

## 構造生物ビームライン試料交換システムの現状 Current Status of Sample Exchange System at Structural Biology Beamlines

平木雅彦<sup>1,2</sup>、山田悠介<sup>2,3</sup>、松垣直宏<sup>2,3</sup>、千田俊哉<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>KEK 機械工学センター、<sup>2</sup>総研大、<sup>3</sup>KEK 構造生物学研究センター

フォトンファクトリーの構造生物ビームライン BL-1A、BL-5A、BL-17A、AR-NW12A、AR-NE3A には、ビームタイムの効率的利用、リモート実験、全自動実験を目的として、試料交換システムが設置されている。本発表ではこれらの試料交換システムおよび、BL-1A 下流に設置されている実験前準備のためのキャビン(Cabin01)に設置したオフライン試料交換システムの現状について述べる。

BL-1A は低エネルギー実験を効率的に行うために、試料回転軸や検出器をヘリウムチャンバー内に設置している。そのためヘリウムチャンバー側面の開口部から試料を交換できる新たな試料交換システム PAM-HC を開発し、2014 年からユーザー運転に供している。2015 年夏期シャットダウン中にキャリブレーション法を見直し、安定運転を実現した。

BL-17A ではビームラインの大改造に伴い、試料交換システムの配置の検討を行い、新しいビームラインに合うように改造を行った。

Cabin01 には、オフラインの試料交換システムを準備した。ビームタイム前に試料の準備に用いられる他、液体窒素を使った試料交換システムのテスト実験、ソフトウェア開発等にも用いている。

全試料交換システムに共通した点としては、トンク乾燥時間を短縮するために新たな乾燥システムの開発を進めており、乾燥途中の水滴を吹き飛ばす装置を実装中である。

本研究の一部は、文部科学省、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、国立研究開発法人日本医療研究開発機構の創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業(創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業)の支援により行われた。

## 構造生物学ビームライン BL-17A の高度化 Upgrade of a macromolecular crystallography beamline, BL-17A

山田悠介<sup>1)</sup>、松岡亜依<sup>1)</sup>、小山篤<sup>1)</sup>、平木雅彦<sup>2)</sup>、松垣直宏<sup>1)</sup>、千田俊哉<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>高エネ機構・物構研・フotonファクトリー

<sup>2)</sup>高エネ機構・共通基盤・機械工学センター

BL-17A は高エネ機構フotonファクトリー初のマイクロビームが利用可能な構造生物学ビームラインとして平成 18 年からユーザー利用が開始されてきた。しかしながら構造解析の対象はより複雑で結晶化が困難なものへとシフトしており、より小さなX線ビームが求められる最近の構造生物学研究においてその競争力の低下は否めず、ユーザーからも更なる高輝度化が求められ、平成 26 年度にビームラインの高度化を実施した。高度化は、(1)第二集光装置の追加などの光学系レイアウト変更による試料位置のビームの更なる微小化、(2)より安定かつ多機能な回折計の導入、(3)大型ピクセルアレイ型検出器の導入、という3つの項目を中心に行った。高度化作業完了後、平成 27 年 5 月からの 1 か月間のコミッショニングを経て、平成 27 年 6 月からユーザー利用を開始した。

光学系の高度化の結果、試料位置のビームサイズをこれまでの  $250 \times 50 \mu\text{m}^2$  から  $80 \times 16 \mu\text{m}^2$  まで縮小することが出来た。鉛直方向のビームサイズはレイトレースシミュレーションで得られた  $8 \mu\text{m}$  に比べて 2 倍の大きさであるが、これは二結晶分光器をはじめとする光学系、および回折計の振動の影響であると考えられる。仮想光源スリットでビーム成形を行うことで試料位置のビームサイズをさらに縮小することが可能であり、2015 年 12 月の時点では水平方向は  $40 \sim 20 \mu\text{m}$  の間の任意のサイズをユーザーが選択できるようにしている。鉛直方向については長時間のビーム位置のドリフトが原因で  $16 \mu\text{m}$  以下のサイズに変更することが出来なかった。このドリフトの問題については仮想光源位置でのビーム位置フィードバックを実施することで解消することが出来ると考えている。

新規回折計の導入により、クライオランプを用いた通常の回折実験の他、結晶化プレートを用いて結晶化ドロップ中の結晶に直接 X 線を照射し回折データを取得することが可能となった。多くのユーザーは与えられたビームタイムの中で、クライオランプによる実験と結晶化プレートによる実験を交互に行うことが想定されるため、この実験の切り替えがソフトウェアにより制御できるようになっている。2015 年 10 月より、結晶化プレートを用いた回折実験のユーザー利用を開始した。

## 歯周病菌由来 DPP11 の構造生物学的研究 Structure and function of PgDPP11.

六本木沙織<sup>1</sup>、鈴木義之<sup>2</sup>、田仲広明<sup>3</sup>、伊中浩治<sup>4</sup>、太田和敬<sup>5</sup>、山田貢<sup>5</sup>、小笠原渉<sup>2</sup>、田中信忠<sup>6</sup>、野中孝昌<sup>1</sup>、阪本泰光<sup>1</sup> 1 岩手医大薬、2 長岡技大工、3 コンフォーカルサイエンス、4 丸和栄養食品、5 JAXA、6 昭和大薬

【背景】歯周病は、人類最大の感染症であり成人の8割が感染しているとされる。歯周病は、死に至る疾患ではないが歯の主な喪失原因であり、歯の喪失は、高齢者の第一の死因とされる肺炎を引き起こす一因ともなっている。歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* は、糖や炭水化物ではなくタンパク質やペプチドを栄養源とする糖非発酵性グラム陰性細菌(NFGNR)である。これら、NFGNR の内膜は、アミノ酸単体ではなく、ジペプチドを選択的にと輸送するため、ペリプラズムでジペプチドを産生するジペプチジルペプチダーゼ(DPP)が、その増殖や生育に重要である。微生物 DPP は、Clan SC S9 と Clan PA S46 の二つのファミリーに分類され、Clan PA S46 ファミリーの DPP は微生物のみに存在する。Clan PA S46 ファミリーに属する歯周病菌由来 DPP11 は歯周病菌における主要な酸性アミノ酸ジペプチド産生酵素で、歯周病菌の増殖だけでなく、細胞障害性単鎖脂肪酸の産生にも関与する<sup>1</sup>。本研究では、微生物 DPP の構造生物学的研究を通じて NFGNR のペプチド代謝機構の解明とその応用を目指している。

【方法】歯周病原菌 *P. gingivalis* 由来 DPP11(PgDPP11)の大量発現系の構築と精製、微小重力下での結晶化、放射光施設での X 線回折データ収集、構造解析を行った。また、DPP11 と同様に Clan PA S46 ファミリーに属する DAP BII に関して、DPP11 化変異体 DAP BII(G675R)と基質との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

【結果および考察】我々は PgDPP11 の結晶構造を 1.66Å 分解能で決定した。PgDPP11 は DAP BII と同様に、触媒三残基を含むダブルβバレルドメインと、Clan PA S46 ファミリーの酵素に特有のαヘリカルドメインを有していた。また、PgDPP11 S1 ポケットの Arg673 が基質の酸性アミノ酸を認識することが示唆された<sup>2</sup>。現在、得られた構造情報に基づいたインシリコスクリーニングと化合物スクリーニングによる DPP11 阻害剤の探索を進めている。歯周病の治療には他の菌にも作用する抗菌薬が使われているが、特異的でない抗菌薬の使用は多剤耐性菌の出現を早め、抗菌薬の寿命を短くする恐れがある。DPP11 をはじめとする S46 ファミリーの DPP に特異的な阻害剤は、結果として歯周病菌や NFGNR に特異的な抗菌薬の開発に結びつく可能性がある。

1. Ohara-Nemoto, Y. et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 38115–38127, 2011
2. Sakamoto, Y. et al., *Sci. Rep.* **4**, 4977, 2014 *Sci. Rep.*, **5**, 11151

# 超巨大蛋白質会合体ヘモシアニンの結晶構造

## Crystal structure of supermolecule hemocyanin

松野明日香, 蓋作啓, 加藤公児, 田中良和, 姚閔

1 北海道大学

生物にとって酸素の運搬は重要な生体機構である。イカなどの軟体動物やカニなどの節足動物ではヘモシアニンという銅含有タンパク質がその役割を担っている。軟体動物のヘモシアニンは、分子量が約数 MDa~数十 MDa にも及ぶ超巨大な蛋白質会合体であり、これは現存する最も大きい蛋白質の一つである。軟体動物のヘモシアニンは、分子量約 50kDa の Functional Unit (FU) が 8 つ連結した約 400kDa のサブユニットが円柱状に 10 分子会合した巨大蛋白質会合体である。ヘモシアニンはその大きさを生かしてハプテンのキャリア分子や、免疫賦活剤として利用されているが、巨大であることや容易にサブユニットへと解離するという性質から、結晶化が困難であり、これまでは主に電子顕微鏡によりその構造が解析されてきた。本研究では、スルメイカ由来ヘモシアニンの結晶構造を 3.0Å の分解能で決定することに成功した。最終的に 32,480 残基, 80 個の  $\text{Cu}_2\text{O}_2$  クラスタ, 50 箇所の糖鎖修飾の原子構造を決定した。明らかになった構造は、円筒状の外壁領域と、5 つの内部領域により構成されていた。外壁領域は、10 個のプロトマーが  $D_5$  の対称性で会合した、直径 310Å, 高さ 160Å の円筒型の構造をしていた。5 つの内部領域にはそれぞれ、4 個の FU が含まれていた。プロトマーを構成する 8 種類の FU はいずれも類似した構造を有しており、FU 同士が 2 回対称に会合した FU 二量体が構造単位となって、3.8-MDa の全体構造が構築されていた。また、糖鎖修飾がプロトマー同士の界面に密集していたことから、プロトマー間の相互作用に寄与する可能性が示唆された。

## 細菌におけるユビキチン様翻訳後修飾の 構造基盤

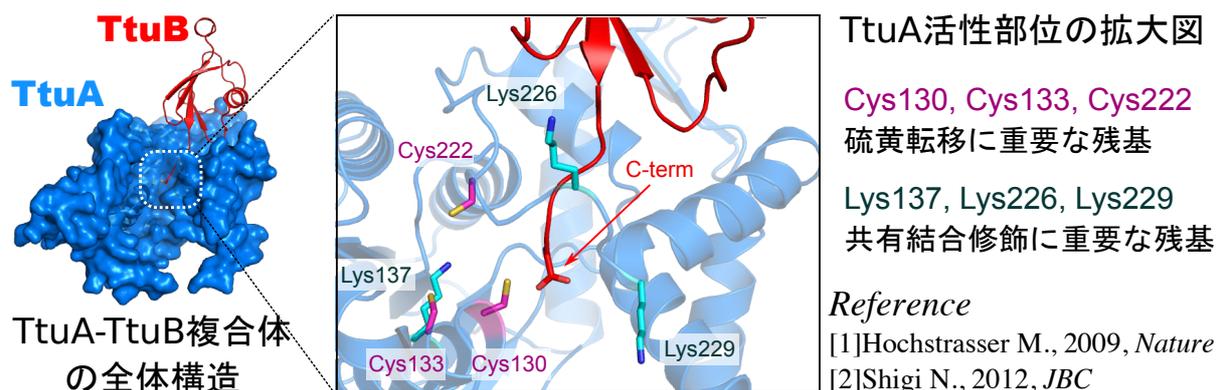
### Structural basis of ubiquitin-like translational modification in bacteria

陳 明皓<sup>1</sup>、奈良井 峻<sup>1</sup>、大村 直樹<sup>1</sup>、嶋 直樹<sup>2</sup>、田中 良和<sup>3</sup>、姚 閔<sup>3</sup>  
1 北大 生命、2 産総研 創薬基盤、3 北大 先端生命

ユビキチンは真核細胞に普遍的に存在する小タンパク質で、標的タンパクと共有結合することで標的タンパク質の分解、転写制御、DNA 修復、ヒストンタンパクの修飾、分子会合のシグナリングなど様々な機能を果たす。一方、原核生物にもユビキチン様の小タンパク質が存在することが知られており、それらはチアミンやモリブデン補酵素などの硫黄を含む化合物を生合成する際、硫黄を運搬する硫黄ドナーとして使われている。それらの高度な相似性から、真核生物のユビキチン系は原核生物の硫黄運搬系から進化してきたのではないかと考えられてきた[1]。

Two-thiouridine synthase B (TtuB)は好熱真正細菌 *Thermus Thermophilus* が持つユビキチン様の小タンパク質で、tRNA の硫化反応のための硫黄ドナータンパク質である。しかし近年、TtuB の機能はそれのみならず、硫化酵素 TtuA と直接共有結合を形成し、その酵素活性を抑制する現象が報告された[2]。これは細菌で初めて、硫黄運搬と翻訳後修飾の両方に関与する二機能性のユビキチン様タンパク質の存在を明らかにした報告で、それらの進化的な関連性を直接裏付ける証拠になった。

しかし、この2つの反応がどのように一つの酵素で制御されているのかについては未だ明らかになっていない。詳細な機構を解明するために、私たちはTtuA-TtuB 二者複合体の結晶構造を 2.4Åの分解能にて決定した。得られた構造では、TtuB のループ状の C 末端が TtuA の活性部位に深く差し込まれ、その先に硫黄転移反応の重要残基と翻訳後修飾のターゲット残基両方が存在していた。この結果から、TtuB の C 末端の状態を認識して、2つの反応を同じ活性部位内で触媒する反応機構が提唱された。



## ***Fusobacterium nucleatum* 由来 硫化水素産生酵素の立体構造と反応機構 Structure and reaction mechanism of H<sub>2</sub>S-producing enzyme from *Fusobacterium nucleatum***

○毛塚雄一郎<sup>1</sup>、吉田康夫<sup>2</sup>、野中孝昌<sup>1</sup>  
1 岩手医大・薬、2 愛知学院大・歯

硫化水素をはじめとする揮発性硫化物は口臭の主要な原因物質であると同時に、低濃度においても強い細胞毒性を持ち、歯周病を進行させる一因でもある。歯周病原細菌として知られる *Fusobacterium nucleatum* は高い硫化水素産生能を有し、これまでに4種類の硫化水素産生酵素遺伝子が同定されている。この中で、硫化水素産生酵素 Fn1055 は2番目に硫化水素産生への寄与が高く、L-システインからL-セリンを生成する反応を触媒する過程で硫化水素を産生する(Suwabe *et al.*, *Microbiology*, 2011)。一般に、細菌や植物においてはL-セリンを出発物質としてL-システインが2段階の反応を経て合成されることから、Fn1055 はこの細菌に特有のアミノ酸生合成に関与する重要な酵素であると考えられる。

Fn1055 の大量発現は大腸菌を宿主として行い、3段階のクロマトグラフィーにより高純度に精製した。この酵素を用いて広範囲におよぶ結晶化条件のスクリーニングを行ったにも関わらず、良質な結晶を得ることができなかった。しかし、リジンのε-アミノ基を化学的にジメチル化した酵素を調製し(Rayment, *Methods Enzymol.*, 1997)、再度スクリーニングを試みたところ、非修飾の酵素よりも良好な回折を与える結晶を得ることができた。得られた結晶からビームライン NW12A において、結晶交換ロボットを使って効率的に回折強度データを収集し、分子置換法により2.1 Å分解能で結晶構造を決定した。

Fn1055 はα/βフォールドを持つ2つのドメインからなっており、補因子であるピリドキサル5'-リン酸はこれらの作るクレフトの底部でLys46と共有結合を形成していた。また、反応中間体複合体の構造解析の結果、中間体の形成によりクレフトが閉じることが示唆された。類縁酵素(システイン合成酵素、アミノ酸配列のアイデンティ: 32%)との構造比較により、クレフトの一部を形成するループのアミノ酸残基の違いが各酵素の基質特異性に寄与していることが考えられた。Fn1055 において、このループ上に位置するAsp232は触媒反応に必須であり、L-システインのβ脱離反応で塩基としての役割を果たすことが分かった。

## SepCysE possesses non-specific tRNA binding domain

○Meirong Chen<sup>1</sup>, Yuto Nakazawa<sup>1</sup>, Yume Kubo<sup>1</sup>, Nozomi Asano<sup>1</sup>, Koji Kato<sup>1,2</sup>, Yoshikazu Tanaka<sup>1,2</sup>, Min Yao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Graduated School of Life Science, Hokkaido University

<sup>2</sup> Faculty of Advanced Life Science

A series of tRNAs are made in cell to serve as adaptors relating the amino acid to genetic code of mRNA. The errorless recognition and attachment of amino acids to tRNAs are performed by a family of enzymes designated as aminoacyl-tRNA synthetases(aaRS). Normally, aaRS can directly ligates amino acid to the cognate tRNA to produce aa-tRNA. However, there are exceptions for Glutamine, Asparagine and Cysteine in some organisms, in which enzymes with different functions assembling to form complex are necessary for aa-tRNA synthesis. And of interest, recent research discovered a huge complex named transsulfursome takes charge of cysteine-tRNA<sup>Cys</sup> synthesis in Methanogenic Archaea.

