

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K01942

研究課題名(和文) 非天然官能基ポスト標識技術による微小マイクロ結晶構造解析法の開発と応用

研究課題名(英文) Development of protein microcrystallography applied by an effective post-labeling method, using methyltransferases and synthetic AdoMet-derivatives

研究代表者

別所 義隆 (Bessho, Yoshitaka)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・客員研究員

研究者番号：70242815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：AdoMetを補酵素とするメチル基転移酵素の一部には、AdoMetの代わりに人工官能基を持つAdoMet類似体を使用することで、生体高分子の特定の位置にプローブを導入することが可能になる。この研究で、超好熱性真正細菌Aquifex aeolicusのメチル基転移酵素TrmIを使用し、tRNA分子のT-Loop部位にCy3、Cy5やローダミンなどの蛍光色素を導入する技術を開発した。SPring-8のマイクロフォーカスビームライン・BL32XUに蛍光・レーザー装置を設置し、X線測定に使用するゴニオステージ上で、複合体の結晶から実際に蛍光を検出し、構造解析用の位相回復に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最適化された非天然官能基を有するAdoMet類似体が多くメチル基転移酵素に適用できるならば、汎用的な生体分子工学に応用できる。

研究成果の概要(英文)：We utilized a chemical biology approach to develop a site-specific DNA/RNA labeling method, in which nucleic acids can be covalently modified at nucleotide precision using engineered methyltransferases and synthetic analogs of their cofactor, AdoMet. By conjugating fluorescent probes such as Cy3, Cy5, and rhodamine into the extended group of the synthetic AdoMet, we successfully developed the core technologies to incorporate fluorescent labels into microcrystals of complexes of tRNA/DNA and their related protein enzymes. The fluorescence and laser system were installed at the microfocus beamline BL32XU of the SPring-8 synchrotron, and the fluorescence was actually detected from the crystal of the complex on the BL32XU goniostage. The X-ray phase recovery for structural analysis was successfully achieved.

研究分野：構造生物学

キーワード：生物・生体工学 バイオテクノロジー 結晶構造 タンパク質 メチル基転移酵素 tRNA 人工補酵素 S-アデノシルメチオニン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)【マイクロビームライン】タンパク質など生体高分子の X 線結晶構造解析において、高フラックス・ビームラインの利用により、結晶サイズや回折強度の問題で解析できなかった結晶への対応など、構造決定技術が急激に進歩を遂げている。理化学研究所 SPring-8 の高輝度放射光では、30 μm サイズの結晶からの構造決定が一般化されている。また、新世代マイクロビームライン・BL32XU においては、10 μm サイズの微小マイクロ結晶から新規構造決定が可能となった。疾病の原因を含む多くの生命現象で重要な役割を担っている膜タンパク質や核酸・タンパク質複合体については、発現・精製・結晶化が非常に困難であり、微量のサンプルから 10 μm 以下の超微小結晶やクラスタ状の結晶しか得られない場合も多い。微小マイクロ結晶は、多くの場合、ダメージの原因となるクライオ保護を使用せずとも測定できるというメリットもあり、より小さな結晶で効率良く構造解析を実現する手法が待ち望まれている。

(2)【メチル基転移酵素の非天然官能基プロービング】AdoMet を補酵素とする DNA メチル基転移酵素の一部には、有機合成した AdoMet 類似体から、メチル基の代わりにエチル基やプロピル基などの非天然官能基を導入する能力がある。我々は、RNA メチル基転移酵素を用いて、これらの非天然官能基の転移が、エチル基などの低分子官能基だけでなく、通常は立体障害のため転移が困難と思われる、GABA などの分子量の大きな官能基にも適用できることを発見した。この技術は、プローブを分子の特定位置に導入することを可能とする。我々は、tRNA 分子にアミノ基を含む高分子非天然官能基を取り込ませて、結晶にダメージなく、TAMRA、AF488、Cy3 等の蛍光ラベルを導入する技術を独自に開発した。

(3)【ミトコンドリアの翻訳システム】動物ミトコンドリアの翻訳系は、他の全ての生物(バクテリア、動植物細胞の細胞質、植物のオルガネラ)のものと比較して顕著な特徴を持っている。すなわち、異常な 2 アーム型 tRNA が存在し、変則的な遺伝暗号を使用する。また、リボソーム等の RNA・タンパク質複合体では、構成要素の RNA が縮小し、その空隙を肥大化したタンパク質が補完している。このような異常な翻訳系も、通常生物の翻訳系と同様の機能を有するが、その分子メカニズムは、ほとんど分かっていない。立体構造を基盤とする検討もこれまで数少ない。

