# X線自由電子レーザーによるダメージフリーのタンパク質構造決定法

中根 崇智<sup>1</sup>, 岩田 想<sup>2</sup>, 溝端 栄一<sup>3</sup>

#### 1. はじめに

タンパク質の機能を理解するには、その立体構造を可視 化することが不可欠である。100万分の1ミリメートル程 度しかないタンパク質の形を知るために、分子や原子レ ベルの極小の世界を分析できる技術、X線結晶構造解析が 用いられてきた.この技術は、タンパク質の結晶を回転 させながらX線を照射し、結晶が反射した光の模様(X線 回折画像)を記録し、そこからコンピュータ上での解析を 通じて、結晶を構成する原子の形(電子密度)を描き出 す.高解像度で明瞭に構造を決定するには、従来、大型 (>200µm)で良質の結晶を作ることが肝要であった.一 方、より小さな結晶でも明瞭なX線回折画像を得るため に、強力なX線を生み出す放射光施設が建設されてきた.

X線自由電子レーザー(XFEL)は、超高輝度・フェム ト秒パルス・高空間コヒーレンスという特徴を有する新 世代の光である.米国で世界初のXFEL施設LCLSが2009 年に建設されたのに次いで、わが国では2011年、国家基 幹技術としてSACLAが兵庫県播磨科学公園都市に建設さ れた.SACLAが生み出す光はSPring-8など従来のシンク ロトロン放射光施設が出す光の10億倍もの明るさを持つ. 本稿では、XFELを利用して数十ミクロンもない多数の微 結晶からタンパク質構造を解明する新しい実験手法「連続 フェムト秒構造解析(serial femtosecond X-ray crystallogra-

<sup>1</sup>東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻(〒113-0032 東 京都文京区弥生2-11-16)

<sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科医学専攻(〒606-8501 京都府京 都市左京区吉田近衛町)

<sup>3</sup>大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻(〒565-0871 大阪 府吹田市山田丘2-1)

### Damage-free protein structure determination by X-ray free electron laser

**Takanori Nakane<sup>1</sup>**, **So Iwata<sup>2</sup> and Eiichi Mizohata<sup>3</sup>** (<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2–11–16 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113–0032, Japan, <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606–8501, Japan, <sup>3</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2–1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565–0871, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890571

© 2017 公益社団法人日本生化学会

phy:SFX)」について実例を通して紹介する.

#### 2. SFXの特性を活かしたダメージフリー構造解析

SFXは、インジェクターから噴出させた多数の微結晶に 対し、XFELを連続的に照射してX線回折画像を収集して 構造解析する手法である (図1). SACLAでは、XFELが 毎秒30発、光の弾丸として機関銃のように微結晶の流れ に向けて発射される.利用できる光の波長範囲は0.62~ 2.76 Åである.1発のXFELはわずか10フェムト秒(100 兆分の1秒)以下のパルス幅を持つ.微結晶にパルス光が ヒットすると、その衝撃で結晶は一瞬で崩壊してしまう. しかし、結晶の崩壊過程よりも早くX線回折画像を記録で きるため、構造解析に支障はない.数万から数十万個の微 結晶についてのX線回折画像を数時間かけて測定し、常温 下でダメージフリーのタンパク質の真の構造を決定でき る.SFXの登場により、従来の放射光X線構造解析で問題 となっていた, 測定時の結晶凍結や放射線損傷が引き起こ すタンパク質構造の変位や歪みを克服することが可能と なった.

ここでは、地球上の窒素循環において重要な役割を担う 銅含有亜硝酸還元酵素(copper-containing nitrite reductase: CuNiR)の解析事例を紹介する<sup>1,2)</sup>.本酵素は活性中心に 銅原子を有し、亜硝酸イオンを一酸化窒素に一電子還元 する反応(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+2H<sup>+</sup>+e<sup>-</sup>→NO+H<sub>2</sub>O)を触媒する.一般 に、従来のシンクロトロン放射光を利用した金属タンパク 質のX線結晶構造解析では、結晶に照射されたX線が水和 電子を発生させ、活性中心の金属原子を還元してしまう現 象(X線光還元)が避けられなかった.CuNiRも同様で、 X線回折画像の収集時に銅原子のX線光還元が速やかに起 こることで触媒反応が進行し、基質NO<sub>2</sub>から生成物NOや 副生成物が生じてしまう.そのため、反応開始前の真の酸 化型構造を観察することが不可能であり、反応機構の全貌 は未解明のままであった.

