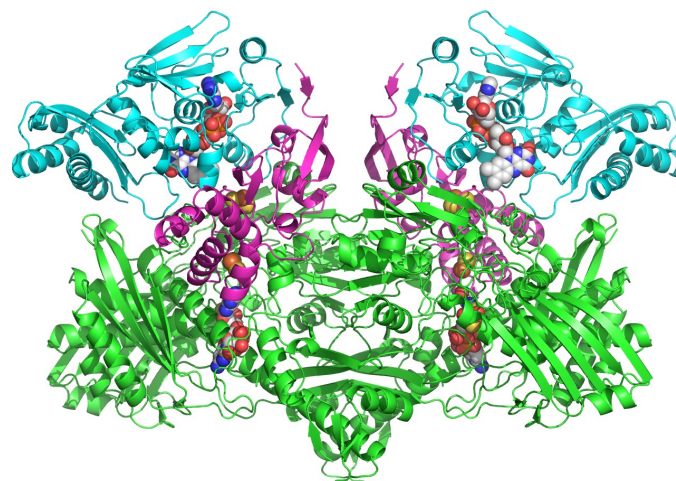
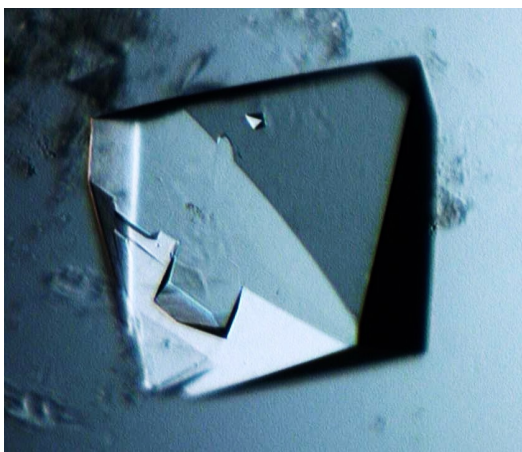




タンパク質結晶構造解析

伏信進矢

(東京大学 大学院農学生命科学研究科)



タンパク質(結晶)構造解析で得られた研究成果

The Nobel Prize in Chemistry 1962 Myoglobin & Hemoglobin

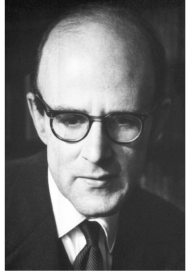


Photo from the Nobel Foundation archive.
Max Ferdinand Perutz

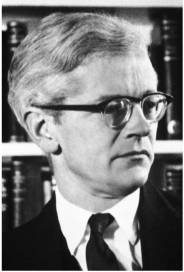


Photo from the Nobel Foundation archive.
John Cowdery Kendrew

Copyright © Nobel Prize Outreach AB 2023

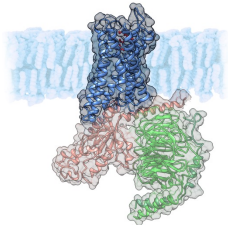
The Nobel Prize in Chemistry 2012 G Protein-Coupled Receptor (GPCR)



© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Robert J. Lefkowitz
Prize share: 1/2



© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Brian K. Kobilka
Prize share: 1/2



From
PDB-101 (RCS-PDB)

The Nobel Prize in Chemistry 2009 Ribosome



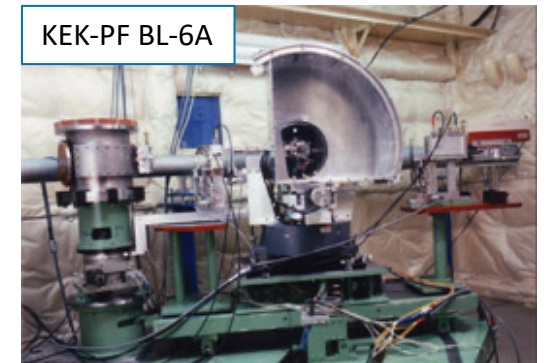
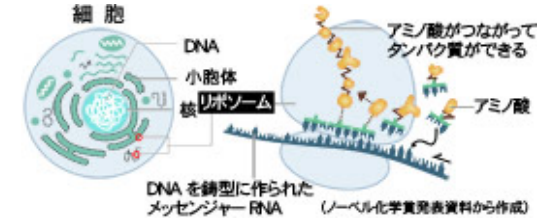
© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Venkatraman Ramakrishnan
Prize share: 1/3



© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Thomas A. Steitz
Prize share: 1/3



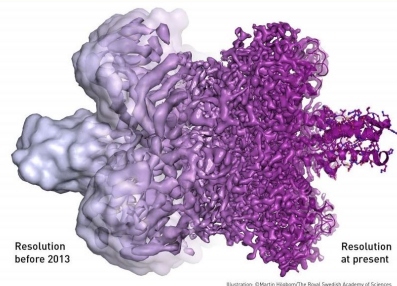
© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Ada E. Yonath
Prize share: 1/3



ワイセンベルクカメラ

The Nobel Prize Chemistry 2017

cryo-electron microscopy



Resolution
before 2013

Resolution
at present

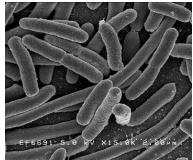
Illustration: ©Martin Högbom
The Royal Swedish Academy of Sciences



