

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金  
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

## I. 基本情報

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）  
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research  
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）SPRING-8 におけるワンストップタンパク質試料生産支援および高分解能  
結晶取得技術の高度化  
（英語）One-stop support of protein sample production at SPRING-8 and enhancement  
of technology to produce high-resolution crystals

補助事業担当者 （日本語）理化学研究所 放射光科学総合研究センター  
グループディレクター 国島直樹

所属 役職 氏名： （英語）Naoki Kunishima, Group Director, Advanced Photon Technology Division,  
RIKEN SPRING-8 Center

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

タンパク質試料生産から構造決定まで SPRING-8 キャンパス内で一貫して行なえる環境「タンパク質構造研究基盤 (Protein Tectonics Platform; PTP)」を理研の山本グループと連携して構築し、SPRING-8 ビームラインユーザーに公開した。整備した PTP を利用して 7 件の支援課題を実施した。また、支援が発展した共同研究を 4 件、本事業の高度化に関する共同研究を 2 件実施した。特に、東レ株式会社との共同研究として行った支援課題では、ヒト由来 Keap1 タンパク質と低分子化合物の複合体の結晶構造を決定し、医薬品設計のために重要なリガンド認識機構を解明した (Sato *et al.*, 2015)。

講習会や受託分析を行い、より広範囲の利用者を支援することで構造生物学の普及を図った。SPRING-8 キャンパスで年 3 回開催した 3 泊 4 日のタンパク質結晶構造解析の導入研

修は、ビームライン（理研の山本グループ・阪大の中川グループ）と連携することで、生産から解析まで一貫した内容で実施した。この導入研修では合計 81 名の研究者を受け入れ、4 件の支援課題につながった。

理研が開発した要素技術を組み合わせ、高難度タンパク質から高分解能結晶を効率的に取得するシステムを開発した。まず、産総研の富井グループとの共同研究により、タンパク質の結晶化率を改善するアミノ酸変異の統計解析による予測法の開発とその実験的検証を行った（論文投稿済）。さらに、構造決定対象タンパク質の分子表面に存在するリジン残基を実験的に簡便に同定し、統計解析に基づく変異体設計により目的タンパク質の結晶性を改善する方向性を示した。

膜タンパク質の結晶化試料生産を計画的に改善する高度化として、安定化変異体作成のための方法論を開発した。特に、荷電性残基導入による計画的なタンパク質熱安定化法の検討を進めた結果、52℃の超耐熱化を達成し、論文発表およびプレスリリースを行った（Matsuura, Yutani *et al.*, 2015 ; プレスリリース 2015 年 10 月 26 日）。疎水性変異導入による予備耐熱化の後に荷電性変異を導入することで超耐熱化タンパク質の設計が可能であることを実験的に示した。

#### 英文

By collaboration with Yamamoto group of RIKEN, we constructed 'Protein Tectonics Platform (PTP)' that provides an on-site facility covering all aspects of the protein crystallography from the sample production to the structure determination, and released it to the beamline users of SPring-8. Using PTP, we performed seven support tasks in PDIS. Four of these tasks advanced to regular research collaborations. We also performed the other two research collaborations regarding the enhancement tasks in PDIS. In a support task as research collaboration with Toray industries, we determined a crystal structure of human Keap1 protein in complex with a small-molecule ligand, which provided an important structural basis for the drug design (Sato *et al.*, 2015).

Aiming the dissemination of structural biology to society, workshops and entrusted analyses were performed to support more broad range of users. For instance, an introductory course for protein crystallography at SPring-8 campus was performed three times per year as a four-day three-night program covering all aspects from the sample production to the structure determination, by collaboration with beamlines: Yamamoto group of RIKEN, Nakagawa group of Osaka Univ. The introductory course accepted a total of 81 researchers which advanced to providing four support tasks in PDIS.

As an enhancement task, we developed a system to produce high-resolution crystals effectively from proteins with low crystallizability by applying RIKEN's elementary technologies. By collaboration with Tomii group of AIST, we developed a method to predict useful mutations providing better crystallizability on the basis of statistical analysis, and examined the method by a crystallization experiment using a model protein (Paper submitted). Furthermore, we proposed a perspective to improve protein crystallizability by introducing mutations at exposed lysine residues identified by a

simple experimental method.