Transsulfursome consists of three protein components, O-phosphoserine-tRNA synthetase(SepRS), Cys-tRNA<sup>Cys</sup> Sep-tRNA:Cys-tRNA synthase(SepCysS), and SepRS/SepCysS pathway enhancer(SepCysE) which functions as a bridge to connect SepRS and SepCysS. Firstly SepRS ligates O-phosphoserine(Sep) to tRNA<sup>Cys</sup>, and then the formed Sep-tRNA<sup>Cys</sup> is transferred to SepCysS where it is converted into Cys-tRNA<sup>Cys</sup>. This two-step pathway is the sole source for cysteine insertion into protein and cysteine biosynthesis in such organisms. Previous research indicated that the N-terminal domain(NTD) of SepCysE is essential for assembly of transsulfursome, and crystal structural analysis of SepCysS-SepCysE\_NTD suggested the formation of a dimer of heterodimer. While the structure and function of SepCysE\_NTD are elaborated comprehensively, little is known about C-terminal domain(CTD) of SepCysE, and how tRNA<sup>Cys</sup> is transferred from SepRS to SepCysS remains unclear.

In current research, we performed binding assay of SepCysE\_CTD with tRNA<sup>Cys</sup> by Native-PAGE and ITC. The strong binding affinity was observed. Whether SepCysE\_CTD specifically binds tRNA<sup>Cys</sup> was further investigated. Surprisingly, the binding affinities of other tRNAs are almost at the same level as tRNA<sup>Cys</sup>, suggesting SepCysE\_CTD can be characterized as a tRNA binding domain. Given the non-specific binding of SepCysE\_CTD on tRNA<sup>Cys</sup>, the recognition of transsulfursome on tRNA<sup>Cys</sup> may mainly depend on SepRS and SepCysS during aminoacylation and the second step reaction, respectively.

## ファミリー4 ウラシル DNA グリコシラーゼと DNA の 複合体構造解析

### Structure analysis of family 4 uracil-DNA glycosylase in complex with DNA

河合聡人<sup>1</sup>、中村照也<sup>2</sup>、山縣ゆり子<sup>2</sup>、宮本秀一<sup>1</sup>  
1 崇城大学薬学部、2 熊本大学大学院生命科学研究部

DNA 中のシトシンは脱アミノ化によってウラシルに変化し、G:C→A:T への点突然変異の原因になる。シトシンの脱アミノ化は温度上昇に伴い、その発生頻度が高くなる。さらに好熱性古細菌由来のファミリーB およびファミリーD DNA ポリメラーゼでは、ウラシルやヒポキサンチンなどの脱アミノ化した塩基を厳密に認識していて、これらの塩基が存在すると DNA の複製反応が停止してしまう。ウラシル DNA グリコシラーゼ(UDG)は、DNA 中に存在するウラシルを認識し、塩基と糖の間にある N グリコシド結合の加水分解反応を触媒することで、DNA 中からウラシルを取り除く酵素である。UDG は、様々な生物種でその存在が確認されていて、これまでの研究で明らかになった構造的な特徴や基質特異性の違いにより、ファミリー1~6 に分類されている。中でもファミリー4 に属する UDG は、好熱性古細菌や好熱性細菌といった高温環境下に適応した生物種のゲノムにコードされていて、その活性は、1 本鎖、2 本鎖 DNA に関係なく DNA 中に存在するウラシルを認識し、除去する。我々は、好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来ファミリー4 UDG(*stoUDG*)について研究を進め、X 線結晶構造解析法により 1.7 Å 分解能で単体およびウラシル複合体の立体構造を解明した[1]。そして、全体構造は他の UDG と同様に  $\alpha/\beta/\alpha$  サンドイッチ構造を形成し、ウラシルの認識様式も他の UDG と類似していることを明らかにした。また、これまでに構造解析された UDG と構造を比較した結果、*stoUDG* では、DNA 結合に関与する領域(leucine intercalation loop)に特徴的な構造が観察された。そこで、詳細な *stoUDG* による DNA の認識様式を明らかにするため、*stoUDG*-DNA 複合体の共結晶化に取り組み、PF BL-1A での X 線回折実験の結果、2.6 Å 分解能で複合体構造を決定することに成功した。本発表では決定した *stoUDG*-DNA 複合体の立体構造、ならびに現在得られている立体構造から推察した *stoUDG* の酵素触媒機構について報告する。

[1] Kawai A. et al., *FEBS lett.*, **589**, 2675–2682, 2015

***Arthrobacter globiformis* T-6 由来  
イソマルトデキストラナーゼのトンネル構造の解析  
Tunnel structure of isomalto-dextranase  
from *Arthrobacter globiformis* T-6**

石寄 雄一<sup>1</sup>、郷津 佳史<sup>1</sup>、岡沢 唯香<sup>1</sup>、西河 淳<sup>1</sup>、殿塚 隆史<sup>1</sup>  
東京農工大院・応用生命化学専攻<sup>1</sup>

【緒言】イソマルトデキストラナーゼ(IMD)はグルコースが $\alpha$ -1,6-結合でつながった多糖およびオリゴ糖に対して、非還元末端側からエキソ型に作用し、二糖イソマルトース(Glc- $\alpha$ -1,6-Glc)を生成する加水分解酵素である。IMD は CAZy データベースにより、糖質加水分解酵素ファミリー27(GH27)に分類されているが、GH27 に分類される主な酵素は $\alpha$ -ガラクトシダーゼや $\alpha$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼである。ゆえに IMD の基質特異性と構造の相関に興味を持たれる。

IMD の野生型及びリガンドとの複合体の構造から IMD には特徴的な構造をしていることが分かった。特徴の一つにトンネル構造がある。このトンネルは IMD の活性中心に向かうように存在し、リガンド結合時のみに現れ、水分子を多く含んでいた。このトンネルが現れるときに、アミノ酸残基に大きなコンフォメーション変化が起こる。今回、このトンネル形成に関わり、大きくコンフォメーション変化を起こす H245 に着目した。この H245 をアラニンに置換した変異体 H245A を作製し、X線結晶構造解析を行い、その構造を解明した。

【方法と結果】IMD\_H245A 発現用プラスミドを作製し、His-tag 融合タンパク質として *E.coli* BL21(DE3)で発現させた。Ni-NTA アガロースによりアフィニティークロマトグラフィーを行った後、Thrombin 処理をした。His-tag を除去した H245A をハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化させ、イソマルトースをソーキング後、X線回折強度測定に用いた。IMD-イソマルトースを鋳型とし、分子置換法により H245A-イソマルトース複合体の構造を 2.2Åの分解能で決定した。

構造解析の結果、イソマルトースは野生型と同じように、活性部位と CBM 両方に1分子ずつ結合していることが分かった。しかし、イソマルトースが活性部位に結合後もアミノ酸残基のコンフォメーション変化が起こらず、トンネルは閉じたままになっていた。また、H245A では、WT と比べ酵素活性が約2分の1に低下することが分かっている。ゆえに IMD\_H245A の活性低下にはこのトンネル構造が関係しており、このトンネル構造は IMD の活性に関係していることが示唆された。

## アーキア由来ユビキチンの結晶構造解析 Crystal structure of archaeal ubiquitin

藤橋雅宏<sup>1</sup>, 橘高瑞奈<sup>2</sup>, 金井保<sup>2</sup>, 跡見晴幸<sup>2</sup>, 三木邦夫<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京大院理・<sup>2</sup>京大院工

ユビキチンは、真核生物において標的蛋白質を修飾(ユビキチン化・ポリユビキチン化)し、蛋白質分解系をはじめとした様々なシステムに関与することが知られている。このシステムには、ユビキチンそのものと、ユビキチン化に関与する酵素である、E1, E2, E3などが含まれることが知られている。

原核生物においてもユビキチン様の蛋白質は見つかっている。例えば ThiS や MoaD と呼ばれる原核生物由来のユビキチン様蛋白質は、硫黄化合物の代謝に関与することが知られている。ThiS や MoaD による硫黄化合物の代謝には E1 様の蛋白質も関与するが、E2 や E3 に相当する因子は見つかっていない。また好塩性アーキア由来 SAMP や好熱菌由来 TtuB は、E1 ホモログを介して標的蛋白質を修飾する。これらのケースにおいても E2 や E3 に相当する因子は見つかっていない。

我々は最近好熱性アーキアである *Caldiarchaeum subterraneum* のメタゲノムより、ユビキチン様蛋白質の遺伝子(CsUbl)を見いだした。この遺伝子の周辺には E1, E2, E3 ホモログの遺伝子が存在し、オペロンが形成されていた。*C. subterraneum* の培養条件は今だに不明であるため、これらの蛋白質の生体内での動態は不明であるが、大腸菌を用いて組換え蛋白質として発現させると、試験管内において E1 のユビキチン化、E2 の E1 を経由したユビキチン化が起こることを確認している。ポリユビキチン化はユビキチンのリシン残基(または N 末アミノ基)を介して起こることが知られているが、一次構造だけでは立体構造上のリシン残基の配置はわからない。そこで CsUbl の結晶構造解析に取り組んだ。

様々な結晶化条件を試したが、太さ 10  $\mu\text{m}$  程度の針状晶しか得ることができなかった。PF-BL1A において X 線回折実験を行ったところ、2.78  $\text{\AA}$  分解能の回折データを得た。このデータは pseudo merohedral twin の性質を持っていた。位相決定は赤痢アメーバ由来ユビキチンをモデル分子とした分子置換によって行い、refmac による twin refinement によって  $R_{\text{free}} = 25.1\%$  にまで構造を精密化した。CsUbl のリシン残基の立体構造上での位置は、真核生物ユビキチンとはあまり一致しないことがわかった。

## 担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来機能未知タンパク質 CcGH131A の結晶構造解析

### Crystal structure of CcGH131A, a function-unknown protein, from a basidiomycete *Coprinopsis cinerea*

林昌宏<sup>1</sup>、奥山舜朔<sup>1</sup>、田中祐太郎<sup>1</sup>、田村瑞<sup>1</sup>、砂川直輝<sup>2</sup>、石田卓也<sup>2</sup>  
梅澤究<sup>3</sup>、吉田誠<sup>3</sup>、五十嵐圭日子<sup>2</sup>、西河淳<sup>1</sup>、殿塚隆史<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農工大学大学院 農学府 応用生命化学専攻

<sup>2</sup>東京大学大学院 農学生命科学研究科 生物材料科学専攻

<sup>3</sup>東京農工大学大学院 農学府 環境資源物質科学専攻

[緒言] 私達のグループでは、担子菌類の卓越した木材腐朽能に着目し、キノコ研究のモデル菌である担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来タンパク質 CcGH131A の構造と機能の研究を行っている。CcGH131A は2つのドメインから成り、C 末端側に糖結合ドメインを持つことから、本菌のバイオマス分解機構において何らかの働きをもつタンパク質であると考えられる。本タンパク質が属する GH131 ファミリーにおいては、 $\beta$ -グルカン分解活性を有するタンパク質の存在が報告されているが、CcGH131A は特異性が不明であり、新規な機能を持つ酵素であることが期待される。

これまでに CcGH131A の糖結合ドメインを欠失させたタンパク質(以下 CcGH131A $\Delta$ CBM)の結晶化を行い、CcGH131A $\Delta$ CBM は $\beta$ -ゼリーロールフォールドを有する構造であることが分かった。さらに、グリセロール3分子が活性中心と思われる部位に結合していた。本研究では CcGH131A の構造機能相関を明らかにするため、結晶構造解析および蛍光測定による糖に対する特異性の評価を行った。

[結果と考察] CcGH131A $\Delta$ CBM について、各種糖に対するトリプトファン蛍光強度変化を指標とした測定を行った。その結果、 $\beta$ -グルカンに対する反応はあまりないのに対し、キシランに対して大きな蛍光強度変化を示すことが分かった。そこで、キシロトリオースをリガンドとして結晶にソーキングを行い、結晶構造解析を行ったところ、低分解能ではあるがキシロースに相当する単糖の電子密度が Trp41 付近に見られた。また、本タンパク質を酵母 *Pichia pastoris* で発現させ糖鎖が付加したものについて結晶構造解析を行い、N 結合型糖鎖の付加部位を確認することができた。

## アサ由来ポリケタイド閉環酵素の X 線結晶構造解析 Structure determination of polyketide cyclase from *Cannabis sativa*.

松井崇<sup>1</sup>、楊新美<sup>1</sup>、児玉猛<sup>1</sup>、周曉希<sup>1</sup>、森貴裕<sup>2</sup>、  
野口裕司<sup>3</sup>、阿部郁朗<sup>2</sup>、森田洋行<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> 富山大・和漢研、<sup>2</sup> 東大院・薬、<sup>3</sup> 静岡県立大・薬

大麻由来 olivetolic acid cyclase (OAC) は、アサ *Cannabis sativa* のテトラヒドロカンナビノイドのポリケタイド骨格の生合成において、Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) であるテトラケタイド合成酵素 (TKS) が生産するヘキサノイルテトラケタイド CoA 中間体を基質として C2-C7 アルドール閉環反応によりオリベトール酸 (OA) へと変換する植物で唯一同定されたポリケタイド閉環酵素である (図 1)。中間体を生成するⅢ型 PKS は広範な構造の CoA チオエステルを基質とし、多様な骨格の酵素反応中間体の生成を経て非天然型芳香族化合物を生産できる。したがって、OAC の基質特異性を拡張し多様な骨格構造を持つ基質を変換できれば、これまで以上に多様な化合物群の創製が期待される。本目的のためには OAC の基質認識機構の解明が必須であり、OAC の結晶構造を解析した。

その結果、OAC および OAC-OA 複合体構造をそれぞれ 1.32、1.70 Å の分解能で解析することに成功した。OAC は各サブユニットに cavity を形成する植物ならびに細菌の dimeric  $\alpha+\beta$  barrel (DABB) タンパク質と高い構造相同性を示した。また、OAC-OA 複合体構造から、この cavity 内に存在する疎水性 tunnel にヘキサノイル基が結合することが明らかとなった。さらに、cavity に存在する残基に対して変異導入し酵素活性を測定した結果、この cavity の入口に存在する Tyr72、His78 が OA の閉環触媒残基である事が示唆された。

これまで、OAC は植物で唯一同定されたポリケタイド閉環酵素であったが、本研究で解明された触媒残基 Tyr72、His78 と触媒残基と相互作用し活性に関与する His5、Tyr27、Asp96 は DABB ファミリーに属する植物ストレス応答性タンパク質 POP3 ファミリーにおいて良く保存されており、POP3 ファミリーも OAC 様のポリケタイド閉環酵素である可能性が示唆された。今後、これらの DABB タンパク質を同定・機能解析と各酵素の比較解析により、多様な非天然化合物ライブラリーの構築に応用可能となる事が期待される。