News@KEKより

タンパク質の構造解析手法の概要

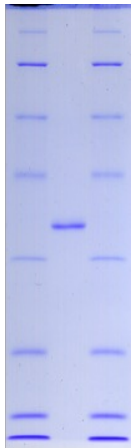
タンパク質を
作って



Taken from Wikipedia

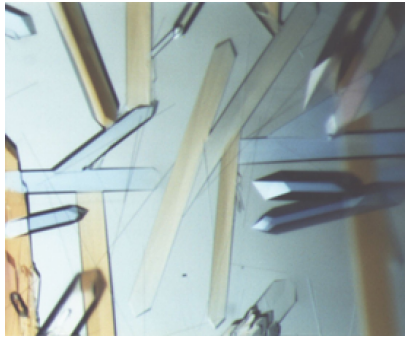


精製する



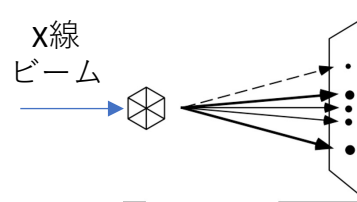
X線結晶構造解析

結晶化



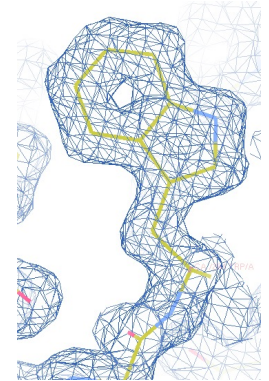
単結晶が必要

X線回折の測定



X線源：
シンクロトン放射光
実験室線源(回転対陰極など)

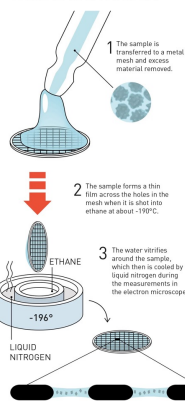
電子密度マップ



フーリエ逆変換

クライオ電子顕微鏡解析 (cryo-EM)

DUBOCHET'S
VITRIFICATION METHOD

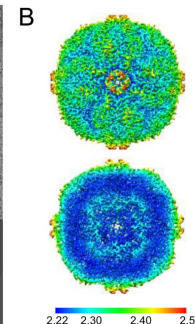
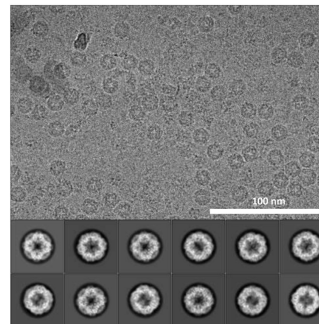


グリッド作成
(氷包埋法)

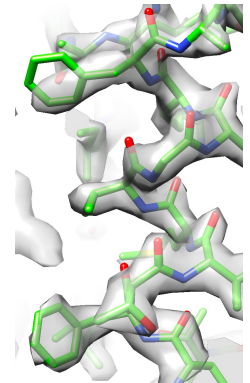
透過電顕
(TEM)

