

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：創薬等支援のためのタンパク質立体構造解析総合技術基盤プラットフォームによる支援と高度化（低エネルギーX線利用を中心としたタンパク質立体構造解析の支援と高度化）
3. 研究開発代表者：国立大学法人北海道大学 特任教授 田中 勲
4. 研究開発の成果

我々は、タンパク質中にはじめから存在するイオウ原子の異常散乱効果を利用して構造解析を行う方法（S-SAD法）を中心として、タンパク質立体構造解析の支援および高度化を進めている。これまで特に、S-SAD法に資する結晶マウント法「溶液フリー・結晶マウント法」を、放射光施設で使えるように（すなわち、放射光施設で使われる針状結晶や薄い板状結晶、微結晶などに適用できるように）改良を進めてきた。

平成 27 年度には、S-SAD 法用の溶液フリー・結晶マウントツールの一部に利用されていた注射針を新しいタイプのものに変更した（図 1）。この変更により、次の 3 つの点で改良があった。1. これまで極低温によると思われる変形（データの質の低下に繋がる）が発生していたが、新しいタイプの針を用いることで熱変形に強くなった。2. 先端が尖っていない針に変えた事でユーザーの安全性が高まった。3. 高度な技術を要した針の曲げ加工が不要になった事からマウントツールの自動作製への道が開けた。マウントツール自動作製を目指しては、さらに、ループ部分も機械が扱いやすい形に改良を進めている。また、このマウントツールが容易に使えるように、「溶液除去と結晶冷却を同期させる自動装置（図 2）」の改良を進め、SPring-8 でのオンライン（ビームライン備え付け）の自動装置と PF でのオフライン（ビームライン側室で利用）の自動装置を整備した。

改良した S-SAD 法用のシステム「溶液フリー・結晶マウントツール」と「溶液除去と結晶冷却を同期させる自動装置」は、PF と SPring-8 での一般使用に提供すると共に、放射光ビームラインスタッフとの連携のもと、S-SAD 法の技術講習会を平成 27 年 11 月 18 日に実施した（北大、理研 RSC、阪大共催）。また、一般構造解析支援についても、前年度に引き続き技術支援・コンサルティング活動を行い、平成 27 年度は、新たにコンサルティングを 2 件実施し、更に 8 件の構造解析に成功した。図 3 はその一例、Rpp38-RNA 複合体の構造である。Rpp38 は RNA と結合する事により RNaseP 複合体の至適温度を上昇させる。本研究では、Rpp38 と RNA の複合体の結晶構造を決定し、Rpp38 が RNaseP 中の 2 つの領域に類似した相互作用様式で結合する事を明らかにした。

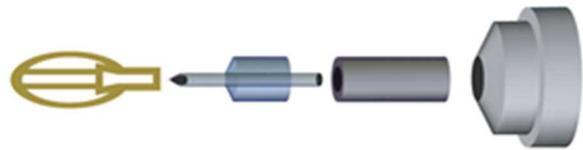


図 1. 溶液フリー・結晶マウントツール  
左からポリイミド製ループ、注射針、中空パイプ、Hampton 製のベースより成る。注射針は、これまではインシュリン用の注射針を用いていたが、新しいツールでは、(株)ユニシスのペンシルポイント型のものを使うように改良した。

