい良質な結晶が得にくい状況にあります。微小結晶から高精度な回折データを得て構造を決定するには、SPring-8<sup>[2]</sup>の高輝度マイクロビームを用いた測定が有効です。この測定では放射線損傷<sup>[3]</sup>により結晶の品質が低下するため、一つの結晶から構造決定に必要な枚数の回折像を得るのは困難です。そのため、多数の結晶から得た部分的な回折像を合わせて完全性を高める必要があります。しかし、多数の回折像を得るには大量の試料が必要なため、少ない試料で微小タンパク質の構造を決定できる効率的な測定方法の開発が求められていました。

そこで、共同研究グループは SS-ROX 法に着目しました。SS-ROX 法では、微小結晶の懸濁液を凍結したものを試料とし、試料位置をずらしながら回転させることで網羅的に X 線を照射し、試料中に含まれる微小結晶を効率よく測定できます。しかし新しい手法であるため、測定技術が確立していませんでした。共同研究グループは SPring-8 BL41XU で SS-ROX 法により、ルシフェリン再生酵素（LRE）<sup>[4]</sup>の水銀誘導体の微小結晶の構造解析を行いました。測定中に試料を回転させない場合は 17,800 枚必要だった回折像を 400~600 枚まで減らして構造を決定できました。また、放射線損傷の評価や S/N 比<sup>[5]</sup>に関する検討などを行い、SS-ROX 法の測定技術を確立しました。

本技術は、世界中の高輝度放射光施設に設置されたマイクロビームが利用可能なタンパク質結晶構造解析用ビームラインであれば、大きく設定を変更することなく使用できます。創薬ターゲットとなる微小タンパク質結晶を用いた効率的なドラッグスクリーニングなどへの貢献が期待できます。

本研究は、国際結晶学会の科学雑誌『*Journal of Synchrotron Radiation*』（2017 年 1 月号）に掲載されるのに先立ち、オンライン版（2016 年 12 月 2 日付け：日本時間 12 月 2 日）に掲載されました。

## ※共同研究グループ

理化学研究所 放射光科学総合研究センター 生命系放射光利用システム開発ユニット

基礎科学特別研究員 山下 恵太郎 (やました けいたろう)

専任技師 平田 邦生 (ひらた くにお)

専任技師 上野 剛 (うえの ごう)

専任研究員 吾郷 日出夫 (あごう ひでお)

ユニットリーダー 山本 雅貴 (やまもと まさき)

高輝度光科学研究センター タンパク質結晶解析推進室

チームリーダー 長谷川 和也 (はせがわ かずや)

(理研生命系放射光利用システム開発ユニット 客員研究員)

博士研究員 ニパワン・ヌアムケット (Nipawan Nuemket)

室長代理 熊坂 崇 (くまさか たかし)

(理研生命系放射光利用システム開発ユニット 客員研究員)

京都大学大学院 薬学研究科

博士前期課程学生 村井 智洋 (むらい ともひろ)

准教授 中津 亨 (なかつ とおる)

(理研生命系放射光利用システム開発ユニット 客員研究員)

## 1. 背景

タンパク質 X 線結晶構造解析法は、高い分解能で生体分子の構造を決める最も一般的な方法です。これまで全世界で 10 万種類以上のタンパク質の構造決定に用いられました。しかし、近年はその構造解析の対象が、サイズが大きい良質な結晶を得ることが難しい疾病原因タンパク質などへ変わってきています。それらの微小結晶から高精度な回折データを得るには、SPring-8 などの放射光施設の高輝度マイクロビームを用いた測定が有効です。一方で、この測定では放射線損傷により結晶の品質が低下し回折能が低下することから、それらの小さな結晶一つから構造解析に必要な数百～数千枚の回折像を得ることが難しくなってきました。そのため、多数の結晶から得た部分的なデータを合わせて完全性を高める必要があります。

10 マイクロメートル ( $\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$  は 100 万分の 1 メートル) 程度の結晶であれば、それぞれの結晶から数十枚の回折像を得ることができるため、数十個の結晶を用意し、各結晶の測定位置を決めた上で測定すれば、数百～数千枚の回折像を得ることができます。しかし、より小さな数  $\mu\text{m}$  サイズの結晶では、一つの結晶から 1～数枚の回折像しか得られないことが多く、結晶を数百～数千個用意する必要があります。このため、より効率的な測定方法の開発が求められていました。