Illustration:
©Johan Jarnestad
The Royal Swedish
Academy of Sciences

単粒子解析



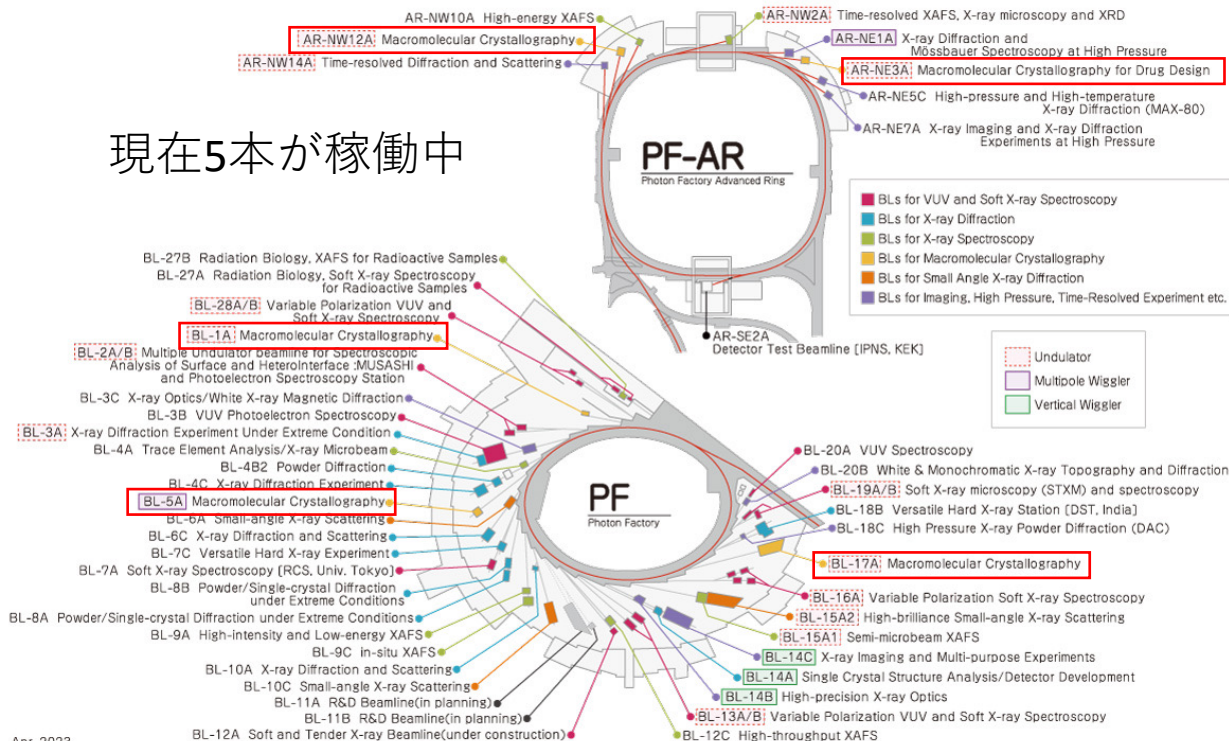
電顕マップ



Sato et al., *J. Str. Biol. X*, 2020

Photon Factoryの構造生物学ビームライン

現在5本が稼働中



From KEK PF website

Source: (Short Gap) Undulator, Multipole Wiggler

Energy range (λ): 0.75 – 2.2 Å (2.7 – 3.25 Å)

Beam size: 0.013 – 0.20 mm (H/V)

Photon Flux: 5×10^{10} – 2.5×10^{11} photons/s ($\lambda \sim 1$ Å / 12.4 keV)

主にタンパク質の単結晶X線結晶構造解析に使用されている

結晶スポンジ法など、他の回折実験にも一部使用される

多数のユーザーグループが利用している

PAC採択課題数

G型 第4分科会(生命科学 I)

2023年度: 27(前期) + 32(後期)

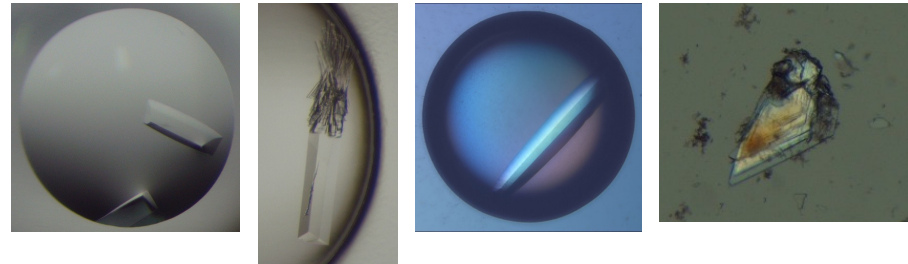
AMED-BINDSでも多数の課題でビームタイム配分されている

KEK IMSS SBRC (物構研 構造生物学研究センター)によりビームラインの研究開発・高度化が進められてきた

高度に自動化され、ユーザー支援も充実している

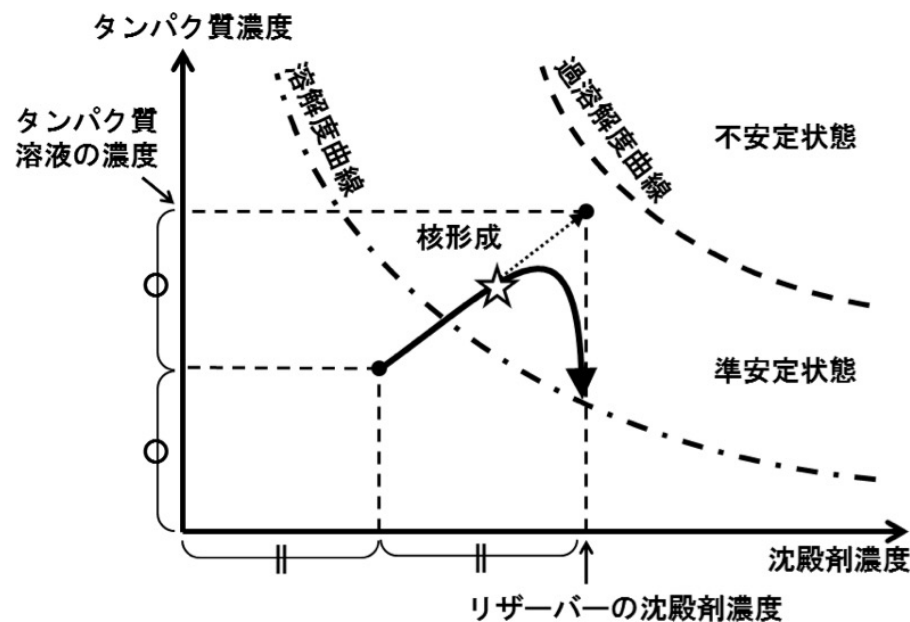
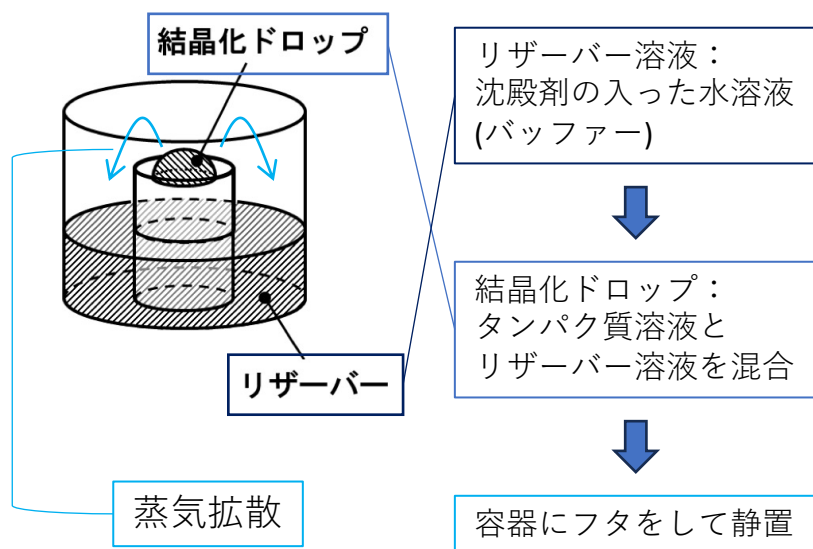
<https://www2.kek.jp/imss/sbrc/>