そこで筆者らは、SACLAにてSFX実験を行い、光還 元のない真の酸化型構造を常温(20°C)下で捕捉するこ とを試みた.並行して、SPring-8の放射光X線を利用し、 CuNiRの触媒反応をX線光還元により誘発させた構造を極 低温(-170°C)と常温下で決定して、SACLAの構造との



図1 連続フェムト秒構造解析

連続フェムト秒構造解析の概念図(左図).わが国では兵庫県播磨科学公園都市にXFEL施設SACLAが大型放射光施設SPring-8に隣接して設置されている(右図).



図2 異なる条件で測定したCuNiRの亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub>) 複合体の構造比較 活性中心の銅原子への亜硝酸イオンの配位様式が測定条件ごとに大きく異なっていた.この違いは、銅原子が SPring-8のX線による光還元を受けることで酵素反応が進行することにより起こる.図は文献1)より改変して転載.

比較対照とした.従来から知られているように,X線照射前の緑色をした酸化型の結晶は,SPring-8でのデータ測定中のX線光還元に伴い無色に変化してゆく様子が観察された.興味深いことに,SPring-8で解いた構造は極低温と常温下のいずれの条件においても,基質NO<sub>2</sub>は銅原子に対

してフェイスオン(face-on)型に近い配位様式をとってい たのに対し,SACLAの構造では直立(vertical)型で配位 していることが明らかとなった(図2).過去に報告され た放射光で解かれたNO<sup>2</sup>複合体構造を調べると,すべて フェイスオン型に近い配位様式であった.このことから, 反応前の酸化状態で直立型に配位したNO<sub>2</sub>は、反応中の 銅原子の還元に依存して配位様式が倒れこむように構造変 化すると考えられた。

また、本稿では詳細な記載を省くが、銅原子の酸化還元 状態に依存し、銅原子に配位するHis残基の側鎖が大きく 回転する現象も見いだされた.これらの新しい知見から筆 者らは、CuNiRの触媒反応機構におけるプロトン共役型電 子移動の新しいモデルを提唱している.本研究成果は、新 時代の光XFELと従来の放射光X線による構造解析手法を 併用することにより、未解明であったタンパク質の作用機 作を初めて発見できた事例として重要である.

# 3. SFXによる位相決定方法

筆者らがSFXに着手した当時,ほとんどのSFX構造は 既知構造をモデルとする分子置換法によって解析されてい た.SFXを従来の放射光施設では解けない新規標的に適用 し,立体構造を常温かつダメージフリーの状態で明らかに するには,SFXでの,分子置換法によらない構造決定,す なわち実験的位相決定法の確立が不可欠であるが,その特 殊性のため近年まで実証例は少なかった.

実験的位相決定には、同型置換法と異常散乱法の2種類 と, 双方を組み合わせた方法がある. 同型置換法の場合 は、ネイティブ結晶と重原子標識した誘導体結晶の反射 強度の違いを利用する.異常散乱法の場合は、バイフッ ト (Bijvoet) 対と呼ばれる反射どうしの強度の差を利用す る.いずれにせよ、微小な違いを正確に測定することが必 要である.しかし、SFXでは数万個以上の独立した結晶か ら、パルス状のX線によってデータを収集するので、観測 値のばらつきは非常に大きい. その原因としては、構造の 非同型性・重原子占有率の違い・結晶形態やサイズの違い といった結晶に由来するものや、ビーム強度やスペクトル の違いといった光源に由来するものがあげられる.また. XFEL ならではの問題点として、すべての反射が部分反射 であることによる部分度 (partiality) の影響もある. モン テ・カルロ法による SFX データセットのマージとは、反 射を何度も測定して多重度を高めることによって、これら の違いを平均化することに他ならない.

理論上,モンテ・カルロ法のデータ精度は多重度の平方 根に比例して改善する.つまり,バイフット対の相対振幅 差であるバイフット比が1%の系で位相決定をするには, バイフット比10%の系の100倍のデータが必要である.た だし,収束のオーダーが理論どおりだとしても,比例係数 は実験データの分散に依存するため,現実的な枚数のX線 回折画像では位相決定できない懸念がある.また,これは 正確性ではなく精度の議論なので,データ処理に系統誤差 がある場合,多重度をいくら増やしても位相決定できない 可能性すら存在する.

2014年までにSFXで実験的に位相が決定された例は1件 のみであった<sup>3)</sup>. ここでは、ニワトリ卵白リゾチームのガ ドリニウム誘導体から単波長異常散乱(SAD)法で位相が 決定された. この系は10%を超える大きいバイフット比 を持つため、異常散乱シグナルがより小さい現実的な系で 位相決定可能かは未知であった. 特に硫黄によるSAD(S-SAD)は、重原子誘導体化を必要とせず、システインやメ チオニンに含まれる硫黄原子から位相決定できる手法であ るが、異常散乱シグナルが非常に小さいため困難が予想さ れた.