微小結晶からのデータ測定には「連続フェムト秒結晶構造解析 (SFX) 法<sup>[6]</sup>」も利用されています。SFX 法は X 線自由電子レーザー (XFEL)<sup>[7]</sup>を用いた解析法です。室温で時間分解能の高いフェムト秒(1 フェムト秒は 1000 兆分の 1 秒、 $10^{-15}$  秒) の極短パルスを利用する測定のため、タンパク質の働く様子の“動的な構造解析”が可能ですが、現状では XFEL 施設が世界に日本と米国の二

箇所にはかないことから、測定の手機が限られています。また、SFX 法では放射光施設の高輝度マイクロビームを用いた測定と比較すると、より多くの試料が必要です。

そこで共同研究グループは、SPring-8 の高輝度マイクロビームと凍結固定した微小結晶を用いて、少ない試料で微小タンパク質の構造を決定できる高分解能な“静的な構造解析”を可能にする新たな測定方法の開発を進めてきました。

## 2. 研究手法と成果

共同研究グループは、高輝度マイクロビームを用いて微小なタンパク質の結晶を効率よく解析するために、「Serial Synchrotron Rotation Crystallography (SS-ROX) 法」に着目しました(図1)。SS-ROX 法では、目的の微小結晶が含まれた懸濁液から、樹脂製の直径約1mmのサンプルループで懸濁液ごとに結晶をすくい上げ、それを凍結したものを試料として実験装置に載せます。

従来の測定では、結晶の位置を合わせ固定した後で X 線を照射しますが、SS-ROX 法ではサンプルループを動かすことでループ内の試料へ網羅的に X 線を照射し、凍結した懸濁液に含まれる微小結晶を効率的にスキャンします。また、試料を数十ミリ～数百ミリ秒間 X 線で“露光”する間にサンプルループを回転させることで照射範囲が大きくなり、回折強度の精度が向上し、回折像1枚あたりに含まれる結晶構造の情報が増えると考えられます。

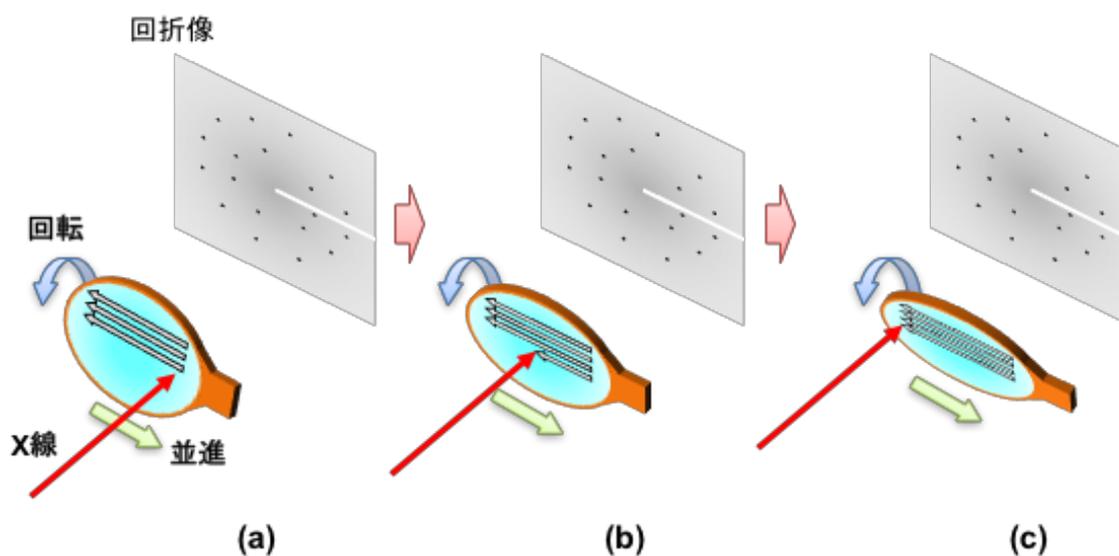


図1 SS-ROX 法による回折データ測定の様式図

樹脂製の直径約1mmの楕円形をしたサンプルループ(茶色)にすくい上げた目的の微小結晶懸濁液(水色)を、緑矢印方向に並進、青矢印方向に回転させながら X 線(赤矢印)を照射する。照射はサンプルループの右端から開始され(a)、左端で終了する(c)。その後、サンプルループを縦方向にずらし、次の行に対して同様の X 線照射を行う。これを一つの試料あたり数十回繰り返す。すると、サンプルループ中の微小結晶に網羅的に X 線を照射することになり、効率のよい回折データ測定が可能となる。

