

X線自由電子レーザーを利用したタンパク質構造決定法の研究（抜粋）

2012年のX線自由電子レーザー（XFEL）施設 SACLA の供用以来、文科省重点課題「創薬ターゲット蛋白質の迅速構造解析法の開発」（代表者：岩田想 教授）等に参加し、シリアルフェムト秒結晶構造解析（SFX）の研究を推進（*Biophys Rev* 2018）。成果は共著を含む国際誌17報、国内誌10報の論文に発表しています。

1.1. SFX のデータ測定システムの開発

SFX の汎用データ収集システムの開発に従事。特に、タンパク質試料の消費量の低減化に著しく貢献しました。当初1つ構造を解くのに1gもの試料を要したが、高粘性媒体を用いる手法を提案し、1mgに減らすことに成功（*Nat Methods* 2015）。本手法は世界のスタンダードとなり、バクテリオロドプシン等の動的構造解析の協同成果（*Science* 2016）に活かされました。

1.2. SFX による実験的位相決定法の開発

当初、SFX で新規構造を決定する手法が確立されていない中、この課題に挑み、膜タンパク質を効率的に構造決定する技術開発に成功（*PNAS* 2016a; 特許第6579560号等）（図4）。

水溶性タンパク質でも、硫黄（*Acta Crystal D* 2015）、水銀（*Sci Rep* 2015）、銅（*PNAS* 2016b）、プラセオジウム（*Sci Rep* 2017）、セレン（*IUCrJ* 2017）を用い構造決定に成功しました。

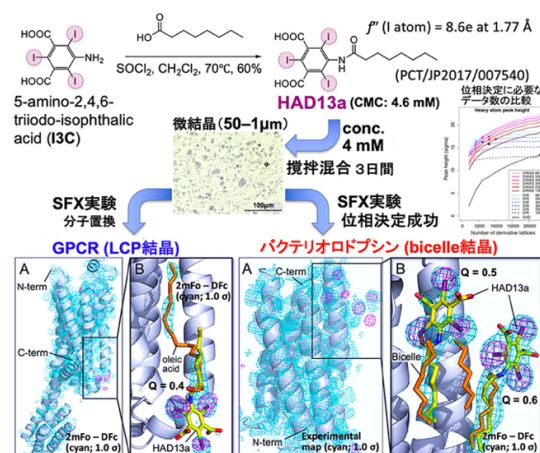
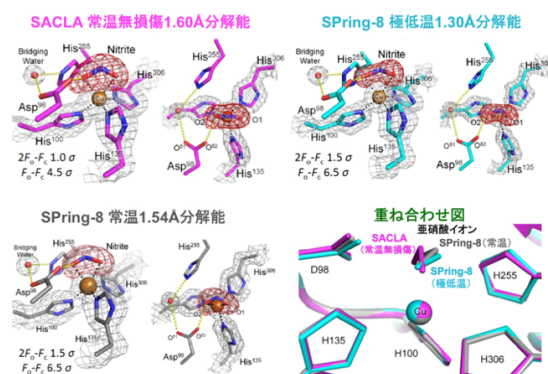


図4. 膜タンパク質の構造をヨウ素界面活性剤とSFXを用いて効率的に決定する技術を開発。

2.3. 金属酵素の常温・無損傷構造化学

銅含有亜硝酸還元酵素は、従来の放射光を用いた解析（SRX）ではX線が銅中心を還元して構造が変わる現象（光還元）が避けられません。今回、SFX で光還元を回避した真の酸化型構造の常温観察に成功しました（*J Biochem* 2016）。一方、光還元で酵素反応を誘起させたSRX構造を決定。SFX の構造と比較し、反応中の銅原子の還元に依存した構造変化を可視化しました（図5、6；*PNAS* 2016b）。





大阪大学
OSAKA UNIVERSITY

2025年8月1日

第83回 放射線科学研究会
大阪ニュークリアサイエンス協会賞講演会

X線自由電子レーザーを利用した タンパク質構造決定法の研究 (抜粋)

大阪大学大学院工学研究科
応用化学専攻
溝端 栄一

各種インジェクターの開発

2

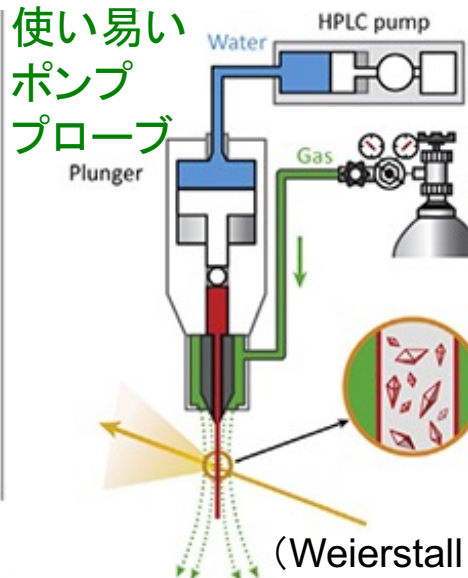
液体ジェット

試料消費量: 500~100 mg

詰まりやすく不安定、ポンププローブ
(Deponte et al. J Phys D, 2008)

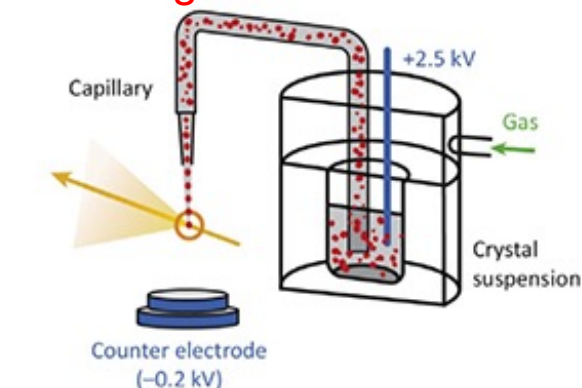
高粘性試料型 1 mg

使い易い
ポンプ
プローブ



エレクトロスピンニング

5~1 mg 詰まりやすい



(Sierra et al. Nat Methods, 2016)

循環ジェット

100~20 mg

壊れる結晶もある

(Tono et al. J Synchrotron Radiat, 2015)

