

# 研究報告書

## 「超薄膜を用いた膜タンパク質の迅速・高分解能構造解析手法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 平田 邦生

### 1. 研究のねらい

近年、放射光 X 線の利用技術の向上、新規 X 線光源(X 線自由電子レーザー)の出現により、微小集光した X 線によるタンパク質結晶の極限的構造解析が現実のものとなりつつある。このような技術の発展によりこれまで困難であった膜タンパク質の結晶構造解析速度は劇的に速くなり、さまざまな周辺技術が発展してきた。一方で、試料結晶の凍結・常温測定における試料の保持技術については発展途上であると言える。試料の保持技術は測定データに直接の影響を与え、さらには、測定効率に密接に関係するにも関わらず従来のマウント方法を導入される場合が多い。

本研究提案では放射光を用いたタンパク質の極限構造解析(高い空間分解能と時間分解能)においてその測定に適した超薄膜による新規試料結晶のマウント方法および効率的なデータ収集法の開発を目標とした。結晶を大量に用いた高分解能構造解析の時間短縮、試料マウントの手技簡便化、さらにクライオ電子顕微鏡分野との連携を目指した。

とりわけ LCP 法により結晶化された大量の膜タンパク質結晶から高い効率で、高分解能回折データを収集するマウント方法を提案した。LCP 法により得られた微小結晶は比較的結晶性が良好であるが、結晶サイズが大きく育たないことが多い。この場合、高フラックス微小ビームの利用が有効であるが、得られる分解能については放射線損傷により規定されてしまう。この問題を解決するために「多数の微小結晶から高分解能のデータを少量ずつ収集しマージする」ことが有効な場合が多い。ここで問題となるのは測定に要する手間と時間、試料結晶の準備に要する手間と時間がより大きくなることであった。現状よく利用されるクライオループなどのマウントデバイスは 500 ミクロン径程度の大きさであるため、マウントできる結晶数を数倍～数十倍にする低バックグラウンドマウント技術を超低バックグラウンド素材であるグラフェンを用いて実現することを目指した。またこの場合にビームライン測定技術としてより速くより多くのデータ収集が実現できる測定系の開発も手掛けた。さらに LCP 結晶はガラスサンドイッチ法を用いて調製されることが多いが、この手法では結晶の取り出しが困難を極め、脂質の相によっては結晶の回収率が 20～30%になることもある。グラフェンは水バリア特性も有するため、結晶化から回折実験までを結晶を取り出すことなく利用することができるマウント法を開発することで得られた結晶を最大限多く、また、結晶に物理的な力を与えることなく測定に持ち込めることを最終目標として設定した。

X 線自由電子レーザーを用いたチトクロム酸化酵素の時分割実験では 500 ミクロン大の大型結晶を常温で調湿・調湿する必要があったためグラフェンを利用した結晶環境制御にも取り組んだ。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

グラフェン膜を用いたタンパク質微小結晶の大量マウント法確立を目指したが実際に得られる単層～二層グラフェンの物理強度では数ミクロン～数十ミクロンの数千～数万個のタンパク質結晶および脂質や結晶化母液などの総重量に耐えることができないことが判明した(30ミク

ロン角穴にはることも困難)。従ってまず PMMA で補強したグラフェン膜でタンパク質結晶を包んで環境制御し、高精度データ収集を成功させた。グラフェン膜支持法の検討やグラフェン成膜条件検討と並行してビームラインでの微小結晶を用いた迅速データ収集法開発を行った。共同研究者らと共に人間の行いうる回折データ収集のすべてを実装した全自動データ収集システム ZOO の開発を行った。結果として SPring-8 ビームライン BL32XU を用いた多数の膜タンパク質の迅速高分解能構造解析に貢献した。試料マウントとしては 1 ミクロン厚の窒化シリコン膜(5mm 角)2枚の間に LCP 結晶を調製し、挟み込んで試料数密度を制御しつつ1ホルダーから数百データセットを自動収集する方法も確立した。

成膜したグラフェンを用いる方法としては数ミクロン穴のグリッドであればカバーすることが可能であることがわかったため、特に電子との相互作用の低さに着目し、クライオ電子顕微鏡分野への応用を考えた。JST/今崎さきがけ研究員とともに試料マウント用のグリッド調製法の確立について共同実験を進めている。

