

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14941

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Development of de novo phasing method with XFEL toward a structure determination of a drug target protein

研究代表者

中津 亨(Nakatsu, Toru)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50293949

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):創薬研究を行うためには薬の標的となるタンパク質のことをよく理解する必要がある。そのためにはタンパク質の結晶を作成し、X線結晶構造解析により立体構造を知ることが重要である。このような創薬ターゲットタンパク質の中には1数 $\mu\text{m}$ 程度ではあるものの、結晶ができている場合がある。しかしながら、このような結晶は構造決定が難しい。そこで従来の放射光施設に比べ、10億倍もの輝度があるX線自由電子レーザーによる解析が期待されている。そこで日本のXFEL施設であるSACLAにおいて新規立体構造決定法の開発を行い、 $\mu\text{m}$ サイズの微結晶タンパク質を用いて、立体構造決定できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):We need to understand the drug target protein in order to study the drug discovery research. It is important to determine the protein structure with X-ray crystallography. However it is difficult to determine the protein structure because the size of the crystal is only 1-10  $\mu\text{m}$ . The structural information is obtained from small crystals illuminated by an X-ray free electron laser. Then we developed de novo protein structure determination method using  $\mu\text{m}$ -sized protein crystals at SACLA which is Japanese X-ray free electron laser facility.

研究分野:タンパク質結晶学

キーワード:X線自由電子レーザー X線結晶構造解析 タンパク質 重原子同型置換法 異常分散効果

## 1. 研究開始当初の背景

創薬ターゲットを始めとする様々な膜タンパク質の立体構造が SPring-8 などの放射光施設を用いて明らかになってきている。しかしながら創薬ターゲットの対象となるタンパク質結晶は、その結晶化が困難であることに加え、たとえ得られたとしても 10  $\mu\text{m}$  程度の大きさしか得られないことが多く、X線回折実験を行なうことすら困難である。またたとえ測定ができたとしても結晶が小さいため、構造決定に必要なとされるX線回折強度を得ることができない。そこで、従来の放射光にくらべ、10億倍程度強度が強いX線が使用できるX線自由電子レーザー(XFEL)を用いた解析が2012年から日本でも開始されている。XFELを使用するとその強大な強度のために1ショットのX線を結晶に当てるだけで、結晶は大きなダメージを受ける。しかしながら、その1発の時間はわずか 10fs(=10<sup>-14</sup>sec)であるため、X線によるダメージを受ける前にデータがとれてしまう。したがって、たくさんの結晶からのデータを集めることができれば、立体構造を決定するために十分なデータと成ることから、このデータを用いた新たな構造決定法が希求されている。

## 2. 研究の目的

創薬ターゲットを始めとする様々な膜タンパク質の中には 10  $\mu\text{m}$  程度の微結晶ではあるものの、結晶ができていないケースが知られている。しかしながら取り扱いが難しいことから、立体構造決定に至らないことがしばしばである。

そこで、最近開発されたX線自由電子レーザー(XFEL)を利用し、だれでも簡単に微結晶を使って構造解析を行なうための技術を開発することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) ルシフェリン再生酵素の微結晶作成

SACLA を用いて、新規構造決定を行うためにはそれが可能なシステムを構築することが必要である。そこで水銀と放射光施設を用いて構造解析を行なったルシフェリン再生酵素(LRE)を用いた。そして SACLA においてX線結晶構造解析を行うための 10  $\mu\text{m}$  程度の大きさが揃った微結晶を大量に作成することが必要である。

すでに LRE の大量発現系はできており、1L の発現から約 20mg の精製タンパク質を得ることができ、100  $\mu\text{m}$  程度の結晶はすでに得られている。SACLA から得られるX線は1秒間に 30 回パルスの形で放出される。適当な割合でうまくX線が結晶にあたりデータが収集できる。適切な結晶の濃度(1x10<sup>7</sup>個/mL程度)に調製しておく、10発中2から3発は結晶にあたり、X線回折イメージが得られる。このような方法であるため1時間の測定に5から10mg程度のタンパク質を利用する。実際

の構造解析ではどの程度の結晶の数、すなわちタンパク質量が必要になるかは、わからない。また大量の微結晶が必要であることから、通常の蒸気拡散法ではなく、バッチ法による結晶化法の検討を行う。この検討を行うためにも、大量のタンパク質が必要であることから、少しでもたくさんのタンパク質を生産するために、大量発現の方法の改良を行う。