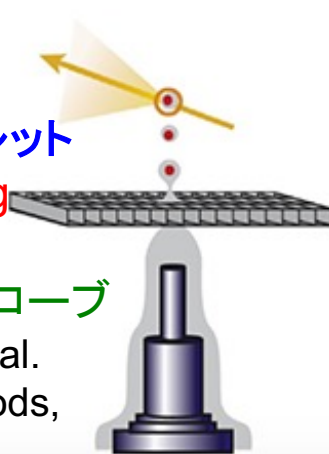


ドロップレット

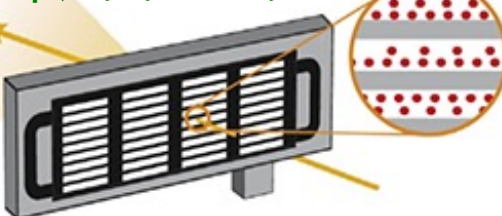
1mg~μg

ポンププローブ

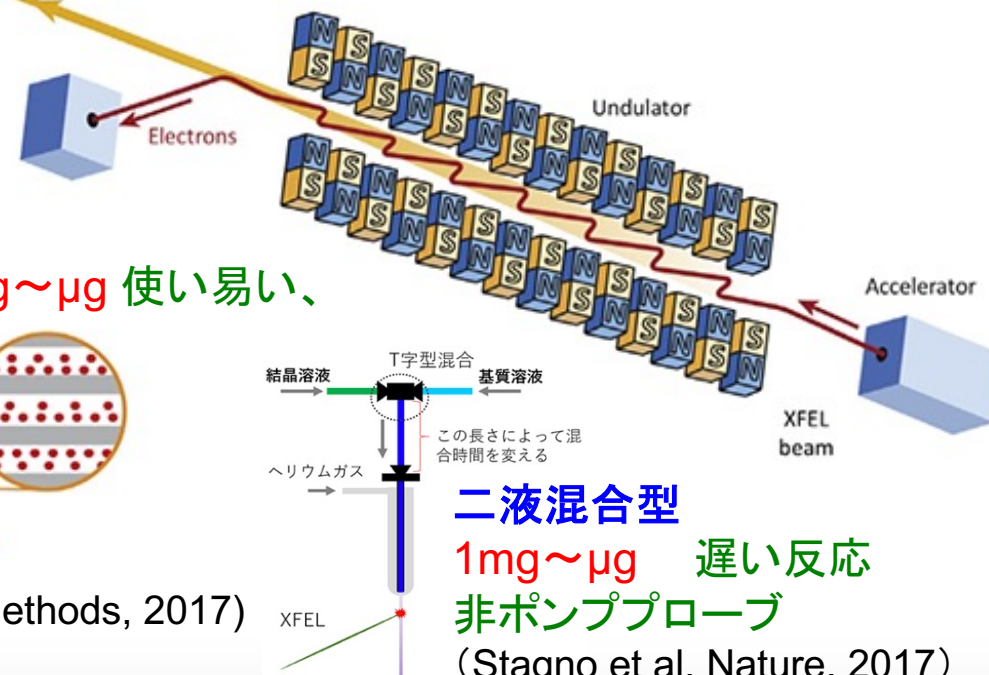
(Fuller et al. Nat Methods, 2017)



Fixed target 1mg~μg 使い易い、
ポンププローブ



(Halsted et al. Nat Methods, 2017)



二液混合型

1mg~μg 遅い反応

非ポンププローブ

(Stagno et al. Nature, 2017)

混ぜることで微結晶試料を高粘度(ゲル化)し、ストリームの流速を下げる物質を探索

高粘性ポリマー



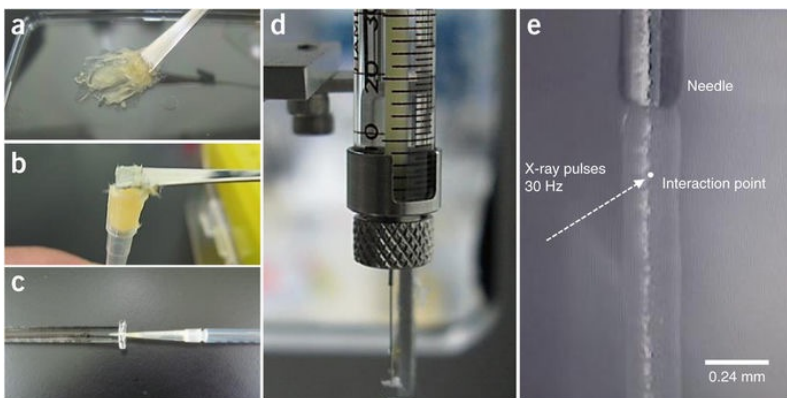
グリース



アガロースゲル



その他、ヒアルロン酸、セルロースetc.

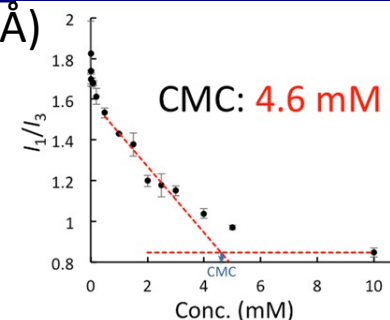
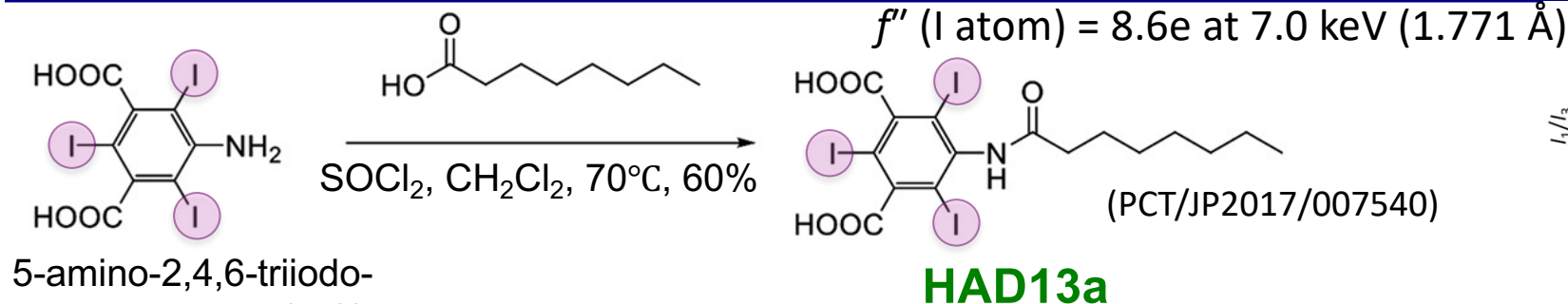


- ・水溶性タンパク質試料の節約と解析の加速化
- ・時分割SFXの高精度化

(Sugahara, Mizohata et al. *Nature Methods*, 2015)

