

事後評価報告書（日英研究交流）

1. 研究課題名：放射光を用いた膜蛋白質結晶構造解析の基盤技術開発

2. 研究代表者名：

2-1. 日本側研究代表者：若槻 壮市（大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所、教授）

2-2. 英国側研究代表者：岩田 想（Imperial College London &研究統括担当）

総合評価：（良）

3. 研究交流実施内容及び成果：

本研究交流では、膜蛋白質結晶化技術の研究交流、及び、膜蛋白質に特化したビームラインの高度化の研究交流を目的とする。具体的には、

- ・次期構造ゲノミクス・プロテオミクス研究の基盤整備の一環として、膜蛋白質結晶構造解析の高度化のための基盤技術を開発する。

- ・低エネルギー領域（6 keV 以下）に特化したビームライン、マイクロフォーカスビームライン、結晶交換ロボットの互換性に関する共同研究を行い、微小結晶しか得られない不安定な膜蛋白質の結晶構造解析を最大限に成功させうる技術を集結する。

研究成果としては以下のとおり。

(1) 日本側の成果

①膜蛋白質結晶化技術の開発

英国側研究代表者の研究室で開発された GFP(green fluorescent protein)を用いた迅速な膜蛋白質発現のスクリーニング技術を利用して、日本から持参した3種類の膜蛋白質について発現条件の検討を行った。酵母のゴルジ体局在膜蛋白質 Rerlp については結晶化にもちこめるだけの量のサンプルを精製することができた。ヒトの POMT1、POMT2 については、発現が確認できた。その後日本側の実験環境を整備し、様々な膜蛋白質の発現・精製実験を行った。

②.ビームラインの高度化

a. 低エネルギー領域（6 keV 以下）に特化したビームラインに関する技術的困難を克服するための技術開発

本研究交流期間中一貫して、低エネルギーX線に最適化した測定プロトコルの開発、回折計の改良、試料雰囲気をより散乱の少ないヘリウムに置換する He 置換システムの開発を行った。現在評価実験を実施中。

b. マイクロフォーカスビームラインにおける微小結晶に対応した回折計と可視化技術の開発

マイクロフォーカスビームを回折計上の微小結晶に的確に照射するためのフィードバックシステムを開発した。微小結晶の可視化技術として、大面積の発光面をもつ照射装置をとり入れた微小試料アライメントシステムを開発した。これは実用化されており、本システムから得られる鮮明な試料像は自動試料認識機能の成功率の飛躍的な向上につながっている。

c. 現在日本側と英国側で互換性のない結晶交換ロボットの互換性を克服する技術開発

ビームラインが稼働中でも結晶交換ロボットに関する技術開発が行えるよう、技術開発用の結晶交換ロボットを開発した。英国で用いられている SPINE 規格のクライオピンを格納できるカセットの開発を行い、試作カセットを用いてテストを行った。また、英国側 Diamond 放射光施設と同様に Uni-Puck を取り扱えるようソフトウェアの改造を行っている。

(2) 英国側の成果

①膜蛋白質結晶化技術の開発

Diamond 放射光施設では、日本側の大規模結晶化ロボットや高エネ研の構造生物学研究室の状況なども参考に、2008年9月に Membrane Protein Lab が立ち上がった。

GFP を用いた迅速な膜蛋白質発現の新規スクリーニング技術について、論文が米国アカデミー紀要に掲載された。この中に日本から持参した Rerlp のデータも含まれている。GFP を用いた新規技術を利用した成果が6本の論文として出版された。

②ビームラインの高度化

Diamond 放射光施設では、マイクロフォーカスビームライン I24 が稼働を初めている。また、低エネルギーX線に特化した蛋白質結晶構造解析用ビームラインを設置することで具体的な検討に入っている。

