

The 12th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2016) 会議報告

公益財団法人高輝度光科学研究センター
タンパク質結晶解析推進室 奥村 英夫

今回で12回目となった International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2016) が、2016年8月21日～24日の期間で、アメリカ合衆国カリフォルニア州メンローパークで開催された。日本ではまだまだ暑さの厳しい時期であったが、飛行機から降りたサンフランシスコでは上着があってもよいくらいの涼しさであった。サンフランシスコから南東へ約45 kmのメンローパークでは、会期中は、朝は必ず曇り、日中は快晴という日々であったが、夕方以降上着は手放せなかった。

会場となった SLAC 国立加速器研究所は、サンフランシスコからつながるカルトレイン（鉄道）のパロアルト駅から南へ下り、スタンフォード大学キャンパスを経た先に位置する。スタンフォード大学は実に広大なキャンパスをもっており、大学のランドマークであるフーバータワーや、その近くにビジターセンターがあり、ここを起点としたキャンパスツアーも行われている。また、キャンパス内にはメモリアルチャーチやコンサートホール、美術館、隣接してショッピングセンターまでもあり、先述のパロアルト駅からも出ている無料のマルガリータバスがキャンパス内で運行され、さながら一つの街の様



会場となった SLAC/Science & User Support Building

相を呈している。SLAC へはこのマルガリータバスを利用して行くこともできるが、駅からの直行便はなく、いささか遠いため、SLAC 敷地内のゲストハウスを利用することが推奨のようであった。

さて、今回の BSR2016 では、オーラル発表は SLAC 内の施設である Science & User Support Building の Panofsky Auditorium で行われた。パラレルセッションは行われず、すべてのオーラル発表がこの Panofsky Auditorium で行われた。各オーラルセッションは招待講演と一般講演で構成され、放射光や XFEL を用いた Biology 研究、また X 線と、他の測定・解析技術を複合的に利用した応用研究について講演が行われた。オーラル発表は全部で9つのセッションで構成され、セッションの最初に招待講演が行われ、引き続き一般講演が行われた。各セッションのテーマは次のとおりである。

Session 1: Membrane Proteins

Session 2: Macromolecular Complexes

Session 3: Hybrid Methods

Session 4: Bioinformatics and Computing

Session 5: Science with Upgraded SRS

Session 6: Industrial or Pharmaceutical

Applications

Session 7: X-ray/IR Imaging/SR-CDI

Session 8: Dynamics

Session 9: 7 Years of XFEL in Structural Biology

本稿では、これらの中からピックアップした、いくつかの口頭発表について報告を行う。

まず、オープニングトークでは、スタンフォード大学教授である若槻壯一氏より、BSR の歴史を中心とした講演がなされた。引き続き、RCSB PDB Director の Stephen Burley 氏、LCLS Directorate の Michael Dunne 氏、SSRL Director の Kelly Gaffney 氏より挨拶があった。

セッション1では、Membrane Proteins ということで、膜タンパク質の構造研究について6件の



Chair の若槻スタンフォード大学教授 (Panofsky Auditorium)

講演が行われた。上海科技大学 iHuman Institute の Zhi-Jie Liu 氏からは、細胞のシグナル伝達に重要であるヒト由来の G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled Receptor: GPCR) について、その構造と機能に関する研究についての講演が行われた。ヒト由来 GPCR 構造の報告数が未だ少ないのは、その発現と結晶化の効率の悪さにある。そこでヒト由来 GPCR について、発現と結晶化効率の向上を目的として、意図的に変異でジスルフィド結合を導入し、GPCR の構造を安定化させて発現させる手法の研究が紹介された。またさらに、XFEL のフェムト秒レーザーを利用するシリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX) による構造決定において、タンパク質がもつ硫黄原子の異常分散を利用する単波長異常分散法 (S-SAD 法) による位相決定の高効率化への応用と展望も紹介された。

岡山大学の沈建仁氏からは、Photosystem II の構造解析について、SPRING-8 で測定された 1.9 Å の構造、および SACLA で比較的大きな結晶で利用される fixed-target crystallography 法を用いて、無損傷測定がなされた 1.95 Å の構造が紹介された。さらに、活性中心に存在する Mn クラスタと呼ばれる構造の、反応中間状態を明らかにするために、ポンプ・プローブ法を利用し、時分割 SFX によって得られた構造について、電子伝達経路などの詳細説明がなされた。

