

## 11月28日(土) 通常講演2 (15:30~17:15)

### 15:30~17:15 オーラルセッション (C会場)

#### 14:50~15:00 接続テスト

15:30~16:00 座長：平田 邦生 (理化学研究所)

OC-II-01 PFタンパク質結晶構造解析ビームラインにおける全自動測定、およびリモート実験の現状

○山田悠介・篠田晃・松垣直宏・引田理英・平木雅彦・千田俊哉

(KEK PF/SBRC・総研大・KEK機械工学センター)

OC-II-02 深紫外レーザーによる結晶加工技術のnative SAD位相決定への応用

○松垣直宏・引田理英・山田悠介・千田美紀・千田俊哉 (高エネ機構物構研構造生物学研究センター)

#### 16:00~16:15 接続テスト

16:15~17:15 座長：山田 悠介 (高エネルギー加速器研究機構)

OC-II-03 SPring-8共用タンパク質結晶回折ビームラインの現状

○馬場清喜・長谷川和也・水野伸宏・奥村英夫・河村高志・村上博則・仲村勇樹・増永拓也・熊坂崇 (JASRI)

OC-II-04 SPring-8におけるタンパク質結晶自動凍結装置の開発

○平田邦生・小林周・松浦滉明・坂井直樹・山本雅貴 (理研RSC)

OC-II-05 X線結晶構造解析による構造多型の同定を目指した自動構造解析パイプラインNABEシステムの開発

○松浦滉明・坂井直樹・河野能顕・平田邦生・山本雅貴 (理研RSC)

OC-II-06 SPring-8におけるリガンドスクリーニングパイプラインの開発

○坂井直樹・松浦滉明・平田邦生・山本雅貴 (理研放射光科学研究センター)

## OC-II-01

### PF タンパク質結晶構造解析ビームラインにおける全自動測定、 およびリモート実験の現状

○山田悠介<sup>1,2</sup>、篠田晃<sup>1</sup>、松垣直宏<sup>1,2</sup>、引田理英<sup>1,2</sup>、平木雅彦<sup>3</sup>、  
千田俊哉<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>KEK PF/SBRC・<sup>2</sup>総研大・<sup>3</sup>KEK 機械工学センター)

茨城県つくば市にある放射光施設フォトンファクトリー(PF)には5本のタンパク質結晶構造解析ビームラインがあり、学術研究や民間企業による研究に利用されている。各ビームラインが特色を持つことで多様なタンパク質結晶構造解析実験をカバーする一方で、全てのビームラインが結晶交換ロボットを備え、同一のソフトウェアで制御されるなど、利用者の使用感は統一されている。ビームラインの測定技術開発は継続して続けられ、現在では全てのビームラインにおいて全自動測定やリモート実験が可能となっている。

PF タンパク質結晶構造解析ビームラインにおける実験の全自動化、およびリモート化はこれまでも段階的に進めてきたが、新型コロナウイルス感染症拡大の影響もありその重要性・必要性が2020年度一層高まった。そこでビームラインの運用体制を見直し、全ての実験課題に

おいて全自動測定やリモート実験を利用者が必要に応じて選択できるよう制度変更を行った。2020年6月の運転では政府の緊急事態解除宣言直後ということもあり、多くの利用者が全自動測定およびリモート実験を選択した(表)。

本発表では、現在のPFタンパク質結晶構造解析ビームラインにおける全自動測定とリモート実験についての現状と、今後の開発計画について紹介する。

	学術利用 1 shift = 8 h	企業利用 1 shift = 4 h
全自動測定	36	38
リモート実験	18	11
来訪実験	8	3

表. 2020年6月の運転における各実験様式のシフト数

## OC-II-02

### 深紫外レーザーによる結晶加工技術の native SAD 位相決定への応用

○松垣直宏、引田理英、山田悠介、千田美紀、千田俊哉  
(高エネ機構 物構研 構造生物学研究センター)

深紫外レーザーによる ablation 効果を利用した試料の加工技術[1]により、凍結タンパク質結晶試料に一般的に存在する周辺溶媒部分の除去、およびタンパク質結晶自体の形状加工が可能である。回折実験において試料の不要部分を取り除くことは、データの S/N を向上させるとともに X 線吸収誤差の低減につながる。これは特に吸収の影響が問題になる低エネルギー X 線 (5keV 程度以下) を利用した測定で重要となる。