タンパク質の結晶化



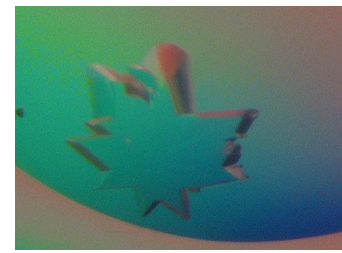
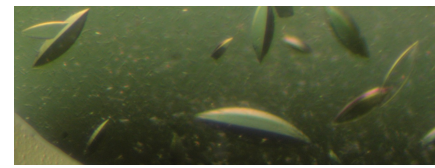
- **タンパク質の単結晶を作る必要がある**
- タンパク質の溶解度を ゆっくり 下げる
- 水溶液中で 沈殿剤 の濃度を徐々に上げる
- 沈殿剤：硫酸アンモニウム、NaCl (塩析)、ポリエチレングリコール、アルコールなど
- 手法：蒸気拡散法、counter diffusion法(微小重力)など

例：蒸気拡散法
(sitting drop vapor diffusion)

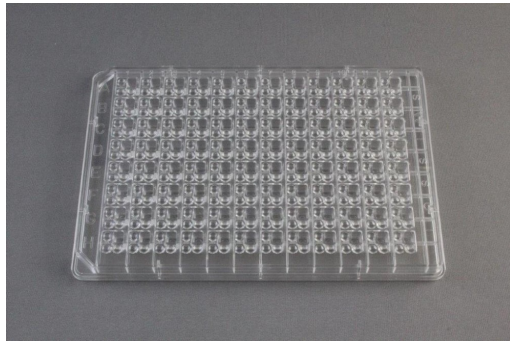


蒸気拡散法における濃度変化
(相図)

結晶化スクリーニング



- 基本的に、タンパク質(ソフトマター)は結晶化しにくい
- タンパク質の性質はそれぞれ大きく違うので、結晶化条件をスクリーニングする必要がある
- アミノ酸配列が1ヶ所違うだけでも結晶化条件が異なることがよくある



結晶化プレート(96 wells)

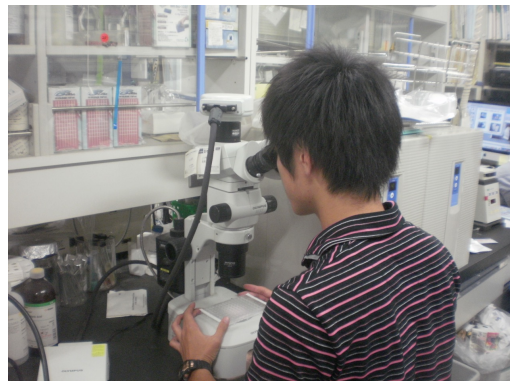


From the website of
Hampton Research

結晶化スクリーニングキット：
ある程度ランダムに設定された96条件が
セットになっていることが多い

Sparse matrix

キットの組成の例



光学顕微鏡で観察する

Tube #	Salt
1.	0.02 M Calcium chloride dihydrate
2.	None
3.	None
4.	None
5.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate
6.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate
7.	None
8.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate
9.	0.2 M Ammonium acetate
10.	0.2 M Ammonium acetate
11.	None
12.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate
13.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate
14.	0.2 M Calcium chloride dihydrate
15.	0.2 M Ammonium sulfate
16.	None

Tube #	Buffer ◇
1.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
2.	None
3.	None
4.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5
5.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5
6.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5
7.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5
8.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5
9.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6
10.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
11.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6
12.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5
13.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5
14.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5
15.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5
16.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5

Tube #	Precipitant
1.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
2.	0.4 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
3.	0.4 M Ammonium phosphate monobasic
4.	2.0 M Ammonium sulfate
5.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
6.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
7.	1.4 M Sodium acetate trihydrate
8.	30% v/v 2-Propanol
9.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
10.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
11.	1.0 M Ammonium phosphate monobasic
12.	30% v/v 2-Propanol
13.	30% v/v Polyethylene glycol 400
14.	28% v/v Polyethylene glycol 400
15.	30% w/v Polyethylene glycol 8,000
16.	1.5 M Lithium sulfate monohydrate