また、XFELを用いた時分割結晶構造解析ではチトクロム酸化酵素のプロトンポンプとポンプ逆止弁の作用機序について議論を可能にする構造決定を行った。

## (2) 詳細

### <研究テーマ A:超薄膜を用いたタンパク質微小結晶大量測定手法の確立>

CVD 装置を導入し 10cm 角の銅箔上に単層グラフェンを成膜するプロトコルを確立した。グラフェンの性状確認については研究期間中にラマン分光法(グラフェンプラットフォーム)、AFM(慶応大学・中迫研)、電子回折実験を行い最終的に単層もしくは二層グラフェン成膜に成功していることを確認した。試料マウントとして利用するためにグラフェン膜を銅箔上から単離する方法の検討も行った。検討を行ったのはエッチングと呼ばれる手法で、銅箔を溶かすことで銅箔上に製膜したグラフェンを単離するものである。多数の条件検討を行ったがエッチングで単離したグラフェンは非常にもろく、自重でも破れてしまう程度の物理強度であった。成膜時のグラフェン結晶断片(フレーク)のサイズに依存するものと考え、成膜条件の検討を行ったがより強靱と認識できる成膜条件を見出すことが研究期間内ではできなかった。エッチングで単離したグラフェンを重ねることで物理的強度を増強することも検討したが重ね合わせ作業自体が困難であるため研究期間内に実現することを断念した。そこで常温測定などの結晶環境制御を目指しグラフェンを PMMA で補強した薄膜を利用してタンパク質凍結結晶を用いた高精度データ収集を行うプロトコルをまず確立し高精度データ収集ができることを確認した。

グラフェンのマウント法検討と並行して SPring-8 の高フラックス微小ビームビームライン BL32XU を用いた膜タンパク質の微小結晶を用いた迅速・高分解能データ収集法の確立を手掛けた。具体的には 2015 年 6 月に岩田研究室との共同研究により GPCR の高分解能構造解析を開始した。この受容体の結晶は可視光で視認することが困難な LCP 法により結晶化されていたため特に下記のようなプロトコルで実験を行った。結晶交換ロボットを用いて試料ホルダーをゴニオメータ上にマウントし、アラインメントカメラを用いて X 線上にループをアラインメントし、走査する領域を定めてビームサイズと同等のグリッドを二次元展開して走査(以下ラスタスキャン)を進め、スキャン中に撮像したイメージ上に回折スポットが観測できたらそのゴニオメータ座標を記録し、その点(つまり回折で見つけた結晶位置)からデータ収集を行うと

いうものである。測定の律速となるのはラスタースキャンであるためこの高速化を実現した。具体的には高速読み出し検出器の撮像タイミングとゴニオメータ並進タイミングを高い時間精度で揃えるための多軸制御ユニットを用いた測定系の開発を行った。高フレームレート(数十 Hz)読み出しが可能な CCD 検出器を用いた高速ラスタースキャン(二次元走査)の実装を行った。これにより高速ラスタースキャン(具体的には 500 ミクロン/sec)を実現した。ラスタースキャン後には回折点検出のためのソフトウェア SHIKA(本成果外)により結晶の位置を特定し、放射線損傷予測ソフトウェア KUMA(本成果外)による露光条件設定を行った上で 5-10° 分のデータ収集を繰り返し行うという基本プロトコルの確立を行った。このプロトコル中のループ自動アラインメントおよびラスタースキャン領域の自動設定プログラム INOCC を開発し、すべてのプログラム群を融合した全自動データ収集システム ZOO の開発に成功した。また X 線ビームよりも大きな結晶を利用する場合には X 線を照射する位置を連続的に変更しながら、重篤な放射線損傷を回避しつつ、結晶体積を最大限活用したデータ収集が有効である。このような複雑な測定を実現するプログラム HEBI の開発により全自動で行うことに成功し、現時点では 10x10x50 ミクロン程度の微小結晶からでもヘリカルデータ収集により高 S/N なデータ収集を行うことが可能となった。2015 年 7 月に確立したプロトコル、自動データ収集 ZOO システムを用いることにより共同研究において 2017 年 11 月までに膜タンパク質の高分解能構造をすでに 20 以上決定することに成功している(主な成果 1,3,4,5)。グラフェンを用いることはできなかったが試料マウントとしては 1 ミクロン厚の窒化シリコン膜(5mm 角)2枚の間で LCP 結晶を調製し、結晶化が完了した後、膜の厚みを制御することで X 線に対する試料数密度を制御して 1 ホルダーから数百データセットを収集する方法も確立した。