Native SAD (Single Anomalous Dispersion) 法は、試料中のタンパク質に自然に含まれているイオウなど軽原子の異常分散シグナルを利用して位相決定を行う結晶構造解析の手法である。回折実験では軽原子からの異常散乱効果が大きくなる低エネルギー X 線を利用することが必須であるが、試料を最適に加工することで高精度データを得、より高難度なターゲットへの適用が可能となる[2]。我々は低エネルギー X 線に最適化されたビームライン (KEK-PF BL-1A) において、

4.6keV の X 線と試料加工技術を用いた Native SAD 位相決定を行ってきた。本発表ではその現状を報告するとともに、位相決定可能な条件や限界についても述べたい。

本レーザー加工技術は、凍結されたタンパク質結晶試料に対して誰でも使用できる一般的な技術である。装置のある KEK キャンパスに来訪せず、試料を郵送し遠隔から試料加工と回折実験を行うことが可能である。発表ではレーザー加工装置の高度化やユーザー利用環境についても報告する。

[1] Kitano H. et al., Jpn. J. Appl. Phys. 44 No.2 (2005)

[2] Basu S. et al, IUCr Journal 2019 6, 373–386

## OC-II-03

### SPring-8 共用タンパク質結晶回折ビームラインの現状

○馬場清喜，長谷川和也，水野伸宏，奥村英夫，河村高志，  
村上博則，仲村勇樹，増永拓也，熊坂崇  
(JASRI)

近年、タンパク質結晶解析における放射光利用者のニーズは、迅速化効率化を求めた回折測定 of 自動測定や遠隔測定、解析の自動処理と、微小結晶測定や超高分解能構造決定など、高難度解析への拡張が求められており、SPring-8 では高性能化を進めている。さらに、多様な構造情報を得るための手法開発など、種々の取り組みを進めている。本発表では、JASRI が維持管理・ユーザー支援を行う BL41XU、BL45XU、共用枠のユーザー支援を行う理研ビームライン BL26B1 で行っているビームライン高性能化と試料調製環境整備について報告する。

・BL45XU: 高強度ビームを利用した結晶回折実験の自動化高効率化を目的とする共用アンジュレータビームライン(ID-BL)。 (1) 多軸ロボットを用いた大容量サンプルカセットストック・交換システムの構築と連続自動運転および運用の改善。(2) 新遠隔測定システムの運用を開始。(3) 自動化されたプレート回折実験システム構築。

・BL41XU: 高強度ビームを利用し、ルーチンにのりにくい測定・汎用性の低い測定に対応する共用 ID-BL。(1) 高エネルギーX線 (20~35 keV) を利用した測定環境の整備・高性能化。(2) 生理条件下での構造多様性解析・時分割実験環境の構築。(3) 新遠隔実験システムの導入。

・BL26B1: 偏向電磁石 BL。その自由度を活かし、室温測定や汎用的な高分解能測定などに対応する。(1) 分光器への非対称結晶の導入、キャピラリーレンズ集光系を利用した X 線の高強度化/高集光化による X 線波長範囲の拡大(6.9~16.5 keV)。(2) HAG を用いた室温(4-20°C)での回折実験環境の構築。(3) 結晶化プレート回折測定システムの構築。(4) 顕微分光測定システムの開発。

・試料調製環境：課題採択者等に対して、試料調製、結晶化ロボットおよび結晶観察装置の利用環境を提供している。

## OC-II-04

### SPring-8 におけるタンパク質結晶自動凍結装置の開発

○平田邦生、小林周、松浦滉明、坂井直樹、山本雅貴

(理化学研究所放射光科学研究センター)

SPring-8 の理研ターゲットタンパク質ビームライン BL32XU ではこれまでマイクロオーダーの高フラックス微小ビームをフル活用し、高難度試料からの高分解能回折データ収集を実現してきた。さらに最近開発した自動データ収集システム ZOO により、全自動データ測定・自動データ処理を実現した。このシステムを利用してコロナ禍においても SPring-8 MX-BL (BL32XU, BL45XU, BL41XU) では、回折データ測定のユーザ実験をいち早く再開させることができた (5月末)。

自動測定により効率化されたタンパク質結晶構造解析をさらに加速させるためには、結晶をプレートから取り出して凍結する工程をも無人化・自動化することが必須と考え、協働ロボット (Universal Robot 社 UR3e) を利用した自動結晶凍結ロボットの開発を開始した。

現在までに、結晶ループをアーム先端に取り付けて UniPuck のウェル番号を指定後 GUI ボタンを押せば、1)