2. 研究の目的

マイクロビームライン・BL32XU では、数ミクロンサイズのサンプル結晶に数ミクロンサイズの X 線ビームを照射するため、極めて正確な結晶のセンタリングが必要になる。結晶を蛍光標識できれば、多数のマイクロ結晶を同時にゴニオセットし、ダメージの原因となる X 線の代わりに同軸レーザーで追尾させることで、データセット取得の完全自動化が実現可能となる。そこで、本研究で、可視光では判別困難なマイクロ結晶に対し結晶に蛍光標識を導入する技術、および結晶に導入した蛍光を検出する装置の開発を進める。また、BL32XU の特性に合わせて、tRNA など核酸・タンパク質複合体を標的化し、マイクロ結晶の立体構造解析を実施する。このため、多くのメチル基転移酵素の結晶構造を分析し、非天然官能基の転移に適した基質結合ポケットの特徴を分析する。また、非天然プローブのバリエーションを増やし、クリスタルコンタクトを破壊しない縮小型官能基の開発を進める。鎖長の短い 2 つのアームからなる異常構造を持つミトコンドリア tRNA も、リボソームに正しくエントリするためには、L 字型に類似した立体構造をとり、両末端間の距離が通常の tRNA のものと同じであることが予想される。変則 tRNA が如何に折りたたまれて機能分子となるかを X 線結晶解析で検証する。

3. 研究の方法

(1)【メチル基転移酵素の構造解析・非天然基質最適化】tRNA メチル基転移酵素の立体構造から補酵素位置を特定し、転移に成功した非天然官能基が、酵素・基質複合体において立体障害を回避する分子メカニズムを分析する。AdoMet 複合体構造が得られていない酵素については、補酵素複合体の結晶構造解析を試みる。さらにメチル基転移酵素と非天然 AdoMet 類似体複合体の構造を決定し、非天然官能基の結合方向について考察する。エチル基やプロピル基に直接アミノ基を繋ぐ有機合成は難しいので、炭素 4 原子単位で AdoMet 類似体を準備する。求核反応を促進させるため、AdoMet のイオウ原子付近で sp² 混成軌道が含まれるように工夫する。複数の AdoMet 類似体の取込み活性を整理し、酵素の分類群との相関を探索する。得られた構造データを分析し、高分子官能基転移反応の一般化に取り組む。天然型のメチル基でないと潜在的な活性が得られない一部の酵素群を予想し実験候補から除外する。

(2)【放射光施設における蛍光・レーザー装置の最適化】現在、BL32XU ビームラインに設置可能な蛍光・レーザー装置を使用し、生化学実験に一般的に用いられる TAMRA(ローダミン)、AF488(FITC 相当)、Cy3 を使った蛍光マイクロ結晶を観察する。マイクロ結晶の微弱蛍光を検出するためには、CCD の検出限界による白色ノイズと照射励起光の漏れによる蛍光ノイズをシグナル強度以下にする必要がある。励起光と蛍光の波長バンド幅の大きな蛍光試料を準備し、網羅的なデータ収集を行う。紫外線(UV)域の蛍光検出が出来れば、追尾測定自動化に向けて、可視光と同時観察が可能になる。レーザー強度の調整により、蛍光試料の安定性を確保し、蛍光結晶の退色比率をまとめる。X 線照射により、通常結晶と蛍光結晶の回折安定性を比較し、データセット撮影法を最適化する。

(3)【ミトコンドリア tRNA・タンパク質複合体の構造・機能解析】ミトコンドリアでは変則的な

2 アームから構成される tRNA が存在し、これらを使用した翻訳の独自システムの多くは謎のままである。変則的な tRNA は分子として不安定であり、結晶が成長しない要因と考えられる。特に、D アームを欠いた mt・tRNA は熱的安定性が乏しく RNA 単体の結晶化は困難である。ミトコンドリア・アミノアシル tRNA 合成酵素 (mt・aaRS) と mt・tRNA の複合体を調製し共結晶化を行う。構造解析の位相決定のためには結晶改良を必要とする。mt・tRNA にどのメチル基転移酵素が反応するか、その取込み活性を調べる。tRNA とメチル基転移酵素双方を改変し、効率的な非天然官能基の取込みを実現する。蛍光微結晶に放射光実験ハッチ内でレーザー照射し蛍光量を調べ、マイクロ結晶に自動追尾 X 線照射出来るかを検討する。また、DNA 修復酵素の蛍光マイクロ結晶を作成し、核酸・タンパク質複合体結晶の蛍光センタリング法を一般化する。

