

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)等に参画し、シリアルフレー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発案し、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)、プラセオジム(*Sci Rep* 2017)、セレン(*IUCrJ* 2017)用い構造決定に成功しました。

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)。

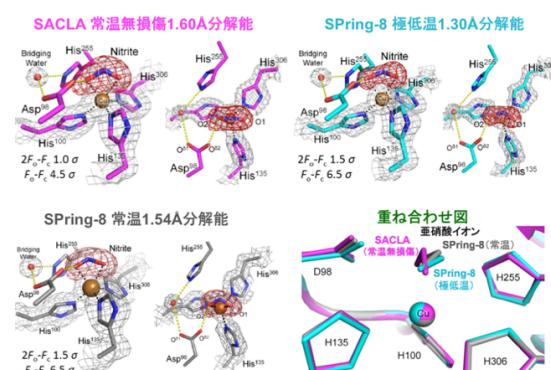


図5. 基質(NO_2^-)とCuNiRの複合体構造。SACLAにてSFX、SPRING-8で極低温SRXおよび常温SRXで解いた構造について、銅活性中心を描いている。

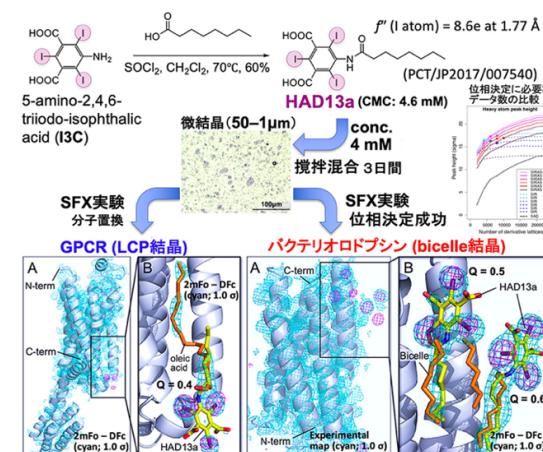


図4. 膜タンパク質の構造をヨウ素界面活性剤とSFXを用いて効率的に決定する技術を開発。

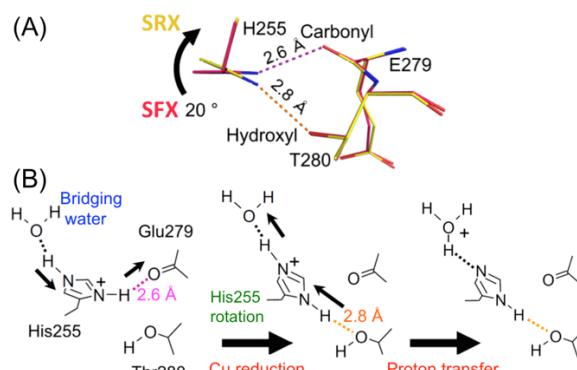


図6. レドックス依存的なHis255の回転とプロトン転移。(A)水素結合パートナーのスイッチング。(B)新しく提案したプロトン転移機構。



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

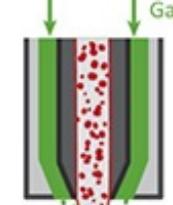
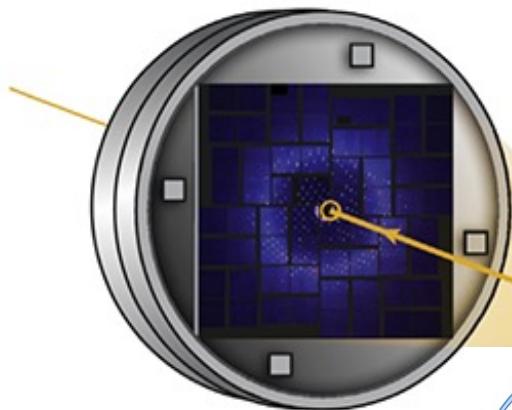
各種インジェクターの開発

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)



循環ジェット

100~20 mg

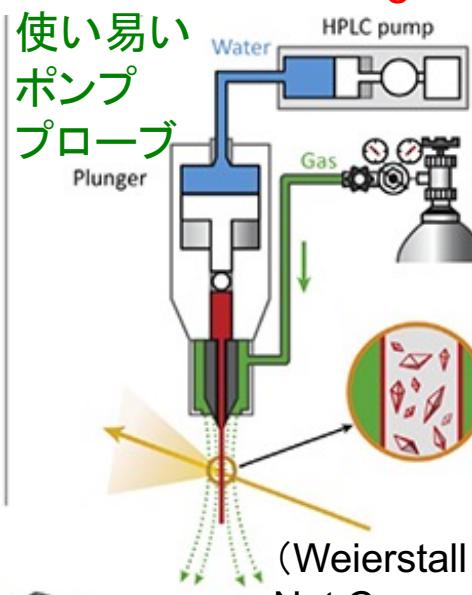
壊れる結晶もある

(Tono et al. J Synchrotron Radiat, 2015)



高粘性試料型 1 mg

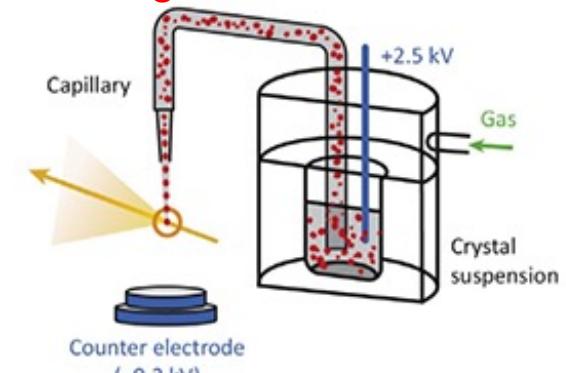
使い易い
ポンプ
プローブ



(Weierstall et al.
Nat Commun, 2014)

エレクトロスピンニング

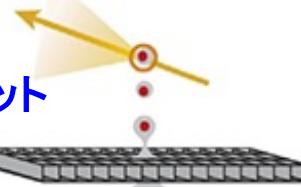
5~1 mg 詰まりやすい



(Sierra et al. Nat Methods, 2016)