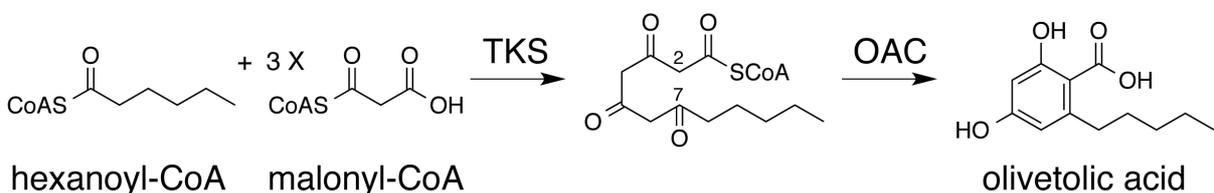


図 1. OA の生合成経路

## ソホロオリゴ糖に特異的な ABC トランスポーター基質 結合タンパク質の熱力学的解析と立体構造

### Thermodynamic analysis and crystal structure of a solute-binding protein of ABC transporter specific for sophorooligosaccharides

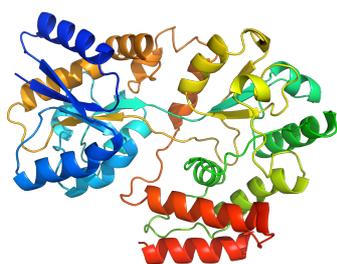
阿部 紘一<sup>1</sup>, 中島 将博<sup>2</sup>, 砂川 直輝<sup>1</sup>, 石田 卓也<sup>1</sup>, 五十嵐 圭日子<sup>1</sup>, 鮫島  
正浩<sup>1</sup>, 宮永 顕正<sup>3</sup>, 中井 博之<sup>4</sup>, 田口 速男<sup>2</sup>, 荒川 孝俊<sup>1</sup>, 伏信 進矢<sup>1</sup>

1 東大院農生科, 2 東理大院理工, 3 東工大院理工, 4 新潟大農

$\beta$ -1,2-グルカンがグルコースが $\beta$ -1,2-結合で重合した多糖であり、自然界では一部のグラム陰性菌が産生する環状糖として主に知られているが、その分解代謝系には不明な部分が多い。近年、我々は *Listeria innocua* において $\beta$ -1,2-グルカンの代謝に関与すると思われる遺伝子クラスターを発見した<sup>1</sup>。そのクラスター内には3糖以上のソホロオリゴ糖( $\beta$ -1,2-グルコオリゴ糖)を、無機リン酸を使って特異的に分解する1,2- $\beta$ -オリゴグルカンホスホリラーゼ(OGP)、2糖のソホロースを好んで分解する $\beta$ -グルコシダーゼがコードされている。また、同クラスター内には推定ABCトランスポーターの構成成分である基質結合タンパク質(LiSBP)および膜貫通タンパク質がそれぞれコードされていることから、*L. innocua*はこのトランスポーターを介して $\beta$ -1,2-グルカンまたはソホロオリゴ糖を取り込んでいると思われる。しかし、*L. innocua*は $\beta$ -1,2-グルカンでの生育例がないことから、ソホロオリゴ糖を取り込んでいるのではないかと推測されるが、LiSBPとソホロオリゴ糖との相互作用を調べた例はなく、その立体構造も未知である。そこで本研究ではLiSBPの熱力学的相互作用解析およびX線結晶構造解析を行った。

等温滴定熱量測定(ITC)を行った結果、LiSBPは3糖以上のソホロオリゴ糖に $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ のオーダーで特異的に結合することが明らかとなった。この結果はOGPが3糖以上のソホロオリゴ糖を分解することと対応している。

さらに、LiSBPの結晶を用いKEK PF-AR NW12AにおいてX線回折実験を行った結果、分解能2.2 Åでリガンドフリー状態の構造決定に成功した。LiSBPの全体構造は、他の基質結合タンパク質で見られる二つの球状ドメインから構成されており、これらのドメインで挟み込むようにしてソホロオリゴ糖を結合するのではないと思われる。また、他の構造既知のタンパク質との比較から、今回得られた構造はOpen型であることが示唆された。



LiSBPの全体構造

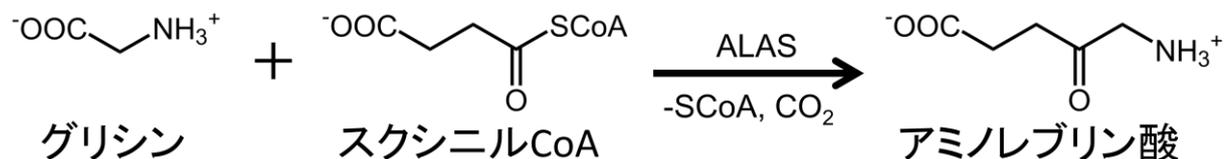
## *Caulobacter crescentus* 由来アミノレブリン酸合成酵素の グリシン複合体の結晶構造

### Crystal Structure of Aminolevulinic acid synthase complexed with Glycine from *Caulobacter crescentus*

主馬野祐希<sup>1</sup>、生城浩子<sup>2</sup>、矢野貴人<sup>2</sup>、神谷信夫<sup>3,1</sup>、宮原郁子<sup>1</sup>

1 大阪市大・院理、2 大阪医大・生化学、3 大阪市大・OCARINA

アミノレブリン酸合成酵素(ALAS)は、グリシンとスクシニル CoA よりアミノレブリン酸を合成する反応を触媒する、ピリドキサル-5'-リン酸(PLP)依存性の酵素である。ALAS が触媒するこの反応は、ヘム合成における律速段階である。また、ヒトにおいては、赤芽球細胞で特異的に発現する ALAS-2 の変異が X 連鎖性鉄芽球性貧血の原因となる。これまでに、*Rhodobacter capsulatus* 由来 ALAS の結晶構造が報告されているが、基質との二元複合体は分解能が低く、電子密度が不明瞭であった。我々の研究グループでは、ALAS の反応機構を構造学的な立場から明らかにすることを目的として、*Caulobacter crescentus* 由来 ALAS(cALAS)の三元複合体の X 線結晶構造解析を達成することを目標に研究を行っている。



培養・精製した cALAS の結晶化スクリーニングを行ったところ、良好な単結晶を得ることができ、PF-AR NW12A において 1.35 Å という高分解能でのデータ収集に成功し、cALAS の結晶構造を初めて明らかにした。PLP は、Lys248 と Schiff 塩基を形成し、Internal Aldimine の状態で存在していた。PLP のピリジン環は Asp214 の側鎖と N1 の水素結合、His142 のスタッキング、His217 の N2 と O3 の水素結合によって活性部位に固定されていた。また、リン酸基は複数のアミノ酸残基や水分子との水素結合によって固定されていた。

また、グリシンとの共結晶も行った。スクリーニングの結果、単結晶を得ることができ、PF-AR NE3A において 1.77 Å 分解能でのデータ収集に試行し、グリシン複合体の構造も明らかにした。PLP はグリシンと Schiff 塩基結合を形成し、そのカルボキシル基を PLP ピリジン環に対して垂直に配向し His142 と水素結合を行っていた。これは同じサブクラスに属するセリンパルミトイル基転移酵素においても見られる構造で、スクシニル CoA が結合するまで、反応が進行しないように制御するための機構であると推定される。

# 動的核偏極タンパク質中性子結晶解析のための ラジカル分子の導入とその評価

## Doping of radical molecules and its evaluation for Dynamic Nuclear Polarization Neutron protein structure analysis

小松崎 直也<sup>1</sup>・田中 伊知朗<sup>2,3</sup>・岩田 高広<sup>4</sup>・宮地 義之<sup>4</sup>

1 茨城大院理工, 2 茨城大工, 3 茨城大フロンティアセンター, 4 山形大理

### 【緒言】

中性子回折実験における水素の検出感度向上の方法として、動的核偏極(DNP)がある。この手法を用いることにより、水素からの相対的な散乱長が従来の約8倍となり、さらに軽水素のままでもバックグラウンドが低いという利点がある。この技術の実現には試料結晶中にラジカルを導入する必要があり、その比率はタンパク質の水素原子数:ラジカル数=1000:1である。本研究ではTEMPOLをリゾチーム結晶に高濃度で導入し、ESR実験及びX線結晶構造解析を行い、タンパク質単結晶内のラジカル分子数の定量とラジカルによる分子構造への影響を評価した。

### 【実験】

タンパク質はSigma-Aldrich社より購入したリゾチームを用い濃度は15-30 mg/mL、結晶化剤は塩化ナトリウム 2-5%+TEMPOL 0-200 mM、緩衝溶液は50 mM 酢酸ナトリウム pH 4.5、温度 293 K、結晶化はマイクロバッチ法を用いて共結晶化を行った。得られた結晶をX線解析用石英キャピラリーに封入し、ESR実験に用いた。また、エチレングリコール 30%(v/v)を抗凍結剤として用いて瞬間凍結し、PF BL-5Aにて100 Kの低温でX線回折及び解析を行った。

### 【結果・考察】

ESR実験の結果より、TEMPOL濃度に対するラジカル分子数とリゾチーム分子数の比を求めたところ、比較的きれいな比例関係が得られ、初めてESR実験によってタンパク質結晶内のラジカルの定量的な検出に成功した。これにより、リゾチームにおける動的核偏極を行うための必要条件を満たす結晶化条件が判明した。この条件を満たすTEMPOL濃度のリゾチーム結晶のX線回折を行い、分解能1.2 Åのデータが得られた。構造解析の結果、TEMPOLのものと思しき電子密度は観測されず、TEMPOLはリゾチームとは直接相互作用しないものと思われる。今後の展望としては、実際に動的核偏極を行い、水素原子の偏極率を測定する予定である。

## HIV-1 逆転写酵素 Q151M 変異体の構造解析 Structure of the HIV-1 reverse transcriptase Q151M mutant

中村彰良、田村範子、安武義晃  
産総研、生物プロセス研究部門

B型肝炎ウイルスの逆転写酵素 (HBV pol)は抗HBV薬開発において重要な標的タンパク質であり、効率的な薬剤設計のためにも立体構造情報の活用が期待されている。しかし、HBV polは生体外では不溶性かつ不安定であることからサンプル調製が困難であり、立体構造解析は難航している。

テノフォビルやラミブジンなどの一部の核酸系逆転写酵素阻害剤は、HBV polとHIV-1の逆転写酵素 (HIV-1 RT)の両方に阻害活性を示すことが報告されている。また、HBV polとHIV-1 RTの配列比較から、活性部位を形成するアミノ酸残基は両者で高く保存されていることが明らかになっている。このことから、HBV polとHIV-1 RTの活性部位構造および反応機構は類似していると予想されている。しかし、活性部位の配列比較では1残基の違いがあり、HIV-1 RTのGln151に相当する残基はHBV polではMetで保存されている。興味深いことに、このGln151がMetに置換されたHIV-1変異体(Q151M変異体)は多剤耐性を示すことが報告されている。しかし、多剤耐性を示すQ151M変異体に対して、HBV pol阻害剤であるテノフォビルおよびラミブジンは変わらず阻害活性を示すことが明らかになっている。以上の活性部位の類似性および薬剤感受性の共通性から、HIV-1 RT Q151M変異体の活性部位構造はHBV polの活性部位構造を反映していると考えられる。

我々は、HIV-1 RT Q151M変異体の立体構造を2.6 Å分解能で決定することに成功した。Q151M変異体の全体構造はこれまでに報告されているHIV-1 RTの閉構造と同じであったが、活性部位を形成する $\beta 2$ - $\beta 3$ シートに構造変化が見られた。この $\beta 2$ - $\beta 3$ シートには置換したMet151が存在しており、Metの疎水性側鎖によってこの構造変化が引き起こされたと考えられる。さらに、Q151M変異体とこれまでに報告されているHIV-1 RT阻害剤複合体との活性部位構造の比較から、Q151M変異により阻害剤との水素結合ネットワークが変化することによって、薬剤耐性やHIV-1 RTとHBV polの薬剤感受性の違いが生じていることが示唆された。

## タンパク質の結晶化における沈殿剤の影響の解析

### Analysis of the influence of precipitants on the protein crystallization

不動聡志<sup>1</sup>、齊非<sup>1</sup>、額賀路嘉<sup>2</sup>、米田友貴<sup>1</sup>、根矢三郎<sup>1</sup>、星野忠次<sup>1</sup>

1 千葉大院薬、2 城西国際大薬

【目的】タンパク質のX線結晶構造解析を行う上で目的タンパク質の結晶化が必須であるが、結晶化条件の探索はしばしば困難を伴う。その原因の1つとして、限られた条件でのみ結晶が析出する理由が明らかでないことが挙げられる。我々は先行研究においてタンパク質の結晶構造における空間群が、結晶化の際に用いられる沈殿剤の種類に大きく依存することを見出した。そこで本研究では、結晶化における沈殿剤の役割の解明ならびにタンパク質結晶化機構の解明を進めた。

【方法・結果】タンパク質として、インフルエンザウイルスの持つポリメラーゼ複合体中のPAサブユニットのN末端側約200残基(PA<sub>N</sub>)を用いた。PA<sub>N</sub>の結晶化条件を探索し、3つの異なる条件でタンパク質結晶を得ることができ、それぞれについて構造解析を行った。用いた沈殿剤はそれぞれ硫酸アンモニウム、酒石酸カリウムナトリウム、PEG 8000である。それぞれの空間群は順にP4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2, P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2, C2であった。同じ空間群となった2つの沈殿剤には、タンパク質に対し類似の作用があると推察される。次にPA<sub>N</sub>の結晶構造をもとに、ハンギングドロップ中の沈殿剤濃度を再現するように沈殿剤の分子をタンパク質の周囲にランダムに発生させたモデルを3つの沈殿剤それぞれについて2つずつ作り、それぞれ100ナノ秒(PEGを含むモデルのみ200ナノ秒)の分子動力学シミュレーションを行った。その結果、3つ全ての沈殿剤について、沈殿剤分子はタンパク質の周りに等方的に分布するのではなく、特定の方位に大きく偏って存在することが判った。硫酸アンモニウムと酒石酸カリウムナトリウムの条件では、タンパク質表面のうち沈殿剤が偏って分布する部位は、結晶中においてタンパク質分子どうしが接触していない部位にほぼ一致した。そのため、これら2つの沈殿剤はタンパク質分子どうしの接触しうる部位を限定するようにはたらき、空間群を規定していると考えられる。PEGの条件では逆に、沈殿剤が偏って分布する部位は、結晶中におけるタンパク質分子どうしの接触部位にほぼ一致した。そのため、PEGの結合するタンパク質表面の部位がそのままタンパク質どうしの接触部位の候補となり、空間群を規定していると考えられる。この場合、タンパク質-PEG相互作用がタンパク質-タンパク質相互作用に置き換わることで、系のエントロピーが増加してタンパク質結晶化の駆動力になると推察できる。

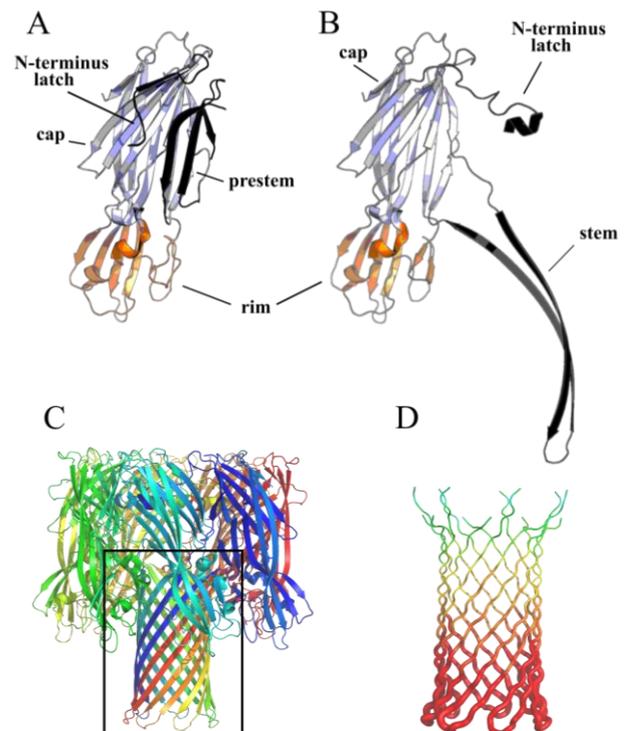
## 黄色ブドウ球菌由来 $\alpha$ -hemolysin の分子機構の解明 Molecular mechanism of staphylococcal $\alpha$ -hemolysin

菅原宇希<sup>1</sup>, 山下大智<sup>1</sup>, 加藤公児<sup>1,2</sup>, 金子淳<sup>3</sup>, 神尾好是<sup>4</sup>, 田中良和<sup>1,2</sup>, 姚閔<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 北大院・生命科学, <sup>2</sup> 北大院・先端生命, <sup>3</sup> 東北大院・農, <sup>4</sup> 尚絅学院大

院内感染の原因菌として知られる黄色ブドウ球菌は, 様々な膜孔形成毒素を分泌し, 宿主の血球細胞を破壊する.  $\alpha$ -ヘモリジン( $\alpha$ -HL)は膜孔形成毒素の一つであり,  $\beta$ -バレル型の膜孔を形成して赤血球を破壊する.  $\alpha$ -HL は可溶性の単量体として分泌されるが, 赤血球の膜上で会合し, 大きな構造変化を経て prepore と呼ばれる中間体構造を形成した後, 膜孔を形成する. 膜孔形成機構の理解に向け, 各段階の結晶構造解析が試みられてきたが,  $\alpha$ -HL は膜孔へと会合しやすく, これまで, 膜孔の構造のみしか決定されていなかった. そこで本研究では, 過去の報告をもとに, 安定な単量体および prepore を形成する変異体を取得し(H35A 変異体および W179A/R200A 二重変異体), これらの結晶構造解析により $\alpha$ -HL の一連の動的な構造変化を明らかにした.