グラフェンを利用した構造生物学研究に関して、成膜したグラフェンをクライオ電子顕微鏡の低バックグラウンドマウントとして利用する検討を開始した。具体的にはカンチフォイルや C フラットと呼ばれる数ミクロンの穴を有するグリッド上にエッチングにより単離した単層グラフェンを載せてグローディスチャージなどの親水処理を行ってタンパク質分子をマウントすることを目指している。C フラット上にマウントしたグラフェンの電子線回折を観察した結果、単層もしくは二層で C フラットの穴上にグラフェンをはることができた。またバックグラウンドは非常に低くクライオ電子顕微鏡を用いたタンパク質の高分解能構造解析に重要な技術開発であることも再認識することができた。この初期検討のさなか、MRC の電子顕微鏡グループから酸化グラフェンの結晶断片(フレーク)を懸濁した溶液に試料グリッドを浸すことで表層に酸化グラフェン層をはり、タンパク質試料をマウントするプロトコルが公開された。これを受けて、超分子複合体の電子顕微鏡を用いた高分解能構造解析を行っている JST/今崎さきがけ研究員(三期生)と共同 FS を開始し、市販の酸化グラフェンやグラフェンをグリッド上へ塗布してカバー率、電子線照射時のバックグラウンド評価を行った。結果としてはグリッド上のカバー率を向上するための条件検討(グローチャージの有無、濃度、マウントの方法)を継続して行う必要があることが分かった。またバックグラウンドレベルについては CVD 装置で成膜しエッチングで単離したグラフェンが市販のフレーク溶液をグリッドにのせる場合に比べてより低いことも分かった。

チトクロム酸化酵素の還元型 CO 結合状態の結晶を光励起によって乖離させる反応を高分解能結晶構造解析することを目指した。励起(ポンプ)から X 線照射時間(プローブ)までの時

間を数ナノ～数百マイクロ秒と変化させて得た各スナップショットの高分解能結晶構造から、酸素還元中心に酸素が結合する逆反応(CO がヘム中心から離れる過程)を追跡しそれによるプロトンポンプの作用機序を推定する結晶構造解析を行うことに成功した。酵素を励起レーザーで励起するため、その励起効率を最大化しなければいけないため開発したグラフェンとPMMA 膜を利用する環境制御を用いることができなかった(業績リスト2)。

### 3. 今後の展開

単層～二層グラフェン薄膜を 30-40 ミクロンメッシュに“はる”ことが非常に困難であることがわかったが数ミクロン程度のメッシュであれば十分なカバー率で“はる”ことが可能であった。電子線回折像撮像の結果から単層～二層程度のグラフェンからの回折バックグラウンドが非常に低い。従って数ミクロンメッシュで問題が無い場合には、グラフェンの試料マウント膜としてのポテンシャルが非常に高い。今後の展開として数ミクロン穴メッシュにグラフェンをはり、プラズマクリーナーを利用するなど親水化処理を行った上でタンパク質試料マウントとして利用する方法を確立したい。

タンパク質結晶構造解析分野においてはミクロンサイズの微小結晶よりも小さな結晶(ナノサイズ結晶)から回折像を撮像することに利用できる検討を開始した。上述したとおり、グラフェンが極めて低いX線散乱体であるため他のどのようなマウントデバイスよりSN比高くデータ収集が実現できることは確かである。また本研究提案で想定した結晶サイズより十分小さいナノ結晶では面積の小さなグラフェンをマウント膜として利用できる可能性は高い。XFEL や次世代光源を利用したナノ結晶構造解析ではシグナルが微弱になるためナノ結晶調製および回折像取得のためにグラフェン利用を検討している。

開発した全自動回折データ収集システム ZOO を用いた迅速データ収集は世界トップレベルの速度で高分解能データ収集が可能である。より多くの(微小)結晶をより簡便に(できれば自動で)大型ホルダーにマウントし、それを全自動データ収集システムに接続できるよう高度化研究を継続し、結晶構造解析分野への貢献度を高めたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