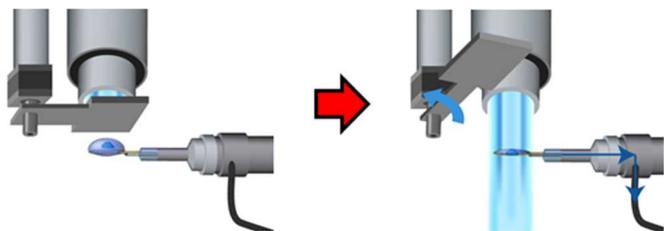


図 2. 溶液除去と結晶冷却を同期させる自動装置  
結晶周りの溶液を吸引除去すると同時に液体窒素ガスのシャッターを開いて結晶を冷却する。

また、軟体動物の酸素運搬タンパク質ヘモシアニンは、分子量 4 MDa にもおよぶ超巨大タンパク質であるが、本課題ではスルメイカ由来ヘモシアニンの結晶構造を 3.0 Å の分解能で決定、モデル構築の際に必要なアミノ酸配列や糖鎖配列も同時に決定して論文を発表した（文献1）。さらに、イオウ転移酵素の反応機構を解明するために、タンパク質複合体およびその基質との複合体の X 線結晶構造解析を行った。得られた構造と生化学実験の結果を合わせ、このイオウ転移酵素がこれまでに報告のない全く新規な反応機構によりイオウを転移していることが明らかになった。分光学的手法による解析の必要性が出て来たことから、現在は創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業外の研究室も含めた大規模な連携研究として展開している。このような一般的な構造解析支援と共に、S-SAD 法を使って効率よく構造決定するためのデータ収集・解析法の研究も継続して行い、実際に、PF の BL-1A ビームラインを使って分子量 117.7 kDa、 $\langle |dF| \rangle / \langle F \rangle = 1.07\%$  レベルの構造を含む、新たな 3 つのタンパク質の構造決定に成功した（図4）。

最良のデータを収集するための努力として、溶液フリー・結晶マウントツールの改良を継続するとともに、多数の結晶からデータを集めることで S/N 比を改善しようとする方法（multi-crystal anomalous diffraction method）に対応したシステムの開発も放射光施設スタッフと協力して進めた。このためには、特に、自動センタリング、自動データ収集、自動構造解析システムの開発を進めた。本システムは、実験用ハッチ内のすべての機器（X 線シャッター、ゴニオメータ、結晶交換ロボット、検出器、CCD カメラ等）の制御を行いながら全自動でデータの測定を行う。これまでユーザー操作に頼っていたループ認識を自動化したのみならず、その認識速度は 1 秒以内で、人間の速度（認識からデータ入力まで数十秒から数分）を遥かに凌ぐ。これにより、限られたビームタイムでより多くのデータを収集するための道筋が示された。平成 26 年度に開発した S-SAD 構造解析パイプラインも本システムに組み込み、測定と解析の同時処理が容易に行えるように計画している。

文献 1. Crystal Structure of the 3.8-MDa Respiratory Supermolecule Hemocyanin at 3.0 Angstrom Resolution. Z. Gai, A. Matsuno, K. Kato, S. Kato, M. R. I. Khan, T. Shimizu, T. Yoshioka, Y. Kato, H. Kishimura, G. Kanno, Y. Miyabe, T. Terada, Y. Tanaka, and M. Yao. *Structure* **23**, 2204-2212 (2015)

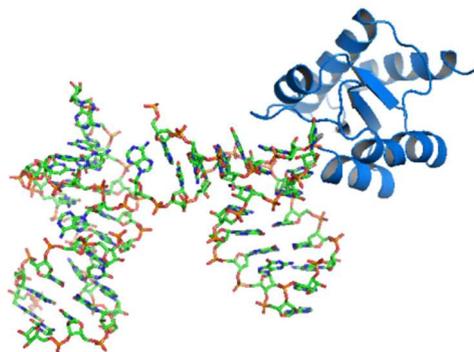


図 3. Rpp38-RNA 複合体の結晶構造

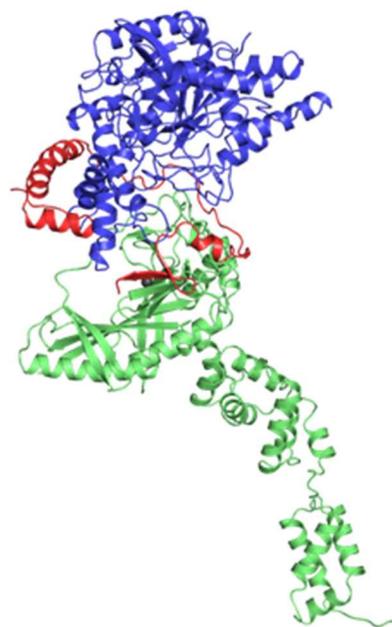


図 4. ヘテロ 3 量体 GatCAB の構造. PF のビームライン BL-1A を使って、S-SAD 法で解析可能であることを確認した。  
 分子量： 117.7 kDa  
 S 原子数/残基数： 32/1060  
 空間群：  $P2_12_12_1$  ( $Z'=1$ )  
 分解能： 2.2 Å  
 モデル自動構築率： 77%