予想された通り, H35A 変異体の結晶構造は単量体であり, 膜貫通領域を形成する stem 領域が折り畳まれていた(図 A,B). また, N 末端に存在する疎水性残基が Cap ドメインと疎水性コアを形成する事で, N 末端ラッチは湾曲した構造を形成していた. W179A/R200A 二重変異体の構造は膜孔と酷似していたが, 膜貫通領域のフレキシビリティが著しく高い点で異なっていた(図 C,D). また, N 末端ラッチの疎水性残基は, 隣接する分子と疎水性コアを形成して, 会合構造を安定化していた. これらの構造解析の結果をもとに, N 末端ラッチの疎水性を利用した,  $\alpha$ -HL の動的な膜孔形成機構が提案された.



(A) 本研究により解明された $\alpha$ -HL 単量体の構造. (B) 既知の7量体膜孔構造中のプロトマーの構造. (C) 本研究により解明された $\alpha$ -HL の prepore の構造. (D) prepore の $\beta$ -バレルにおける B-factor 図 (C の四角部分の拡大図). ※色の濃さ, リボンの太さは温度因子の高さを表す.

## ソーマチンの甘味と構造に関する研究 The study of thaumatin of sweetness and structure

三ツ屋智弘<sup>1</sup>、田中伊知朗<sup>1,2</sup>  
1 茨城大学工、2 茨城大フロンティアセンター

### 【緒言】

甘味タンパク質ソーマチンは西アフリカ原産の植物の果実に見出された塩基性のタンパク質であり、極めて強い甘味を有し、ショ糖の十万分の一の濃度で甘味を呈する。甘味に重要といわれているアミノ酸は生理学的実験からある程度わかっているが、甘味の発現機構は未だ謎のままである。これまでの研究では、解析の際にタンパク質の近くに抗凍結剤や結晶化剤が見えてしまい、アミノ酸と相互作用してしまっている。また、pHの差で甘味に重要なアミノ酸がどのような影響を受けるのかも詳細に検討されていない。pHを変えることによる各甘味に重要なアミノ酸の構造比較を行うことと、抗凍結剤を変えてその影響を比較することを今回の実験の目的とした。

### 【実験】

ソーマチンはシグマアルドリッチ社より購入したものをそのまま用いた。結晶育成条件は、結晶化剤として酒石酸ナトリウムカリウムを用いて、MES-NaOH pH 6.5で、室温、シッティングドロップ法で行った。KEK-PF BL-5Aにおいて低温 100 KにてX線回折を行った。抗凍結剤にはエチレングリコール、グリセロール、スクロース、PEG4000の4つを用いた。

### 【結果・考察】

甘味に特に重要であると言われている Arg82 と Lys67 を pH 4.5, 6.5, 7.0 の条件下で温度因子または occupancy をそれぞれ比較したところ、塩基性に近づくほど不安定になる傾向が見られた。抗凍結剤にスクロースを使用したものではスクロースは二つ見え、甘味に重要なアミノ酸と相互作用していた。グリセロールは 4 分子見えた。エチレングリコールは 2 分子見えていたが、今回の実験で最高の 1.1 Å の高分解能で得られた。また、甘味に重要なアミノ酸との相互作用はなかった。PEG4000 を使用したものでは、PEG4000 は見えずアミノ酸との相互作用は他に比べ少なかった。結晶化剤として用いた酒石酸ナトリウムカリウムはそれぞれの抗凍結剤の条件で 2 分子ずつ存在していた。

## 糖-Lysozyme 複合体の高分解能X線構造解析 High resolution X-ray crystallography study of sugar-Lysozyme complexes

嶋崎隼<sup>1</sup>, 田中伊知朗<sup>1,2</sup>

1 茨城大工, 2 茨城大フロンティアセンター,

**【緒言】**リゾチームは真正細菌の細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素であり、工業的には卵白から抽出したリゾチームが食品や医薬品に応用されている。しかし、リゾチームの加水分解機構、糖との相互作用については解明されていない部分が多い。そこで本研究では、糖-リゾチーム複合体を高分解能でのX線結晶構造解析を行い、apo 体リゾチームを含む先行研究の糖-リゾチーム複合体データと比較し、糖の導入のされ方や特に水を介したタンパク質との相互作用を検証する。

**【実験方法】**今回用いた糖は N,N',N'',N'''-Tetraacetylchitotetraose ((NAG)<sub>4</sub>)と N,N',N''-Triacetylchitotriose ((NAG)<sub>3</sub>)であり、Dextra Laboratories 社より購入した。((NAG)<sub>4</sub>)と((NAG)<sub>3</sub>)の結晶育成条件はそれぞれ、モル比でリゾチーム:糖=1:1.2 で混合させ、リゾチーム濃度は 40, 30 mg/mL、NaCl 結晶化剤濃度は 0.7, 0.8 M、以下は同じ条件で、緩衝溶液(酢酸ナトリウム):0.050 M pH 4.5、温度:293 K、結晶化方法:マイクロバッチ法で結晶育成を行った。不凍液はグリセロール 30 %を用いて、KEK-PF BL-5A において低温 100 K でX線回折実験を行い、HKL2000を用いてデータ処理し、Phenix、Cootを用いて構造解析を行った。

**【結果・考察】**データ処理・解析の結果、本研究での(NAG)<sub>4</sub>-リゾチームで結晶育成したリゾチームの分解能は 1.07 Åであった。また、(NAG)<sub>3</sub>-リゾチームで結晶育成をしたリゾチームの分解能は 1.06 Åであり、R-free は 18.13 %、20.61 %という先行研究データと比較しても、非常に高分解能なデータを得ることができた。それぞれ(NAG)<sub>4</sub>、(NAG)<sub>3</sub> がリゾチームに導入されたことが確認でき、またこれまでには確認されていない水を介した糖-リゾチームの間の水素結合が複数確認された。

## 遊離セリンリン酸化酵素における反応機構の解明 Structural study on the reaction mechanism of a free serine kinase

永田隆平<sup>1</sup>、藤橋雅宏<sup>1</sup>、牧野勇樹<sup>2</sup>、川村弘樹<sup>2</sup>、佐藤喬章<sup>2</sup>、  
跡見晴幸<sup>2</sup>、三木邦夫<sup>1</sup>  
1 京大院理、2 京大院工

始原菌には他の生物種にはない特有の代謝経路が存在する。例えば、始原菌のシステイン生合成経路は、真正細菌や真核生物のものとは異なっている。最近、超好熱性始原菌 *Thermococcus kodakarensis* のシステイン生合成に関わる新規の遊離セリンリン酸化酵素 SerK が見つかった。SerK は ADP 依存的に遊離のセリンをリン酸化し、システインの前駆体であるホスフォセリンを生成する(図 1)。本酵素は初めて同定された遊離のセリンをリン酸化する酵素であり、タンパク質中のセリン・スレオニン残基をリン酸化する酵素とは異なるものである。また、いずれの既知のリン酸化酵素とも一次配列類似性を示さないため、新規の反応機構を持つことが期待できる。

我々は初めに、SerK の AMP 複合体の構造を 1.65 Å 分解能で決定した。この構造から AMP のリン酸基付近の 4 つの酸性残基(E4, E30, E36, D69)のうち少なくとも 1 つが触媒残基だと考えられた。これらの 4 残基をそれぞれアラニンに置換すると、E30A と D69A の変異体では活性が著しく低かった。そこで、反応直前の構造を捉えようと、これらの変異体を用いてセリンと ADP との共結晶化を行った。その結果、D69A の結晶は X 線の回折能が低く構造決定には至らなかったが、E30A の結晶構造は 2.0 Å 分解能で決定できた。この構造では、基質結合部位に生成物であるホスフォセリンと AMP が結合していた(図 2)。発表では、これらの構造に基づいて SerK の反応機構について議論する。

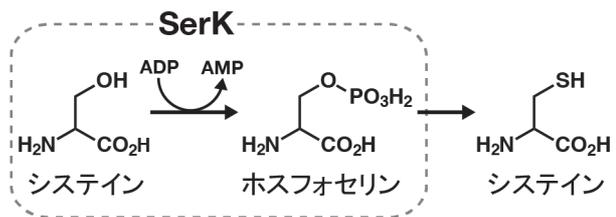


図 1. システイン生合成において SerK が触媒する反応

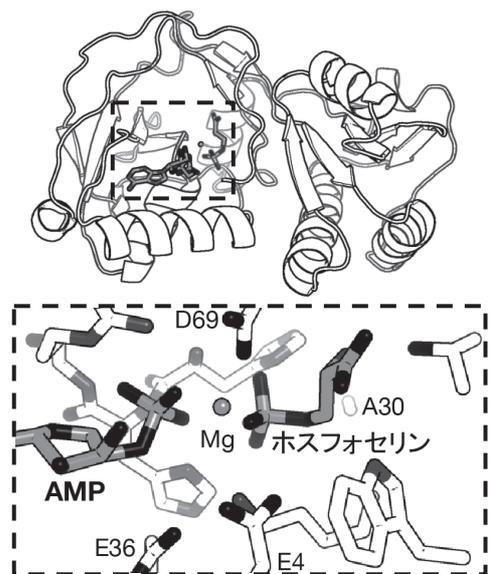


図 2. SerK-E30A の全体構造と基質結合部位の様子

## 真菌由来tRNAリガーゼ(Trl1)のリガーゼドメインの機能・構造解析 Structure analysis of ligase domain of fungal tRNA ligase

村井綱二<sup>1</sup>, 加藤公児<sup>1, 2</sup>, 姚閔<sup>1, 2</sup>

1 北海道大学生命科学院, 2 北海道大学先端生命科学研究院

生命活動に必須なタンパク質合成はリボソームによって行われる。tRNA は細胞内で mRNA 上のコドンに対応するアミノ酸をリボソームへと運搬するアダプター分子として機能している。DNA から転写された tRNA が機能を有する tRNA になるためには、様々な成熟化過程を経ることが必須である。一部の tRNA 前駆体には余分な配列であるイントロンが含まれており、そのままではアミノ酸を運搬できない。tRNA が成熟化するためにはヌクレアーゼがイントロンを切除した後、残った2つの必要な配列であるエキソンがつながれる必要がある。この反応は tRNA スプライシング反応と呼ばれており、多くの生物では2つの酵素 (CPDase, キナーゼ) により末端の修飾が行われた後、tRNA リガーゼがエキソン同士をつなぐ。一方で、真菌由来 tRNA リガーゼ (Trl1) は3つのドメインの働きにより、たった一つの酵素でこの一連の反応を触媒している。現在、多くの真核生物のゲノム解析が完了しているにも関わらず、Trl1 とホモロジーを持つ遺伝子は哺乳類のゲノム中からは発見されていない。そのため、Trl1 は有用な抗真菌薬となる可能性が示唆されているが、この反応機構の詳細は不明である。

本研究では、*Aspergillus oryzae* 由来 Trl1 のリガーゼドメインの構造を分解能 1.9 Å で明らかにした。得られた構造では、活性部位の Lys117 に、発見に用いた大腸菌由来の AMP が結合しており、この AMP の認識に 7 つの残基が関わっていることが明らかとなった (Fig1)。既に構造が決定されている Trl1 のホモログタンパク質 T4 RNA リガーゼ Rnl1 の構造と比較した結果、塩基の認識が異なっていることがわかった。そこで、基質認識に関する知見を得るために、NTP を用いた基質特異性の解析を行うことで、Trl1 の特有の基質認識機構の足掛かりをつかんだ。また、活性部位周辺の残基の変異体の活性測定からも Rnl1 とは異なる結果が得られており、Trl1 が特有の反応機構や tRNA の認識機構を持つタンパク質であることが示唆された。

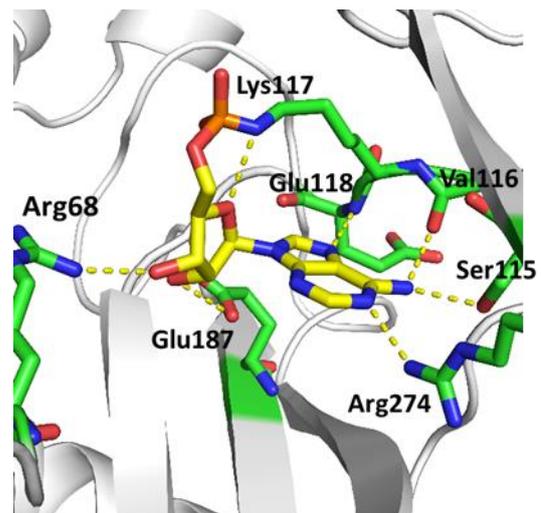


Fig 1. AMP の認識

## CK2 サブタイプ間で異なる hematein の 相互作用様式の解明

### Structural insight into binding of hematein to CK2 catalytic subunits

露口正人<sup>1</sup>、平澤明<sup>2</sup>、仲庭哲津子<sup>3</sup>、櫻井淳史<sup>4</sup>、仲西功<sup>4</sup>、木下誉富<sup>1</sup>

1 大阪府大院理、2 京大院薬、3 大阪大蛋白研、4 近畿大薬

Casein Kinase 2 (CK2) は 100 種以上もの基質のリン酸化を介して様々な細胞プロセスに関与するセリン・スレオニンキナーゼである。CK2 の活性サブユニットとして CK2 $\alpha$ 1、CK2 $\alpha$ 2 の 2 つのサブタイプが存在する。CK2 $\alpha$ 1 は広く発現しており、がんなどの疾患の創薬ターゲットとされている。一方、CK2 $\alpha$ 2 は精巣で特異的に発現しており、その阻害により精巣毒性などの副作用が懸念されるため、オフターゲットとされている。したがって、副作用を抑えるためには高選択性 CK2 $\alpha$ 1 阻害剤の創成が望まれる。2 つの立体構造は非常によく似ており、選択性を高めるための構造知見は得られていない。