As an enhancement task to improve the production of membrane proteins for crystallization, we developed a methodology to design thermo-stabilizing mutations. By introducing charged residues, we successfully hyper-thermo-stabilized a test protein by 52 degrees (Matsuura, Yutani et al., 2015; press release on 26th Oct. 2015). The design of hyper-thermo-stabilization is possible by introducing charged residues after a preliminary thermo-stabilization by introducing hydrophobic mutations.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 5 件）

1. Asada Y, Sugahara M, Mizutani H, Naitow H, Tanaka T, Matsuura Y, Agari Y, Ebihara A, Shinkai A, Kuramitsu S, Yokoyama S, Kaminuma E, Kobayashi N, Nishikata K, Shimoyama S, Toyoda T, Ishikawa T, Kunishima N. Integrated database of information from structural genomics experiments. *Acta Crystallogr. D*. 2013, 69, 914-919.
2. Agari Y, Sakamoto K, Yutani K, Kuramitsu S, Shinkai A. Structure and function of a TetR family transcriptional regulator, SbtR, from *Thermus thermophilus* HB8. *Proteins*. 2013, 81, 1166-1178.
3. Bagautdinov B, Matsuura Y, Yamamoto H, Sawano M, Ogasahara K, Takehira M, Kunishima N, Katoh E, Yutani K. Thermodynamic analysis of unusually thermostable CutA1 protein from human brain and its protease susceptibility. *J. Biochem*. 2015, 157, 169-176.
4. Satoh M, Saburi H, Tanaka T, Matsuura Y, Naitow H, Shimozono R, Yamamoto N, Inoue H, Nakamura N, Yoshizawa Y, Aoki T, Tanimura R, Kunishima N. Multiple binding modes of a small molecule to human Keap1 revealed by X-ray crystallography and molecular dynamics simulation. *FEBS Open Bio*. 2015, 5, 557-70.
5. Matsuura Y, Takehira M, Joti Y, Ogasahara K, Tanaka T, Ono N, Kunishima N, Yutani K. Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100 °C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues. *Scientific Reports*. 2015, 5, 15545.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. RIKEN SPring-8 Center Protein Crystallography Database, ポスター発表, Kunishima N, Sugahara M, Tanaka T, Naitow H, Agari Y, Shinkai A, Kuramitsu S, Nishikata K, Toyoda T, Asada Y, 第 2 回モデル生物丸ごと一匹学会／第 11 回高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト連携研究会 (SPring-8), 2012/9/28, 国内.

2. 回折実験のためのタンパク質結晶マウント法, ポスター発表, 菅原道泰, 国島直樹, 平成 24 年度日本結晶学会年会 (仙台), 2012/10/26, 国内.
3. タンパク質 X 線結晶構造解析における結晶化支援ツール, ポスター発表, 田中智之, 国島直樹, 油谷克英, 内藤久志, 松浦祥悟, 村岡愛一郎, 菅原道泰, 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡), 2012/12/14, 国内.
4. ゲルカプセル内でのタンパク質結晶化, ポスター発表, 菅原道泰, 国島直樹, 第 85 回日本生化学会大会 (福岡), 2012/12/15, 国内.
5. 放射光生命科学を加速するタンパク質構造研究基盤, ポスター発表, 国島直樹, 油谷克英, 堀哲哉, 菅原道泰, 内藤久志, 田中智之, 松浦祥悟, 村岡愛一郎, 山本雅貴, 石川哲也, 第 85 回日本生化学会大会 (福岡), 2012/12/15, 国内.
6. SPring-8 における蛋白質試料のオンサイト生産支援, 口頭発表, 国島直樹, 第 13 回日本蛋白質科学会年会 (鳥取), 2013/6/12, 国内.
7. 100℃以上の高温での蛋白質の熱安定化をもたらす荷電残基の探索, ポスター発表, 松浦祥悟, 竹平美千代, 田中智之, 小野直子, 国島直樹, 油谷克英, 第 13 回日本蛋白質科学会年会 (鳥取), 2013/6/12, 国内.
8. 水中での揺らぎ構造からみた低温菌から超好熱菌由来蛋白質の特徴—トリプトファン合成酵素  $\alpha$  サブユニットの場合, 口頭およびポスター発表, 油谷克英, 小笠原京子, 田中智之, 城地保昌, 第 13 回日本蛋白質科学会年会 (鳥取), 2013/6/14, 国内.
9. 多糖ゲルカプセル内でのタンパク質結晶化, ポスター発表, 菅原道泰, 国島直樹, 第 86 回日本生化学会大会 (横浜), 2013/9/11-13, 国内.
10. 結晶非接触操作を可能にするゲルカプセル内でのタンパク質結晶化法, ポスター発表, 菅原道泰, 国島直樹, 平成 25 年度日本結晶学会年会 (熊本), 2013/10/12-13, 国内.
11. 荷電残基導入による 100℃以上の高温での蛋白質の熱安定化, ポスター発表, 松浦祥悟, 竹平美千代, 小野直子, 国島直樹, 油谷克英, 第 14 回日本蛋白質科学会年会 (横浜), 2014/6/25, 国内.
12. 化学修飾によるタンパク質表面残基の簡便な検出法, ポスター発表, 村岡愛一郎, 松浦祥悟, 伊原誠, 国島直樹, 第 14 回日本蛋白質科学会年会 (横浜), 2014/6/25, 国内.
13. 多糖ゲルビーズ内タンパク質結晶からの X 線回折データ収集, ポスター発表, 菅原道泰, 国島直樹, 第 14 回日本蛋白質科学会年会 (横浜), 2014/6/25, 国内.
14. 自動ゲルビーズ内タンパク質結晶化スクリーニング, ポスター発表, 菅原道泰, 国島直樹, 第 87 回日本生化学会大会 (京都), 2014/10/16, 国内.
15. 結晶化促進物質を利用したタンパク質結晶化, ポスター発表, 菅原道泰, 国島直樹, 平成 26 年度日本結晶学会年会 (東京), 2014/11/1,3, 国内.
16. 140℃にまで変性温度を高めた CutA1 変異型の耐熱化から見た安定性向上の戦略, ポスター発表, 松浦祥悟, 竹平美千代, 小野直子, 国島直樹, 油谷克英, 第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島), 2015/6/24, 国内.
17. 生理的条件下で天然状態と平衡にある変性状態における蛋白質(PCP)構造の MD シミュレーション, ポスター発表, 油谷克英, 内藤久志, 城地保昌, 第 15 回日本蛋白質科学会年会 (徳島), 2015/6/26, 国内.