微結晶化はバッチ法により行う。その際、すでに結晶化条件としてわかっている PEG3350 を沈殿剤として使い、最適な結晶化条件の探索をおこなう。このとき、たくさんのタンパク質微結晶を作るためのタンパク質濃度や沈殿剤との混合の割合などを検討する。また結晶の数を調整するためにシーディング法の検討も行う。

構造決定を行うためには水銀誘導体の結晶を作成しなければならない。そこで、0.5mM 程度の HgO が溶けた溶液中に結晶を浸すことで水銀が結合した状態の結晶を得る。そのときに結合の状態をよくするために、結晶が壊れない程度で、より高い濃度の HgO の濃度や、浸漬の時間、結合しなかった水銀の除去方法などを検討する。

### (2) SACLA でのX線回折実験

上記の方法で得られた LRE の Native および水銀誘導体結晶を SACLA においてX線回折実験を行なう。このときのX線エネルギーは 12.6keV を用いる。放射光の実験で通常行なう、最も異常分散効果を示す最適なX線エネルギーを探すということはおこなわない。それは水銀の異常分散効果を得るために、この付近で測定すればほぼそのデータが得られることがこれまでの様々な構造解析データから明らかであるためである。

結晶をX線照射位置に導入するためにはインジェクターから流し出す必要がある。得られた結晶溶液は粘性が低いため、そのままインジェクターから結晶を流すと非常にたくさんの結晶が必要となる。そこで、溶液の粘性をあげるためにグリースと混ぜてから測定を行う。

測定は1ヶの結晶に対して、1イメージしか得ることができないため、データの精度をあげていくためには非常に多くのイメージデータを処理する必要がある。そこで、データの冗長性が 1000 程度を目標に行なう。通常の放射光での測定であれば、冗長性は 10 程度である。

これにより得られた異常分散効果のデータを用いて単波長異常分散(SAD)法による構造決定を行う。ただし、得られるシグナルは微弱であるため、成功するかどうかかわからない。そこで、Native 結晶についても同様のデータ収集を行なっておき、異常分散効果を考慮した重原子同型置換(SIRAS)法による解析についても試みる。

#### 4. 研究成果

##### (1) ルシフェリン再生酵素の微結晶化

ルシフェリン再生酵素(LRE)の結晶化を行うためのサンプル調製として、まずはLREの大量発現を行った。培地としてTB培地を用いて発現させることにより、2Lから50gの菌体を得られた。この菌体からタンパク質を抽出したのち、His-tagによるアフィニティ精製を行った。スロピンにより、N末端のHis-tagを切断して除去したのち、27mg/mLに濃縮した。最終的に1Lの培養から100mgの精製タンパク質を得られた。

SACLAを用いて実験を行うためには、大量の微結晶が必要である。微結晶化は27mg/mLのLRE溶液(10 mM HEPES pH 7.5, 0.1 M NaCl, 10% glycerol)と結晶用沈殿剤溶液(35% PEG3350, 10% MPD, 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.2 M MgCl<sub>2</sub>)を1:2もしくは1:1.6の比で混合し、4度の条件下で行った。この方法では微結晶の大きさをうまく制御することができなかったため、水銀誘導体結晶を作成する際は、シーディング法も合わせて行った。水銀誘導体結晶は1mM HgOを含む結晶母液に6日間浸漬することにより作成した。その後、1時間、母液に対して結晶を母液で数回洗浄したのち、1時間母液につけることで結合していない水銀を除去した。

##### (2) SACLAでのX線回折実験

シリアルフェムト秒構造解析(SFX)の実験はSACLAのビームラインBL3で行った。このときX線エネルギーを12.6keV(0.984Å)に設定した。使用した結晶のサイズは幅が2-5µm、長さは10-30µmであった。使用する結晶はあらかじめ口径30µmのメッシュフィルターをかけ、大きな結晶を除去した。この結晶溶液をインジェクターにセットし、ビームライン内のDAPHNISにセットした。流速を0.48-0.5µL/minで流した。

高分解能のX線回折強度を得るために、最高強度のX線を使用すると低分解能側の回折点が、使用するX線検出器(MPCCD)の感度を超えてしまい、正しい測定ができなかった。そこで、一度に全分解能の回折点を正しく測定するために、3.8Å分解能より低分解能側にマスク(300µmのアルミニウム)を取り付けることによって、約36%の強度の低減することにより、実験を行った。