CK2 阻害剤 hematein は CK2 $\alpha$ 1、CK2 $\alpha$ 2 に対する阻害活性は同程度であるが、CK2 $\alpha$ 1 に対しては ATP 非拮抗型阻害型、CK2 $\alpha$ 2 には ATP 拮抗型阻害型と、それぞれ異なる様式で作用する。この差異には何らかの構造的要因があると予想される。

そこで、本研究では、CK2 $\alpha$ 1、CK2 $\alpha$ 2 について hematein との複合体構造を解析した。CK2 $\alpha$ 1 は PF/NE3A で、CK2 $\alpha$ 2 は SPring-8/BL44XU で X 線回折データを測定した。HKL2000 で回折イメージの積分及びスケーリングを行ったところ、CK2 $\alpha$ 1 は 1.91 Å、CK2 $\alpha$ 2 は 3.09 Å 分解能のデータが得られた。空間群は CK2 $\alpha$ 1 は  $P2_12_12_1$ 、CK2 $\alpha$ 2 は  $P1$  である。初期位相は、既知の CK2 $\alpha$ 1 (3WAR) あるいは CK2 $\alpha$ 2 (3OFM) の構造を鋳型として molrep を使った分子置換法により決定した。精密化は DSmodeling/CNX、Coot/Refmac5 などのプログラムを用いて行った。CK2 $\alpha$ 1 は  $R_{\text{work}} = 22.6\%$  /  $R_{\text{free}} = 25.6\%$ 、CK2 $\alpha$ 2 は  $R_{\text{work}} = 24.8\%$  /  $R_{\text{free}} = 33.0\%$  となっている。hematein は共に ATP 結合サイトに結合していたが、その結合様式には明らかな違いが見られた。CK2 $\alpha$ 1 については、His160 の側鎖が大きく反転して hematein と相互作用していた。CK2 $\alpha$ 2 では His161 (CK2 $\alpha$ 1 の His160 に相当) の側鎖は ATP 結合サイトと逆側を向いており、hematein との相互作用は全く見られなかった。このことから、CK2 $\alpha$ 1 に対する hematein の阻害様式は His160 の側鎖の反転が重要であると結論される。

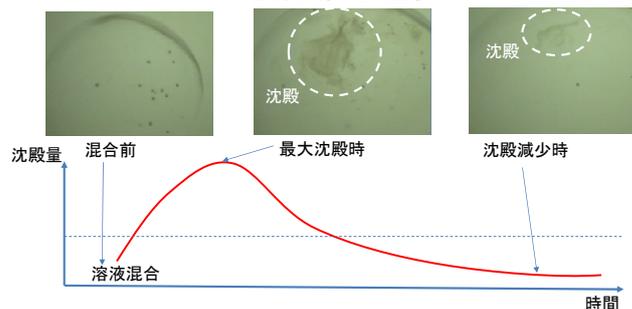
# タンパク質結晶化条件の高速スクリーニングのための 画像処理による沈殿検出 Precipitation Detection with Image Processing for Fast Screening of Crystallization Conditions of Protein

江並和宏<sup>1</sup>, 平木雅彦<sup>1</sup>, 千田美紀<sup>1</sup>, 千田俊哉<sup>1</sup>  
1 高エネルギー加速器研究機構

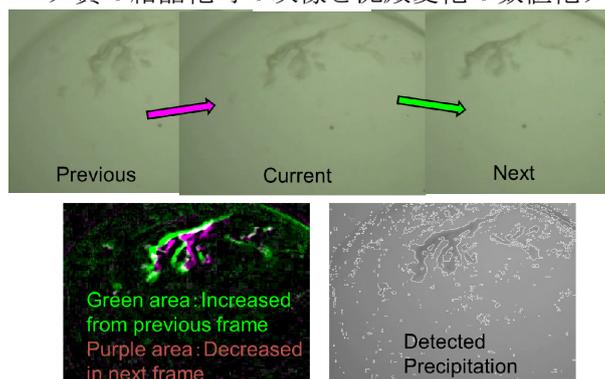
タンパク質結晶を効率よく生成するための手法として、「すぐ見る法」がある。「すぐ見る法」は、結晶化直後のドロップを観察するスクリーニング手法である。タンパク質溶液と結晶化試薬の混合時、下図のようにドロップ中に一旦沈殿が生じ、結晶化試薬の拡散に従い沈殿が減少していく現象が見られることがあるため、これを観察することで結晶化の可能性を推測し、効率良くスクリーニングを進めることができる。

現状は人間が沈殿の発生・変化を観察し、結晶化可能性を判定しているが、この判定を機械的に可能にすれば、専門家を要しない自動判定や、溶液作成及び判定の並列化による高速化が可能になる。そこで、機械的な結晶化期待値判定によるスクリーニングを目指す。

このためには、沈殿が生じてから消えていく過程の沈殿量の数値化が要求される。そこで、時間差のある3枚の画像の差分から沈殿を検出する手法を提案し、溶液混合時の映像から沈殿部分を抽出できることを示した。



タンパク質の結晶化時の映像と沈殿変化の数値化グラフ



差分による沈殿検出

# ATP および様々な ATP 類似体と結合した キナーゼタンパク質 DAPK の構造比較

## Structural comparison of the kinase protein DAPK bound to ATP and various ATP analogues

松尾悠平<sup>2</sup>・田中伊知朗<sup>1,3</sup>

1 茨城大工、2 茨城大学大学院理工学研究科

3 茨城大フロンティアセンター

### 【緒言】

DA PK は  $Ca^{2+}/CaM$  活性型の Ser/Thr キナーゼである。このタンパク質は生体内で脱リン酸化されることで活性化し、細胞死を促進することがわかっている。これまでの構造学的研究で特筆すべき点は、ATP 結合領域には多数の水分子が存在しており、アナログ結合前後で内部に存在した水和水の半数以上がそのまま結合部位に保存されていることである。そのため、ATP 加水分解やリン酸転移反応のエントロピーも含めたエネルギーの収支を議論するためのモデルに適している。X 線による非水素原子情報における阻害剤や基質の相互作用様式に関しての知見は、キナーゼそのもののリン酸基転移機構の詳細の解明や DAPK の阻害剤の開発にも役立つものと期待される。そこで本研究では、DAPK と ATP および ATP 類似体複合体の X 線結晶構造解析を行い、それぞれの ATP 結合部位に着目した構造比較を行うことを目的とした。

### 【実験】

キナーゼドメイン(残基数 277)を大腸菌で大量発現させて精製した DAPK を使用した。結晶化剤には  $(NH_4)_2SO_4$ 、ATP アナログには、Sigma Aldrich 製の AMP-PnP (ANP) と ATP- $\gamma$ S (AGS) および ATP、金属には  $MgCl_2$  を用いて、293K の条件下でハンギングドロップ法により結晶化した。結晶化は、Apo 体、DAPK-ATP、DAPK-ANP-Mg、DAPK-AGS-Mg、DAPK-ATP-Mg、それぞれ pH 6.5 と 8.0 の全 10 条件で行った。また、モル比が DAPK:アナログ:金属=1:5:50 になるように DAPK 溶液にアナログと金属を加えて、それをタンパク質溶液とした。X 線回折実験は KEK-PF AR-BL5A にて行い、Phenix と coot を使用してデータ解析を行った。

### 【結果】

分解能 2.3 Å の DAPK-ATP ( $R_{free}$ :0.2478)、2.25 Å の DAPK-ATP-Mg ( $R_{free}$ :0.2461)、2.06Å の DAPK-AGS-Mg ( $R_{free}$ :0.2297)の構造が新たに得られた。それぞれの構造における DAPK とアナログとの相互作用の比較や Apo 体との水の配位の仕方の違いについて、検討を行った。詳細な議論は当日のポスター発表にて行う。

## アーキア由来新規キチナーゼの結晶構造 Crystal structures of a novel type of chitinase from archaea

○西谷優一<sup>1</sup>、堀内あゆみ<sup>2</sup>、金井 保<sup>2,3</sup>、跡見晴幸<sup>2,3</sup>、三木邦夫<sup>1,3</sup>

1 京大院理、2 京大院工、3 CREST

超好熱性アーキア *Thermococcus chitonophagus* は、キチンを唯一の炭素源とする培地より単離された菌である。このような培地で生育できる超好熱菌の報告例はこれまでになく、本菌の高いキチン分解・資化能の解明を目指して、本菌のゲノム解析が行われた。その結果、新規キチナーゼの可能性のある *Tc-ChiD* 遺伝子が見つかった。*Tc-ChiD* は N 末端にシグナル配列を持ち、それに続いて超好熱性アーキア *T. kodakarensis* 由来キチナーゼのキチン結合ドメイン(ChBD)と相同性のある領域を二つ持つ。一方、C 末端ドメインには既知糖質分解酵素との配列相同性が見られず、GH18-type キチナーゼで保存されている DXDXE モチーフすら存在しない。本研究では、*Tc-ChiD* の X 線結晶構造解析を行い、新規キチナーゼの全体構造ならびに反応機構を明らかにすることを目的とした。

全長タンパクの大量発現は困難であったため、推定キチナーゼドメインのみを有する *Tc-ChiD*( $\Delta$ BD)を作製したところ、大量発現可能でかつ活性を有するサンプルを得ることができた。このサンプルを用いて結晶化を行い、基質非結合型ならびに基質結合型構造を決定した。またその際、結晶化の温度を 20°C から 35°C に上げることで、20°C の時とは形状の異なる結晶を得ることができ、分解能を 2.65 Å から 1.95 Å まで向上させることができた。現在は、全長タンパクの大量発現・結晶化にも取り組んでいる。

明らかになった *Tc-ChiD*( $\Delta$ BD)は、アミノ酸配列からでは予想できなかった三つ目の ChBD3 と、活性ドメインの二つから構成されていた。構造が類似した酵素との比較から、*Tc-ChiD* は約 100 残基からなる本酵素特有の C 末領域を有することが分かり、それが ChBD3 の固定に重要な役割をしていることが分かった。また、活性ドメインに基質の結合を確認し、反応に関わる残基を予想した。これらの構造情報を元に、生化学的解析も行った。発表では、*Tc-ChiD* の反応機構とキチン鎖結合について議論したい。

## [NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化に関わるアーキア由来

## HybD の X 線結晶構造解析

**Crystal structure of a [NiFe] hydrogenase maturation protease HybD from *Thermococcus kodakarensis* KOD1**権 成鶴<sup>1</sup>、西谷優一<sup>1</sup>、渡部 聡<sup>2</sup>、金井 保<sup>3,4</sup>、跡見晴幸<sup>3,4</sup>、三木邦夫<sup>1,4</sup>

1 京大院理、2 東北大多元研、3 京大院工、4 CREST

[NiFe]ヒドロゲナーゼは、水素の酸化還元反応を触媒する酵素である。この酵素は、大サブユニットと小サブユニットから成り、大サブユニットの活性部位には Ni と Fe が組み込まれている。この金属クラスターの形成には、成熟化と呼ばれる翻訳後修飾のプロセスを必要とする。成熟化の最終段階において、HybD または HycI の成熟化プロテアーゼは、大サブユニットの C 末端残基の切断を行う。Ni イオンが成熟化プロテアーゼの基質認識及び切断に重要であることが分かっているが、このプロセスに関する詳細はまだ不明である。本研究では、この基質認識及び切断機構を理解するために、好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来 HybD (TkHybD) の X 線結晶構造解析を行った。

TkHybD を大腸菌により大量発現した後、陰イオン交換クロマトグラフィーと疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製し、結晶化試料を調製した。結晶は Polyethylene glycol 6000 を沈殿剤とする条件で得られ、マイクロシーディング法により結晶の質を改良した。PF beamline などを使用して最終的に 1.8 Å 分解能の回折データを収集し、分子置換法により結晶構造を決定した。解析の結果、大腸菌由来 HybD や HycI、また Peptidyl-tRNA ヒドロラーゼと同様に、TkHybD には金属認識及び触媒作用に必要なと思われる残基(Asp16, Asp57, His89)が保存されていることが分かった。さらに、我々はリガンド結合部位を予測するプログラムを用いて、これらの残基が Ni イオンの結合部位を形成する可能性が高いことを示した。現在は、TkHybD の構造に基づいて、TkHybD と[NiFe]ヒドロゲナーゼ大サブユニットとの複合体の結晶化実験を行っている。

# iBIX を利用したマンガンカタラーゼ結晶の TOF 中性子回折実験 TOF Neutron Diffraction Experiments of Manganese Catalase using iBIX

山田太郎<sup>1</sup>・矢野直峰<sup>1</sup>・日下勝弘<sup>1</sup>・細谷孝明<sup>1</sup>・田中伊知朗<sup>1</sup>・大原高志<sup>2</sup>

1 茨城大学フロンティア研究センター, 2 J-PARC センター

茨城県生命物質構造解析装置 iBIX はタンパク質・有機分子結晶等の単結晶中性子構造解析を行うことを目的に J-PARC MLF のビームライン BL-03 に設置された飛行時間(TOF)型中性子回折計である。iBIX はビーム強度を得るために結合型減速材を中性子源に使用している。このため回折点が TOF 方向に広がる特性を有している。大きな結晶格子を有するサンプルにおいては、隣り合う回折点が空間方向のみならず、時間方向で重なる可能性がある。このような場合、回折点の分離積分法開発が必要となる。こうした状況を踏まえ、我々は平成 29 年度までに3つの格子長が 135 Å までのタンパク質結晶の中性子構造解析を行うことを目標としている。今回、テストデータを得るため、高度好熱菌 *T. Thermophilus* 由来のマンガンカタラーゼの結晶の TOF 中性子回折実験を行った。この結晶は a 軸が 132 Å の立方晶系(空間群  $P2_13$ )に属する。V. V. Barinin らの報告を参考にしてマンガンカタラーゼの結晶化を行った。30 台の検出器を有する iBIX を用いて、任意の一結晶方位について、加速器出力 300 kW のパルス中性子ビームを 41 時間照射した。使用した中性子波長は約 2.5–6.5 Å である。最小面間隔 d が 2.7 Å 程度の TOF 回折像を得た。得られたデータから将来構造解析が可能かどうかを判断するため、2.0 Å 分解能までの回折点の積分処理を行って、隣り合う反射の重なりを調査した。その結果、中低角の検出器( $2\theta = 50\text{--}75$  度)のうち、重なる可能性がある反射の割合が大きくなるものがあることが分かった。これに対し低角度側と高角側の検出器ではほとんど重なりが生じないことが分かった。効率よく TOF 中性子回折実験を行うためには、重なった反射の分離積分法の開発が必要である。マンガンカタラーゼの場合、結晶の対称性が高く、重なった回折点を無視しても、等価な強度データが別の回折条件で得ることができる。このため 2.0 Å 分解能の中性子単結晶構造解析に必要な回折データが現実的な測定時間で取得可能であると予想される。

時分割 X 線結晶構造解析による  
酸化ヌクレオチド加水分解酵素の反応機構の解明  
Reaction mechanism of oxidative nucleotide  
hydrolase

平田啓介、中村照也、吉川紘平、池鯉鮒麻美、池水信二、山縣ゆり子  
熊本大院薬

生命活動で生じる活性酸素種は DNA、RNA、さらにはその前駆体であるヌクレオチドに酸化損傷を与える。その中でもグアニンの 8 位が酸化を受けた 8-オキソグアニン(8-oxoG)は、生成頻度が高く、シトシンのみならずアデニンとも同程度に塩基対を形成できるため、8-oxo-dGTP が DNA 複製時に新生鎖へ取り込まれると突然変異を誘発する。ヒト由来 MutT ホモログは  $Mg^{2+}$  または  $Mn^{2+}$  の存在下で 8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP へ加水分解することで DNA 鎖への取り込みを阻害し、8-oxoG に起因する突然変異の防御系の一つとして機能している。