• • • •

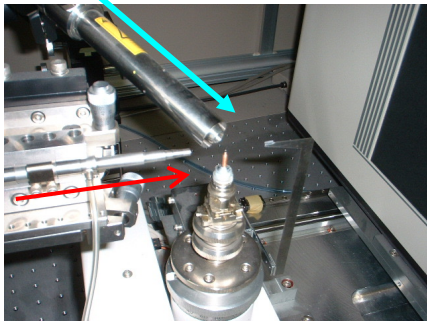
Crystal Screen (Hampton Research)

結晶の冷却と抗凍結剤

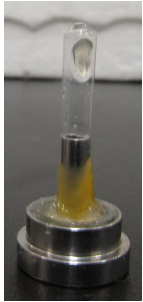
- X線ビームによる結晶のダメージを抑えるために冷却した窒素ガス(～100 K)を吹き付けながら照射する
- 氷の成長による結晶の破壊を防ぐために抗凍結剤(cryoprotectant)を加える
- 抗凍結剤：グリセロール、トレハロース(糖)、低分子量PEG、アルコール類など
- ループで結晶をすくい、液体窒素に入れて冷却する、もしくは冷却窒素ガスのストリームに直接入れる

冷却N₂ガス

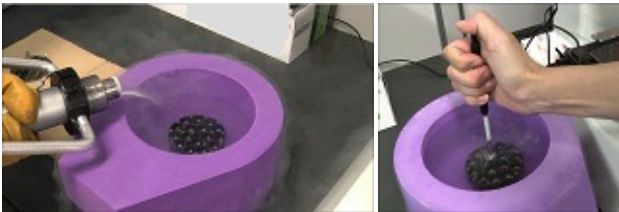
X線



室温で測定する場合もある
(石英キャピラリ中に封入)

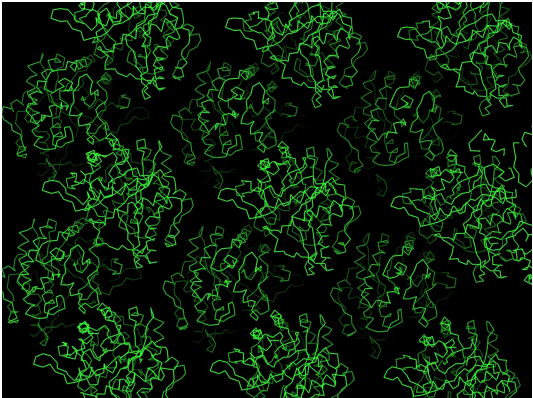


液体窒素に突っ込む

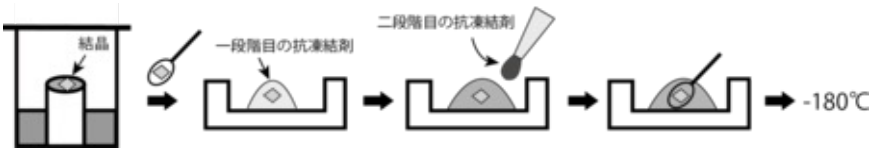


From KEK IMSS SBRC website

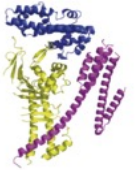
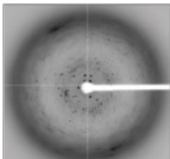
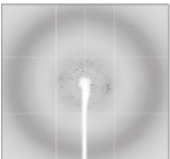
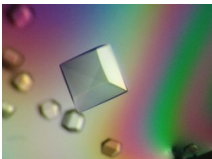
タンパク質の結晶のパッキング
間隙が水溶液で満たされている
溶媒含量 25 ～ 75% (平均値は～45%)