まずNative結晶を用いてSFX実験を行った。133,958枚の回折像を取得した。そのうち、回折点の強度をもとに、回折点が見られていると考えられる26,238枚の像を選んだ。そこから指数付けおよび強度の積分を行ったところ、10,792枚の像から回折強度データが得られた。水銀誘導体結晶についても同様におこない、583,291枚の回折像を取得し、298,061枚の像を選んだ後、85,747枚の像から、回折強度データを得た。X線回折強度データの計算はX線回折強度データ解析プログラムCrysfEL0.5.3を用いて行った。

Native結晶においては1.5Å分解能までの回折強度データが得られ、SFX多重度は222であった。また水銀誘導体結晶からは1.6Å分解能までの回折強度データが得られ、SFX多重度は908であった。この水銀誘導体のデータのみを用いて短波長異常分散法(SAD法)により、構造決定を試みたが、構造決定には至らなかった。

そこで、Nativeおよび水銀誘導体結晶の両方のデータを用いて異常分散を考慮した重原子同形置換法(SIRAS法)による構造決定を試みた。まずは構造解析プログラムSHELXを用いて、水銀の結合位置を探した。その結果、図1に示した差パーソン図からもわかるとおり、水銀を表すピークが観測できた。このときのSHELXDから得られたCC<sub>all</sub>、CC<sub>weak</sub>値はそれぞれ11.89%、9.42%であった。

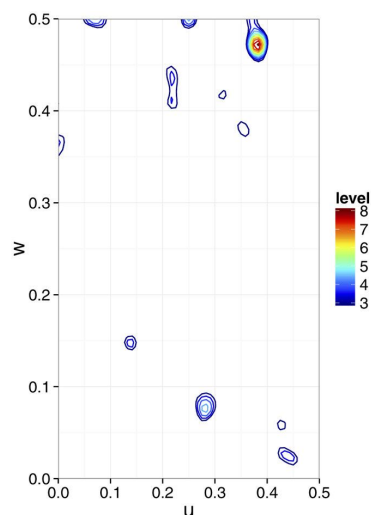


図1

この重原子位置を利用し、SHELXEにより位相改良とポリアラニンモデルの自動構築を行った。その結果、197アミノ酸残基のモデル構築に成功した。このときの位相の正確さをあらわすFOMは0.615であった。さらにARP/wARPによるモデル自動構築を行ったところ、308アミノ酸残基中304アミノ酸残基のモデル構築に成功した。このときのモデルの正確さを示すR<sub>work</sub>、R<sub>free</sub>値はそれぞれ、22.3%、27.6%であり、構造解析が成功していることが明らかとなった。Cootによる手動でのモデル修正とphenix.reineによる精密化を行ったところ最終的なR<sub>work</sub>、R<sub>free</sub>値はそれぞれ18.5%、23.2%であった(図2)。このとき10,792枚のNative結晶(1.5Å分解能)、10,000枚の水銀誘導体結晶(1.6Å分解能)からのデータを用いた。

続いて、構造決定を行うためにはどれくらいの回折イメージからのデータが必要かを明らかにするため、図3に示したように1,000枚ごとにNativeと水銀のデータの使用量を変更して、構造解析をおこなった。その際、位相の精度を示す値として、SHELXEによって

実験的に決まった電子密度と、タンパク質モデルより計算された電子密度との相関係数 (CC) を指標とした。CC が 0.65 以上となったとき、構造決定成功とした。その結果、最低でも Native 結晶については 5,000 枚、水銀誘導体結晶については 8,000 枚必要であった。構造決定するには最低でも合わせて 18,000 枚必要であることもわかった。