膜タンパク質をヨウ素界面活性剤で標識して迅速構造決定

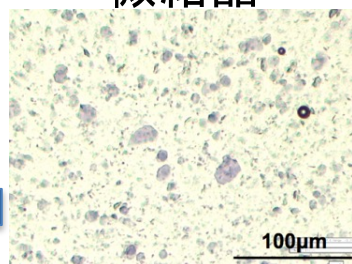
4



SACLAでbRを測定

実験的位相決定に成功

微結晶



conc. 4 mM

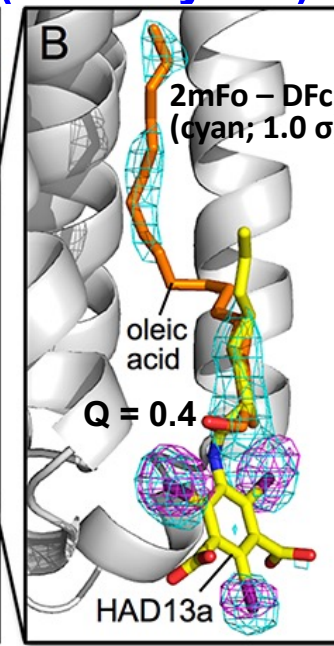
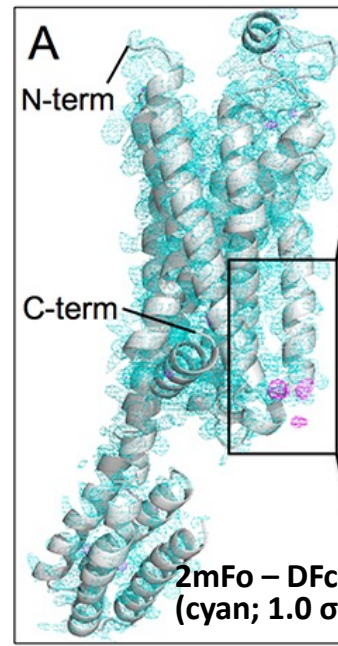
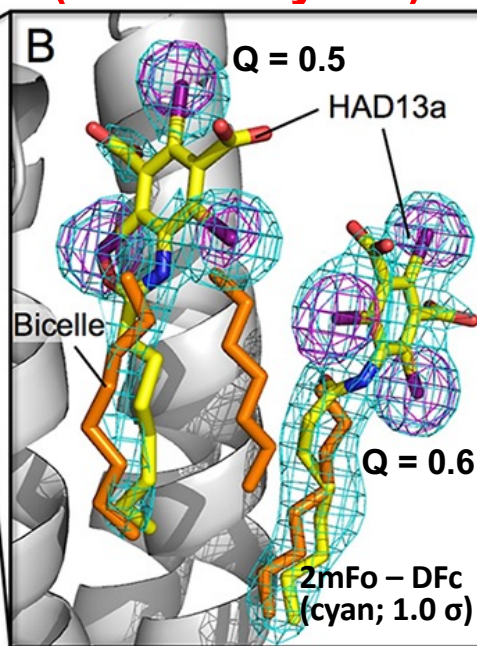
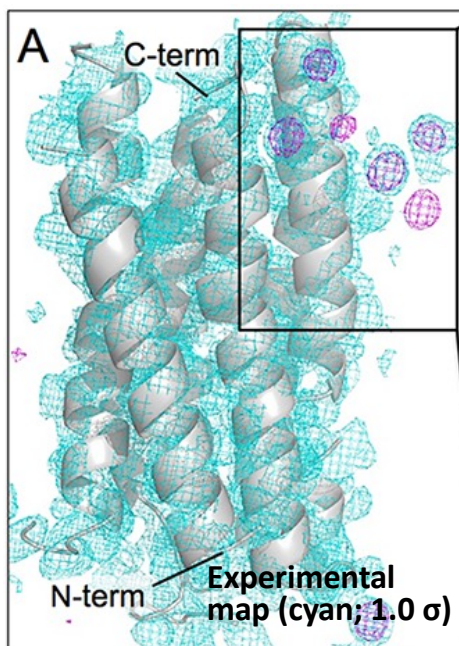
Mix and stir for 3 days

4 mM I3C or BaCl₂はbRに結合せず.
20 mM NaIは結合したが、HAD13aよりもはるかに低い親和性.

SACLAでA2A GPCRを測定
分子置換法で位相決定

バクテリオロドプシン (bicelle crystal)

A2A GPCR (LCP crystal)



(Nakane et al & Mizohata* PNAS, 2016)

紫のメッシュ:
異常散乱マップ
(I原子の位置)

SADは23,347枚のイメージで分解能2.1 Åで成功.

SIR/SIRASはわずか3,000枚 (native) と 4,000枚 (derivative)のイメージで成功.

全てのイメージを使えば、**SIRAS**は分解能**3.3 Å**の低分解能でも可能.

異常散乱元素	Gd	Hg	S/Cl	Cu	Se	S	Pr	Hg/Gd/I	S	I
水溶性／膜タンパク質	水溶性タンパク質								膜タンパク質	
タンパク質名	lysozyme	LRE	lysozyme	CuNiR	strept- avidin	thaumatin	proteinase K	BinAB	A2A GPCR	bR
空間群	$P4_32_12$	$P2_12_12_1$	$P4_32_12$	$P2_12_12_1$	$P2_1$	$P4_12_12$	$P4_32_12$	$P2_12_12_1$	$C222_1$	$C222_1$
位相決定に必要な最低イメージ数	60,000	18,000	150,000	155,588	300,000	125,000	3,000	398,971	500,000	7,000
位相決定に必要な最低分解能	1.8 Å	1.7 Å	2.3 Å	1.9 Å	1.9 Å	2.9 Å	2.0 Å	2.25 Å	2.5 Å	3.3 Å
位相決定法	SAD	SIR	SAD	SAD	SAD	SAD	SAD	MIRAS	SAD	SIR/SIRAS

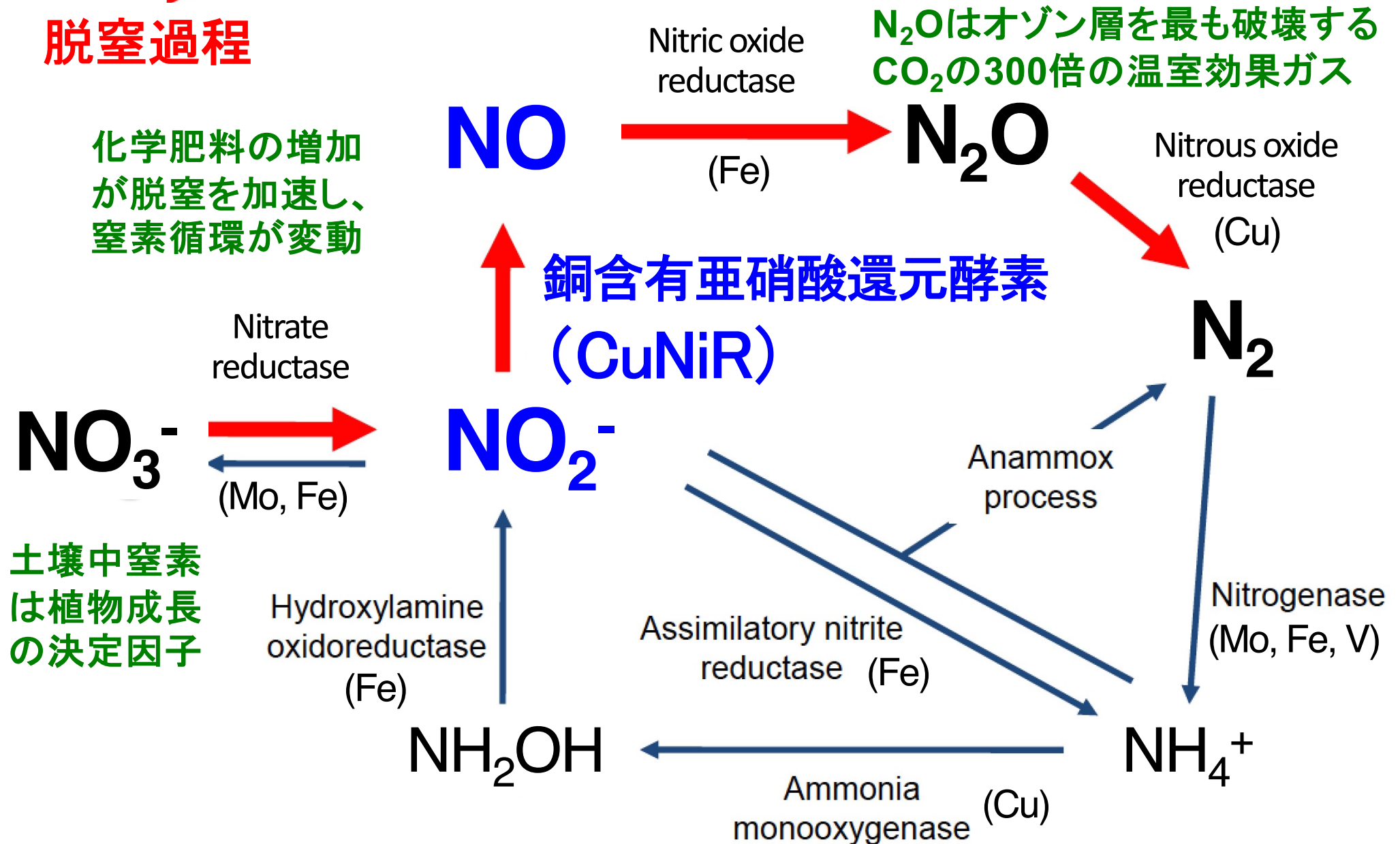
(Nakane et al & Mizohata* *PNAS*, 2016)

