

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）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（生体超分子複合体を中心としたタンパク質立体構造解析の支援と高度化）
（英語）Platform of Protein Structural Analysis and Research Support for Drug Discovery and Life Sciences (Analysis and Research Support of Structural Studies of Biological Macromolecular Assemblies)

補助事業担当者（日本語）大阪大学 蛋白質研究所 教授 中川敦史
所属 役職 氏名：（英語）Atsushi Nakagawa, Professor, Institute for Protein Research, Osaka University

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）

支援

大阪大学蛋白質研究所が SPring-8 に設置・運営している生体超分子複合体構造解析ビームライン (BL44XU) (蛋白研ビームライン) の特長を生かし、格子定数が 400 Å を超える結晶や分解能の低い結晶、あるいは生体超分子複合体を持つ利用者を中心としてビームタイム配分を行い、高精度な回折強度データ収集と構造解析の支援を行った。

ビームタイムの支援に関しては、高エネ機構、理研と協力して、支援課題の受け入れ態勢を整えるとともに、利用システムを構築した。期間中に創薬等 PF に対して、当初計画目標とした 10% を超えるビームタイムを本事業に提供した。

さらに、これまでの高難度な超分子複合体の構造解析の経験を生かし、物理的な衝撃に弱い結晶の取扱方法から微弱な回折強度データを高精度に収集する方法について、一緒に実験を行いながら結晶ごとにあった方法を最適化していくことを基本に、以下の支援を行った

- ・ 回折実験とデータ収集

- ・ 結晶の凍結方法についての技術指導とサポート
- ・ データ測定方法の提案や回折強度データ処理
- ・ 次回のビームタイムまでの予備実験や次回実験方法についての指導
 - 複数の晶系があった場合、どの晶系が解析に向いているのかの提案
 - 位相決定のために必要な結晶や適切なビームライン選択方法に関する指導
- ・ 低分解能の構造の解析での構造精密化に関する指導・支援
- ・ 構造解析全般に関する教育・指導

9件の解析支援（東工大、分子研、京都薬大、九大、阪大3件、先端医療センター、弘前大）を進め、5件について構造解析に成功した。そのうちの3件については、本業務のメインターゲットである巨大分子複合体である。これらの成果のうち、3件については、*Science* を含む国際的な学術雑誌に論文として発表しており、またそれ以外の2件については現在構造解析の論文を作成中である。5件のうちの1件については新たな薬剤候補化合物の設計のための構造情報として利用している。

若手および初めて BL44XU を使うユーザーを中心とした利用講習会や、理研と連携して結晶構造解析の初心者講習会、JASRI、理研、北大と協力して結晶構造解析の新手法の研修会を実施した。

高度化

大阪大学総長裁量経費および蛋白研所内予算で導入した大面積高感度二次元検出器の性能を最大限に利用するように本事業で新たにカメラ架台を設計・制作した。これにより、当初計画していた格子定数が 1000 Å の結晶から 3.5 Å を超える分解能の回折強度データ収集が行えるビームラインとする目標以上の、格子定数が 1000 Å の巨大格子定数の結晶から 3 Å 分解能以上（格子定数 2000 Å の結晶から 3.7 Å 分解能以上）のデータ収集が可能となった。

さらに、分光器の低振動化を行い、強度変化を 2/3 程度に抑えることができた。これは当初予定していた程度の値である。また、この高度化により、データの質を改善することができただけでなく、ビーム強度を 2 割増強することができた。さらに、縦集光ミラーの導入を含む集光系の高度化により、通常利用している波長 0.9Å において、当初計画に比べて 2 倍にあたる 10 倍のビーム強度の増強を得ることができた。これに加えて、従来からの 4 象限スリットの下流・試料直前にピンホールを設置することでビーム形状の改善と寄生散乱の軽減を行うことができるようになった。ビームポジションモニターの導入により、ビームの位置安定性をモニターできるようになった。

User Support

We supported diffraction data collection and structure determination for drug discovery and structural life science using the synchrotron radiation beamline BL44XU (IPR beamline) at SPring-8 which is operated by the Institute for Protein Research, Osaka University. This beamline utilizes an undulator as a light source which produces high brilliance and highly parallelized X-ray beam. This beamline is designed to collect high precision diffraction data from large unit cell crystals (longer than 400 Å), low resolution crystals and large biological macromolecular crystals.