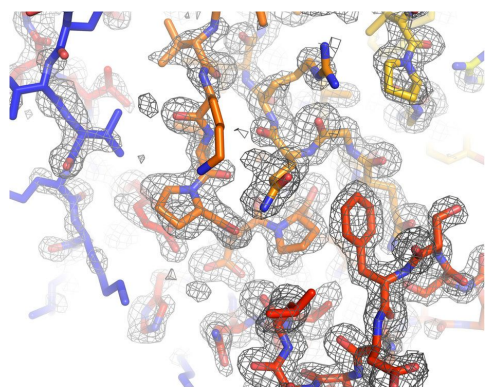


図 2

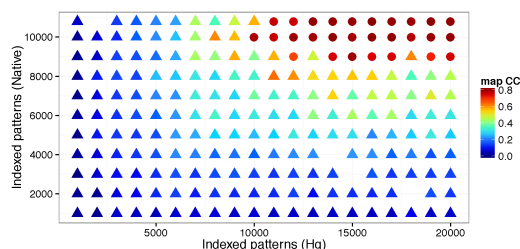


図 3

次に分解能はどこまで必要であるのかを SIRAS について調べた (図 4)。その結果、Native、水銀誘導体結晶がいずれも 1.7Å 分解能の時構造決定に成功した。同様に異常分散効果を考慮しない重原子置換法 (SIR 法)で行ったところ、Native 結晶が 1.6Å 分解能、水銀誘導体結晶が 1.8Å 分解能の時に構造決定に成功した。

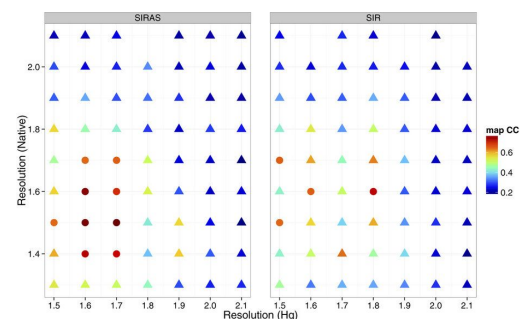


図 4

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yamashita K, Pan D, Okuda T, Sugahara M, Kodan A, Yamaguchi T, Murai T, Gomi K, Kajiyama N, Mizohata E, Suzuki M, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Park J, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Iwata S, Kato H, Ago H, Yamamoto M, Nakatsu T, An isomorphous replacement method for efficient de novo phasing for serial femtosecond crystallography. Scientific reports, 5, 14017, 2016, 査読有, DOI: 10.1038/srep14017

Nakane T, Song C, Suzuki M, Nango E, Kobayashi J, Masuda T, Inoue S, Mizohata E, Nakatsu T, Tanaka T, Tanaka R, Shimamura T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Iwata S, Sugahara M, Native sulfur/chlorine SAD phasing for serial femtosecond crystallography. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography, 71, 2519-2525, 2015, 査読有, DOI:10.1107/S139900471501857X

Fukuda Y, Tse KM, Nakane T, Nakatsu T, Suzuki M, Sugahara M, Inoue S, Masuda T, Yumoto F, Matsugaki N, Nango E, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Song C, Hatsui T, Yabashi M, Nureki O, Murphy ME, Inoue T, Iwata S, Mizohata E, Redox-coupled proton transfer mechanism in nitrite reductase revealed by femtosecond crystallography., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113, 2928-2933, 2016, 査読有, DOI: 10.1073/pnas.1517770113

〔学会発表〕(計 3 件)

山下 恵太郎, 潘 東青, 奥田 智彦, 菅原 道泰, 小段 篤史, 山口 知宏, 村井 智洋, 溝端 栄一, 鈴木 守, 南後 恵理子, 登野 健介, 城地 保昌, 亀島 敬, 初井 宇記, 矢橋 牧名, 岩田 想, 加藤 博章, 吾郷 日出夫, 山本 雅貴, 中津 亨, X 線自由電子レーザーを用いた新規タンパク質の立体構造決定, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

山下 恵太郎・潘 東青・長谷川和也・菅原 道泰・村井智洋・小段篤史・溝端栄一・鈴木 守・榊田哲哉・平田邦生・加藤博章・吾郷日出夫・熊坂崇・山本雅貴・中津 亨、シリアル結晶学における重原子誘導体を用いた位相決定、平成 27 年度日本結晶学会年会、平成 27 年 10 月 17 日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (大阪府堺市)

山下 恵太郎, 潘 東青, 菅原 道泰, 吾郷 日出夫, 山本 雅貴, 中津 亨, De novo

structure determination for serial femtosecond crystallography using heavy atom derivatives、第 53 回生物物理学会年会、2015 年 9 月 13 日、金沢大学（金沢市）

〔図書〕（計 1 件）

中津 亨 他、朝倉書店、光と生命の事典、2016、pp. 32-33

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中津 亨 (NAKATSU, Toru)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：5 0 2 9 3 9 4 9