微生物の金属酵素群が担う地球上の窒素循環

7

酵素反応の理解が窒素循環の制御や環境保全のために重要！

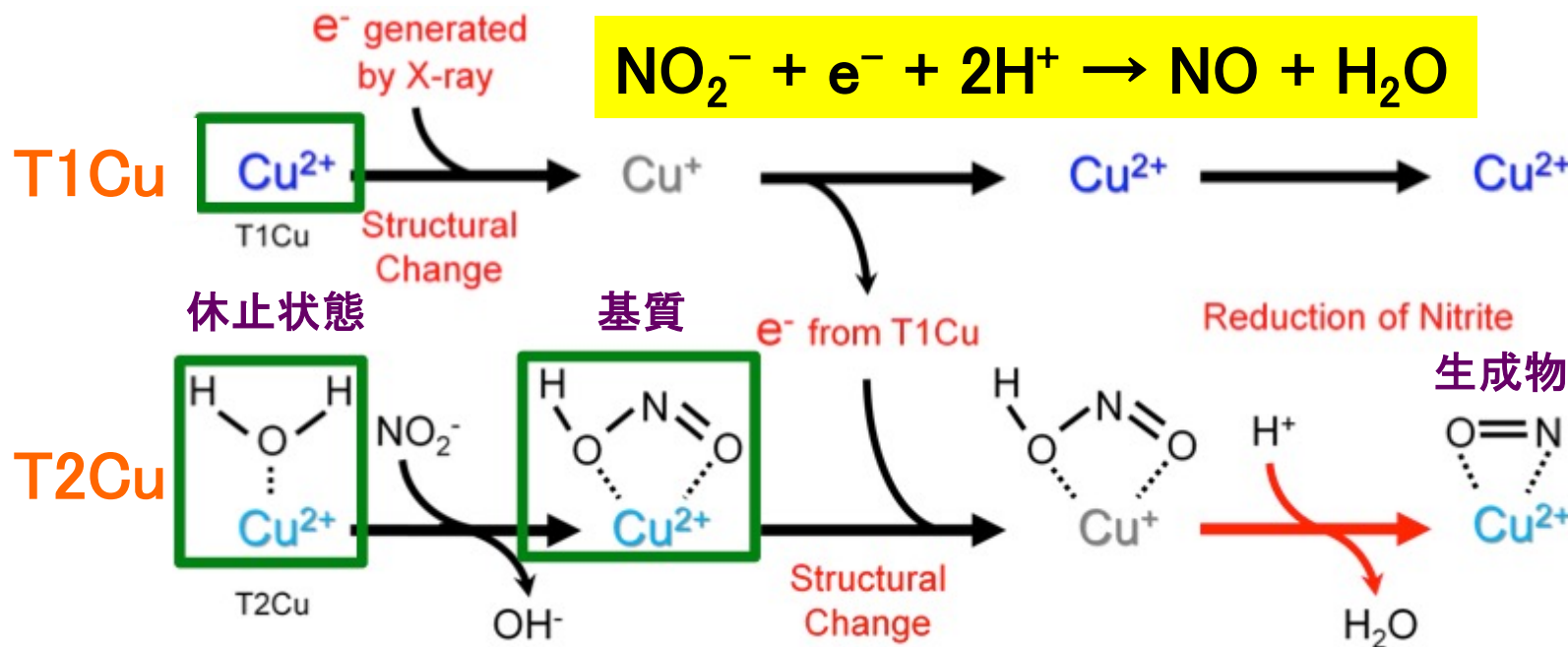
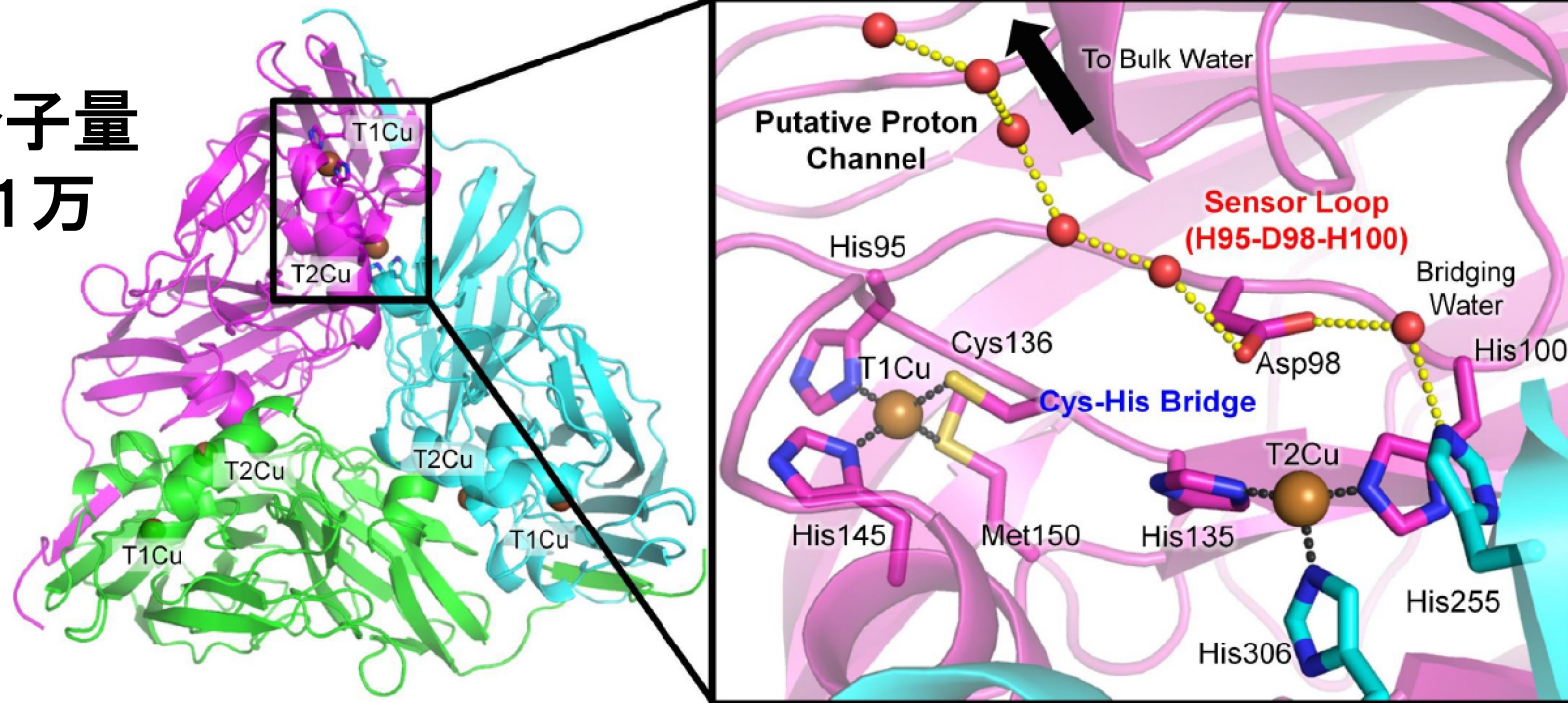
脱窒過程