その一方で、SS-ROX 法は SFX 法のように、放射線損傷が生じる前にデータ

取得が可能な“Diffraction before destruction の原理”に基づいた測定法ではなく、試料が無損傷であることが明らかな測定法ではありません。そこで、放射線損傷の影響を評価し、SS-ROX 法の測定技術を確立することが必要でした。

共同研究グループは、ルシフェリン再生酵素（LRE）の水銀誘導体の微小結晶（図2左）を用いて、SPring-8の構造生物学用ビームラインの一つであるBL41XUでSS-ROX 法による測定を行いました。1枚の回折像を得るにあたって、試料の回転角度を $0^{\circ}$ ～ $2^{\circ}$ に変えてデータ測定を行いました。その結果、静止写真（回転角度 $0^{\circ}$ の測定）では構造決定に17,800枚の回折像が必要だったのに対し、 $1^{\circ}$ 以上回転させると400～600枚の回折像で構造決定できました（図2右）。

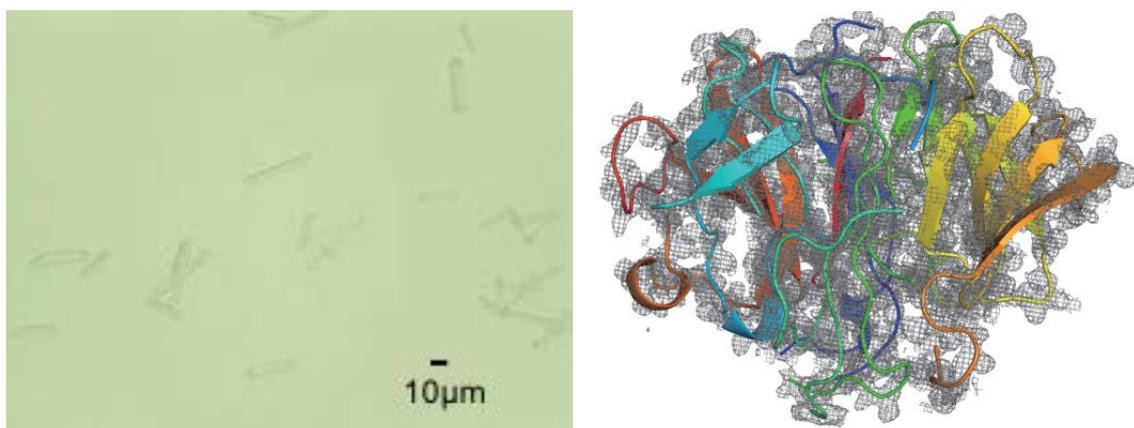


図2 SS-ROX 法による測定に使われたルシフェリン再生酵素（LRE）

左：LREの微小結晶の光学顕微鏡写真。細長い棒状の結晶がLREである。

右：SS-ROX 法により得られたLREの電子密度図（灰色）と立体構造（リボン図）。

また、この測定に使用した試料の量はわずか数マイクログラム（ $\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ は100万分の1グラム）で、SFX法の約100分の1の量で済みました。さらに、露光時間を変えながら放射線損傷の影響について調べたところ、LREでは吸収線量3Mグレイ（Gy、1MGyは100万グレイ）までであれば、放射線損傷による劣化のデメリットよりも長時間露光によって得られるS/N比向上のメリットの方が大きいことが分かりました。

以上の結果により、共同研究グループが、少ない試料でタンパク質微小結晶から構造を決定できるSS-ROX法の測定手法を確立したことが示されました。

### 3. 今後の期待

共同研究グループは、これまでに高輝度マイクロビームラインやそれを用いたデータ測定法の開発を行い、SPring-8での微小結晶の測定を実現してきました。今回確立したSS-ROX法は、微小結晶構造解析の効率化を達成し、従来法では困難だったより小さい結晶の利用も実現できます。また、SPring-8のような高輝度放射光施設に設置されたマイクロビームが利用できるビームラインであれば、世界中どこでも適用可能な測定手法であることから、SS-ROX法は微小