ドロップレット

1mg~ μ g

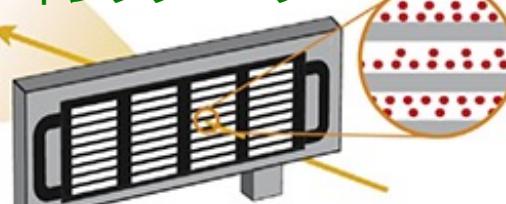


ポンププローブ

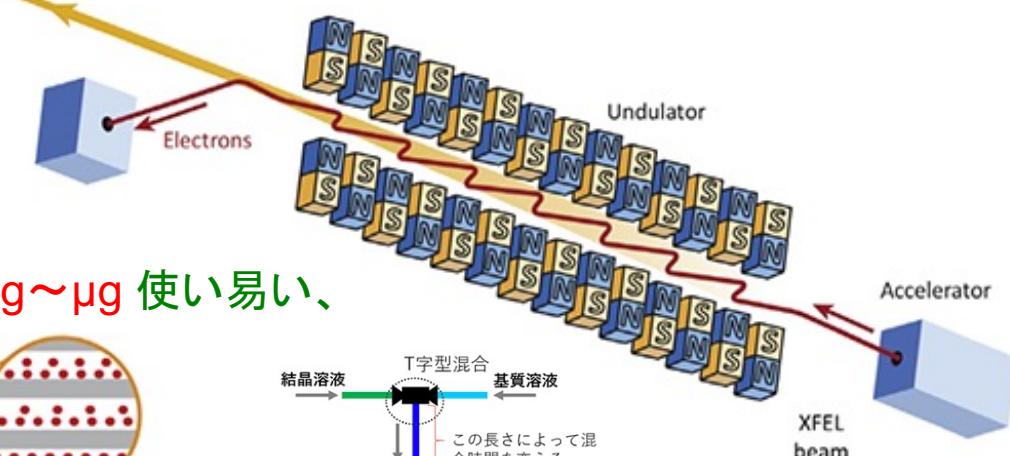
(Fuller et al.
Nat Methods,
2017)



Fixed target 1mg~ μ g 使い易い、 ポンププローブ



(Halsted et al. Nat Methods, 2017)



結晶溶液 → T字型混合 基質溶液
ヘリウムガス

この長さによって混
合時間を変え
る

二液混合型
1mg~ μ g 遅い反応
非ポンププローブ
(Stagno et al. Nature, 2017)

試料消費量の低減や測定の安定化

3

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



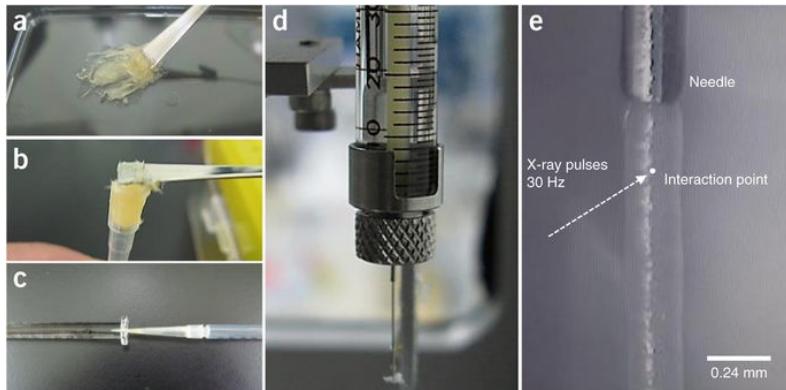
グリース



アガロースゲル



その他、ヒアルロン酸、セルロースetc.



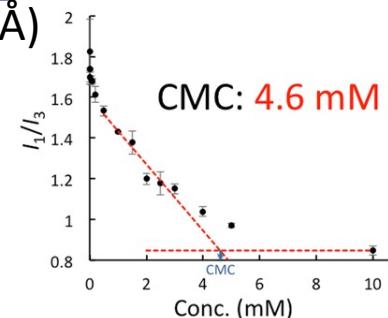
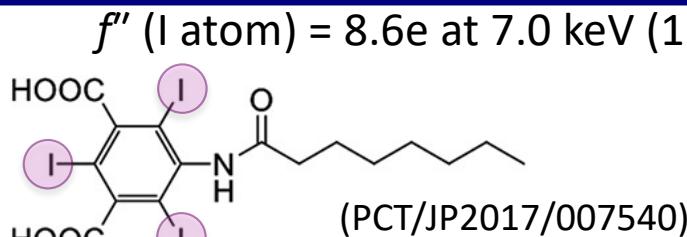
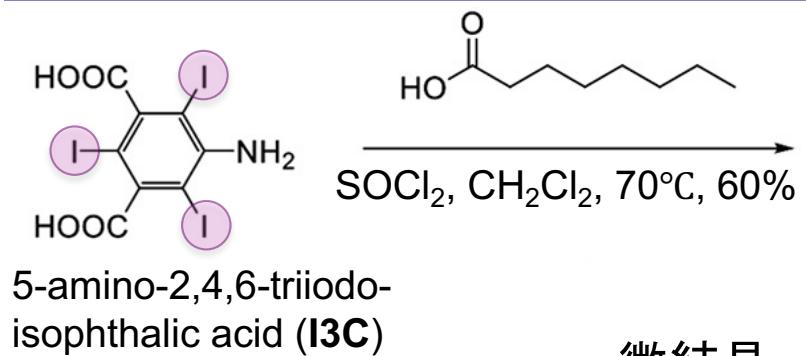
sample preparation

- ・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)