Diamond 放射光施設ですでに稼働しているビームライン IO2、IO3、IO4で、米国 SSRL が開発した Uni-Puck というカセットを取り扱えるよう改造を行った。ビームライン I24 に設置予定の結晶交換ロボットは、CATS に決定した。CATS は SPINE 規格のクライオピンを扱えるだけでなく、PAM で扱っているカセットに対応することが可能となる。

今後期待される効果

・ 科学技術進展の面から

今回英国側から日本側チームにもたらされた GFP を用いたスクリーニング法により、発現と精製を GFP の蛍光でモニターできるようになった。もし GFP 融合蛋白質のまま結晶化できれば、結晶観察、結晶ハンドリングを含めたあらゆる段階で実験操作がさらに容易になる。現在日本側チームでは、GFP 融合膜蛋白質のまま結晶化するための技術を開発している。この技術

が完成すればマイクロフォーカスビームラインにおける微小結晶の可視化にも応用できることが期待できる。

- ・ 社会・産業への波及効果の面から

新薬開発において重要な役割を果たすことが期待されているビームラインの開発にあたっては、本課題で開発を続けてきたビーム位置の安定化システムや、結晶可視化技術などが実用化されており、試料のハイスループットスクリーニングが可能となっている。

4. 事後評価結果

4-1. 総合評価

膜タンパク質の結晶構造研究で実績のある英国グループと、シンクロトロン放射 X 線のビームラインの建設や維持、可溶性タンパク質の構造研究の日本グループとの研究交流事業であり、膜タンパク質の発現・精製・結晶化技術と、膜タンパク質に特化したビームラインの高度化、具体的には長波長 X 線のビームライン、微結晶用のマイクロフォーカスビームライン、ならびに結晶交換ロボットの互換性について研究交流を行うものである。これらの交流は、主に日本側の英国訪問で計画されており、実際、そのように実行された。シンポジウムやワークショップなどの開催はなかった。日本側には、膜タンパク質の発現・精製の技術が導入されるとともに、ビームラインの高度化が進んだ。技術に関する情報交換が高度化にどのように生かされたのかは、本報告書では詳らかではない。実際、年次報告も最終報告もごく簡素のものでしかない。しかし、本事業により双方の膜タンパク質を標的としたビームライン建設や高度化が進化したと認められる点は評価できる。英国側代表者の岩田教授は平成17年度後半から ERATO プロジェクトを日本と英国で実施しているので、日本国内でも研究交流が可能ではなかったのか。また研究代表者（若槻）はターゲット蛋白質研究プロジェクトとして平成19年度よりほぼ同内容のビームライン高度化研究資金を受けているので、それが開始されてからは本事業と重複があったのではないかと、との疑問が残るが、これらについての明確な説明がなかったのは残念である。

4-2. 研究交流の有効性

ビームラインの高度化では、マイクロフォーカスビームラインでは照射焦点制御や微小結晶の可視化、あるいは結晶交換の互換性での改良が、低エネルギー（長波長）X 線の利用では He ガスによる散乱バックグラウンドの抑制が試みられた。これらのビームライン改良に、どのように交流の成果が生かされたか、あるいは、交流が必要であったかの具体的な記述がないので、交流の有効性という観点からは評価が困難である点は問題である。

ビームラインスタッフ等の若手研究者の派遣がなされており、将来の研究交流につながる人材の育成がなされている。

膜蛋白質結晶に特化したビームライン（実は、膜蛋白質結晶に特化した技術開発ではなく、低回折

能結晶・脆弱結晶・微小結晶に特化した技術開発)は, 膜蛋白質結晶のみならず, 種々の問題を抱える結晶への適用が考えられるので, 必然的に, 積極的な交流が深まるであろうと期待できる。

4-3. 当初目標の達成度

申請時には最終年度にセミナーを開催する計画であったが, それを含め, ワークショップ等の開催は全くおこなわれなかった。

ほとんど一方的な訪問による交流であったが, 日本側としては, 当初の目的を達成できる十分な派遣がなされた