(達成状況)グラフェンを利用した応用研究展開のテーマ設定をしたが研究期間内に実現することができなかったが、並行して行った全自動データ収集システム ZOO を開発により放射光施設を利用したデータ収集に革新をもたらしたと自負している。またこのデータ収集システムにマッチした大量結晶マウント方法の検討についても多くの共同研究を通して最適解を見出すことができ、1～2年の間に少なくとも LCP 結晶を用いた測定について国内の標準的な試料結晶準備方法になると確信している。

(進め方)

ビームラインのユーザを含め、さきがけ領域内・外の優秀な研究者らとの共同研究や議論を活発に行い、生まれたアイデアとニーズに基づき、初期テーマに準じた現実的な研究計画を立てることができたと考えている。

(今後の見込み: 科学技術および社会・経済への波及効果)



放射光構造生物科学分野において世界的に見ても高い評価を得ており(関連招待講演が2件)、海外からの共同研究依頼も増えてきた。また予期せず、開発したデータ収集システムは国内の製薬会社での創薬開発にも役立っている。特に製薬企業の放射光利用では限られた時間の中でより良いデータをより多く収集する必要がある。本研究で開発した測定システムを導入することで人間より速く効率よく安定して高分解能データ収集を実現することが実現し、実際に多くの企業ユーザから賞賛の声を頂いており、産業界への貢献度も高いと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

単層グラフェンによる試料マウント技術については、当初の目標には至らなかったが、PMMA で補強した薄膜を利用する技術、クライオ電顕への応用等の派生技術の開発は、一定の成果と言える。また、放射光施設における全自動回折強度測定システムの構築、高分解能データ収集に関する試み、LCP 結晶の大量マウント技術などは、多くのユーザーへ多大な貢献を果たしている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. “Protein microcrystallography using synchrotron radiation” IUCrJ (2017). 4, 529–539. Masaki Yamamoto, Kunio Hirata, Keitaro Yamashita, Kazuya Hasegawa, Go Ueno, Hideo Ago and Takashi Kumasaka
2. “A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase” Science Advances (2017) Vol. 3, no. 7, e1603042. Atsuhiko Shimada, Minoru Kubo, Seiki Baba, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Go Ueno, Takashi Nomura, Tetsunari Kimura, Kyoko Shinzawa-Itoh, Junpei Baba, Keita Hatano, Yuki Eto, Akari Miyamoto, Hironori Murakami, Takashi Kumasaka, Shigeki Owada, Kensuke Tono, Makina Yabashi, Yoshihiro Yamaguchi, Sachiko Yanagisawa, Miyuki Sakaguchi, Takashi Ogura, Ryo Komiya, Jiwang Yan, Eiki Yamashita, Masaki Yamamoto, Hideo Ago, Shinya Yoshikawa and Tomitake Tsukihara
3. “Structural insights into ligand recognition by the lysophosphatidic acid receptor LPA6” Nature 548, 356–360 (17 August 2017) Reiya Taniguchi, Asuka Inoue, Misa Sayama, Akiharu Uwamizu, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Masahito Yoshida, Yoshiki Tanaka, Hideaki E. Kato, Yoshiko Nakada-Nakura, Yuko Otani, Tomohiro Nishizawa, Takayuki Doi, Tomohiko Ohwada, Ryuichiro Ishitani, Junken Aoki & Osamu Nureki
4. “Structure of the triose-phosphate/phosphate translocator reveals the basis of substrate specificity” Nature Plants 3, 825–832 (2017). Yongchan Lee, Tomohiro Nishizawa, Mizuki Takemoto, Kaoru Kumazaki, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Ayumi Minoda, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Ryuichiro Ishitani & Osamu Nureki
5. “X-ray structures of endothelin ET<sub>B</sub> receptor bound to clinical antagonist bosentan and its analog” Nature Structural & Molecular Biology (2017) 24, 758–764. Wataru Shihoya,

Tomohiro Nishizawa, Keitaro Yamashita, Asuka Inoue, Kunio Hirata, Francois Marie Ngako Kadji, Akiko Okuta, Kazutoshi Tani, Junken Aoki, Yoshinori Fujiyoshi, Tomoko Doi & Osamu Nureki

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件