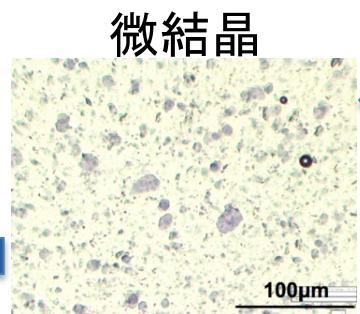
膜タンパク質をヨウ素界面活性剤で標識して迅速構造決定

4



SACLAでbRを測定

実験的位相決定
に成功

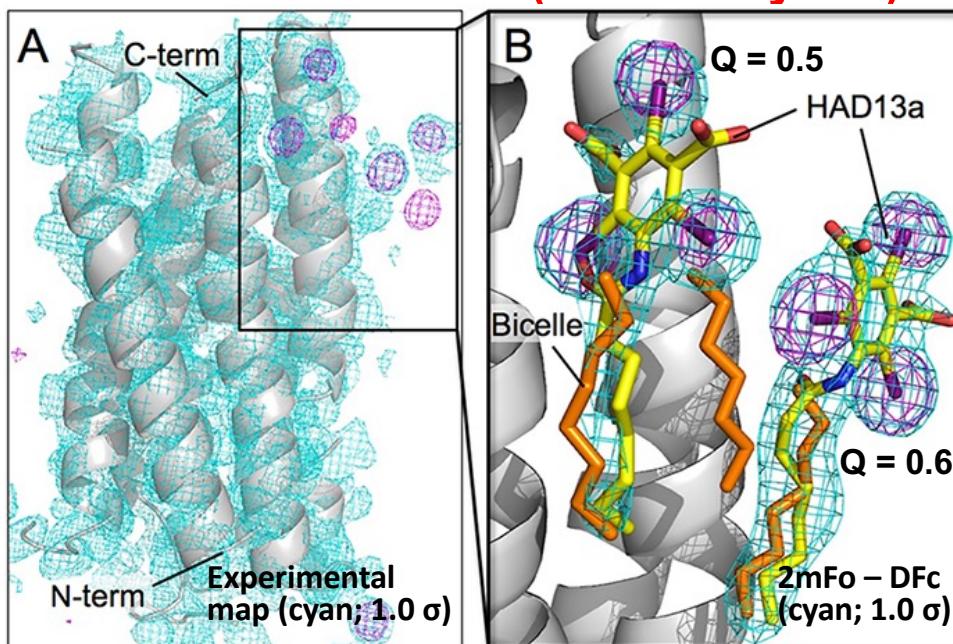


HAD13a
conc.
4 mM
Mix and stir
for 3 days

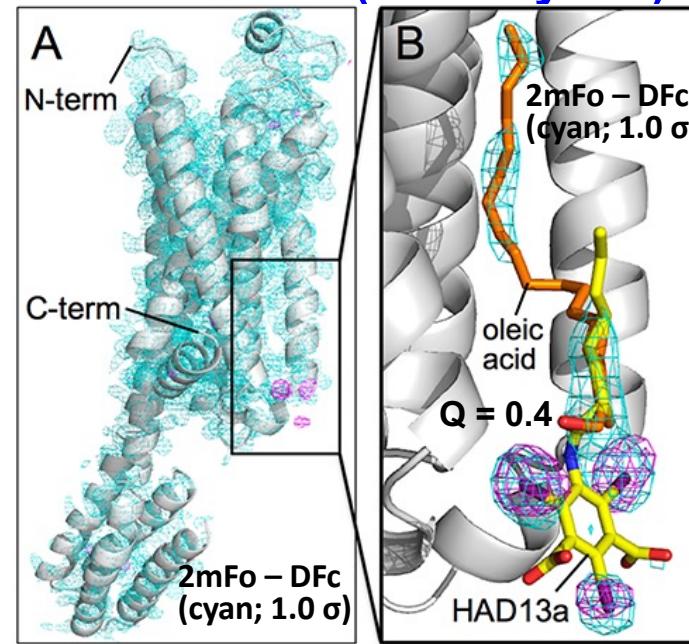
4 mM I3C or BaCl₂はbRに結合せず。
20 mM NaIは結合したが、HAD13aよりもはるかに低い親和性。

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)

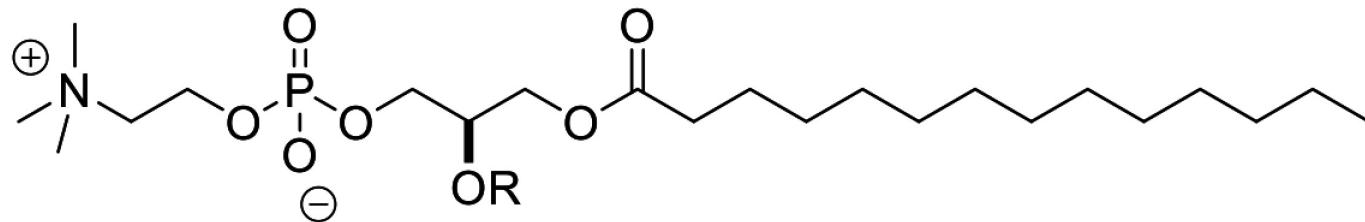


(Nakane et al
& Mizohata*
PNAS, 2016)

紫のメッシュ：
異常散乱マップ
(I原子の位置)

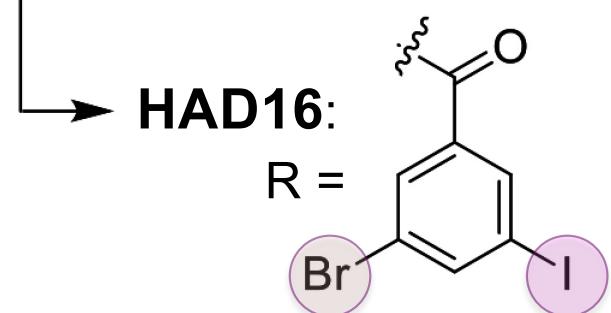
膜タンパク質と脂質の相互作用解析

5



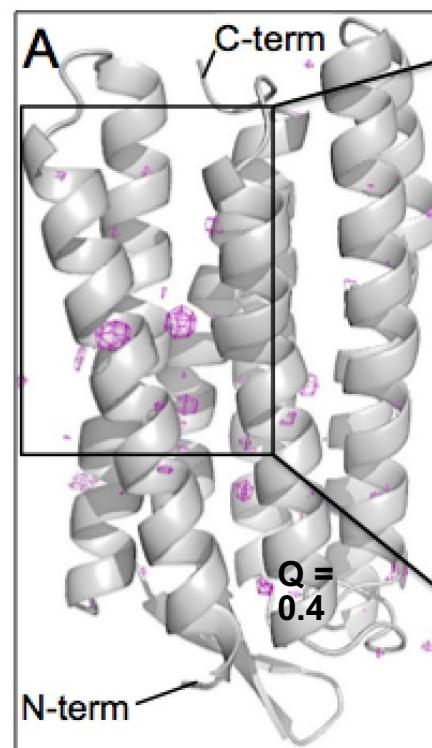
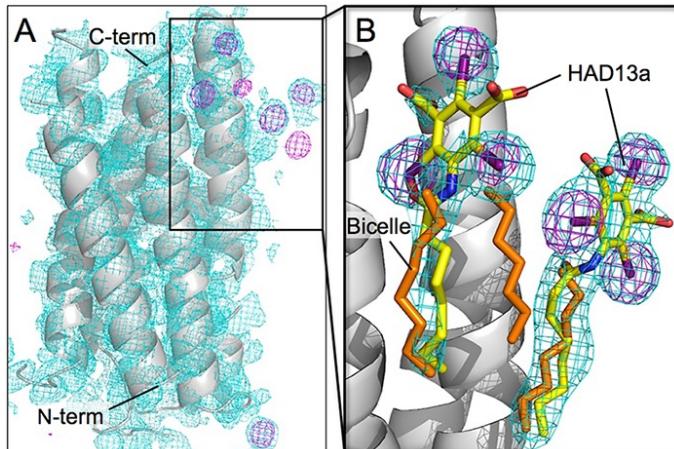
3-bromo-5-iodobenzoic
acid
NMBA
4-pyrolidinopyridine
 CH_2Cl_2 64%

lyso PC: R = H (**HAD16H**)