We constructed the beamtime allocation and user support system for this project collaborating with the Proton Factory, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator

Research Organization (KEK-PF) and the RIKEN. More than 10% of total beamtime was assigned for this project.

Based on our experiences on the structure determination of large biological macromolecular crystals and membrane protein crystals, we supported the users for high precision data collection and structure determination from fragile crystals with poor diffraction as shown below,

- Structure refinement of low resolution structures
- Structure determination of the complex of the target protein and developed drug candidate molecules
- User support and education for the beginners

Total of 9 projects (Tokyo Institute for Technology, Institute for Molecular Science, Kyoto Pharmaceutical University, 3 laboratories of Osaka University, Institute of Biomedical Research and Innovation Hospital and Hirosaki University) was supported and performed, and 5 project was succeeded to solve the structures. Three of them were large biological macromolecular assemblies, which were main targets of this project. Three of them were reported on the high impact journals, including Science, and another two of them are now in preparation for publication. One project is developing drug candidate molecules based on the complex structures.

Beamline workshops and training courses were held to spread X-ray crystallography.

Development

IPR beamline had been upgraded to collect large unit cell crystals at high resolution (higher than 3 Å resolution from a crystal with its cell dimension of more than 1000 Å, or higher than 3.7 Å resolution from a crystal with its cell dimension of 2000 Å).

Improvement of the double crystal monochromator can reduce vibration about 2/3 than before to get more precise data. With this improvement, beam flux increased about 20%. The introduction of a vertical focusing mirror increase beam brilliance and about 10 times more beam flux can be obtained after 50×50 μm pinhole at the sample position. The pinhole beam optics improved the beam shape and reduced background scattering comparing the old slit system. Beam stability can be monitored by a beam position monitor system.

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 1 件、国際誌 9 件)

1. Fujihashi M, Hiraki M, Ueno G, Baba S, Murakami H, Suzuki M, Watanabe N, Tanaka, Nakagawa A, Wakatsuki S, Yamamoto M, Miki K, Crystal sample pins and a storage cassette system compatible with the protein crystallography beamlines at both the Photon Factory and SPring-8, *J. Appl. Cryst.*, 2012, 45, 1156-1161.
2. Yamamoto K, Higashiura A, Suzuki M, Aritake K, Urade Y, Uodome N, Nakagawa A, Crystal structure of a Bombyx mori sigma-class glutathione transferase exhibiting prostaglandin E synthase activity, *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830, 3711-3718.

