

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06971

研究課題名(和文) X線結晶構造解析とコヒーレントX線回折イメージングによるPBCV1の相関構造解析

研究課題名(英文) The structure analysis of PBCV-1 by the combination of X-ray crystallography and coherent X-ray diffraction imaging

研究代表者

東浦 彰史 (Higashiura, Akifumi)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：90598129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：巨大ウイルスであるPBCV1を用い、X線結晶構造解析とコヒーレントX線回折イメージングを用いた相関構造解析を目指した研究に取り組んだ。PBCV1の結晶を得ることができなかったが、他のウイルス結晶をモデルとして用いた周辺技術開発により、脆弱な結晶から効率よく高分解能データを取得することに成功した。

X線自由電子レーザーを用いたコヒーレントX線回折イメージングでは多数の回折像を取得し、2次元の像回復に成功し、3次元再構築を目指したデータ選別に取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：Studies aimed at the structure analysis of a giant virus, PBCV-1 by the combination of X-ray crystallography and coherent X-ray diffraction imaging was carried out. The single crystals of PBCV1 have not been obtained yet, but the technical improvements were proceeded using the other virus crystals as a model. The high-resolution diffraction patterns were successfully observed from viral fragile crystals.

In the experiment of coherent X-ray diffraction imaging, so many diffraction patterns from PBCV-1 were collected and processed for 2D imaging. The data selection of diffraction data from huge data set is carrying out aimed to the 3D reconstruction of PBCV-1.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶解析 コヒーレントX線イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

複雑で多様な生命現象を担う蛋白質には巨大な超分子複合体を形成して始めて機能するものが数多く存在する。超分子複合体の機能も突き詰めれば原子レベルでの化学反応であり、その機能を原子分解能で理解する上でX線結晶構造解析は強力な手法である。X線結晶構造解析ではターゲットとなる蛋白質の超分子複合体が巨大なものほど困難になる。また、X線結晶構造解析で得られる構造は結晶中の平均構造であり、動的な構造の解析は原理上非常に困難である。さらに、対象が細胞の様にその形態に多様性を有するものであれば結晶化は不可能であり、X線結晶構造解析は不可能である。

近年、高い平行性を有した高輝度パルス光であるX線自由電子レーザー(XFE-L)が実用段階に入った。2011年に米国SLAC国立加速器研究所のLinac Coherent Light Source(LCLS)を利用した直径4500のMimivirusの単粒子構造解析(Seibert *et al.*, 2011)の報告を端緒にXFE-Lを用いたコヒーレントX線回折イメージングによる構造解析が現実のものとなった。我が国においてもSPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser(SACLA)を利用した微生物細胞の生きた状態での単粒子構造解析が報告されている(Kimura *et al.*, 2014)が、生物試料のコヒーレントX線回折イメージングの成功例は世界的にも未だ少なく、その解析対象はマイクロメートルオーダーのサイズに限られていた。

X線結晶構造解析の静的な高分解能構造とコヒーレントX線回折イメージングの対称性の低い動的な天然状態の構造の相関構造解析が実現すれば、超分子複合体のより天然状態に近い構造情報を手にすることが可能となる。

## 2. 研究の目的

本申請ではX線結晶構造解析とコヒーレントX線回折イメージングの相関構造解析を目指す。その対象として *Paramecium bursaria Chlorella virus 1* (PBCV-1)を用いる。PBCV-1は *Phycodnaviridae* 科 *Phycodnavirus* 属に属するクロレラを宿主とするウイルスで、自然界の淡水中に広く分布している。約400kbpのゲノムを有する直径約2000の巨大な球状ウイルスであり、電子顕微鏡の単粒子解析により正二十面体対称を有することや、外殻上の特徴的な突起構造が報告されている(Zhang *et al.*, 2011)。また、カプシド内側に脂質二重膜を保持するという構造的特徴を有している。PBCV-1のゲノムにはゲノムの複製系・転写系・翻訳系・各種代謝系・イオンチャネルなど、約400種類の蛋白質がコードされている。イオンチャネ