セッション 2 の Macromolecular Complexes では、タンパク質複合体について 6 つの講演がなされた。東京大学の濡木理氏からは、ゲノム編集ツール

として注目されている Cas9 タンパク質および Cpf1 タンパク質の構造解析とその機能について報告がなされた。先に報告された Cas9 では、2 本のガイド RNA と結合し、ガイド RNA の一部と相補的な 2 本鎖 DNA を見つけ出して狙った場所を切断するが、Cpf1 では 1 本鎖のガイド RNA と結合し、切断された末端が Cas9 の時のそれとは異なる切り口となることを、その構造解析の結果から説明がなされた。

セッション 3 の Hybrid Methods では、X 線/ニュートロン結晶学、電子顕微鏡単粒子解析、ラマン/吸収分光、表面プラズモン共鳴 (SPR) など複数の手法を複合的に用いることで、構造と機能をより詳細に研究する手法に主眼が置かれ、7 つの講演がなされた。University of Essex の Michael A. Hough 氏より、X 線結晶構造解析と単結晶分光測定を組み合わせた測定法について紹介がなされた。タンパク質の酸化還元状態や基質の結合状態を正確に見積もるためには、X 線回折測定中に分光測定による状態評価が有効であり、また溶液状態のデータと比較し、反応中間状態の特定も可能となる。本発表では X 線構造解析と分光測定により、ヘムタンパク質の温度依存性による構造と状態変化を捕捉した例や、銅結合タンパク質において、X 線照射により結合部位近傍が連続的に変化する様子の、温度による違いを、動画として再構成させた解析例の紹介がなされた。

セッション 4 の Bioinformatics and Computing では、解析計算法やバイオインフォマティクスによる classification について 6 つの講演がなされた。University College London の Christine Orengo 氏からは、CATH FunFams と呼ばれる、新しいタンパク質構造の分類法について紹介がなされた。アミノ酸配列・構造などにクラスタリングを適用して、分類が行われるのが CATH データベースであるが、新しい手法では、この CATH の各スーパーファミリーに、隠れマルコフモデルと呼ばれる解析手法を適用し、タンパク質の機能をベースとするクラスタリングを行うということであった。これにより、10,000 種の類似構造・機能をもつ分類 (CATH FunFams) が同定され、例えば、CATH FunFams で見出される保存された側鎖により、同じクラスターの構造で活性部位が特定できるとのことであった。

University of Liverpool の Dan Rigden 氏からは、分子置換法による解析が適用できない場合に、バイ

オインフォマティクスによって解を得るソフトウェアの開発が紹介された。本手法では AMPLE と呼ばれるソフトにより、目的のタンパク質のうち、小さい部分構造に対し、全体としては一致度が低くても部分的に類似している構造コアを見つけて部分置換を行うことで計算の成功率を上げる。AMPLE で試してみると良い目的タンパク質としては、あまり大きすぎない新規構造のもの、コイルドコイル構造をもつもの、既存の分子置換法が効かない複数の類似構造をもつものなどが挙げられるとのことであった。

セッション5の Science with Upgraded SRS では、放射光施設のアップグレードについて5つの講演がなされた。このうち、MAX IV Laboratory の Marjolein Thunnissen 氏からは、現在コミッショニング中の MAX IV について、現状とそのスペックの紹介がなされた。MAX IV は1.5 GeV と3 GeV のストレージリングから成り、3 GeV リングでは19本のビームラインが建設されている。Biology 関連のビームラインとして、多目的 SAXS のための CoSAXS beamline、2.4~40 keV のエネルギーに対応し、多様な核種が利用可能な (Bio)XAS/XES 測定用の Balder beamline、100 フェムト秒パルスを出す FemtoMAX、ハイスループット回折データ測定を目的とした BioMAX が説明された。

Northwestern University の Gayle Woloschak 氏からは、APS における X 線蛍光イメージング技術向上の試みについて報告がなされた。この分野では、ナノ粒子で修飾した生物試料（細胞、オルガネラ、細胞内外の分子）に対し、フォーカスした X 線で走査することにより、試料内での粒子の分布をモニタリングする技術が向上しているとのことであった。その研究例として、がん細胞の一種であるヒラ細胞に対し、Ti、Fe、Zn を導入し、異なるフォーカスサイズのビームを用いることで細胞の形状から、細胞内のナノ粒子の局在までスケールをまたがって観察される様子が示された。