これまでに我々は、X 線結晶構造解析および時分割 X 線結晶構造解析により MutT ファミリータンパク質の基質認識機構および反応機構の解明を行ってきた。今回、低温トラップ法を用いた時分割 X 線結晶構造解析により、ヒト由来 MutT ホモログの加水分解反応過程を追跡した。8-oxo-dGTP の複合体結晶に  $Mg^{2+}$  または  $Mn^{2+}$  を含む溶液に浸漬させて結晶内反応を開始させた後、反応時間毎に 100K の  $N_2$  ガスで急速凍結して反応を停止させ、反応開始から終了までのそれぞれの中間体構造の解析を行った。本発表では、反応中間体構造から明らかになったヒト由来 MutT ホモログの加水分解反応機構について報告する。また、これまでに我々が明らかにした大腸菌 MutT の反応機構と比較、検討したので報告する。

## 茨城県生命物質構造解析装置 iBIX -現状と最近の解析例- IBARAKI biological crystal diffractometer iBIX -current status and recent results-

日下勝弘<sup>1</sup>, 山田太郎<sup>1</sup>, 矢野直峰<sup>1</sup>, 細谷孝明<sup>1</sup>, 大原高志<sup>2</sup>, 片桐政樹<sup>1</sup>,  
野田幸男<sup>3</sup>, 田中伊知朗<sup>1</sup>

<sup>1</sup>茨城大 iFRC、<sup>2</sup>JAEA J-PARC センター、<sup>3</sup>東北大多元研

生体高分子の単結晶中性子回折法による構造解析は、一般的に低分解能な X 線データでは観測が困難な水素原子やプロトン化状態について、X 線回折データとの相補的な利用により、精度の高い情報を得ることができる。生体内で約半分を占める水や分子表面の水素原子の詳細な情報は生体高分子の分子認識や化学反応機構解明に対して重要な知見を与えることが期待できる。ハイスループットな中性子構造解析を実現するために、茨城県により J-PARC の物質・生命科学実験施設(MLF)に茨城県生命物質構造解析装置(iBIX)が開発・建設された。iBIX は 2008 年 12 月から茨城大学の運転維持・管理のもとその供用を開始し、2012 年度に検出器の高度化がなされ、タンパク質試料への本格的供用が可能となった。2013 年度からは、加速器出力の 1MW への増強に合わせて、標準試料サイズ 1mm<sup>3</sup> の測定が可能となることを目指し、データ精度の向上・ユーザーニーズへの対応を目的とした、ソフトウェアおよび試料周辺環境装置の開発を進めている。

積分強度データの精度を向上するためには、検出器上に観測される Bragg 反射の位置を精密に予測する必要がある。これを実現するために、単結晶の Bragg 反射を測定することによる検出器座標の精密測定を行った。検出器 30 台全ての座標とゴニオメータのオフセット角が求まり、反射位置を予測するために必要な UB 行列の精度が向上し、指数付けの確度や得られる格子定数の精度が向上した。さらに、データ処理ソフトウェアのコンポーネントである積分法について以下の新たな方法を開発した。Bragg 反射の形状を考慮し、積分領域形状を最適化する方法と TOF 方向に対してプロファイルフィッティング法を適応した積分法である。これによりデータ精度、特に等価反射の一致度の向上を図った。ユーザーがより使い易い環境を提供するために測定制御・データ処理ソフトのユーザビリティ向上の改良も進めている。また、多様なユーザーニーズに対応するため、試料の外部条件を変化させる装置として、パルスレーザー照射装置・高温装置・延伸装置・恒温装置の開発を行っている。現在、ユーザー実験に供するべく設置・調整中であり、2016 年度下期のユーザー利用開始を目指している。

本発表では上述した最近の開発状況に加えて、iBIX により中性子構造解析の特徴を生かして得られた解析例についても報告する。

## 蛋白質脱イミノ化酵素 PAD1 の構造と結晶化条件の改良 Overall structures of PAD1 and improvement of the crystal

永井杏奈<sup>1,4</sup>、眞下隆太郎<sup>1,4</sup>、西條慎也<sup>2</sup>、清水伸隆<sup>2</sup>、  
高原英成<sup>3,4</sup>、海野昌喜<sup>1,4</sup>  
(1.茨大院理工、2.高エネ研、3.茨大農、4.茨大 iFRC)

蛋白質脱イミノ化酵素 peptidylarginine deiminase (PAD)は、Ca<sup>2+</sup>存在下で、蛋白質中のアルギニン残基をシトルリンに変換する酵素である。哺乳類には PAD1-PAD6 の 5 種類のアイズォイムが存在する。我々は、毛髪内に多量発現する S100A3 タンパク質 (S100A3) がシトルリン化を受けていることを見出したことから、毛髪内で起こるシトルリン化反応に興味を持った。毛髪には PAD1, PAD2, PAD3 の 3 種類が存在している。毛髪キューティクル細胞内に多量に存在する PAD3 は S100A3 の Arg51 を特異的にシトルリン化する。この翻訳後修飾により、ホモ二量体で存在する S100A3 は四量体に構造変化し、Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>との親和性が上がることから、PAD3 による S100A3Arg51 の特異的シトルリン化は、Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>の恒常性維持に関わる重要な反応であることが明らかになってきた。一方、*in vitro* で PAD1, PAD2 は S100A3 の 4 つすべてのアルギニン (Arg3, Arg22, Arg51, Arg77) をシトルリン化し、PAD3 とは異なる基質特異性を持つ。本研究の最終目的は、PAD1, PAD2 と PAD3 の基質認識の相違を構造生物学的に解明することである。

当研究室では、PAD1 の結晶化を Ca<sup>2+</sup>存在下で行い、X 線結晶構造回折実験から 3.7 Å の分解能を得られた。PAD1 結晶の構造解析から、非対称単位中に 2 分子存在していること、活性部位に隣の細長い N 末端が入り込む構造であることが明らかになった。しかし、その 2 分子の配置が PAD2 や構造既知である PAD4 二量体構造とは明らかに異なる構造であった。これらの構造が結晶内分子パッキングによる人工的なものである可能性を考慮して、溶液中での構造を決定するために、X 線小角散乱 (SAXS) 実験を行い、溶液中の構造を解析した。X 線小角散乱による溶液構造解析において、PAD1 は、細長い棒状の形状を示し、単量体であることが明らかになったが、基質認識の違いは全体構造のみでは解明できないと判断し、原子レベルの解析が必要となった。

PAD1 の高分解能構造解析を目指し、結晶化条件の改良を行ったところ、PF の AR-NE3A で、3.2 Å の分解能に相当する回折データを得ることに成功した。また、阻害剤を用いて共結晶化を行い、阻害剤結合型の構造の解明を試みている。本シンポジウムでは PAD1 の構造についてと、高分解能化を目指した結晶化条件の検討・改良の状況について議論する。

## 時間分割結晶構造解析によるニトリルヒドラーゼの 触媒機構解析

### Time-resolved crystallography of the reaction mechanism of nitrile hydratase

山中保明<sup>1</sup>、尾高雅文<sup>1,2</sup>、加藤祐一<sup>3</sup>、橋本浩一<sup>1</sup>、野口巧<sup>3</sup>、野口恵一<sup>1</sup>、  
養王田正文<sup>1</sup>

1 東農工大・院・工、2 秋田大・院・工学資源、3 名古屋大・院・理

結晶構造解析で反応プロセスをモニターすることは構造解析の課題の一つである。我々は、ニトリルヒドラーゼ(NHase)を材料に反応機構の時間分割結晶構造解析に取り組んでいる<sup>1,2</sup>。NHaseはアクリルアミドやニコチンアミドの工業生産に広く利用される産業的に最も成功した酵素である。しかし、二つの酸化修飾を受けたシステイン配位子を含む鉄またはコバルト錯体という極めて特異な活性中心をもつことから、その触媒機構は未だ明らかになっていない。本研究では、鉄型 NHase の時間分割結晶構造解析により、反応中間体の結晶構造を明らかにした<sup>3</sup>。反応速度を野生型の 0.2%まで低下させた  $\beta$ R56K 変異体をニトロシル化で不活性型にしたものを暗所で結晶化し、基質として pivalonitrile を添加し、種々の時間光照射をして NO を光解離させて酵素反応を行わせたあと、凍結によって反応を停止させ、結晶構造を決定した。その結果、NO の光解離に伴って、基質ポケットに取り込まれていた基質が酵素に結合し、反応時間 50 分以上の結晶では、基質のニトリル炭素に相当する電子密度にはシステイン酸化修飾の一つ  $\alpha$ Cys114-SOH の側鎖酸素原子が共有結合しており、生産物である pivalamide に極めて似た構造を形成していた。すなわち、基質が鉄の第 6 配位座に結合した後、 $\alpha$ Cys114-SOH の側鎖酸素が基質のニトリル炭素に求核攻撃して環状の反応中間体を形成することが示された。そこで、<sup>18</sup>O ラベルした水中で触媒反応をさせて FTIR で解析した結果、触媒サイクル中に  $\alpha$ Cys114-SOH の O 原子が溶媒の水分子と交換されることを明らかにした。以上の結果から、 $\alpha$ Cys114-SOH が基質を求核攻撃する新規触媒モデルを提唱した。

#### 参考文献

- (1) K. Hashimoto, H. Suzuki, K. Taniguchi, T. Noguchi, M. Yohda, M. Odaka, J. Biol. Chem. 2008, 283, 36617–36623.
- (2) Y. Yamanaka, K. Hashimoto, A. Ohtaki, K. Noguchi, M. Yohda, M. Odaka, J. Biol. Inorg. Chem. 2010, 15, 655–665.
- (3) Y. Yamanaka, Y. Kato, K. Hashimoto, K. Iida, K. Nagasawa, H. Nakayama, N. Dohmae, K. Noguchi, T. Noguchi, M. Yohda, M. Odaka, Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 10763–10767.

## ブルー銅タンパク質 Met16Gly 変異体の 構造と電子移動反応

### Structure and electron transfer reaction of blue copper protein Met16Gly pseudoazurin mutant

玉置彩緒理、大下宏美、山口峻英、海野昌喜、高妻孝光  
茨城大院・理工

脱窒菌 *Achromobacter cycloclastes* 由来のシュードアズリン(PAz)は、脱窒過程において亜硝酸還元酵素(NiR)、亜酸化窒素還元酵素への電子供与体として機能している。第二配位圏には Met16 残基が位置し、活性中心の銅イオンに配位する His81 との相互作用を通して、機能発現と活性中心構造の安定性に寄与していることが知られている[1]。本研究では、Met16 をアミノ酸側鎖が水素原子である Gly に置換した Met16Gly 変異体を作製し、弱い相互作用の変化が構造や電子移動反応に及ぼす効果について検討した。

Met16Gly の電子吸収スペクトルを測定したところ、453 nm と 593 nm に吸収極大を与えた。453 nm と 593 nm の吸光度比は  $A_{453} / A_{593} = 0.47$  であり、Wild Type ( $A_{454} / A_{594} = 0.46$ ) とほぼ同じ値であることから、活性中心の構造は Wild Type と同様の構造を有しているものと考えられた。Met16Gly の酸化還元電位は、313 mV vs. NHE であり、Wild Type (260 mV vs. NHE) よりも 53 mV 高い酸化還元電位を有することが明らかとなった。電気化学的に得られた Met16Gly と NiR との電子移動反応速度定数は  $5.76 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  であり、Wild Type ( $1.42 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) よりも約 25 倍遅くなることが判明した。このことは、Met16Gly の酸化還元電位が 53 mV 高いこと、および、Gly 残基を導入したことによって活性中心近傍での弱い相互作用に変化が生じたことによるものと考えられる。酸化型 Met16Gly (pH 7.5) の結晶について X 線結晶構造解析を行ったところ、活性中心の構造は酸化型 Wild Type (pH 7.5) と同様の構造をとっていたが、Gly に置換した 16 位周辺の構造は、2 分子のうち chain A では Met16 側鎖の位置に水分子と考えられる電子密度が見られ、chain B では Lys10 から Glu19 のループ構造がディスオーダーしている構造をとっていることが明らかとなった。このことから、Gly 残基の導入によりオープンスペースが与えられると、ループ構造が変化しやすくなるが、Met16 側鎖の位置に水分子が存在することで His81 との間で新たな相互作用が生じ、ループ構造が安定化すると示唆された。

[1] R. F. Abdelhamid, Y. Obara, Y. Uchida, T. Kohzuma, D. M. Dooley, D. E. Brown, H. Hori, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 165–173.

## 2 台の二次元検出器を用いた高角回折 X 線データ収集環境 High-angle diffraction data collection environment using two area detectors

松垣直宏<sup>1</sup>、山田悠介<sup>1</sup>、Dorothee C. Liebschner<sup>1</sup>、平木雅彦<sup>2</sup>、千田美紀<sup>1</sup>、  
千田俊哉<sup>1</sup>

1 KEK-PF 構造生物学研究センター、2 KEK 機械工学センター

低エネルギー X 線を利用した軽原子 SAD(単波長異常分散)法は、試料中のタンパク質に自然に含まれている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。試料への重原子導入を省けることによる解析の高速化だけでなく、重原子導入自体が困難なタンパク質の構造解析等が期待される。しかし、イオウやリンなど軽原子からの微弱な異常散乱シグナルを精度よく測定することには多くの困難があり、現在においても一般的な位相決定法として普及していない。

軽原子からより大きな異常分散シグナルを得るには、より低エネルギーの X 線を使用するのが一般的に有利である。しかし回折データ収集においては、試料そのものや大気による X 線の吸収、回折角の増大による検出器側の制約等の問題がよりシビアになり、精度の高いデータ収集を困難にしている。PF-BL1A では、一般的な構造生物学ビームラインがカバーできない 4keV 近傍の X 線を用いると同時に上記問題を克服すべく、データ収集・解析法の開発を進めている。高角の回折 X 線を精度よく測定するため、二台の二次元検出器をヘリウムチャンバー中で V 字状に配置しデータ収集するシステムを開発中である。2015 年 6 月の予備実験では  $2\theta$  が 90 度近傍までカバーされた状態でデータ収集を行い、データ統計が妥当なこと、軽原子 SAD 法による位相決定が可能であることが示された。2015 年度冬の停止期間に 2 台の検出器の角度をそれぞれ 0~30 度まで独立に変更できる新型の検出器架台のインストールを行い、通常配置及び V 字状配置でのデータ収集を切り替えて実験ができるシステムを構築予定である。2-3 月のビームタイムでテスト実験を経た後に来年度からのユーザーオープンを目指したい。

## MR-SAD を用いた転写因子の結晶構造解析 Structural study of a bacterial transcription factor by MR-SAD

秋山友了<sup>1</sup>、山田悠介<sup>2</sup>、矢嶋俊介<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学バイオサイエンス学科、<sup>2</sup>KEK-構造生物学研究センター

[背景] ヒドラジドは一般式  $R^1C(=O)NR^2NR^3R^4$  で表される化合物である。原料のヒドラジンやカルボン酸は安価で入手が簡単であり、合成も容易であるため、医薬品、農薬、染料、塗料など工業的に広く用いられている。しかし、天然にはわずかにしか知られておらず、その代謝メカニズムについて詳細は不明である。近年、ヒドラジドを単一の炭素源として生育可能な細菌、*Microbacterium* sp.HM58-2 株が土壌から単離され、ヒドラジド分解酵素 hydrazidase が同定された(1)。この酵素遺伝子はグルコースを炭素源とした培地では発現が抑えられるのに対し、ヒドラジドを炭素源とした培地において発現が誘導され、その制御は IclR 型の転写因子によることが予想された。そこで、ヒドラジド代謝機構を明らかにするために、IclR の立体構造解析に着手した。

[方法・結果] IclR は約250残基からなり、すでに大腸菌、*Rhodococcus*, *Thermotoga* 等由来の結晶構造が明らかとなっていた。そこで、常法に従い、*Microbacterium* 由来 IclR (mi-IclR)を大腸菌を用いて大量発現させ、Ni-affinity カラムにより精製を行った。ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶を得たが、非常にもろく回折データ収集が困難であったため、カウンターディフュージョン法を用いることで、再現性良く良質な結晶を得ることに成功した。PDB上のIclRは、お互いのアミノ酸配列 identity は18~21%であるが、基質結合とDNA結合ドメインが短い $\alpha$ -ヘリックスでつながれた共通構造を取っている。mi-IclRのアミノ酸配列も同様の identity であるため、得られたデータからドメインごとにMolrep, Phaserで分子置換を試みたが解が得られなかった。そこで、MoRDaを使用したところ、非対称単位中に基質結合ドメインが7分子の解が得られ、そのうち2分子が正しい解であると考えられた。BL-1Aを利用して波長2.7ÅでS-SAD用回折データ(分解能3Å)を収集した。XDS packageによりintegration, scalingを行い、CCP4 suiteのCRANK2にMoRDaの解を用いて、MR-SADを行った(2)。その結果、非対称単位中にある4分子(ホモ2量体x2)のモデリングがすべて自動で得られたので報告する。

### 参考文献

- (1) Oinuma, et al., (2015) J. bacterial. 197, 1115-1124.
- (2) Senda, et al., (2015) 日本結晶学会要旨集, p50.