3. Higashiura A, Ohta K, Masaki M, Sato M, Inaka K, Tanaka H, Nakagawa A, High-resolution X-ray crystal structure of bovine H-protein using the high-pressure cryocooling method, *J. Synchrotron Rad.*, 2013, 20, 989-993.
4. Yamamoto K, Suzuki M, Higashiura A, Nakagawa A, Three-dimensional structure of a *Bombyx mori* Omega-class glutathione transferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 438, 588-593.
5. Yamamoto K, Suzuki M, Higashiura A, Aritake K, Urade Y, Uodome N, Hossain T, Nakagawa A, New insights into the catalytic mechanism of *Bombyx mori* prostaglandin E synthase gained from structure-function analysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, 440, 762-767.
6. Abe J, Hiyama TB, Mukaiyama A, Son S, Mori T, Saito S, Osako M, Wolanin J, Yamashita E, T. Kondo, S. Akiyama, Atomic-scale origins of slowness in the cyanobacterial circadian clock, *Science*, 2015.7, 349, 312-316.
7. Hattori Y, Kobayashi K, Deguchi A, Nohara Y, Akiyama T, Teruya K, Sanjoh A, Nakagawa A, Yamashita E, Akaji K, Evaluation of transition-state mimics in a superior BACE1 cleavage sequence as peptide-mimetic BACE1 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 5626-5640.
8. Hirabayashi K, Yuda E, Tanaka N, Katayama S, Iwasaki K, Matsumoto T, Kurisu G, Outten FW, Fukuyama K, Takahashi Y, Wada K, Functional dynamics by the structure of the SufBCD complex, a novel ATP-binding cassette (ABC) proteins that serves as scaffold for iron-sulfur biogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2015, published online.
9. Higashiura A, Yamashita E, Yoshimura M, Hasegawa K, Furukawa Y, Kumasaka T, Ueno G, Yamamoto M, Tsukihara T, Nakagawa A, SPring-8 BL44XU, beamline designed for structure analysis of large biological macromolecular assemblies, *AIP Conf. Proc.*, 2016, 1741, 030028.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 高品質蛋白質結晶構造解析のための技術開発, 口頭, 中川敦史, 第 12 回蛋白質科学会, 2012/6/20-22, 国内.
2. 低分解能データを利用したディスオーダー領域の構造解析に向けた試み, ポスター, 木平清人、姜志姪、前田将司、中川宗、三角裕子、菅倫寛、山下栄樹、舘野賢、月原富武, 平成 24 年度日本結晶学会年会, 2012/10-25-26, 国内.
3. 構造生物学と放射光, 口頭, 中川敦史, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013/6/12-14, 国内.
4. Crystal Structure of a *Bombyx Mori* Omega-Class Glutathione Transferase, Yamamoto K, Suzuki M, Higashiura A, Nakagawa A, 口頭, The 12th Conference of The Asian Crystallographic Association, 2013/12/7-10, 国外.
5. Structure determination of biological macromolecules using synchrotron radiation and X-ray free electron laser, 口頭, Nakagawa A, International Symposium on New Drug Discovery and Development, 2013/12/12, 国外.
6. SPring-8 での放射光構造生物学, 口頭, 中川敦史, 蛋白研セミナー「量子ビームの連携利用に向けた新しいタンパク質結晶学」, 2013/12/17-18, 国内.