胃がん関連タンパク質CagAの結晶化



多段階ソーキング法で分解能アップ

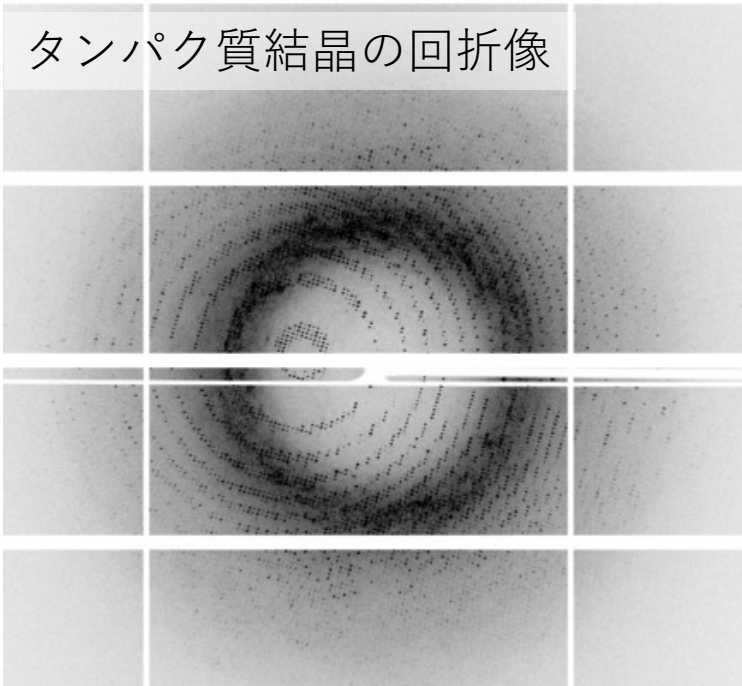
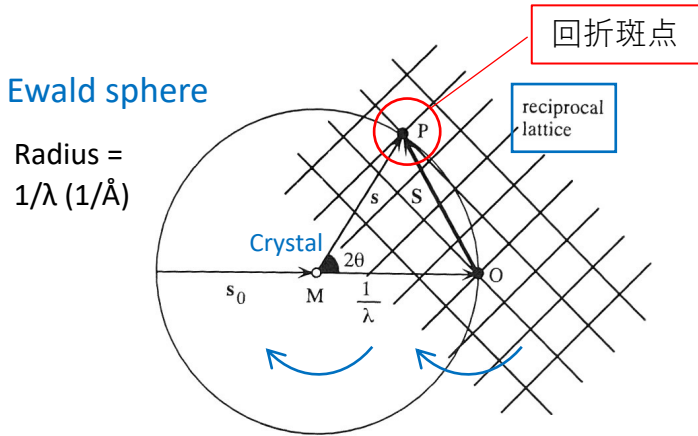
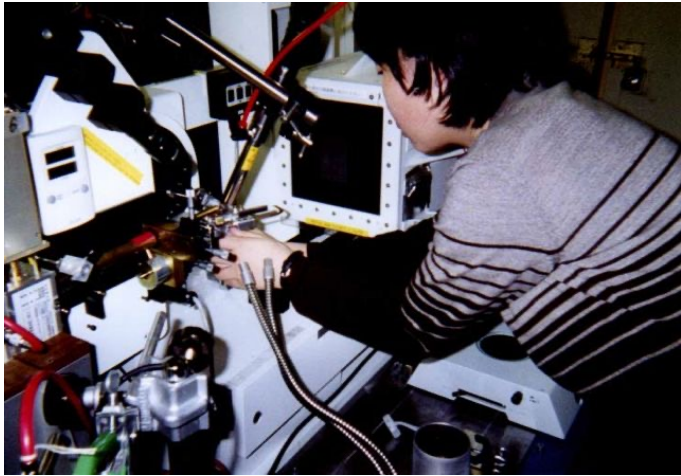
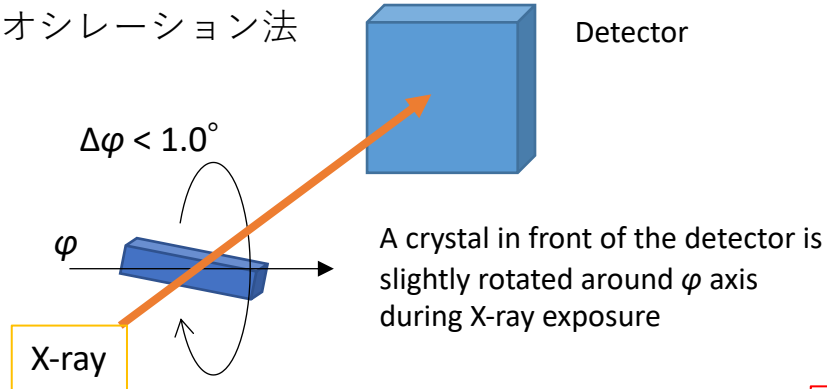


CagA



BLへ

X線回折データ測定



H	K	L	(flag)	I	σI
0	0	54	7.00	1416.73	19.31
0	0	56	12.00	2778.81	33.33
0	0	58	7.00	1898.51	24.67
0	0	60	11.00	1788.38	22.76
0	0	62	18.00	644.24	13.61
0	0	64	7.00	3200.80	38.25
0	0	66	1.00	2680.77	32.96
0	0	68	6.00	1275.65	18.23
0	0	70	7.00	1005.24	15.81
0	0	72	9.00	1731.90	23.03
0	0	74	0.00	1812.14	24.81
0	0	76	16.00	1039.11	16.24