## タンパク質単結晶の高圧凍結法の最適化 Optimization of high pressure freezing method of single crystal of protein

岳 文雪<sup>1</sup>、飛田 雅之<sup>2</sup>、田中 伊知朗<sup>2,3</sup>

1 茨城大院理工、2 茨城大工、3 茨城大フロンティア

大形生体高分子単結晶凍結は、中性子回折技術において水素検出感度向上を目的とした核偏極中性子回折実験において重要なものである。通常のタンパク質単結晶の凍結は、不凍液を用いて育成した単結晶を短時間で冷却することで、水をアモルファスのまま、氷の結晶を生じさせずに、結晶を壊さないまま低温にする方法である。この方法は、放射光 X 線源で用いる小さい結晶には適しているが、中性子用の比較的大型単結晶には、不向きである。大抵の場合、中性子実験用の大型単結晶は、何個も用意できないことも多く(通常は 1-2 個)、失敗が許されない。なので、大形たんぱく質結晶の凍結法の検討が必要になっている。

2005 年米国コーネル大 Kim らのグループによって開発された約 200MPa まで高圧環境での凍結法が大型単結晶に適用できるのではないかと注目した。大型結晶が凍結できるような圧力管(内径 6.35mm 以上)やピン(約 3mm ループ付)を特別に追加した仕様の高圧凍結装置 HPC-201(米国 ADC Inc)の市販 1 号機を発注し、2014 年 3 月に設置することができた。

高圧凍結の手順は:①結晶をループで掬う、②ループを凍結ピンに乗せる、③凍結ピンを圧力管にセットする、④凍結ピンごとに加圧する(200MPa まで)、⑤常圧に戻る、⑥凍結管を開放する、⑦結晶をループステージに移動する、⑧結晶を液体窒素の中に保存する。

従来の瞬間凍結の手順と違うのは、手順④から手順⑧までの作業について、結晶と結晶を触る設備が全部 100K に保持しなければならない。実際に高圧凍結装置を使って高圧凍結実験を行ったところ、最初は予想外に、凍結がほとんどできませんでした。調べてみると、ループ、凍結ピン、圧力管、開放道具、ループステージについて、それぞれ不具合があった。また、凍結後の結晶の取り出しについても大きなトルクを必要とし、結晶に損傷を与える可能性があることも分かった。それに対して、ループ、凍結ピン、圧力管、開放道具、ループステージの改良をそれぞれ行うことにした。何回も改良したうえ、凍結の成功率が最初の 10% 以下から、ほぼ 100% に上がった。

結果として、抗凍結剤と結晶保護剤を使わず、最大体積が  $0.8 \times 0.8 \times 0.8$  mm<sup>3</sup> のリゾチームたんぱく質を凍結した。水をアモルファスのまま、氷の結晶を生じさせずに、凍結できた。以下 X 線のディフラクションを見ると、高圧凍結した結晶が瞬間凍結した結晶より、氷のバックグランドが完全に低かった。

**鉄貯蔵タンパク質アポフェリチンへ  
Fe<sup>2+</sup>イオンを導入したときの結晶学的研究  
Crystallographic studies of iron storage protein  
Apoferitin introduction by Fe<sup>2+</sup> ions**

矢本早紀<sup>1</sup>, 田中伊知朗<sup>1,2</sup>

1 茨城大工, 2 茨城大フロンティアセンター

**【緒言】**アポフェリチンは空洞を持つ球状の 24 量体の鉄貯蔵タンパク質である。分子の大きさは、外径約 130 Å、内径約 80 Å で、24 量体は F432 という空間群で非常に高い対称性をもって構成されている。空洞内には鉄を ferric hydroxyphosphatemicelles という形で最大 4500 個貯蔵することができ、生体内で鉄の保存・放出に関与している。アポフェリチンの結晶には Cd<sup>2+</sup>イオンが配位していることがわかっている。そこで本研究では、X線回折測定の前直前に Fe<sup>2+</sup>イオンを結晶に導入することで、Fe<sup>2+</sup>イオンの結晶構造への取り込み及び、Cd<sup>2+</sup>イオンに対する影響を調べ、アポフェリチンへの Fe<sup>2+</sup>イオン導入の効果を結晶学的に考察することを目的とした。

**【実験】**アポフェリチンタンパク質はウマ脾臓由来の Sigma-Aldrich 製(A3641)を購入した。結晶化溶液は、沈殿剤に Ammonium Sulfate、添加剤として Cadmium Sulfate、Sodium Azide を用い、293K の条件下で、ハンギングドロップ法によって結晶化した。X 線回折実験は茨城県つくば市にある KEK-PF BL-5A にて低温 100K で行った。結晶への Fe<sup>2+</sup>イオンの導入は、測定直前に結晶を硫酸鉄(II)水溶液にソーキングすることで試みた。抗凍結剤には ethylene glycol を用いた。データ処理は HKL2000、構造解析は Phenix、coot を使用した。

**【結果】**X 線回折実験の結果、分解能はアポフェリチン結晶で 1.75 Å、鉄導入を試みた結晶は 2.20 Å であった。ソーキングによる結晶の損傷は見られなかった。

分子間結合に関与する Asp80 と Gln82 におけるカドミウムの電子密度分布は楕円体で、異方性温度因子を決定することができた。解析の結果、両構造の比較により、Fe<sup>2+</sup>イオンの導入を試みた結晶ではアポ体のカドミウムに相当する電子密度が少し広がっており、ピーク値が減少した。これは、Cd<sup>2+</sup>イオンが Fe<sup>2+</sup>イオンに置き換わった可能性があると考えられる。詳細な議論は当日ポスター発表で行う。

# 多数のヨウ素イオンが配位したリゾチームタンパク質の X 線 構造解析

## X-ray structure analysis of lysozyme protein coordinated by many iodine ions

小林政義<sup>1</sup>・田中伊知朗<sup>2,3</sup>

1 茨城大院理工、2 茨城大工、3 茨城大フロンティアセンター

【緒言】ヨウ素が体内に取り込まれると、甲状腺に集まり、甲状腺ホルモンが作られる。一方でヨウ素がタンパク質に多く配位することが結晶学的に知られている。本研究では、リゾチームにNaIを加えることで良質な単結晶を作製し、X線解析を行うことで、ヨウ素のタンパク質中における詳細な配位の様子に関する情報を得ることを目的とした。これにより、ヨウ素の代謝に関するモデル系を構築できる可能性がある。

【実験】リゾチームはSigma-Aldrich社より購入したものをを用いた。結晶育成条件は、タンパク質濃度:10-90mg/ml リゾチーム、結晶化濃度:0.5%~5.0% Sodium Iodide(NaI)、緩衝液:0.050M NaOAc(酢酸/酢酸ナトリウム)pH=4.5、温度 293K、結晶化法:ハンギングドロップ法で結晶化実験を行い、約 0.5mm<sup>3</sup>の結晶が得られ、KEK-PF AR-NW12A および BL-5A において低温 100K にて X 線回折および解析を行った。

【結果・考察】X線回折実験を行った結果、NaI 濃度 0.5% (分解能:1.46 Å、 $R_{\text{free}}$ :19.81%)、2.0% (分解能:1.00 Å、 $R_{\text{free}}$ :20.52%)、3.0% (分解能:1.20 Å、 $R_{\text{free}}$ :20.41%)、4.0% (分解能:1.52 Å、 $R_{\text{free}}$ :20.59%) の 4 条件において解析することが成功し、単斜晶系リゾチームであることが確認できた。ヨウ素が多数配位したデータとしては、非常に高分解能として解析が成功した。これらの結果を、それ自身と、ヨウ素が配位した室温の単斜晶データ[1]および正方晶データ[2]から、ヨウ素が結合する場所と結合様式に関して、測定温度、濃度、晶系、非等方性温度因子の 4 つの観点からそれぞれの依存性を比較したところ、多くの同一性や相違点を見つけることができた。さらに、ヨウ素の有無による構造の変化、結晶パッキングに関与するヨウ素といった情報を得ることができた。詳細は当日、ポスターにて議論する。

### 参考文献:

[1] M. C. Vaney, *et al.*, *Acta Cryst*, **D57**, 2001, 929-940

[2] K. Takeda, *et al.*, *J. Appl. Cryst.* **37**, 2004, 925-933

PF-BL5A, PFAR-NE3A, PFAR-NW12A

## 中性子結晶構造解析に向けたビリン還元酵素 PcyA 変異体 I86D の大型結晶作製条件の探索

### Search for the conditions for obtaining the large crystals of a bilin reductase PcyA mutant I86D for the neutron crystal structure analysis

五十嵐啓介<sup>1</sup>, 海野昌喜<sup>2,3</sup>, 杉島正一<sup>4</sup>, 和田啓<sup>5</sup>, 福山恵一<sup>6</sup>

1. 茨城大学工学部, 2. 茨城大学大学院理工学研究科, 3. 茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター, 4. 久留米大学医学部, 5. 宮崎大学テニュアトラック推進機構, 6. 大阪大学大学院工学研究科

PcyA はテトラピロールのビリン色素の一つであるビリベルジン IX $\alpha$  (BV)をフェレドキシン依存的に還元し、光合成や光応答で重要な役割を担うフィコシアノビリン(PCB)を合成する。PcyA は BV の D 環ビニル基と A 環ビニル基を部位特異的に順序立てて還元する特徴的な酵素である。本研究では、BV と重要なアミノ酸 Asp105 の近傍に位置する Ile86 をアスパラギン酸に置換した PcyA 変異体 I86D (I86D)の水素化状態を可視化する。I86D と BV の複合体 (I86D-BV)の吸収スペクトルは野生型 PcyA と BV の複合体 (WT-BV)と比較して 730nm 付近の吸光度が大きく増大していた。その吸収は、一段階目の反応で PcyA によって BV にプロトンが付加された BVH<sup>+</sup>由来であると推測されている。そこで I86D-BV 複合体結晶の中性子結晶構造解析から得る水素原子の位置情報によって、BVH<sup>+</sup>の構造とプロトンドナーの解明を目指す。

形質転換した大腸菌で I86D 遺伝子を発現、I86D タンパク質を精製した後、I86D-BV 複合体の結晶化条件を検討、最適化して大型結晶作製を目指している。ハンギングドロップ蒸気拡散法やシッティングドロップ蒸気拡散法、ボタン透析法などの様々な結晶化方法を試みた。また、緩衝液や沈殿剤の濃度や種類、pH などの条件を検討していった。得られた結晶を用いて低温 X 線回折実験、室温 X 線回折実験を行い、温度因子などから結晶性の評価をした。今のところは、最長軸が 1.3mm ほどの I86D-BV 複合体の結晶の作製に成功している。本シンポジウムでは、I86D-BV 複合体の大型結晶化への取り組みと、現在得られている結晶について報告したい。

## ブタ肝臓由来シトクロム $b_5$ 可溶性ドメインの 高分解能結晶構造

### High-resolution crystal structures of solubilized domain of porcine cytochrome $b_5$

平野 優<sup>1</sup>、木村 成伸<sup>2</sup>、玉田 太郎<sup>1</sup>

1 原子力機構量子ビーム、2 茨城大学工学部

哺乳類のミクロソームに存在するシトクロム  $b_5$  は、様々な電子伝達パートナーとの間で電子伝達反応を行うことが知られている。シトクロム  $b_5$  は、約 134 アミノ酸残基からなるヘム結合タンパク質であり、N 末端側は小胞体膜の細胞質側に存在するヘム結合領域で、C 末端側で小胞体膜に結合している。本研究では、ブタ肝臓由来シトクロム  $b_5$  の N 末端側 94 残基のヘム結合領域について、2 つの結晶化条件で酸化還元状態の計 4 種の結晶を作成し、X 線結晶構造解析を実施した。回折実験は PF BL5A と BL17A において行い、4 種の結晶全てについて 1 Å 分解能を超えるデータセット (0.76–0.95 Å) を取得した。高分解能構造解析の結果、いくつかのアミノ酸残基で水素原子の電子密度を観測することができた。また、高分解能構造を用い酸化還元状態の比較を行ったところ、ヘムの酸化還元状態調節に重要だと考えられる構造の特徴をとらえることができた。まず、原子間結合距離、角度の制約をはずした立体構造精密化を行った結果、ヘムのプロピオン酸基におけるプロトン化状態が、ヘムの酸化還元状態の調節に関わっている可能性が示唆された。また、ヘム鉄配位子の構造については、酸化還元状態間で有意な差を観測することはできなかったため、ヘム鉄配位子の構造変化は大きく制限されていることが明らかとなった。一方、ヘム鉄の軸配位子 His68 の周辺においては、水素結合ネットワークの構造変化が観測された。そのため、His68 周辺の水素結合ネットワークの構造変化がヘムの酸化還元状態調節に関わっていると予想された。

# Photoactive Yellow Protein におけるアルギニン 52 の 精密構造解析

## Structural Detailed Analysis of Arginine52 in Photoactive Yellow Protein

米澤健人<sup>1</sup>、清水伸隆<sup>2</sup>、山崎洋一<sup>1</sup>、片岡幹雄<sup>1</sup>、上久保裕生<sup>1</sup>