結晶の汎用的なデータ測定方法になると期待できます。

近年、創薬ターゲットとなるタンパク質では大きいサイズの良質な結晶が得にくくなっています。今後 SS-ROX 法と、XFEL での SFX 法による動的構造解析を相補的に組み合わせることで、微小結晶からの効率的な構造解析とドラッグスクリーニングへの貢献が期待できます。

#### 4. 論文情報

<タイトル>

Development of a dose-limiting data collection strategy for serial synchrotron rotation crystallography

<著者名>

Kazuya Hasegawa, Keitaro Yamashita, Tomohiro Murai, Nipawan Nuemket, Kunio Hirata, Go Ueno, Hideo Ago, Toru Nakatsu, Takashi Kumasaka, and Masaki Yamamoto

<雑誌>

*Journal of Synchrotron Radiation*

<DOI>

10.1107/S1600577516016362

#### 5. 補足説明

##### [1] タンパク質 X 線結晶構造解析法

タンパク質の結晶に X 線を照射して得られる回折像からタンパク質の立体構造を決定する手法。結晶中には周期的にタンパク質の粒子が配列しているため、その散乱パターンは規則的な間隔で並ぶ斑点状になる。各回折斑点の強度はタンパク質の立体構造を反映しているため、それぞれの強度を精度よく測定することが構造解析において重要である。

##### [2] SPring-8

理研が所有する兵庫県の播磨科学公園都市にある世界最高の放射光を生み出す施設。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が行っている。SPring-8 の名前は Super Photon ring-8 GeV に由来。放射光とは、電子を光とほぼ等しい速度まで加速し、電磁石によって進行方向を曲げたときに発生する強力な電磁波のこと。SPring-8 では、遠赤外から可視光線、軟 X 線を経て硬 X 線に至る幅広い波長域で放射光を得ることができるため、原子核の研究からナノテクノロジー、バイオテクノロジー、産業利用や科学捜査まで幅広い研究が行われている。タンパク質の結晶構造解析の分野でも、大きな成果を上げている。

##### [3] 放射線損傷

X 線照射により生じるタンパク質結晶の品質の劣化のこと。回折能の低下や格子定数の変化などの全体的損傷と、ジスルフィド結合の解離などの局所的損傷の二つに大別できる。いずれも、X 線照射中に結晶が受ける吸収線量（単位重量あたりに吸収するエネルギー。単位はグレイ (Gy=J/kg) に依存する。凍結結晶の場合 20 MGy で回折

強度が半分になることが知られている。それに対して局所的な損傷は、もっと低い吸収線量で生じるが、どの程度で起きるかは損傷の種類や周辺的环境によっても異なる。いずれの損傷も構造解析に影響を及ぼすため、回折データ測定において注意が必要である。

#### [4] ルシフェリン再生酵素 (LRE)

蛍の発光に関わるタンパク質。蛍の発光は、ルシフェラーゼというタンパク質がルシフェリンという基質に作用してオキシルシフェリンに変化することで生じる。ルシフェリン再生酵素は、オキシルシフェリンをニトリル体に変換することで、元のルシフェリンの再生を手助けするタンパク質である。LRE は Luciferin-regenerating enzyme の略。

#### [5] S/N 比

一般的には測定時の信号 (signal) と雑音 (noise) の比率を示す。本研究では、構造解析のために利用する結晶からの回折線の信号と解析の妨げとなる結晶以外からの寄生散乱により生じる雑音の比率を指す。S/N 比が大きくなるほど、精度の高い測定データが得られる。

#### [6] 連続フェムト秒結晶構造解析 (SFX) 法

多数の微結晶を含む液体などをインジェクターと呼ばれる装置から連続的に供給し、フェムト秒の X 線レーザーパルス照射して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。

#### [7] X 線自由電子レーザー (XFEL)

近年の加速器技術の発展によって実現した X 線領域のパルスレーザー。従来の半導体や気体を発振媒体とするレーザーとは異なり、真空中を高速で移動する電子ビームを媒体とするため、原理的な波長の制限がない。XFEL は X-ray Free Electron Laser の略。