我々はリゾチームのS-SADに挑戦し,指数がついた13 万枚分のX線回折画像から位相決定に成功した<sup>4)</sup>.この系 は、非対称単位あたり10個の硫黄原子と1個の溶媒由来の 塩化物イオンを含み、理論上のバイフット比は約1.6%で あった.部分構造探索にはSHELXD,位相計算・位相改 善にはSHELXEという、通常のX線結晶構造解析でも頻 用されるプログラムを用いたが、分解能上限や溶媒比率な どのパラメータを網羅的に振った大量の計算を実行するこ とが成功に不可欠であった.また、人間にはほとんど解釈 不能な電子密度マップでも、SHELXEでの主鎖自動トレー スと位相改善を25回反復することで、自動モデリング・ プログラム Buccancer による側鎖のあてはめが可能なマッ プに改良できることを驚きとともに知った.

上述したCuNiRの結晶は,非対称単位に六つの銅原子 を含み,理論上のバイフット比は約1.7%となる.リゾ チームのS-SADと同様にパラメータの網羅的探索を実行 したところ,Cu-SADによる位相決定に成功した.SFX のために開発されたデータ処理プログラムCrystFELバー ジョン0.5.4を用いて,指数がついた15.6万枚の回折画像 からの位相決定を論文報告した<sup>1)</sup>.論文では最低必要枚数 の検討を行わなかったが,実際には指数がついた回折画像 10万枚で十分であった.

S-SADについては、のちにソーマチン<sup>5)</sup> や膜タンパク 質であるA2a受容体<sup>6)</sup> でも成功が報告された. それぞれの 理論上のバイフット比は約2.1%と1.9%であり、指数がつ いた回折画像がそれぞれ12.5万枚、50万枚必要であった. これらの報告により、バイフット比が2%未満の系でも SFXでSAD法による位相決定ができることが確立された. しかし、いずれの場合でも膨大な枚数のデータが必要であ り、サンプルやビームタイムの消耗が著しい. 必要枚数を 減らすには、シグナルを強めるのと、データ処理の質を高 めるという二つの方向で取り組める.

シグナルを強めるアプローチとして,我々は膜タンパク 質の重原子誘導体の新しい調製法を開発した(図3)<sup>7)</sup>.膜 タンパク質の結晶構造では,分子表面に界面活性剤や脂質 分子を認めることが多々ある.そこで,ヨウ素を三つ含む テクニカルノート





重原子試薬I3C, 通称magic triangleをカプリル酸とアミド 結合させた化合物HAD13aを合成した. これをバイセル中 で得られたバクテリオロドプシン微結晶と混合するだけで 結晶の重原子標識が可能であり、7keVでデータ収集した 2.3万枚の指数がついた回折画像から、SAD法で位相決定 することに成功した。非対称単位あたり2分子のHAD13a. つまり六つのヨウ素が結合しており、10.5%という高い バイフット比を得られたのが、少ない枚数での成功につ ながった. 仮にHAD13aを使わず, S-SADをするとする と、バイフット比はわずか0.9%である.次に、HAD13a を含まないネイティブ結晶のデータと組み合わせて, 異 常散乱効果を伴う単一重原子同型置換(SIRAS)法を行っ たところ、ネイティブ3000枚・誘導体4000枚、合計わず か7000枚の指数がついた回折画像から位相決定ができた. さらに、測定したすべての回折画像を用いてSIRASを行 うと、分解能3.3 ÅというSFXでの位相決定における最低 分解能記録で構造解析することもできた. これは同型置換 シグナルと異常散乱シグナルが相補的な位相情報を提供

するためと考えられ、効率のよい位相決定には、ネイティ ブ結晶の併用が効果的であることを確認できた.なお、 HAD13aは、人工的な脂質二重膜である脂質キュービック 相(LCP)の中で結晶化したGタンパク質共役受容体にも 結合でき、異常散乱シグナルを与えることを確認してお り、今後さまざまな膜タンパク質に応用可能と期待して いる.このほか我々は、水溶性タンパク質で水銀<sup>8)</sup>やプラ セオジム<sup>9)</sup>などの重原子を用いた位相決定にも成功してい る.