CuNiRの触媒反応 ～プロトン共役電子移動～

8

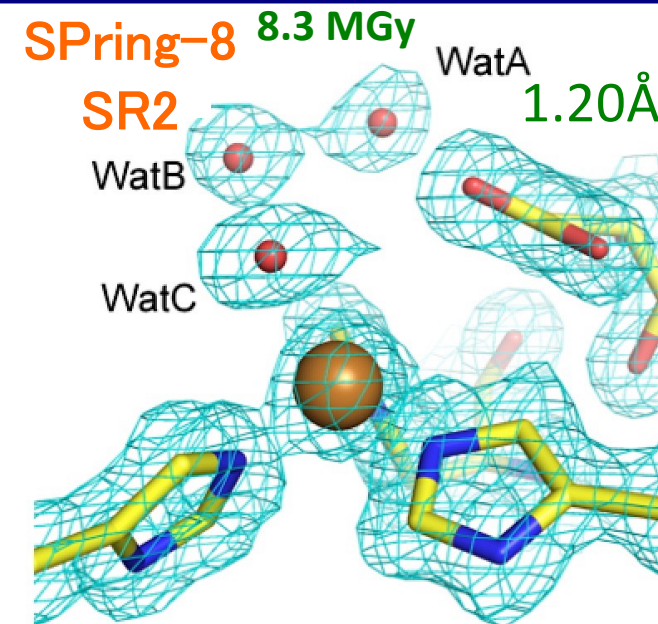
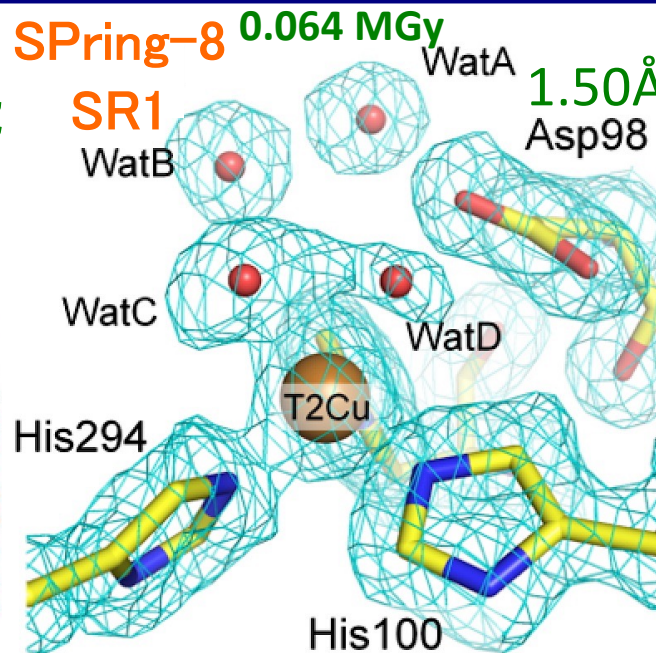
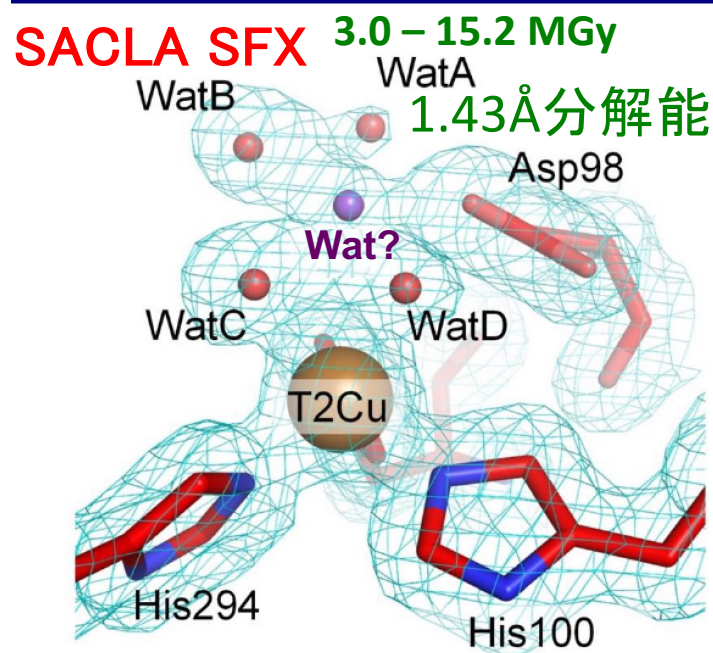
分子量
11万