ルがPBCV-1を構成する構造蛋白質のひとつであるとの報告もあり(Romani *et al.*, 2013)、まるで小さな細胞の様な特徴を有している。このPBCV-1の立体構造をX線結晶構造解析の手法を用いて原子レベルで決定することができれば、ひとつの細胞の詳細な構造を決定するに等しい知見を得ることができると考え、申請者はこれまでにPBCV-1のX線結晶構造を目指した研究を継続してきた。これに加え、本申請ではPBCV-1のX線結晶構造解析(MX)とコヒーレントX線回折イメージング(CXI)による単粒子構造解析を実施する。X線結晶構造解析とコヒーレントX線回折イメージングで得られた立体構造の相関構造解析から小さな細胞のような特徴を有するPBCV-1の動的な内部構造を含んだ、より天然状態に近い立体構造を明らかにすることを目的とする(図1)。

X線結晶構造解析の手法でPBCV-1ほどに大きな対象の構造解析例は存在しないため、X線結晶構造解析のサイズ限界を大きく押し上げ、超分子複合体の構造解析技術開発に大きく寄与できる。また、コヒーレントX線回折イメージングでは直径4500のMimivirusが最小の構造解析例であったため、PBCV-1の単粒子構造解析を通じた技術開発は世界的な広まりを見せつつあるコヒーレントX線回折イメージングのスタンダードと成り得る。

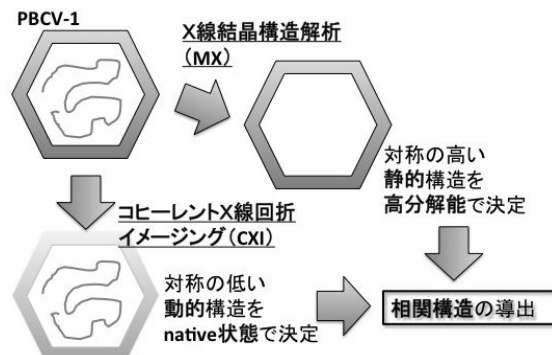


図1:MXとCXIによる相関構造解析概要

## 3. 研究の方法

(1) 分子量が10億にも及ぶPBCV-1の構造解析には大量かつ高純度のPBCV-1め、これまでの研究で確立した手法で高純度大量調製を継続的に実施する。

高純度サンプルを用い、結晶化スクリーニングを網羅的に行う。また、これまでの研究でPBCV-1の表面にファイバー状の構造体が存在していることが明らかになっており、このファイバーが結晶化を妨げる可能性があるため、その同定と除去を目指す。結晶が得られ次第、放射光施設を用いたX線回折実験を行う。得られたPBCV-1の結晶から、データ収集が可能となれば、電子顕微鏡で得られ

ている構造を初期構造として原子分解能まで構造情報を拡張する。

(2) PBCV-1の結晶がX線による放射線損傷に脆弱である場合、多数の結晶からの回折強度データ収集が必要となるため、データ収集方法と解析方法の開発改良を行う。また、回折実験を行うビームラインの改良も別プロジェクトであるが継続的に行っており、本研究との関連性は非常に高い。放射光施設で供される高輝度なX線を用いた回折実験では結晶に対する放射線損傷が非常に大きいため極低温下で行われることが主流である。極低温下での回折実験を行うためには結晶を抗凍結剤に置換する必要があるが、ウイルスの様な超分子複合体より成る結晶は経験上、物理的・化学的に脆弱である場合が多い。そこで、結晶の抗凍結剤の置換を最小限に抑えるための高圧凍結実験をモデル蛋白質や他の既知のウイルス結晶に適用し、技術基盤を確立する。

(2) これまでのLCLSにおけるコヒーレントX線回折実験では120Hzでのデータ収集を数時間行い、20万を超えるコヒーレントX線回折データを取得した。取得した莫大なデータ群より、単粒子からの回折パターンをみの選別を行ってきたが、分解能とデータの質が十分ではなかった。そこで、ウプサラ大学と連携し、より高分解能、高精度なデータ収集のための回折実験を実施する。

得られた回折データは蛋白質研究所もしくはウプサラ大学で回折データの選別を行う。PBCV-1からの単粒子回折データは正二十面体対称を有する特徴から同心円状に現れるため、これを手がかりにデータの選別を行うことが可能である。

選別された単粒子由来の回折データを用い二次元像回復、三次元像の再構築を行う。動的な内部構造の決定には技術的に困難を伴う事が想定されるため、まずPBCV-1の正二十面体対称の特徴を利用した構造平均化を用い、可能な限り高分解能での構造決定を行う。