SFXのデータ処理法には、まだ改善の余地がある. CrystFEL付属のpartialatorというソフトでスケーリングで きるようになりつつあるが、温度因子(B factor)が発散 するデータセットも散見され、万全とはいいがたい、結晶 品質にバラつきがある場合の処理も問題である。一定の分 解能に達しない結晶を棄却したり(min-resオプションを 使用)、結晶ごとにマージに使う分解能を変えたり(pushresオプション)するとデータの質がよくなることがある。 一番の課題は部分度である.post-refinementによる部分度 の補正はいくつか報告されており<sup>10,11)</sup>, BinABタンパク 質の, 複数の誘導体と異常散乱効果を用いたMIRAS法に よる位相決定<sup>12)</sup>でも用いられたが, 筆者らの経験では, データセットによって効果は異なり, かえって悪化する ことも多い. 我々のCuNiRの系では, CrystFELの(執筆 時点での)最新バージョン0.6.2を使うことで,必要な枚 数を10万枚から8万枚に減らすことができている. また, post-refinementによってさらに枚数を削減することに成功 しており, 論文報告を準備中である.

# 4. おわりに

SFXを応用すると、タンパク質が働く際の構造変化を ムービーのように捉えることができる(時分割解析). こ れまでに我々は、バクテリオロドプシンや光化学系など の膜タンパク質でその技術を実証することに成功してい る<sup>13,14)</sup>.時分割解析には、上述の実験的位相決定において 経験したSFXで微小な違いを正確に検出する手法の開発 が活かされている.構造生物学は、タンパク質の静止構造 から動的構造を解明するダイナミクス研究の新時代に入っ たといえよう.

なお、本稿で紹介した研究は、文部科学省X線自由電子 レーザー重点戦略研究課題「創薬ターゲット蛋白質の迅速 構造解析法の開発」、JST-ERATO「村田脂質活性構造プロ ジェクト」、および、JSPS科研費15K18487の支援を受け て実施した.計算解析はSACLA HPCシステムおよびミニ 京スーパーコンピュータシステムを利用して実行した.関 係各位に深く感謝したい.

#### 文 献

- Fukuda, Y., Tse, K.M., 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, M.E., Inoue, T., Iwata, S., & Mizohata, E. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 2928– 2933.
- Fukuda, Y., Tse, K.M., Suzuki, M., Diederichs, K., Hirata, K., Nakane, T., Sugahara, M., Nango, E., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Song, C., Hatsui, T., Yabashi, M., Nureki, O., Matsumura, H., Inoue, T., Iwata, S., & Mizohata, E. (2016) *J. Biochem.*, **159**, 527–538.
- Barends, T.R., Foucar, L., Botha, S., Doak, R.B., Shoeman, R.L., Nass, K., Koglin, J.E., Williams, G.J., Boutet, S., Messerschmidt, M., & Schlichting, I. (2014) *Nature*, 505, 244–247.
- 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. (2015) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 2519–2525.
- 5) Nass, K., Meinhart, A., Barends, T.R., Foucar, L., Gorel, A., Aq-

uila, A., Botha, S., Doak, R.B., Koglin, J., Liang, M., Shoeman, R.L., Williams, G., Boutet, S., & Schlichting, I. (2016) *IUCrJ*, **3**, 180–191.