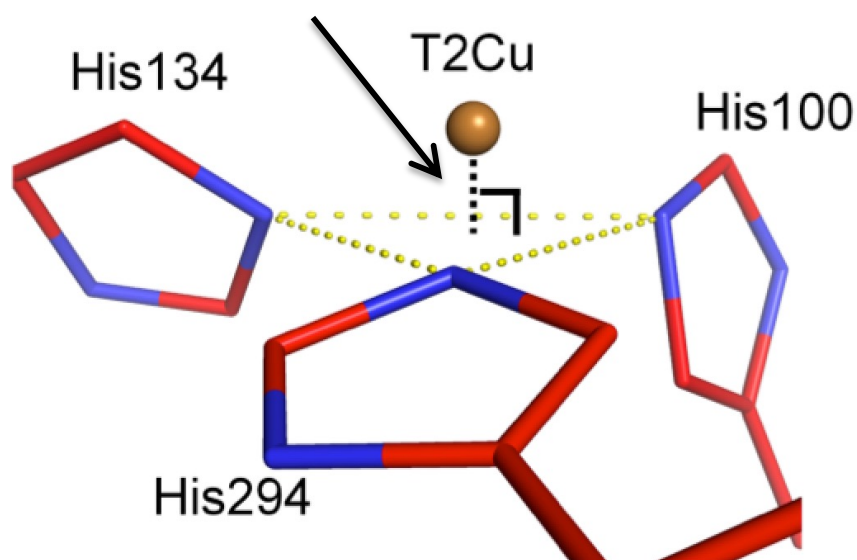
放射光X線では光還元で反応が進行し、完全酸化型構造が見えない

休止状態の活性部位の構造

9

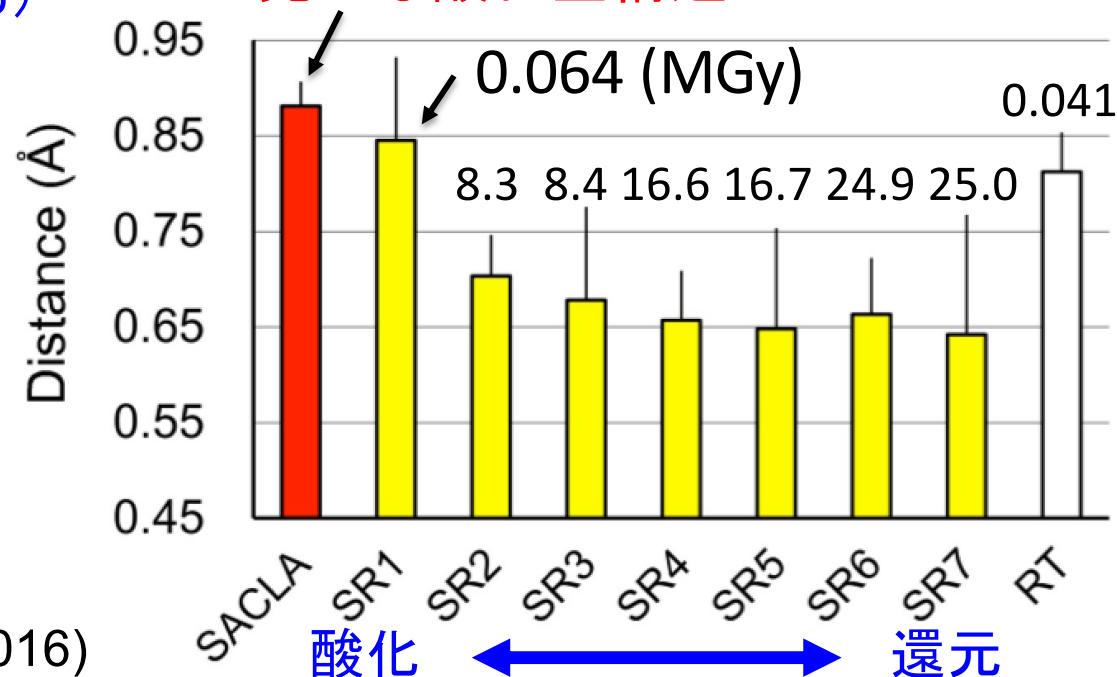


レドックス状態を反映(還元で短くなる)



(Fukuda et al & Mizohata* *J Biochem*, 2016)