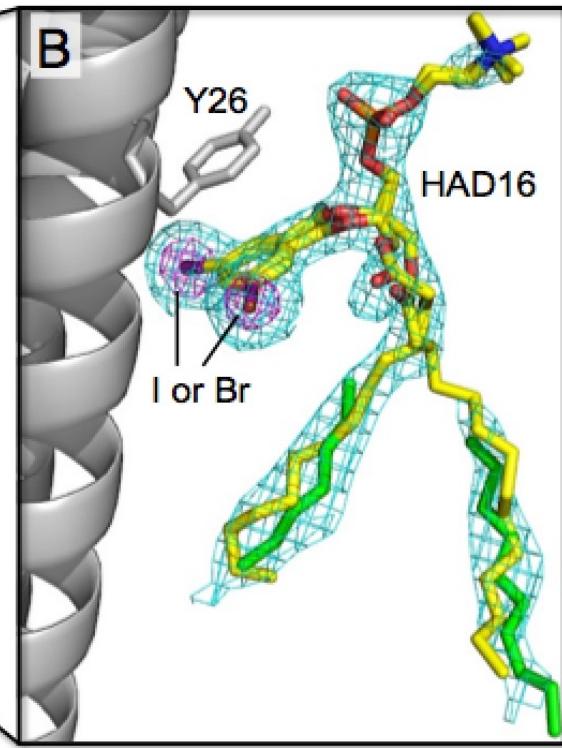


(Hanashima *et al* & Mizohata*,
Membranes, 2021)

HAD13a



90°
rotation



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.

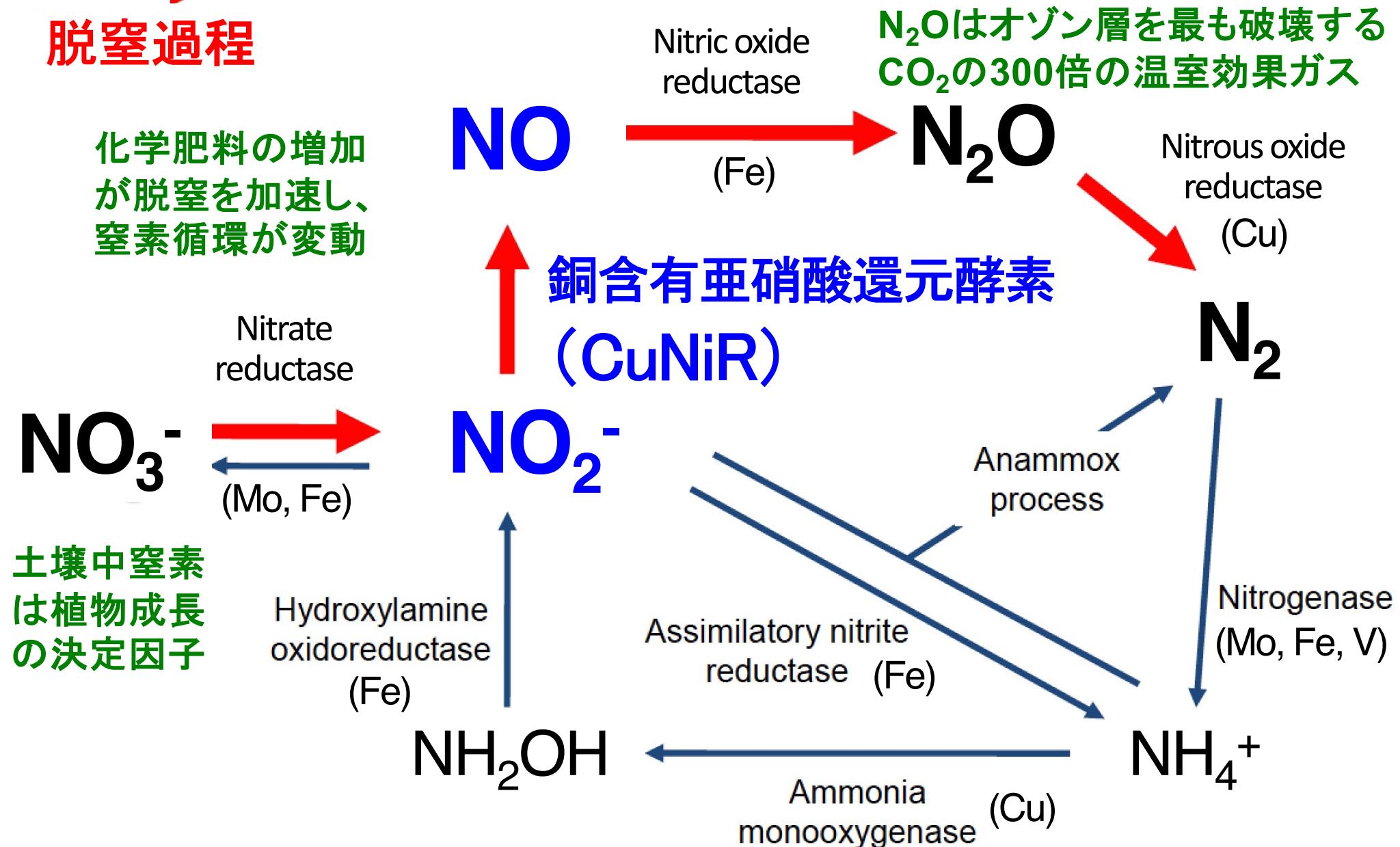
全てのイメージを使えば、**SIRAS**は分解能**3.3 Å**の低分解能でも可能.