4. 研究成果

(1)【メチル基転移酵素の構造解析・非天然基質最適化】

超好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* のメチル基転移酵素 TrmI を使用して、tRNA 分子の T-Loop 部位に非天然官能基を取り込ませることに成功した。非天然官能基の末端に位置するアミノ基に Sulfo-NHS-Biotin 試薬を反応させて、tRNA 分子に結合した人工官能基の末端をピオチン化した。また、TrmI の触媒部位の立体構造を分析し、結晶化用に非天然官能基の長さを最適化した。アミノ基の代わりにピオチンを末端に持つ AdoMet 類似体もデザインし、tRNA 分子に直接ピオチンを転移させることが可能になった。それぞれ、ピオチン化された tRNA 分子は、ストレプトアビジンを使用したゲルシフトアッセイ電気泳動実験の結果から、十分な反応効率であることが確認された。さらに、tRNA 分子に取り込ませた非天然官能基の末端に Cy3 や Cy5 などの蛍光色素を導入することにも成功した。作製した蛍光化 tRNA 分子の修飾基が立体障害しないように、T-Loop 部位を認識しない tRNA 結合タンパク質を選定して、tRNA・タンパク質複合体の結晶化を試み成功した。得られた複合体結晶が導入した蛍光を発することが確認された。

(2)【放射光施設における蛍光・レーザー装置の最適化】

SPring-8 のマイクロフォーカスビームライン BL32XU は、マイクロ結晶から回折データを得るために開発されたビームラインである。この BL32XU に蛍光・レーザー装置を設置し、Cy3 を導入した tRNA・タンパク質複合体の蛍光結晶から、実際に X 線測定に使用するゴニオステージ上で蛍光の検出に成功した。開発した蛍光・レーザー装置を高度化し、Cy3 や Cy5 蛍光色素の他にローダミン蛍光色素も検出できるようになった。BL32XU ビームラインのゴニオステージにて、それぞれの蛍光色素について蛍光結晶の退色が起こらないレーザー強度を調べた。さらに、UV 波長により励起する蛍光色素も検出できる条件を見出した。それぞれの蛍光色素について蛍光結晶の退色が起こらないレーザー強度を調べたところ、UV 波長の蛍光は可視光に比べて強度が若干弱く、実用とするには改善が求められることが分かった。