#### 4. 研究成果

(1) X線結晶構造解析のための結晶化を妨げる要因であると考えているPBCV-1表面のファイバー状構造体の除去を目指した実験を実施したが成果は得られていない。ファイバー状構造体の同定を目的とした各種アッセイを実施したが、現在も同定するには至っていない。また、結晶化条件の探索は継続して実施しているが結晶様の凝集体を得るのみである。結晶化時のPBCV-1の沈降が結晶化を妨げる原因であると考え、クリノスタットを用い重力加速度をキャンセルした状態での結晶化を試みたが結晶性を改善するに

は至らなかった。

(2) PBCV-1の結晶構造解析を目指した周辺技術開発を実施した。既に結晶の得られている他のウイルスやウイルス様粒子をモデルとして周辺技術の開発と整備を行った。モデル結晶を用い、より高分解能のX線回折データを効率よく取得するための放射光施設でのデータ収集法の改良とビームライン(SPring-8 BL44XU)整備を行った。ウイルス様粒子の結晶を用いた回折実験ではこれまでの3.6分解能から3.2分解能までの向上に成功した。また、初期の位相決定などに重要である低分解能(約400Å)の回折強度を測定できることも確認できた。さらに、環境変化に脆弱であるイネ萎縮ウイルス結晶をモデルとして、高圧凍結法の整備を進め、環境変化に脆弱な結晶でも最高2.5分解能の回折点を観測するに至った。

(3) コヒーレントX線イメージングでは既に取得済みであった回折イメージの選別を実施し、PBCV-1の単粒子由来であると考えられる回折パターンを複数得ることができた。ここで得られた回折イメージの位相回復を行い、低分解能ではあるが妥当な2次元イメージを得ることに成功した(図2)。

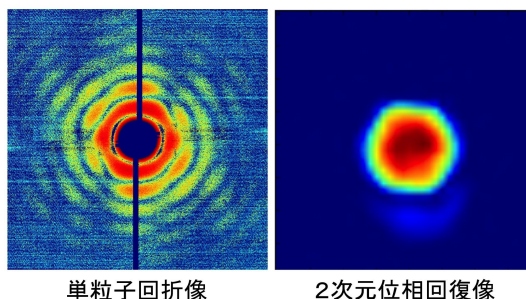


図2: 単粒子からの回折像と2次元位相回復像

より、高分解能かつ精度の高いデータを取得するために、新たにLCLSとEuropean XFELにおいて回折実験を実施した。これまでよりも精度の高いデータ収集に成功しており、新規データからの2次元イメージングにも成功した。更なる回折データの選別に取り組んでおり、3次元再構築を目指した回折データの選別に引き続き取り組んでいる。

## 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7件)

Munke A., (17名略), Higashiura A., (35名略), Coherent diffraction of single Rice Dwarf Virus particles using hard X-rays at the Linac Coherent Light Source, *Sci Data.*, 査読有, 1, 3, 160064, 2016, DOI: 10.1038/sdata.2016.64

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.*, 査読有, 1741, 030028, 2016, doi: 10.1063/1.4952851

Nakagawa A., Miyazaki N., Higashiura A., Hierarchical structure assembly model of rice dwarf virus particle formation., *Biophys Rev.*, 査読有, 10(2), 2018, 659-665, DOI: 10.1007/s12551-017-0375-2

[学会発表](計15件)

Higashiura A., van der Schot G., Hantke M., Liu J., Yamada T., Hajdu J., Nakagawa A., Approaches for Coherent X-ray Diffraction Imaging of Paramecium bursaria Chlorella virus-1, *The 13th Conference of the Asian Crystallographic Association*, 2015, Kolkata, India

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, 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, 平成27年度日本結晶学会年会, 2015, 大阪

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, *12th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation*, 2015, New York, US

Yamashita E., Higashiura A., Yoshimura M., Hasegawa K., Furukawa Y., Kumasaka T., Ueno G., Yamamoto M., Tsukihara T., Nakagawa A., SPring-8 BL44XU, A Beamline Designed for Structure Analysis of Large Biological Macromolecular Assemblies, *5th International symposium on diffraction structural biology*, 2016, Knoxville, US

Higashiura, A.; Nakamichi, Y.; Miyazaki, N.; Tsutsumi, K.; Iwasaki, K.; Murata, K.; Omura, T. & Nakagawa, A., Structure assembly mechanism of Rice Dwarf Virus, *24th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography*, 2017, Hyderabad, India

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

東浦 彰史 (HIGASHIURA, Akifumi)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号: 90598129