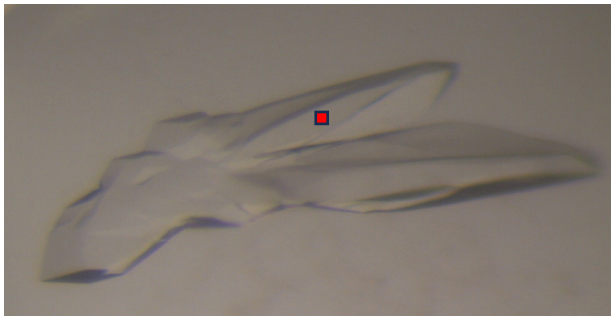
回折点を
指数付け
(indexing)
強度Iを測定する

SBRCビームラインの高度化と自動化

微小ビーム

BL-1A: 0.013 x 0.013 mm

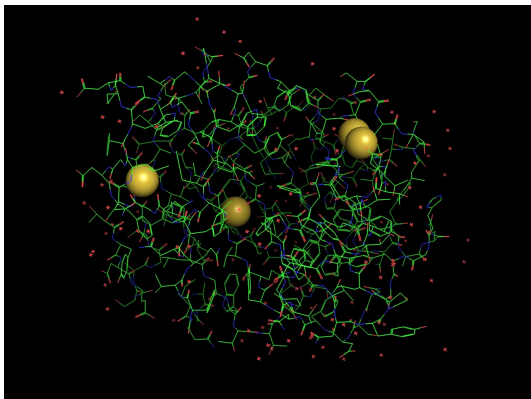
BL-17A: 0.02-0.04 x 0.016 mm



微小結晶や
Polycrystalでもデータ測定できる

長波長X線の利用

BL-1A: 2.7 - 3.3 Å; BL-17A: - 2.1 Å



S, Feなどの原子の異常分散を位相決定や原子位置の特定に用いる
タンパク質中の硫黄原子(システイン、メチオニン)、金属原子など

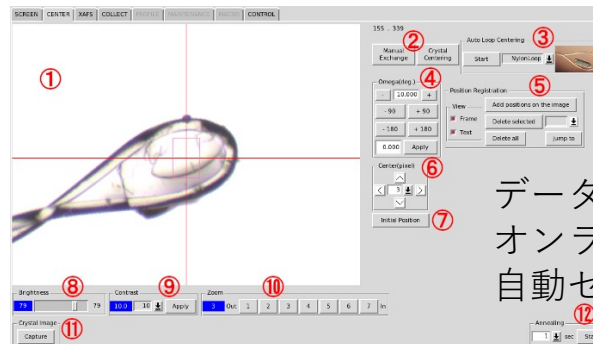
自動化：全自動測定システム

結晶交換ロボット PAM



- ・全自動測定
- ・リモート測定
- ・現地測定

いずれか選べる



データ測定システムPReMo
オンライン測定対応
自動センタリングも可能

From KEK IMSS SBRC website

SPring-8の構造生物学ビーム
ラインもハード・ソフトともに充実している

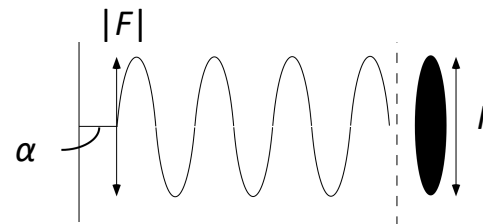
位相問題について

I (強度)から $|F|$ (構造因子)への変換 ($F^2 \propto I$)

$\bar{F}(hkl) = F(hkl)e^{i\alpha(hkl)}$ $|F|$ は測定できるが位相 α は直接に測定できない

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

$\rho(xyz)$ (電子密度)の計算には位相が必要



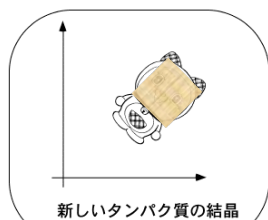
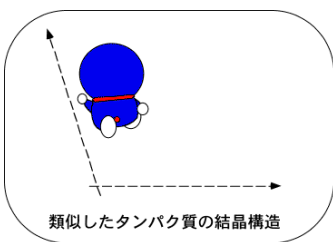
位相決定の手法

- 直接法
- 重原子同形置換法

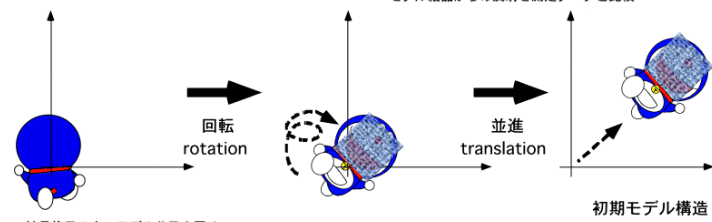
分子置換法

類似構造が必要

AlphaFold2の登場
良質な予測構造が
鋳型として使用で
きるようになった

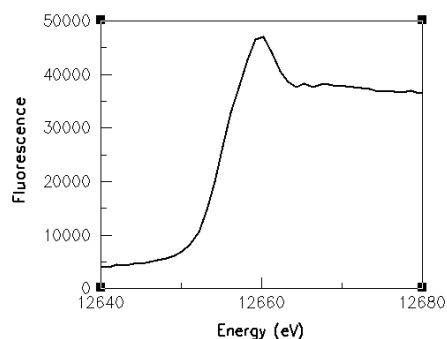


モデル結晶からの反射を測定データと比較



異常分散法

(Single-wavelength
or Multi-wavelength)
Anomalous Dispersion



SeのK吸収端=
0.9795 Å

(= 12.6578 keV)

タンパク質中のメチオニ
ンのS原子をSeにしたセ
レノメチオニンでタンパ
ク質を作る

PtのL-III吸収端 = 1.0722 Å

FeのK吸収端 = 1.7433 Å

SのK吸収端 > 5 Å

他の原子(金属、Br, Iなど)でも位相決定可能

タンパク質の結晶構造解析 データ処理と構造決定

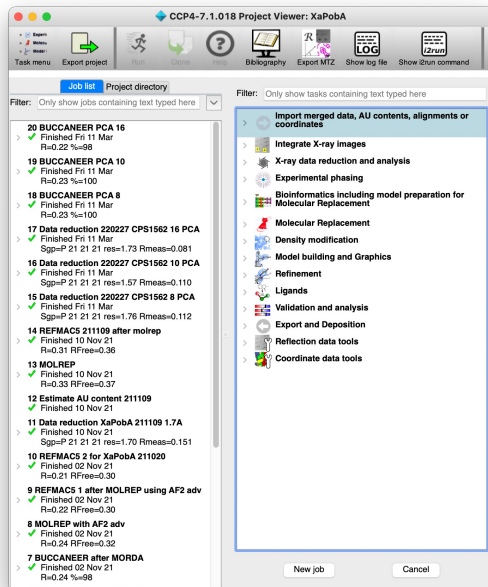
回折像から強度、構造因子を計算する：XDS, DIALS, HKL-2000/3000, iMosflm etc.