7. Synchrotron radiation beamline for macromolecular assemblies operated by IPR (SPring-8 BL44XU), ポスター, Yamashita E, Higashiura A, Yoshimura M, Hasegawa K, Furukawa Y, Ohata T, Kumasaka T, Ueno G, Yamamoto M, Yoshikawa S, Tsukihara T, Nakagawa A, 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2013 (ISDSB2013), 2013/5/26-29, 国外.
8. High-resolution X-ray crystal structure of bovine H-protein using a high-pressure cryocooling method, Higashiura A, Ohta K, Masaki M, Sato M, Inaka K, Tanaka H, Nakagawa A, ポスター, 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology 2013 (ISDSB2013), 2013/5/26-29, 国外.
9. IPR Beamline for Macromolecular Assemblies at SPring-8 (BL44XU), ポスター, Yamashita E, Higashiura A, Yoshimura M, Hasegawa K, Furukawa Y, Ohata T, Kumasaka T, Ueno G, Yamamoto M, Nakagawa A, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr2014), 2014/8/5-12, 国外.
10. 蛋白質の精密X線結晶構造解析, 口頭, 中川敦史, 宇宙航空科学技術推進委託費・宇宙科学研究拠点形成プログラム「高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成」 キックオフシンポジウム, 2015/3/5, 国内.
11. Structure Determination of Biological Macromolecules by X-ray, 口頭, Nakagawa A, Workshop on Innovation and Pioneering Technology (WINTech2015), 2015/3/12, 国外.
12. Structure Biology Using Synchrotron Radiation, 口頭, Nakagawa A, The First Trilateral Workshop for Frontier Protein Studies, 2015/4/23-25, 国外.
13. Structure Biology Using Synchrotron Radiation, 口頭, Nakagawa A, Molecular and Cellular Life Sciences: Infectious Diseases, Biochemistry & Structural Biology (MCLS2015), 2015/5/7-9, 国外.
14. Synchrotron radiation beamline of the Institute for Protein Research, 口頭, Yamashita E, International Symposium on Establishment of Structural Biology Network in the Asian Region, 2015/9/30-10/1, 国外.
15. Crystallography using Synchrotron Radiation, 口頭, Nakagawa A, Joint Symposium between the Institute for Protein Research (Osaka University) and the Research School of Chemistry (Australian National University) "Protein Structure and Function", 2015/11/14-16, 国外.
16. High-Precision X-ray Crystallography of Proteins, 口頭, Nakagawa A, The joint conference of ISPS-6 and ITTW2015, 2015/9/14-18, 国外.
17. SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (大阪大学蛋白質研究所) BL44XU の現状, ポスター, 山下栄樹, 東浦彰史, 吉村政人, 長谷川和也, 熊坂崇, 古川行人, 大端通, 上野剛, 山本雅貴, 吉川信也, 月原富武, 中川敦史, 第28回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 2015/1/11-12, 国内.
18. 高圧凍結法を用いたイネ萎縮ウイルスの高分解能X線結晶構造解析への取り組み, ポスター, 東浦彰史, 中道優介, 太田和敬, 宮崎直幸, 一木珠樹, 大村敏博, 中川敦史, 平成27年度日本結晶学会年会, 2015/10/17-18, 国内.
19. Structural origins of slowness and regulatory mechanism in KaiC ATPase, ポスター, Abe J, Hiyama TB, Mukaiyama A, Son S, Mori T, Saito S, Osako M, Julie W, Yamashita E, Kondo T, Akiyama S, 第53回日本生物物理学会, 2015/9/13-15, 国内.
20. Circadian timing governed by cyanobacterial KaiC ATPase, ポスター, Mukaiyama A, Abe J, Hiyama T, Son S, Mori T, Saito S, Osako M, Wolanin J, Yamashita E, Kondo T, Akiyama S, 第53回日本生物物理学会, 2015/9/13-15, 国内.

21. SPring-8 BL44XU, A Beamline for Large Biological Macromolecular Assemblies, 口頭, Nakagawa A, Yamashita E, Higashiura A, Yoshimura M, Hasegawa K, Furukawa Y, Ohata T, Kumasaka T, Ueno, Yamamoto M, Tsukihara T, 5th International Symposium on Diffraction Structural Biology (ISDSB2016), 2016/8/7-10, 国外.
22. Structural Studies Using X-ray Diffraction, 口頭, 中川敦史, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/7-9, 国内. 平成 28 年 6 月 7-9 日 福岡国際会議場
23. 蛋白質の精密 X 線結晶構造解析, 口頭, 中川敦史, 高品質蛋白質結晶化技術の宇宙科学研究拠点形成 平成 28 年度「関西チーム若手向け研究会」, 2016/9/21, 国内.
24. High-Precision X-ray Crystallography of Proteins, 口頭, Nakagawa A, The 2nd International Workshop of Space Science of High Quality Protein Crystallization Technology, 2016/10/20, 国外.
25. SPring-8 生体超分子複合体構造解析ビームライン (大阪大学蛋白質研究所) BL44XU の現状, ポスター, 大阪大学蛋白質研究所, 第 29 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 2016/1/9-11, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 放射光を利用したタンパク質結晶構造解析, 中川敦史, 平成 26 年度日本学術振興会東北地区会議学術講演会, 2014/10/25, 国内.

(4) 特許出願