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	streptavidin	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)

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！

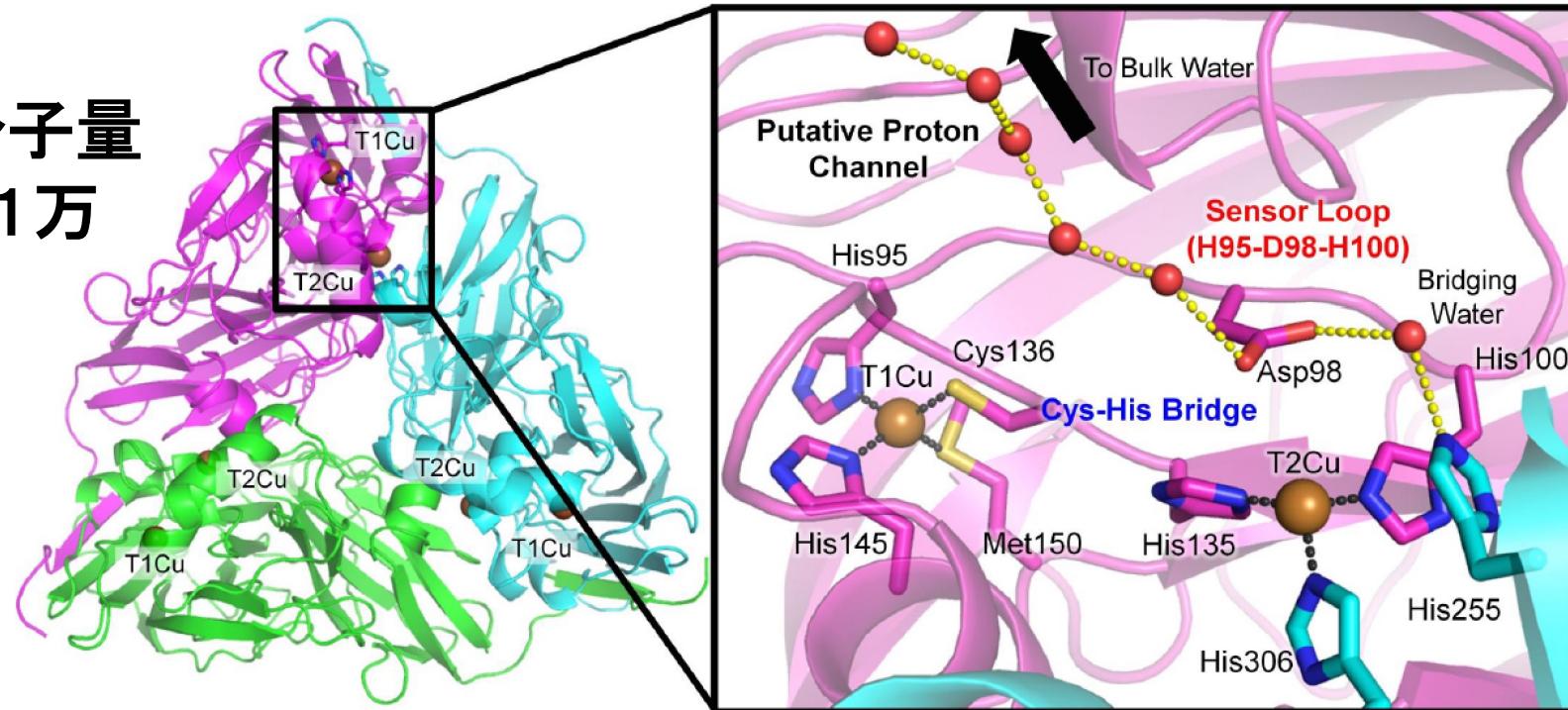
脱窒過程



CuNiRの触媒反応 ~プロトン共役電子移動~

8

分子量
11万



e^- generated
by X-ray



T1Cu



T1Cu
Structural Change



休止状態

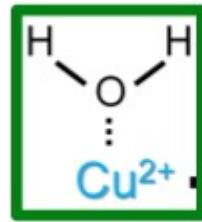
基質