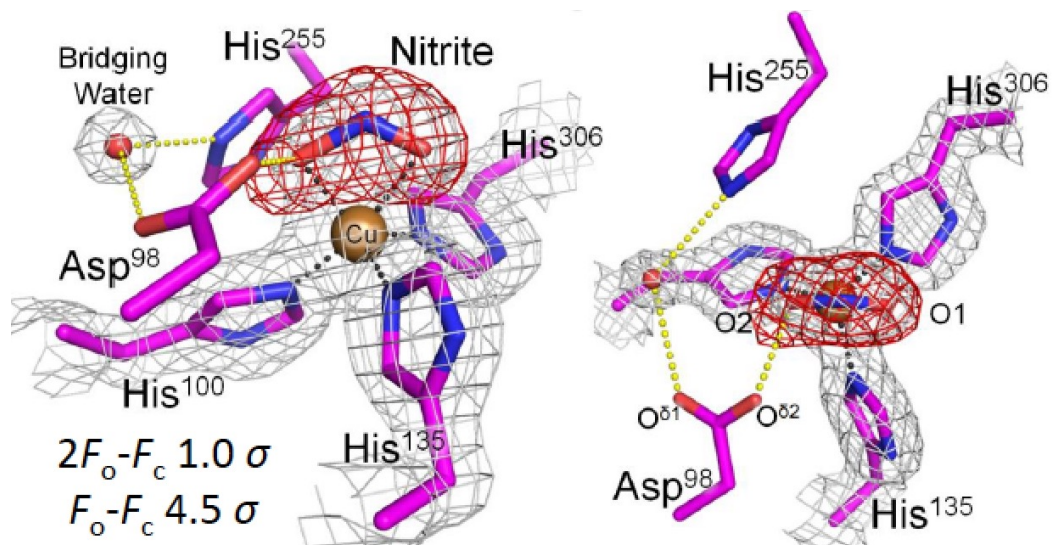
完全な酸化型構造



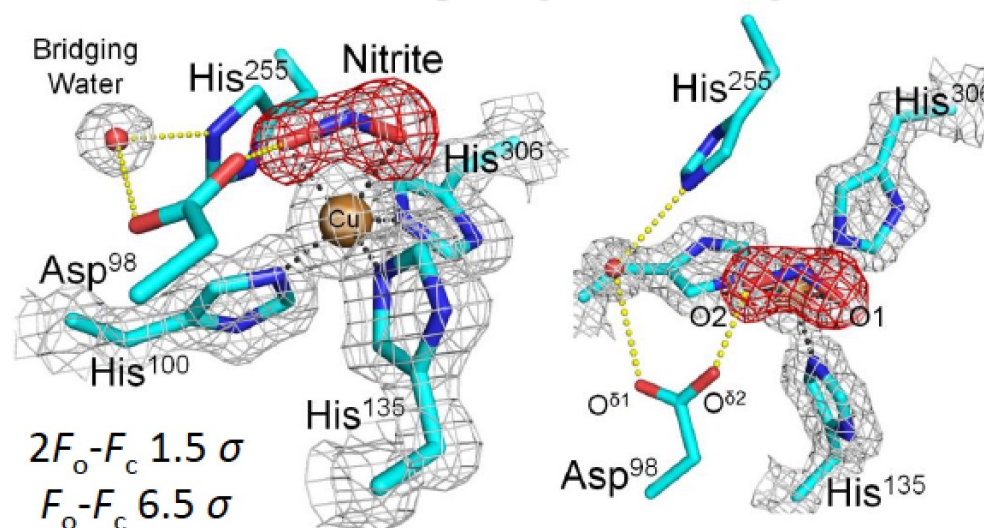
亜硝酸イオン(NO_2^-)の結合様式の比較

10

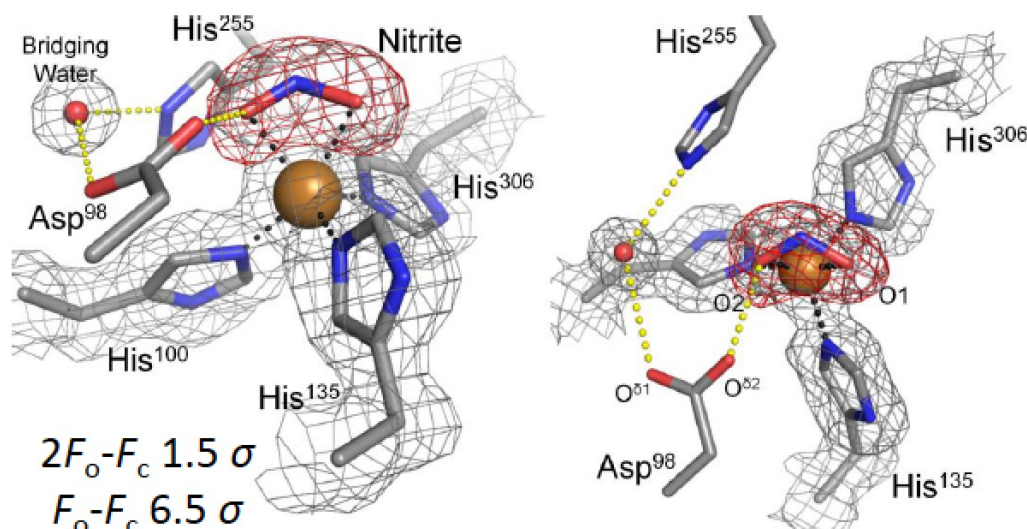
SACLA 常温無損傷1.60 Å分解能



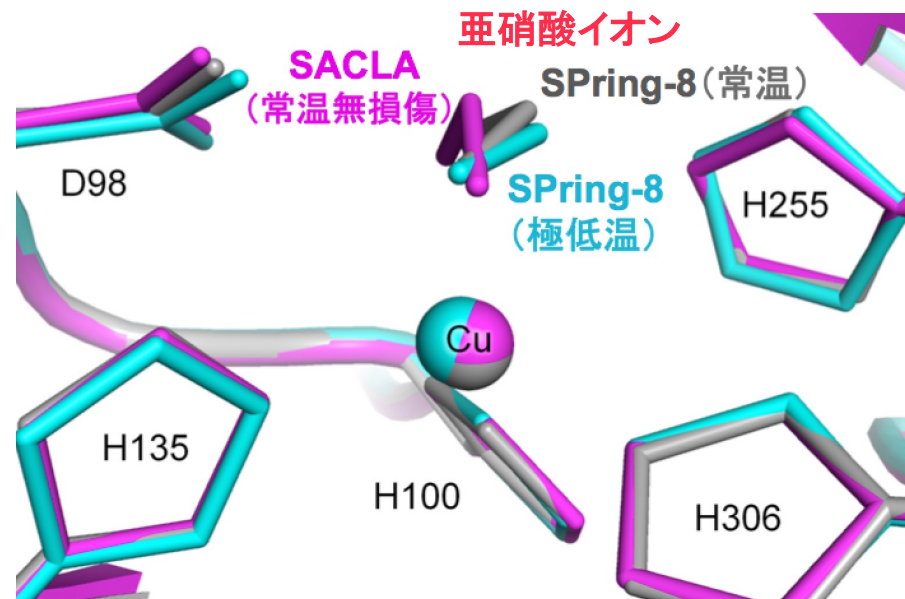
SPring-8 極低温1.3 Å分解能



SPring-8 常温1.54 Å分解能



重ね合わせた図



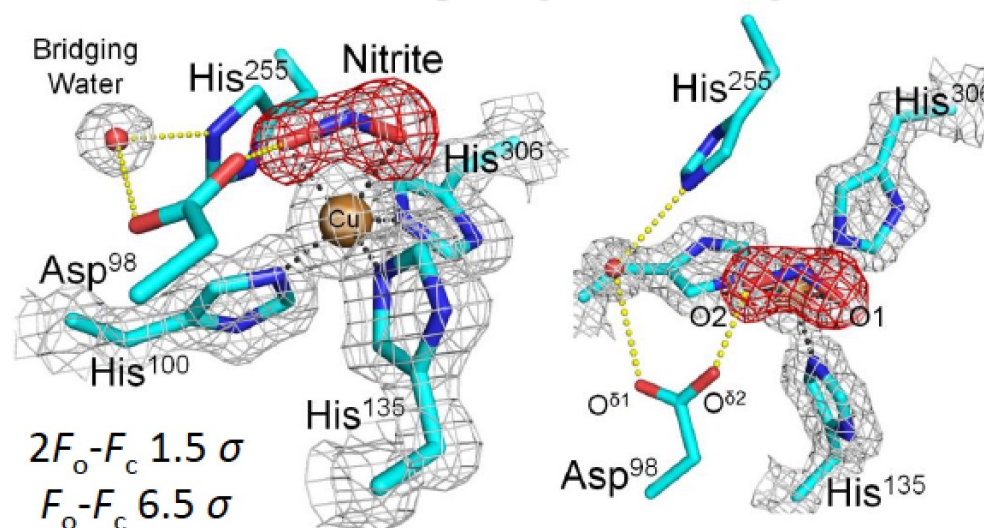
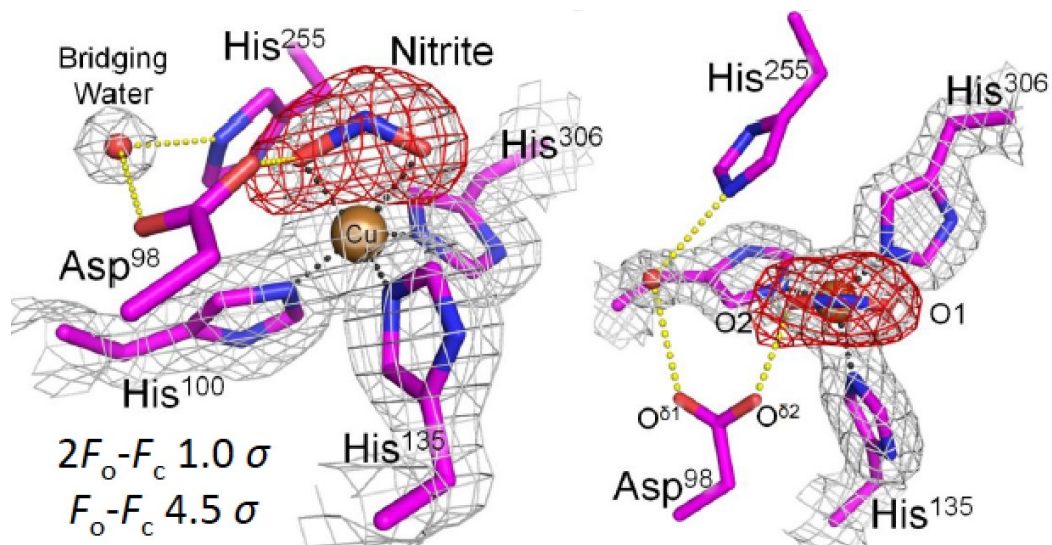
(Fukuda et al & Mizohata* *PNAS*, 2016)