18. 化学修飾によるタンパク質表面リジン残基の簡便な検出法, ポスター発表, 村岡愛一郎, 松浦祥悟, 伊原誠, 国島直樹, 第 88 回日本生化学会大会 (神戸), 2015/12/1, 国内.
19. ヒト由来 Keap1 と低分子化合物の複合体の結晶構造および分子動力学シミュレーションによる構造評価, 口頭およびポスター発表, 佐藤幹也, 佐分元, 田中智之, 松浦祥悟, 内藤久志, 下藺利恵子, 山本尚義, 井上秀樹, 中村紀子, 吉澤良隆, 青木拓実, 谷村隆次, 国島直樹, 第 88 回日本生化学会大会 (神戸), 2015/12/3, 国内.
20. 網羅的な荷電性残基変異型の安定性変化のデータから明らかになった高温での安定化戦略, 松浦祥悟, 竹平美千代, 城地保昌, 小野直子, 国島直樹, 油谷克英, 第 16 回日本蛋白質科学会年会 (福岡), 2016/6/7, 国内.
21. XFEL の創薬利用を目指したタンパク質-リガンド複合体の連続フェムト秒結晶構造解析, 国島直樹, 第 381 回 CBI 学会講演会「難解析性タンパク質の構造解析手法の新展開」(東京), 2017/2/16, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X 線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 堀哲哉, 第 1 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～(SPring-8), 2012/11/6, 国内.
2. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X 線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 堀哲哉, 第 2 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～(SPring-8), 2012/12/18, 国内.
3. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X 線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 堀哲哉, 第 3 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～(SPring-8), 2013/1/22, 国内.
4. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X 線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 内藤久志, 第 4 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～(SPring-8), 2013/6/25, 国内.
5. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X 線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下恵太郎, 第 5 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～(SPring-8), 2013/10/22, 国内.

6. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下恵太郎, 第 6 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2013/12/10, 国内.
7. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下恵太郎, 第 7 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2014/7/1, 国内.
8. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下恵太郎, 第 8 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2014/10/21, 国内.
9. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下恵太郎, 第 9 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2014/12/2, 国内.
10. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下栄樹, 山下恵太郎, 第 10 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2015/7/21, 国内.
11. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下栄樹, 山下恵太郎, 第 11 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2015/10/20, 国内.
12. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下栄樹, 山下恵太郎, 第 12 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2015/12/8, 国内.
13. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下栄樹, 山下恵太郎, 第 13 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2016/6/28, 国内.

14. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下栄樹, 山下恵太郎, 第 14 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2016/10/4, 国内.
15. 構造生物学の裾野を広げ潜在ユーザーを発掘することを目的とした初心者向け講習会における講演「X線構造解析の概要と SPring-8 での測定」「タンパク質の立体構造の安定性」「タンパク質の結晶化ツール」「膜タンパク質の調製と結晶化」「タンパク質の結晶構造決定」, 国島直樹, 油谷克英, 菅原道泰, 山下栄樹, 山下恵太郎, 第 15 回理研 RSC 研修～SPring-8 ではじめるタンパク質結晶構造解析～ (SPring-8), 2016/12/6, 国内.

#### (4) 特許出願