Reduction of Nitrite

生成物

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

T2Cu



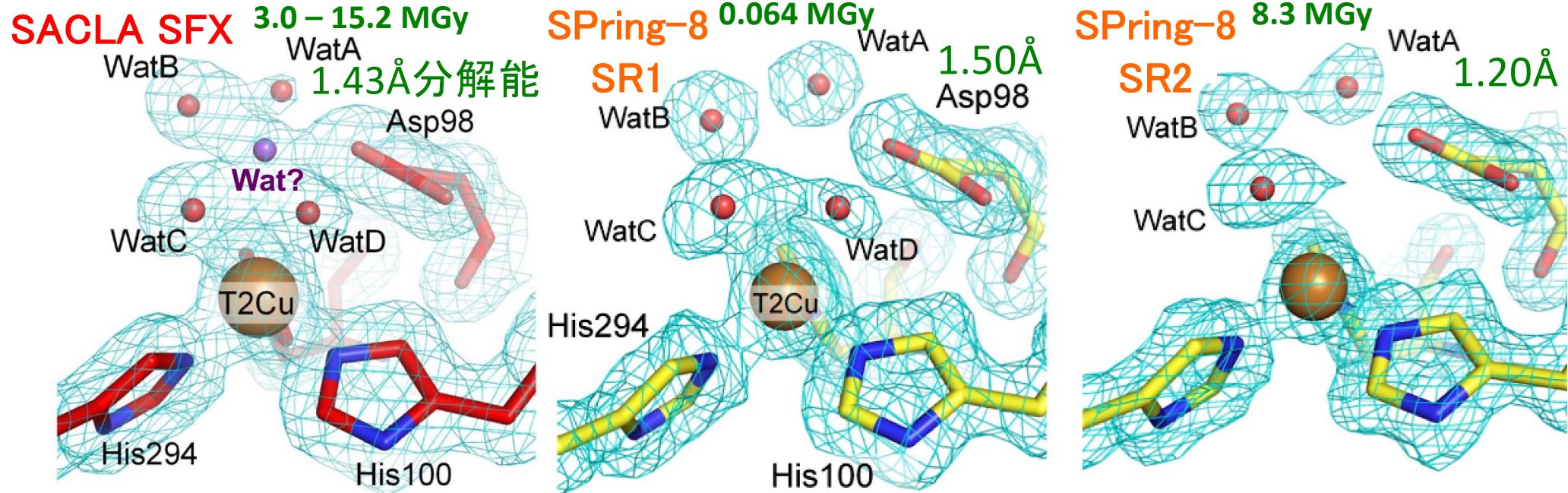
Structural Change

e^- from T1Cu

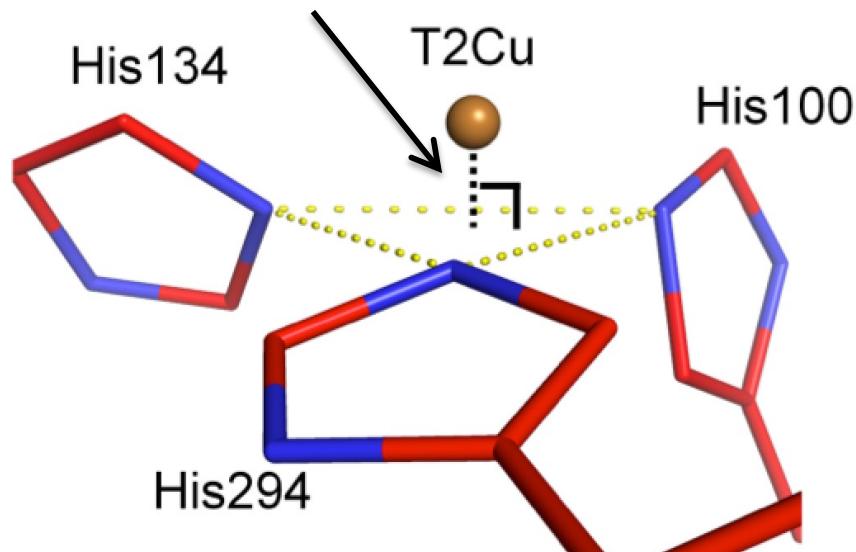


休止状態の活性部位の構造

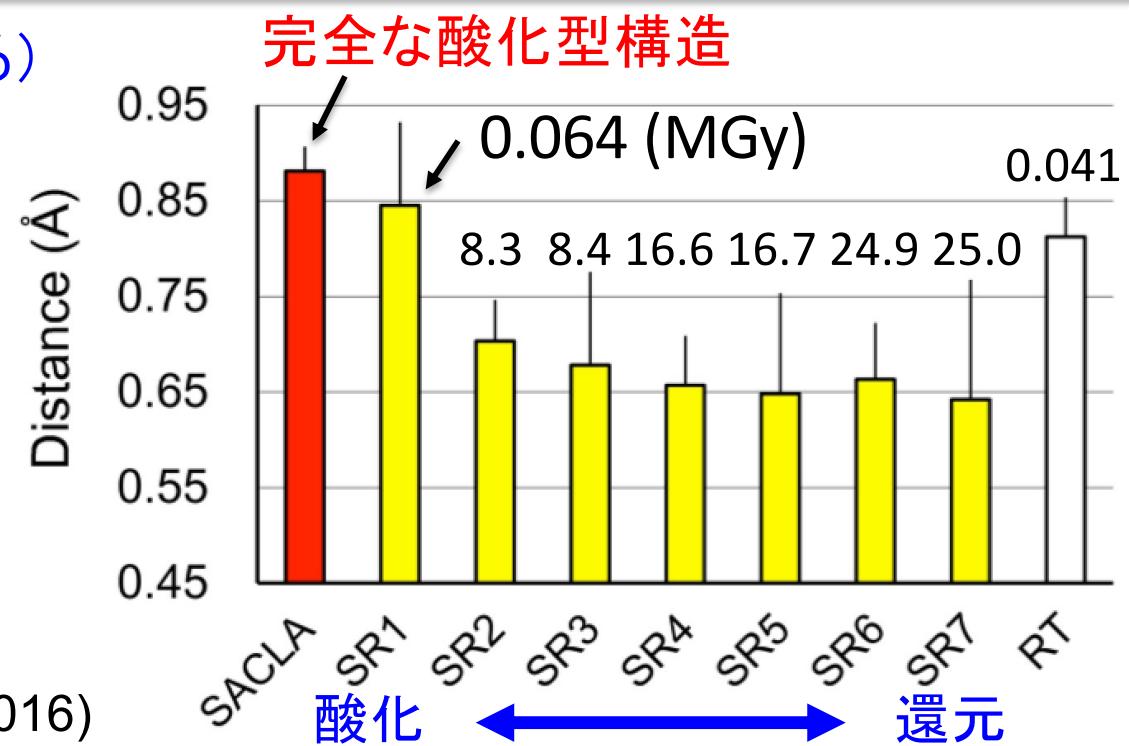
9



レドックス状態を反映(還元で短くなる)



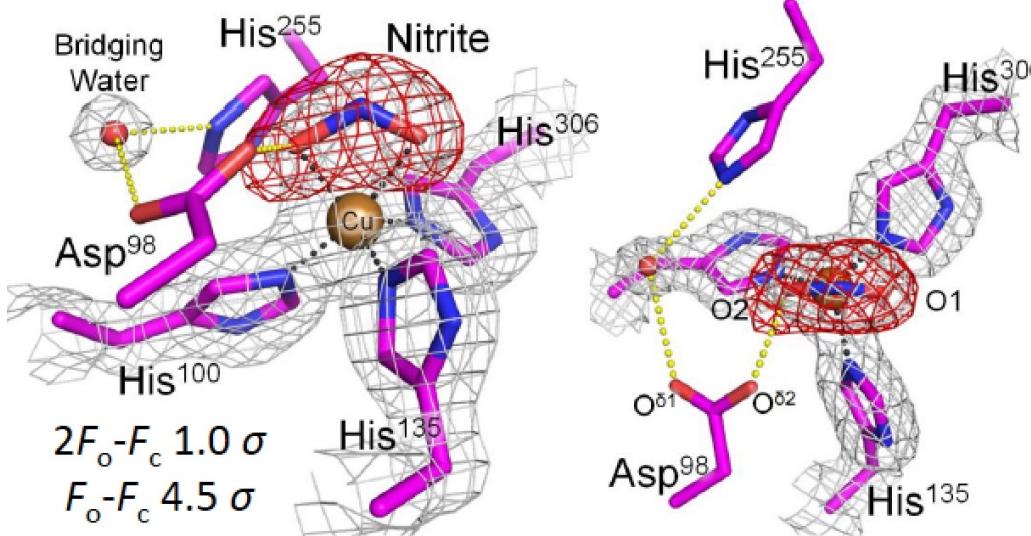
(Fukuda et al & Mizohata* *J Biochem*, 2016)