ループ写真を撮像、2) 結晶を液体窒素中で凍結、3) 所定のウェルにピンを装填、4) アーム先端の除霜、5) 結晶受け取り位置に戻る、までを実現した。

協働ロボットは 6 軸アームの関節部のトルクセンサで先端ツールにかかる力を正確に感じることができるため、UniPuck の基準位置に対するアーム先端の相対位置を自動決定したり、ピンを UniPuck のウェルに一定の力で押し当てながらアームを引き抜くなどの人の手仕事と同等の複雑な作業も実現できる。顕微鏡カメラの画像解析を組み合わせることでさらに高度な連携も実装可能となった。

次のステップでは Molecular Dimensions 社製 Diffrax プレート (フィルムサンドイッチプレート) (96 well) の LCP 結晶を打ち抜きパンチ (AOMUSHI) により 1 ウェルまるごと切り出して、ホルダーに取り付けて凍結するまでの自動化を目指している。

## OC-II-05

### X線結晶構造解析による構造多型の同定を目指した 自動構造解析パイプライン NABE システムの開発

○松浦滉明、坂井直樹、河野能顕、平田邦生、山本雅貴  
(理化学研究所放射光科学研究センター)

タンパク質の構造決定において、X線結晶構造解析法は依然、中心的な役割を担っている。SPring-8 タンパク質構造解析ビームラインでは、全自動データ収集システム ZOO や自動データ処理プログラム KAMO の開発により、手動測定では困難な、大量の結晶を利用した構造決定が可能になった。特に BL32XU では、マイクロフォーカスビームを利用し、従前、解析が困難であった膜タンパク質の構造決定を次々と可能にしてきた。

我々は、構造生物学研究をさらに加速するべく、ZOO や KAMO で収集・処理したデータに対して、分子置換を行い、電子密度マップの一覧を表示する、自動構造解析パイプライン NABE システムの開発を開始した。全自動収集によって得られた大量のデータを電子密度マップに変換し、Web ブラウザ上に指定した領域の三次元構造を一覧表示することにより、リガンドや構造変化の有無

などを一望できるようになった。NABE システムを小スケールの化合物スクリーニングに試験的に適用したところ、データ収集後、迅速なフィードバックが可能であり、SBDD のさらなる加速化が期待できた。

さらに NABE システムでは単なる構造決定にとどまらず、構造多型を同定することを目指している。複数の結晶を利用した構造解析やヘリカルデータ収集では、結晶間や結晶内の同型性が少なからず疑問視されていた。一方で、適切なクラスタリングにより同型なものを分類すれば構造多型を同定し、ダイナミクス理解につなげられる可能性もある。

本講演では、NABE システムの概要や、試験的な利用の結果をもとに、「単一の結晶」ではなく、「複数の結晶」を利用した、X線結晶構造解析の新たな展開について紹介したい。

## OC-II-06

### SPring-8 におけるリガンドスクリーニングパイプラインの開発

○坂井直樹、松浦滉明、平田邦生、山本雅貴

(理化学研究所放射光科学研究センター)

標的タンパク質とリガンドの結合情報は新規の薬剤候補化合物のデザインにとって重要な手がかりとなる。新規な化合物のデザインのため、構造の多様性を有する低分子量のリガンド（フラグメント）のライブラリーを用いたスクリーニングにより結合するフラグメントを見つけるとともにリガンドの相互作用様式に関する立体構造情報を取得する **Fragment-Based Drug Discovery (FBDD)** は一つの有力な手法である。FBDD の実施においては数百種類の異なるフラグメントを導入した標的タンパク質の結晶の X 線結晶構造解析が必要となる。各化合物を導入した結晶の数に冗長性を持たせる場合その数は数千にせまる。

このような大量の結晶に数百種類のフラグメントを導入するためにアコースティック分注装置 **Echo 650** を用いたフラグメントソーキングの系の立ち上げを行った。標準試料として **trypsin** を用いた実験ではシッティング

ドロップ蒸気拡散法により結晶成長させたドロップ（150 - 200 nL）に対して 5 - 10 %の体積の高濃度フラグメント溶液を非接触で添加し、結晶へ化合物を導入した。8 種類のテスト化合物の導入は 1 分以内で完了し、その後各 4 個の結晶をマニュアルで拾って抗凍結処理を行い **UniPuck** へ装填した。

自動データ収集システム **ZOO** および自動データ処理パイプライン **KAMO** によりデータ収集、データ処理を行い、開発中の自動構造解析パイプライン **NABE** により自動的にリガンド結合部位の電子密度を解析した。

**SPring-8** では将来のユーザーへの供用を見すえ、上述の自動化システム群に加えて現在開発中の協働ロボットを用いた結晶回収と凍結工程の自動化の技術要素を組み込み、リガンドスクリーニングパイプラインの完全自動化を目指した開発を実施している。