セッション7の X-ray/IR Imaging/SR-CDI では、6つの講演がなされた。このうち、Paul Scherrer Institute の Andreas Menzel 氏より、X 線タイコグラフィーを利用した X 線イメージング研究の紹介がなされた。X 線タイコグラフィーはレンズを用いないイメージング技術であるコヒーレント X 線回折イメージング (Coherent X-ray Diffraction Imaging: CXDI) の1つとして分類され、走査型

CXDI とも呼ばれている。実施例として凍結した酵母細胞の3D密度マップが150 nm分解能で示され、脂質、でんぷん質、細胞質などが可視化されていた。3D再構成はビームタイム中にすぐさま可能であり、フィードバックをかけることができるとのことである。また、放射線損傷の激しい試料に対応するため、OMNY と名付けられたクライオ環境で測定するための装置の開発が紹介され、マウス脳のクライオタイコグラフィーによるトモグラフ像の再構成の成功例が紹介された。

セッション8の Dynamics では、反応のメカニズムや時間依存の構造変化などに着目した6つの演題が講演された。このうち、University of Wisconsin の Marius Schmidt 氏より、LCLS を利用した、Photoactive Yellow Protein (PYP) の時分割 SFX について報告がなされた。Gas Dynamic Virtual Nozzle と呼ばれる装置で微結晶をインジェクションし、140 フェムト秒のパルスレーザーで励起、40 フェムト秒の X 線をプローブとしてデータを収集した結果、暗状態から励起状態 (250 フェムト秒)、PYP の発色団であるクマル酸のトランス体からシス体への異性化 (800 フェムト秒)、その後の熱的变化過程 (3~100 ピコ秒)、化学的变化過程 (1.7 ナノ秒~100 マイクロ秒)、そして元の暗状態へと反応の全過程を観測することに成功したことが説明された。本研究結果からさらに発展し、光感受性タンパク質のみならず、酵素の触媒反応への応用が期待される。

セッション9の7 Years of XFEL in Structural Biology では、XFEL が利用開始されてからの構造生物学の発展に着目し、7つの講演がなされた。University of Gothenburg の Richard Neutze 氏からは、理研 SPring-8 センターの南後氏らとの共同研究により、SACLA で測定が行われた、光受容プロトンポンプタンパク質であるバクテリオロドプシンの時分割 SFX について報告された。LCP インジェクターで導入される bR 微結晶にポンプレーザーを照射し、フェムト秒 X 線レーザーでデータを収集した結果、初期反応の中間体である K 中間体構造をとる16ナノ秒から M2 中間体をとる1,725 マイクロ秒までの時間スケールで構造解析に成功している。これにより、プロトン輸送反応の起点であるレチナル発色団近傍のリアルタイムでの構造変化が明らかとなり、プロトンの受け渡しをするシッフ塩

基の pKa 値の変化を示唆する構造変化と、その近傍に位置する水分子の重要性が明らかとなった。

Max Planck Institute for Medical Research の Ilme Schlichting 氏からは、SFX における位相計算の問題について紹介がなされた。ランダムな方位の微結晶に1回だけ X 線パルスを照射、破壊することを繰り返す SFX の手法では、データの完全性を高めるために数多くのイメージデータを必要とする。位相決定のためには精度の高いデータが要求されるが、計算手法の発展とともに、必要となるイメージの数は減少してきた。2014年にはガドリニウムを結合させたりゾチームの構造解析での位相計算に60,000枚もの回折イメージを必要としていたが、2016年には7,000枚のイメージから位相決定することに成功している。一方、重原子導入を必要としない S-SAD 法ではりゾチームで150,000枚のイメージを必要としており、現実的には低い異常分散シグナルが問題となっている。問題解決方法としては、解析技術の向上に合わせ、XFEL にて2波長データを同時に測定できる dual color mode 運転が考えられ、これにより少ないイメージで多波長異常分散法 (MAD 法) による位相決定が可能となった。

次回の BSR は、3年後の2019年に中国・上海にて、上海科技大学 iHuman Institute のオーガナイズで開催されるとのことである。

奥村 英夫 *OKUMURA Hideo*

(公財)高輝度光科学研究センター タンパク質結晶解析推進室
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1-1-1
TEL : 0791-58-0833
e-mail : okumurah@spring8.or.jp