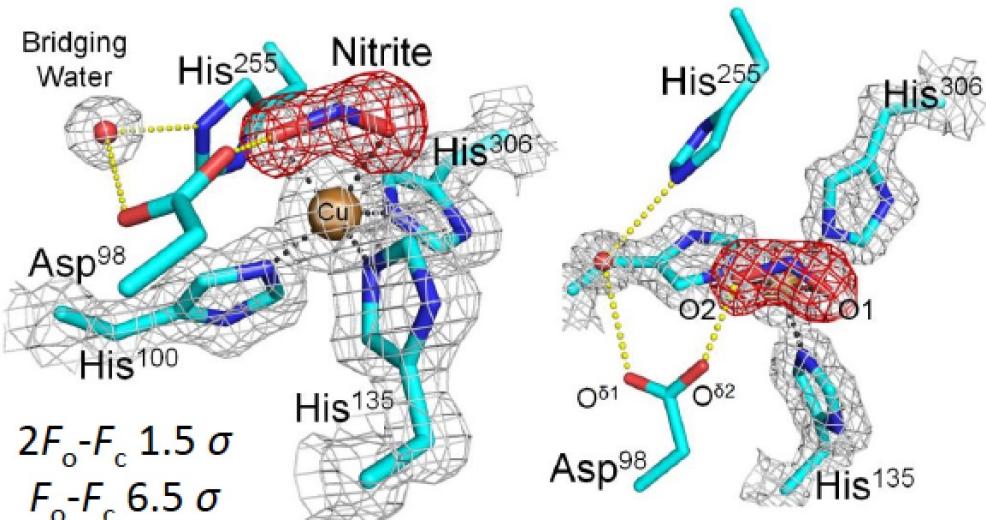
亜硝酸イオン(NO_2^-)の結合様式の比較

10

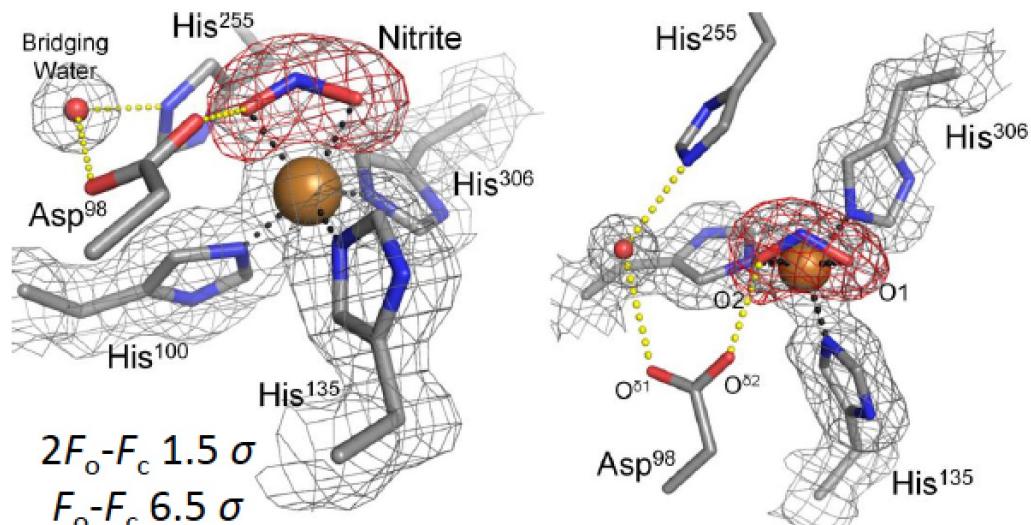
SACLA 常温無損傷1.60 Å分解能



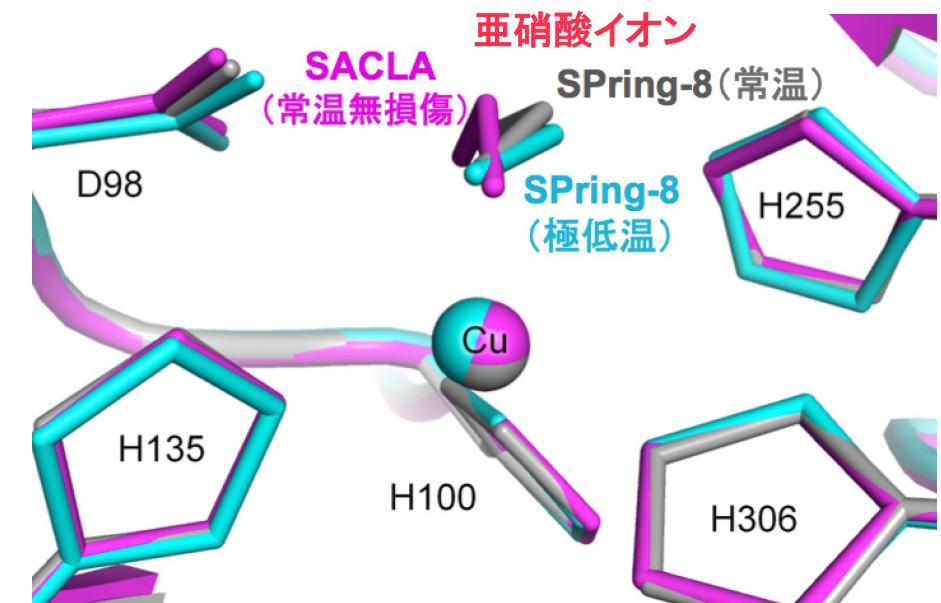
SPring-8 極低温1.3 Å分解能



SPring-8 常温1.54 Å分解能



重ね合わせた図

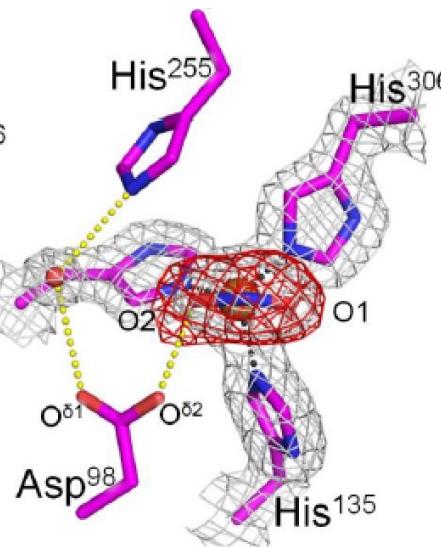
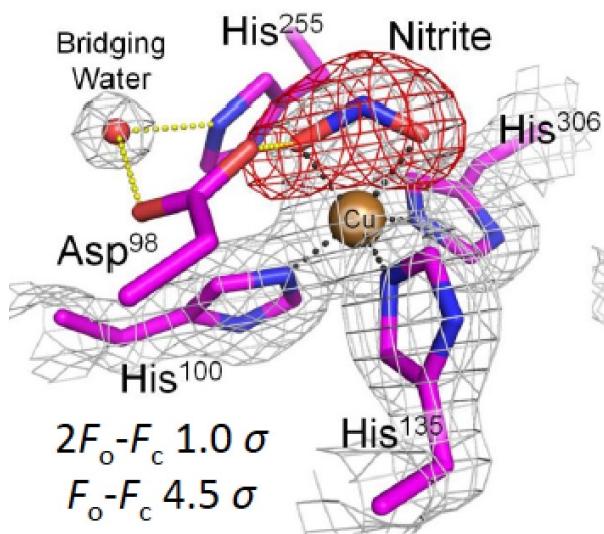