位相決定、モデル構築、精密化など最後まで：

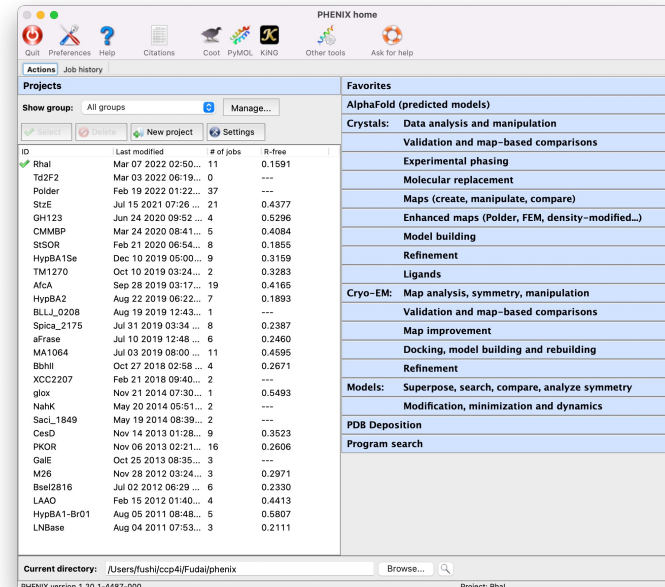
PHENIX, CCP4 (aimless, (SHELX), CRANK2, Refmac5, Coot etc.),

構造表示：PyMOL, Chimera(X) etc.

CCP4i2



PHENIX



GUIも充実している

いずれもソフトウェアとしては枯れてきていると言ってもよい

まとめ

- Photon Factoryの構造生物学ビームラインは約40年の年月を経て高度に整備され、自動化も進んでおり、分野外の人にも使いやすくなっています。SPring-8も使いやすくて強力です。
- 結晶化というハードルさえ乗り越えれば、解析ソフトウェアも充実していますので、あとはすんなり行くことが多いです。
- 結晶化しやすいタンパク質も結構あり、やってみないと分からないです。スクリーニング試薬なども豊富。
- 構造生物学ではクライオ電顕が主流になりつつありますが、結晶構造解析でないと難しいこともまだ多いです。
- 国内に優秀なタンパク質結晶構造解析の専門家が多数いますし、BINDSによる支援もありますので、ぜひチャレンジしてみてください。



創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム
Basis for Supporting Innovative Drug Discovery and Life Science Research

<https://www.binds.jp>

2ビームに対する期待

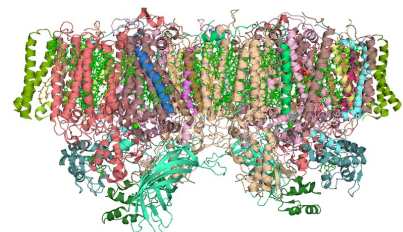
プローブ光

ポンピング光
(吸収端)
ケミカルプローブの活性化
(caged化合物、ナノ粒子等)、
化学結合の切断など

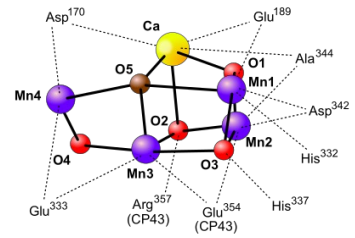
各種構造解析

Hybridリング：超高性能のシングルパスビームと
高性能・汎用のストレージビームのマルチビーム実験が可能

タンパク質の中に含まれる
金属の状態を精密に明らかにする



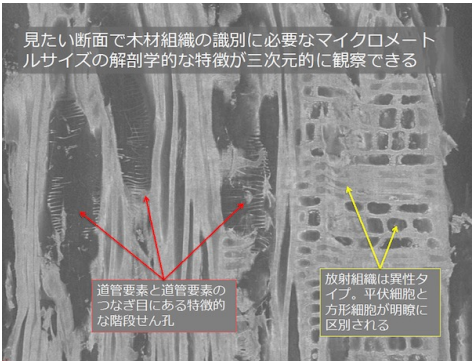
例：光化学系II
全体構造は~1.0 Å
波長のX線結晶構
造解析で



吸収端付近の
XANES, EXAFSの同
時測定で構造情報
+電子状態も解析

Pictures from Wikipedia

高分解能CTで細胞内構造を観察



例：植物細胞壁
複雑な多糖と
タンパク質(酵素)
の相互作用など

細胞内の結晶なども

軟X線を結晶中の化合物を 活性化するトリガーとして用いる