(3)【ミトコンドリア変則型 tRNA の構造・機能解析】

バクテリア由来の tRNA・タンパク質複合体のマイクロ結晶に非天然官能基を導入する条件を最適化し、BL32XU の特性を生かす蛍光マイクロ結晶を作製した。BL32XU にて、この tRNA・タンパク質複合体の蛍光マイクロ結晶から、構造解析用の X 線回折データセットの取得し、位相回復に成功した。ミトコンドリア tRNA・タンパク質複合体については、マイクロ結晶の X 線回折データが効率的に取得できるようになったものの、回折分解能が不十分で位相回復が出来なかった。引き続き結晶改良に努めている。マイクロ結晶のメチル基転移酵素による非天然官能基蛍光プロービング法を一般化するために、DNA 修復酵素のマイクロ結晶化と、BL32XU にて蛍光検出にも成功した。SACLA の XFEL にも使用できるマイクロ結晶から、高分解能の X 線回折データが得られる実験条件を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Takashi, Suzuki Akihiro, Yang Ying, Niida Yoshiya, Nishioka Akiko, Takei Masashi, Wei Jinjian, Mitomo Hideyuki, Matsuo Yasutaka, Niikura Kenichi, Ijiri Kuniharu, Tono Kensuke, Yabashi Makina, Ishikawa Tetsuya, Oshima Tairo, Bessho Yoshitaka, Joti Yasumasa, Nishino Yoshinori	4. 巻 91
2. 論文標題 Micro-liquid enclosure array and its semi-automated assembling system for x-ray free-electron laser diffractive imaging of samples in solution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Review of Scientific Instruments	6. 最初と最後の頁 083706 ~ 083706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0008398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki Akihiro, Kimura Takashi, Yang Ying, Niida Yoshiya, Nishioka Akiko, Tachibana Tatsuro, Takei Masashi, Tono Kensuke, Yabashi Makina, Ishikawa Tetsuya, Oshima Tairo, Bessho Yoshitaka, Joti Yasumasa, Nishino Yoshinori	4. 巻 22
2. 論文標題 Design of a liquid cell toward three-dimensional imaging of unidirectionally-aligned particles in solution using X-ray free-electron lasers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 2622 ~ 2628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cp03658j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masami Ueta, Chieko Wada, Yoshitaka Bessho, Maki Maeda, Akira Wada	4. 巻 22
2. 論文標題 Ribosomal protein L31 in Escherichia coli contributes to ribosome subunit association and translation, whereas short L31 cleaved by protease 7 reduces both activities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 452-471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maestre-Reyna M, Yang CH, Nango E, Huang WC, Putu EPGN, Wu WJ, Wang PH, Franz-Badur S, Saft M, Emmerich HJ, WHY, LCC, HKF, CYK, LJH, WJH, GW, CCW, PAH, SM, OS, HY, JY, YA, TR, TT, LF, TK, HKC, KS, Schapiro I, Spadaccini R, Royant A, Yamamoto J, Iwata S, Essen LO*, Bessho Y*, Tsai MD*	4. 巻 14
2. 論文標題 Serial crystallography captures dynamic control of sequential electron and proton transfer events in a flavoenzyme	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Chemistry	6. 最初と最後の頁 677 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41557-022-00922-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 楊影、森屋利幸、別所義隆、西野吉則、大島泰郎
2. 発表標題 高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB27のミニセルの作製
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshitaka Bessho, Toshiyuki Moriya, Ying Yang, Akihiro Suzuki, Yasumasa Joti, Yoshinori Nishino, Tairo Oshima
2. 発表標題 XFEL Coherent Diffractive Bio-Imaging at SACLA/SPring-8
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kei Yura, Yoshitaka Bessho, Kohsuke Honda, Gota Kawai, Toshiyuki Moriya, Naoki Nemoto, Makoto Nishiyama, Gen-ichi Sampei, Tairo Oshima
2. 発表標題 ThermusDB: Renewal to a Comprehensive Knowledge Simulator for the Biological Information of <i>Thermus thermophilus</i>
3. 学会等名 15th International Congress on Thermophiles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 別所義隆、山元淳平、田中里枝、南後恵理子、岩田想、Ming-Daw Tsai、Lars-Oliver Essen、Manuel Maestre-Reyna
2. 発表標題 光修復酵素DNAフォトリアーゼのXFEL結晶構造解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 別所義隆
2. 発表標題 SACLAでの生体溶液試料XFEL回折イメージング手法の開発
3. 学会等名 第5回RIBOSOME MEETING
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田雅美、和田千恵子、別所義隆、和田明
2. 発表標題 大腸菌リボソーム蛋白 L31 と L36 およびそれらのパラログ(YkgM, YkgO)の機能解析
3. 学会等名 第5回RIBOSOME MEETING
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 別所義隆
2. 発表標題 XFEL analysis of light-mediated pyrimidine dimer repair by DNA photolyase
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 別所義隆
2. 発表標題 XFEL Diffractive Bio-Imaging at SACLA/SPring-8
3. 学会等名 International workshop on “50th anniversary of Thermus thermophilus discovery” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshitaka Bessho
2. 発表標題 Advanced X-ray bioimaging technology for structural genomics
3. 学会等名 8th International Conference on Proteomics and Bioinformatics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 別所義隆
2. 発表標題 遺伝暗号の初期進化とtRNA修飾酵素の役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田雅美、和田千恵子、別所義隆、和田明
2. 発表標題 大腸菌リボソーム蛋白L31, L36パラログはzur変異によって恒常的に発現する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 別所義隆
2. 発表標題 タンパク質生合成系遺伝子群の成立と進化
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 上田雅美、和田千恵子、別所義隆、和田明
2. 発表標題 大腸菌リボソームの翻訳活性は従来の測定値より40%高い：L31蛋白損傷の影響を排除する
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

中央研究院・生物化学研究所・Structure-based Protein Functions
<https://www.ibc.sinica.edu.tw/people/investigators/visiting-scholars/yoshitaka-bessho>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	山本 雅貴 (Yamamoto Masaki) (60241254)	国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・部門長 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
リトアニア	Vilnius University		
台湾	Academia Sinica		