(Fukuda et al & Mizohata* PNAS, 2016)

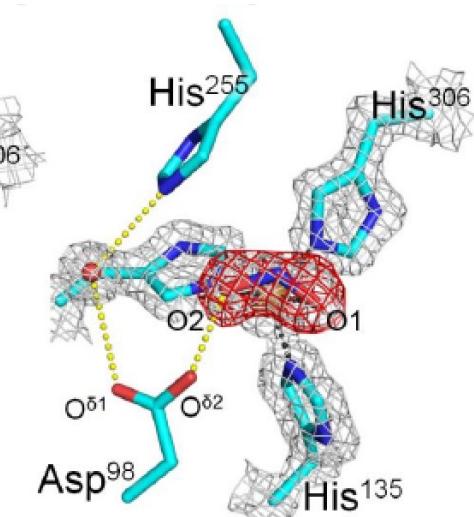
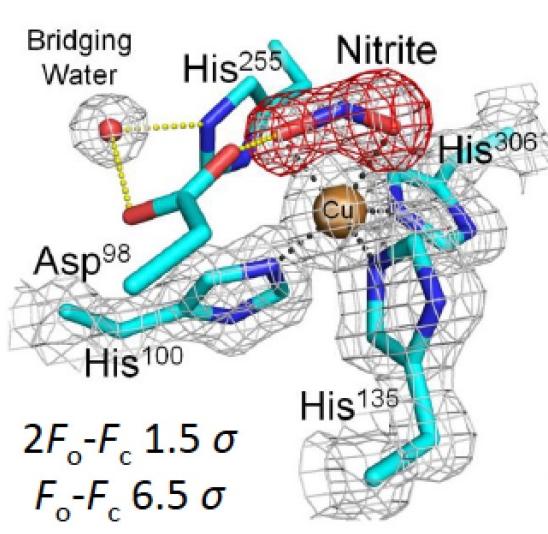
亜硝酸イオン(NO_2^-)の結合様式の比較

11

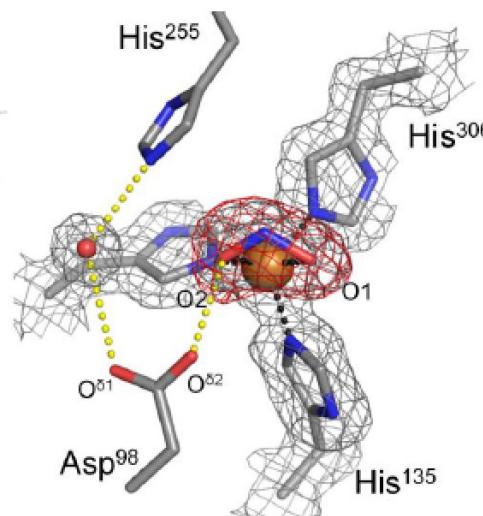
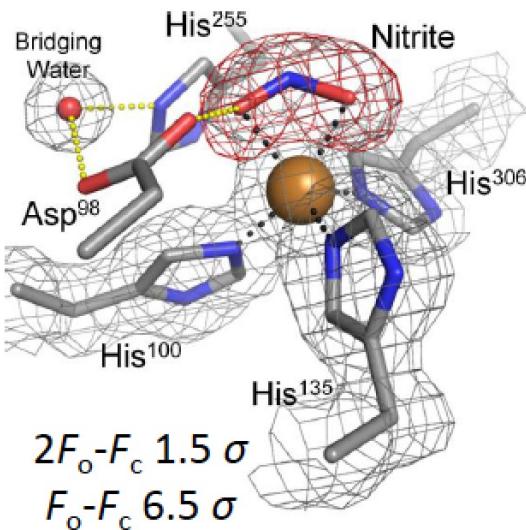
SACLA 常温無損傷1.60 Å分解能



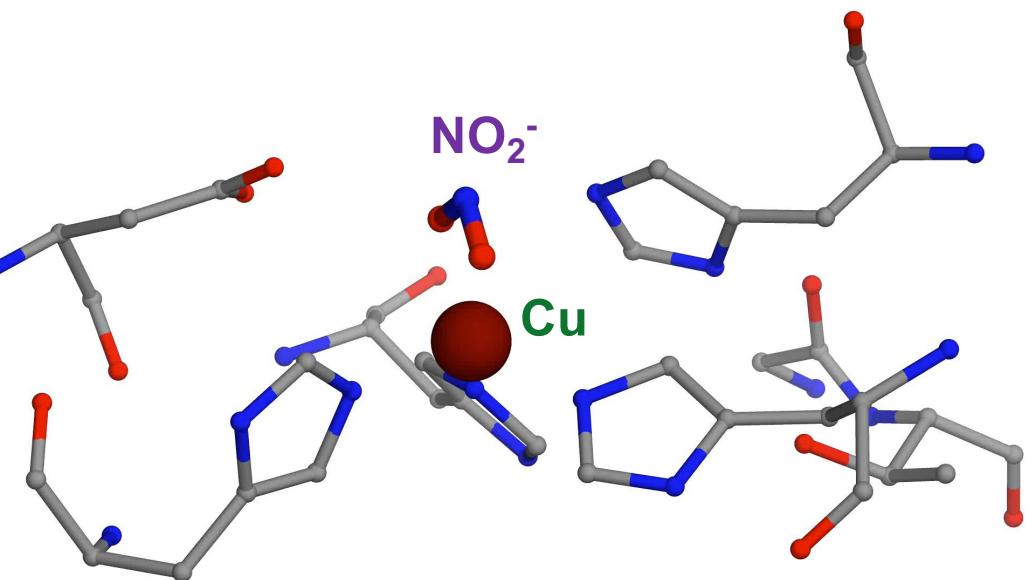
SPring-8 極低温1.3 Å分解能



SPring-8 常温1.54 Å分解能



重ね合わせた図



(Fukuda et al & Mizohata* PNAS, 2016)

X線光還元にともなうHis255の回転と反応機構

12