- 6) Batyuk, A., Galli, L., Ishchenko, A., Han, G.W., Gati, C., Popov, P.A., Lee, M.Y., Stauch, B., White, T.A., Barty, A., Aquila, A., Hunter, M.S., Liang, M., Boutet, S., Pu, M., Liu, Z.J., Nelson, G., James, D., Li, C., Zhao, Y., Spence, J.C., Liu, W., Fromme, P., Katritch, V., Weierstall, U., Stevens, R.C., & Cherezov, V. (2016) *Sci. Adv.*, 2, e1600292.
- Nakane, T., Hanashima, S., Suzuki, M., Saiki, H., Hayashi, T., Kakinouchi, K., Sugiyama, S., Kawatake, S., Matsuoka, S., Matsumori, N., Nango, E., Kobayashi, J., Shimamura, T., Kimura, K., Mori, C., Kunishima, N., Sugahara, M., Takakyu, Y., Inoue, S., Masuda, T., Hosaka, T., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Hatsui, T., Yabashi, M., Inoue, T., Nureki, O., Iwata, S., Murata, M., & Mizohata, E. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 13039–13044.
- 8) 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. (2015) *Sci. Rep.*, **5**, 14017.
- Sugahara, M., Nakane, T., Masuda, T., Suzuki, M., Inoue, S., Song, C., Tanaka, R., Nakatsu, T., Mizohata, E., Yumoto, F., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Hatsui, T., Yabashi, M., Nureki, O., Numata, K., Nango, E., & Iwata, E. (2017) *Sci. Rep.*, in press.
- Ginn, H.M., Brewster, A.S., Hattne, J., Evans, G., Wagner, A., Grimes, J.M., Sauter, N.K., Sutton, G., & Stuart, D.I. (2015) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 1400–1410.
- Uervirojnangkoorn, M., Zeldin, O.B., Lyubimov, A.Y., Hattne, J., Brewster, A.S., Sauter, N.K., Brunger, A.T., & Weis, W.I. (2015) *eLife*, 4, e05421.
- Colletier, J.P., Sawaya, M.R., Gingery, M., Rodriguez, J.A., Cascio, D., Brewster, A.S., Michels-Clark, T., Hice, R.H., Coquelle, N., Boutet, S., Williams, G.J., Messerschmidt, M., DePonte, D.P., Sierra, R.G., Laksmono, H., Koglin, J.E., Hunter, M.S., Park, H.W., Uervirojnangkoorn, M., Bideshi, D.K., Brunger, A.T., Federici, B.A., Sauter, N.K., & Eisenberg, D.S. (2016) *Nature*, 539, 43–47.
- 13) Nango, E., Royant, A., Kubo, M., Nakane, T., Wickstrand, C., Kimura, T., Tanaka, T., Tono, K., Song, C., Tanaka, R., Arima, T., Yamashita, A., Kobayashi, J., Hosaka, T., Mizohata, E., Nogly, P., Sugahara, M., Nam, D., Nomura, T., Shimamura, T., Im, D., Fujiwara, T., Yamanaka, Y., Jeon, B., Nishizawa, T., Oda, K., Fukuda, M., Andersson, R., Båth, P., Dods, R., Davidsson, J., Matsuoka, S., Kawatake, S., Murata, M., Nureki, O., Owada, S., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Schertler, G., Yabashi, M., Bondar, A.N., Standfuss, J., Neutze, R., & Iwata, S. (2016) *Science*, **354**, 1552–1557.
- 14) Suga, M., Akita, F., Sugahara, M., Kubo, M., Nakajima, Y., Nakane, T., Yamashita, K., Umena, Y., Nakabayashi, M., Yamane, T., Nakano, T., Suzuki, M., Masuda, T., Inoue, S., Kimura, T., Nomura, T., Yonekura, S., Yu, L.J., Sakamoto, T., Motomura, T., Chen, J.H., Kato, Y., Noguchi, T., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Hatsui, T., Nango, E., Tanaka, R., Naitow, H., Matsuura, Y., Yamashita, A., Yamamoto, M., Nureki, O., Yabashi, M., Ishikawa, T., Iwata, S., & Shen, J.R. (2017) *Nature*, 543, 131–135.

# テクニカルノート

### 著者寸描 📃

#### ●中根 崇智(なかね たかのり)



東京大学大学院理学系研究科特任助教. M.D., Ph.D.

■略歴 1985年岐阜県生まれ.2010年京 都大学医学部卒業.同大学院医学研究科 博士課程在籍中,ケンブリッジ大学(英 国)にてComputational Biology MPhilを取 得.14年より東京大学特任研究員,17年 より現職.

■研究テーマ X線回折や電子顕微鏡 データの解析. プログラムのソースコードや実験の生データを 誰でも自由に利用できるオープン・サイエンスの推進. ■ウェブサイト https://github.com/biochem-fan/ ■趣味 オープンソース・ソフトウェア開発.

●岩田 想(いわた そう)



京都大学大学院医学研究科教授.理化学 研究所放射光科学総合研究センター SACLA利用技術開拓グループグループ ディレクター.博士(農学). ■略歴 1963年兵庫県生まれ.91年東京

大学大学院農学系研究科博士課程修了. 96年ウプサラ大学(スウェーデン)生化 学科講師,99年同大学教授.2000年より 英国インペリアルカレッジ生命科学科教

授(~15年).07年より京都大学教授,12年より理化学研究所 グループディレクターを併任.

■研究テーマ X線結晶学, 膜タンパク質構造生物学.

■ウェブサイト http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/ ■趣味 サイクリング.

## ●溝端 栄一(みぞはた えいいち)

大阪大学大学院工学研究科講師. 博士(工学).

■略歴 1975年東京都生まれ.2003年大 阪大学大学院工学研究科博士課程修了, 同年,理化学研究所横浜研究所リサーチ アソシエイト.06年英国インペリアル カレッジロンドン・リサーチアソシエイ ト,07年よりダイヤモンドライトソース 協力研究員を兼任.09年大阪大学助教,

15年より現職.

■研究テーマ XFELによるタンパク質構造解析,次世代抗体 医薬開発.

■ウェブサイト http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?u=2561 ■趣味 観劇, 植物観賞.