亜硝酸イオン(NO_2^-)の結合様式の比較

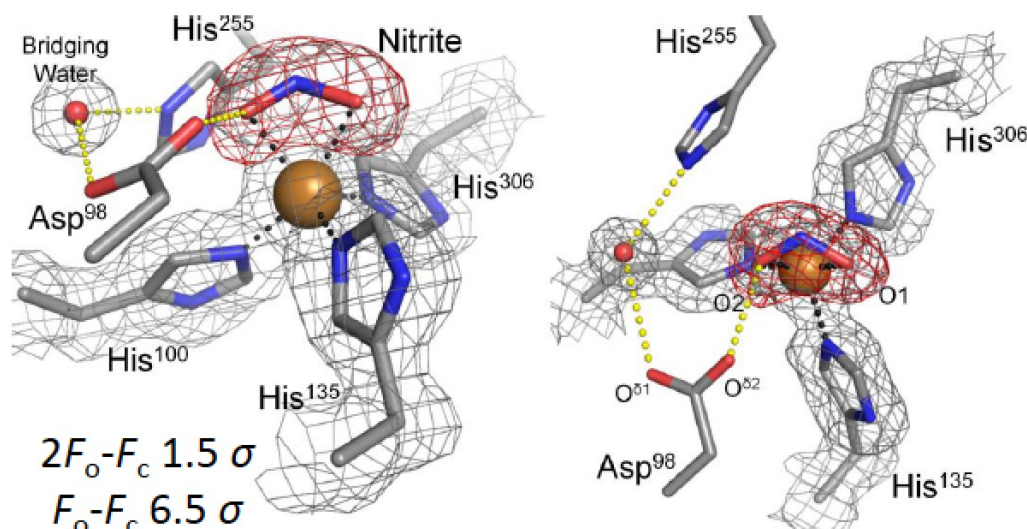
11

SACLA 常温無損傷1.60 Å分解能

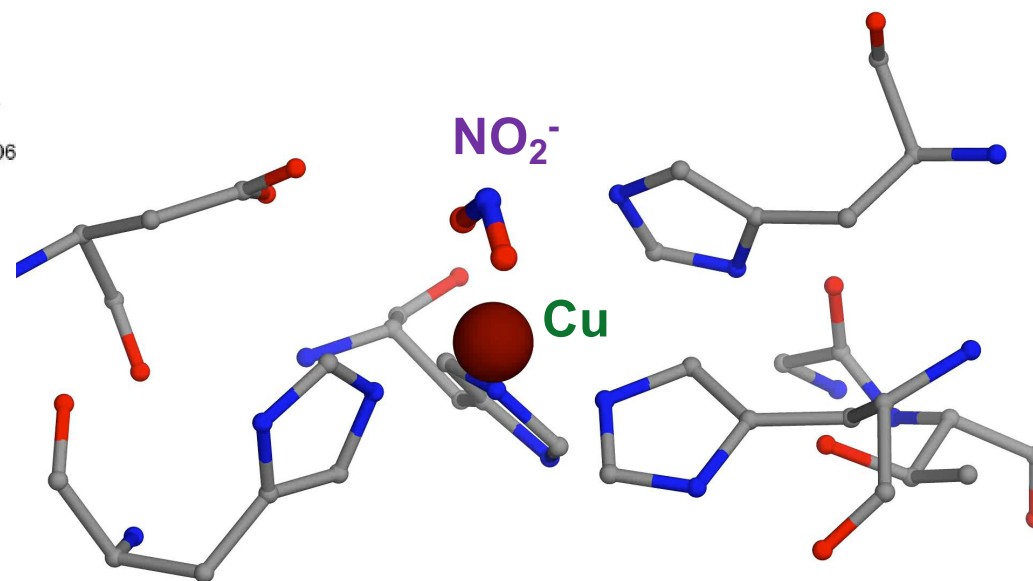
SPring-8 極低温1.3 Å分解能



SPring-8 常温1.54 Å分解能



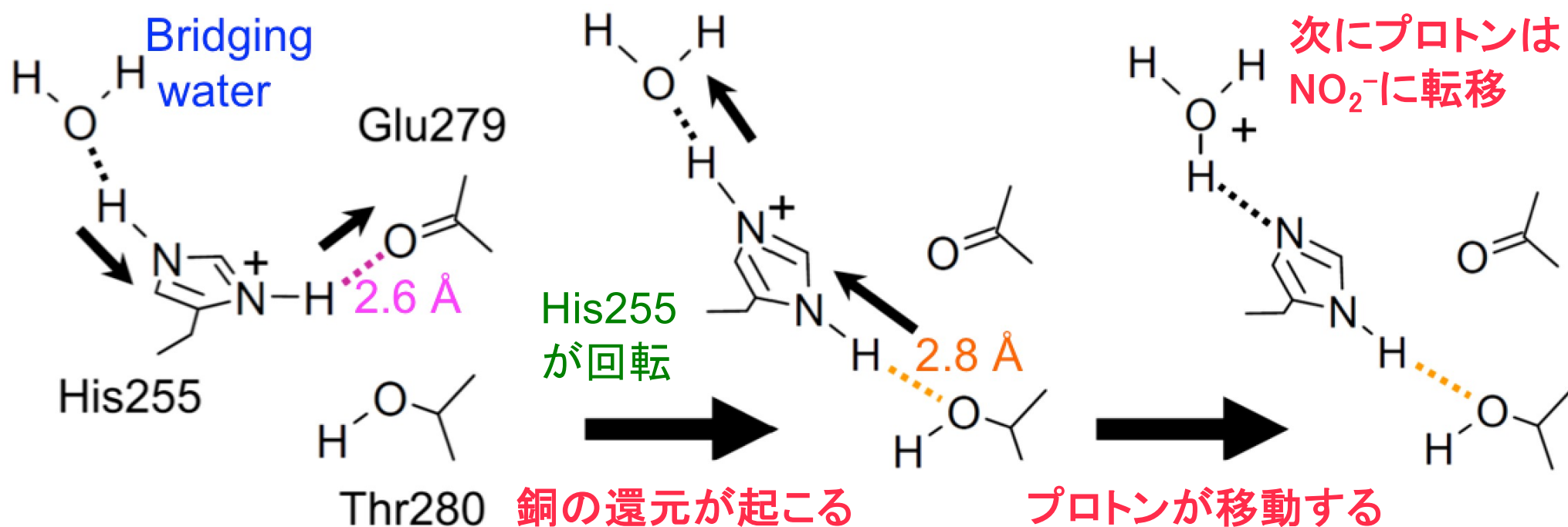
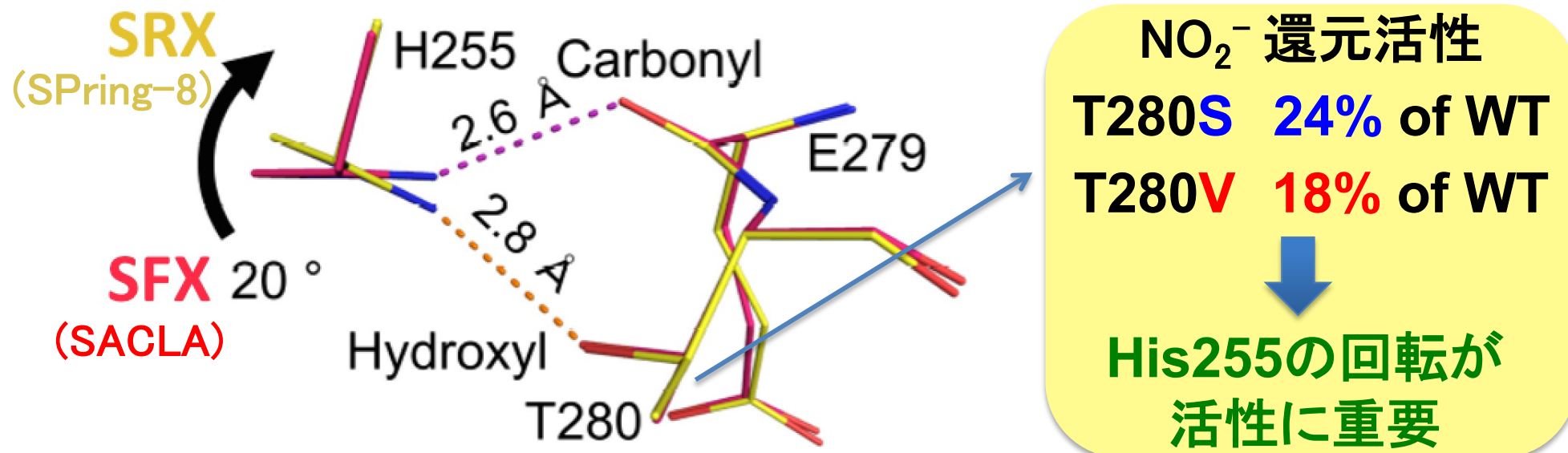
重ね合わせた図



(Fukuda et al & Mizohata* *PNAS*, 2016)

X線光還元にもなうHis255の回転と反応機構

12



(Fukuda et al & Mizohata* *PNAS*, 2016)