1 奈良先端大・物質、2 KEK-PF

アルギニン残基の pKa は約 13.8 であり、この値はアミノ酸残基の中で最も高い。そのため蛋白質内部のような疎水環境でも、アルギニンが電氣的に中性状態を取ることは難しいと考えられている。我々は X 線・中性子結晶構造解析を用いることで、光受容蛋白質 (Photoactive Yellow Protein, PYP) の暗状態において、蛋白質表面近傍に位置するアルギニンが電氣的な中性状態をとることを示唆してきた。しかしながら、結晶構造解析に一般的に用いられているソフトウェアには電氣的な中性状態のアルギニンのトポロジーやパラメータが提供されていないため、先の構造解析ではプロトン化したアルギニンのトポロジーとパラメータを使用した。プロトン化したグアニジノ基は  $C_\xi-N_\epsilon$  並びに  $C_\xi-N_{\eta_{1,2}}$  の間で共鳴構造をとり、 $C_\xi$  を中心に対称的な結合を有する。一方で、電氣的な中性状態のグアニジノ基では、 $C_\xi-N_\epsilon$  並びに  $C_\xi-N_{\eta_{1,2}}$  の間で単結合と 2 重結合が明確に区別される構造となる。本研究では、Arg52 の詳細な構造を高分解能 X 線結晶構造解析 (0.84Å) と中性子結晶構造解析によって決定することを目的とした。高分解能 X 線結晶構造解析の結果から Arg52 のグアニジノ基の電子密度は非対称性を示し、 $C_\xi-N_{\eta_1}$  の  $\pi$  電子に由来すると考えられる電子密度が観測され、 $C_\xi-N_{\eta_1}$  が 2 重結合性を示すことが明らかとなった。高分解能 X 線結晶構造で決定したグアニジノ基の C, N の位置を元に中性子結晶構造解析を行い、グアニジノ基の水素原子の精密化を行った。その結果、2 重結合を形成している  $N_{\eta_1}$  ではプロトン 1 原子のみ核密度が観測された。一方、単結合と考えられる  $C_\xi-N_{\eta_1}$  の窒素原子では 2 つのプロトンに由来する各密度が観測されたことに加え、 $N_{\eta_2}$  周りにおけるプロトンの核密度は、グアニジノ基の平面構造に対して外れた所に位置していることが明らかになった。この結果は、 $N_{\eta_2}$  が  $sp^3$  混成軌道によって説明できることを意味している。以上の結果から、PYP の Arg52 は蛋白質表面近傍に存在しているにもかかわらず電氣的に中性状態をとっていることが明らかとなった。ポスター発表では、赤外吸収分光と DFT 計算の結果も示し、溶液状態でのアルギニンのプロトン化状態についても議論する。

## 「multi-step soaking 法」による タンパク質結晶の質の改善

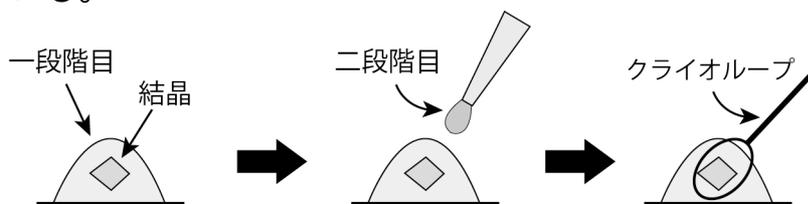
### Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality from protein crystals

千田美紀<sup>1</sup>、林剛瑠<sup>2</sup>、畠山昌則<sup>2</sup>、竹内恒<sup>3</sup>、佐々木敦朗<sup>4</sup>、千田俊哉<sup>1</sup>

1 KEK-物構研、2 東京大学、3 産総研、4 シンシナティー大学

近年では微小で質の悪い結晶であっても回折データの収集が可能な時代になってきた。しかし、高分解能になる程に結晶構造から得られる情報量が増加するため、質の良い結晶を得るための手法に対する関心は高い。タンパク質の結晶化に関する技術は未成熟であるため試行錯誤に頼ることが多いが、経験に基づいて一定の判断基準を設定することで迅速に結晶の質を改善することが可能になる。我々のグループでは、様々なタンパク質の X 線結晶構造解析を行う中で、独自の結晶化の手法を開発し実践してきた。本発表では、結晶の質を改善するために開発した複数のクライオプロテクタントを多段階で用いる multi-step soaking 法について紹介したい(1)。

ピロリ菌の発がんタンパク質 CagA 結晶の場合、室温で測定した場合や代表的なクライオプロテクタントであるグリセロールを用いた場合には 7 Å 分解能の回折しか生じなかった。しかし、約 20 種類のクライオプロテクタントの中から CagA 結晶に適したクライオプロテクタントを選び出し、多段階で組み合わせて用いた結果、最終的には 3.1 Å 分解能までデータが改善され、SAD 法による構造決定を行うことができた(2)。また、脂質キナーゼの PI5P4K $\beta$  については、当初 4 Å 分解能のデータしか収集することができなかったが、multi-step soaking 法を適用することにより、最大で 2.1 Å 分解能のデータを収集することができた。その結果、GTP と ATP の結合様式の違いを明確に示すことができ、PI5P4K $\beta$  が GTP センサーであることを証明するに至った(3)。この方法は他のタンパク質結晶の質を改善するためにも適用できると考えている。



#### Reference

1. M. Senda *et al.* *Crystal growth & Design* in press.
2. T. Hayashi *et al.* (2012) *Cell Host & Microbe*. 12, 20-33.
3. K. Sumita *et al.* (2016) *Molecular Cell* 61, 1-12.

# *N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼの X線結晶構造解析と機能改変 X-ray crystal structural analysis and changing substrate specificity of *N*-acetylhexosamine 1-kinase

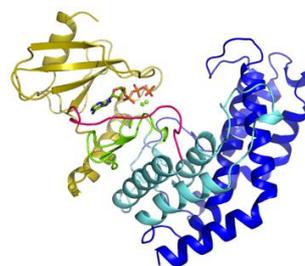
佐藤真与<sup>1</sup>、荒川孝俊<sup>1</sup>、西本完<sup>2</sup>、北岡本光<sup>2</sup>、伏信進矢<sup>1</sup>

1 東大院・農、2 農研機構・食総研

ビフィズス菌はヒトの健康に有益な善玉菌として知られ、宿主や他細菌が利用しにくい難消化性の糖質である、ヒトミルクオリゴ糖やヒト消化管粘膜のムチン糖鎖などを利用して生育する。それに対応してビフィズス菌が保持する独特な糖代謝機構の1つがGNB/LNB経路であり、本研究の対象である*N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼ(NahK)は、この経路中で主に*N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)または*N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)の1位 $\alpha$ -ヒドロキシ基のATPによるリン酸化を触媒する他、基質特異性が広く様々な糖 1-リン酸を生成できる。本研究では NahK を活用したオリゴ糖合成を目指し、X線結晶構造解析と機能改変を行った。

## 【NahKのX線結晶構造解析】

結晶化、Se-SAD法による位相決定により、基質フリー、ATP、ADP複合体(open構造)、GlcNAc、GalNAc複合体(closed構造)の5種の立体構造を決定し(図)、基質結合に伴う大きなopen-close構造変化の様子を明らかにした。変異体の詳細な活性測定により、触媒反応に関わる残基を同定し、ATPに結合した2つのMg<sup>2+</sup>の重要性を示した。以上から、NahKが既存の糖キナーゼとは性質が異なり、プロテインキナーゼから進化してきた酵素であることを見出し、キナーゼの分子進化に関する新たな知見を得た(Sato, et.al., *BBA*, 2015)。



(図)NahKの全体構造

## 【NahKの機能改変】

NahKにより生成する糖 1-リン酸のうち、 $\alpha$ -マンノース 1-リン酸は、 $\beta$ -マンノシドに作用する反転型ホスホリラーゼ(糖質加水分解酵素ファミリー130)の逆反応により各種 $\beta$ -マンノオリゴ糖を合成する際の基質となる。しかし NahKのManに対する活性は本来の基質であるGlcNAcの約1/13と、実用化には不十分であったため、NahKの基質特異性をGlcNAcからManへシフトさせるような機能改変を目指した。60種以上の変異体を作製した結果、Manに対する $k_{cat}$ が上昇し、触媒効率が野生型の約15倍上昇したI146K/F149Yと、Manに対する $K_m$ が低下し、触媒効率が約30倍上昇したI146Y/F149Y、2種の実用化の見込まれる改変酵素が得られた。

PF AR NE3A, PF BL17A

## *Sphingobium* sp. SYK-6 株の脱メチル化酵素 LigM の X 線結晶構造解析

### Structural analysis of demethylase, LigM from *Sphingobium* sp. SYK-6.

<sup>1,2</sup> 原田彩佳、<sup>3</sup> 上村直史、<sup>3</sup> 政井英司、<sup>1,2</sup> 千田俊哉<sup>1</sup>. KEK PF 構造生物 <sup>2</sup>. 総研大 物質構造科学 <sup>3</sup>. 長岡技術科学大学 生物系

*Sphingobium* sp. SYK-6 という微生物は、パルプ廃液から単離された微生物で、通常の生物とは大きく異なる栄養要求性を持っている。通常の生物が”食べる”ものは食べられず、芳香族化合物である低分子性のリグニンを分解してエネルギーを得ている。SYK-6 株の LigM は低分子性リグニン誘導体であるバニリン酸や 3-O-メチルガリク酸を基質とする脱メチル化酵素として知られている。LigM は脱メチル化の補酵素としてテトラヒドロ葉酸 (THF) を利用することで 5-CH<sub>3</sub>-THF を生成し、炭素原子1つを C1 代謝経路に供与すると考えられている。しかし SYK-6 株以外の生物の C1 代謝とは基質が全く異なっていることから、SYK-6 は、主要なエネルギー源であるリグニン誘導体化合物を C1 代謝に利用できるように進化したと考えられた。そこで、SYK-6 株の進化の過程を明らかにするために、X 線結晶構造解析法を利用して LigM の結晶構造を決定し、ホモログ酵素の立体構造を比較することで進化的な知見を得る事を計画した。PF AR NE3A 及び PF BL17A を利用し、アポ型、基質結合型、補酵素結合型、基質アナログ+補酵素結合型の結晶構造をそれぞれ 1.85 Å, 1.80 Å, 1.90 Å, 1.95 Å の分解能で決定することができた。それぞれの構造を C $\alpha$  で重ねあわせを結果、基質や補酵素が結合したことによる顕著な全体構造の変化は見られなかった。しかし、ホモログ酵素の構造と比較した結果、GCV-T-C ドメインの部分の構造が大きく異っていた。今回は LigM の結晶構造解析の結果とホモログ酵素との構造の比較結果を発表する。

## *Sphingobium* sp. SYK-6 株由来 Type II エクストラジオール ジオキシゲナーゼ DesZ の X 線結晶構造解析

### Purification, crystallization and X-ray structure determination of a type II extradiol dioxygenase DesZ derived from *Sphingobium* sp. SYK-6

○松原永季<sup>1</sup>、上村直史<sup>2</sup>、政井英司<sup>2</sup>、千田俊哉<sup>1,3</sup>

1 総研大、2 長岡技術科学大学、3 高エネ研・物質構造科学研究所

DesZ は活性中心に二価の非ヘム鉄をもつ typeII エクストラジオールジオキシゲナーゼで、*Sphingobium* sp SYK-6 株の代謝経路において 3-O-methylgallate (3MGA)の芳香環開裂反応を触媒する酵素である。SYK-6 株はリグニン由来の低分子芳香族化合物を資化して生育することが可能な菌株で、この代謝経路はこれまでに網羅的に解析されてきた。この経路で鍵となる芳香環の開裂反応を担う酵素は現在までに DesZ・LigAB・DesB の3種類が単離されており、それぞれの異なる基質特異性を利用して複数の経路を持つことによりエネルギー代謝の核となる芳香環開裂反応を相互補償している。我々はこれまでの研究において、LigAB および DesB の結晶構造を決定したが、DesZ については未知であった。本研究では、DesZ の詳細な立体構造を得ることにより、これら3種類の酵素の基質特異性の違いについて新たな知見を得ることを最終的な目的とし、DesZ の発現・精製方法の最適化および結晶化、X 線結晶構造解析を行った。

DesZ は活性中心に二価鉄を必要とするが、この種に属する酵素は酸素による酸化を受けて鉄が遊離することが知られている。そのため今回は DesZ の精製に要する時間を極力減らし、精製後すぐに嫌気条件下に移行して結晶化を行った。得られた結晶は PF-BL1A および BL17A で X 線回折データを測定し、位相決定は PF-BL1A のヘリウムチャンバー内で波長 1.9Å で測定した回折データを用いて Native-SAD 法により行った。また、ここで得られた構造をモデルとした分子置換法により、最終的に 1.85Å 分解能での構造決定に成功した。

DesZ は LigAB・DesB の活性中心を含むドメインとよく似た構造を持っており、その R.M.S.D.はそれぞれ 1.9Å および 2.7Å であった。また、活性中心で金属と配位する残基は His-His-Glu で、アミノ酸配列同様に非常によく保存されていた。しかし活性部位の蓋に相当する部分では DesZ のみに存在する領域が外側に巻き上がり活性部位を開け放つ状態にあった。今後、今回得られなかった基質-複合体構造を決定し、さらなる解析を進めていく予定である。

# ユビキチンの高圧結晶構造解析 High-Pressure Protein Crystallography of Ubiquitin

永江峰幸<sup>1</sup>, 下赤直人<sup>2</sup>, 渡邊信久<sup>1, 2</sup>  
1名大シンクロトロン, 2名大院工

蛋白質は圧力に対して、解離・会合やコンフォメーション変化といった様々な応答を示す。こういった応答の多くは蛋白質と周囲の水分子との相互作用に起因していると考えられている。X線結晶構造解析法では、蛋白質分子自身の立体構造に加えて、蛋白質分子表面や分子内の水和水の構造も決定することが可能である。そこで我々はダイヤモンドアンビルセル(DAC)と放射光の短波長X線を使用した蛋白質結晶の高圧構造解析を行っている。

本研究では、ヒトユビキチン結晶を用いて、Photon Factoryのタンパク質結晶構造解析用ビームラインPF AR-NW12Aと、あいちシンクロトロン光センターの名古屋大学ビームラインBL2S1で常圧から800 MPa程度までの様々な圧力条件下で回折データを収集し、比較を行った。ヒトユビキチン結晶をDAC試料室にサンプリングし、常圧・室温の条件のもとで、波長0.75 Åの短波長のX線を用いてデータ収集を行い、その後結晶を加圧し、常圧下で照射した箇所と同じ箇所に再度X線を照射しデータ収集を行った。その結果、圧力の増加に伴ってRmergeやI/sigma(I)などの回折データの統計値が顕著に向上することが明らかとなった(図1)。これは主にユビキチン周辺の水分子が加圧によって秩序化されたことによると考えている(図2)。当日は構造を含めて詳細を発表する。

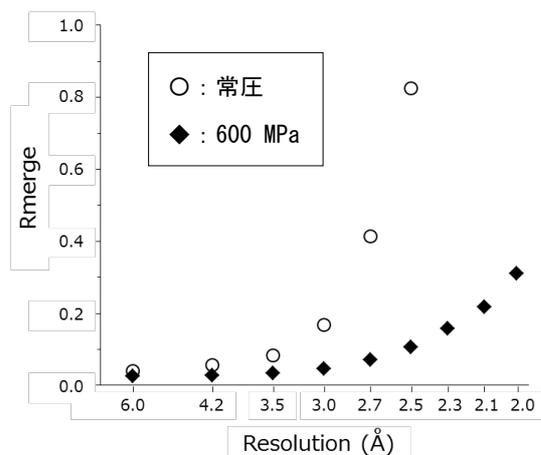


図1. 常圧データと高圧データの比較。DAC中で常圧下で回折データを収集した後、結晶を加圧して同じ箇所に再度X線を照射した。R値が顕著に向上している。

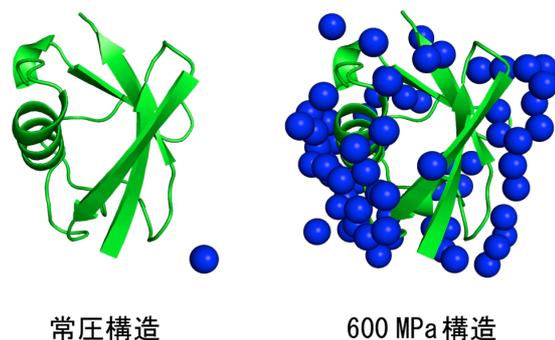


図2. ユビキチンの常圧構造と高圧構造の比較。タンパク質分子はリボンで、水分子は球で表示してある。加圧によって観測可能な水和水の数が増加している。

### 3メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST) による阻害剤認識の構造基盤

## Structural basis for inhibitor recognition by 3MST

諏訪内悠介, 藤間 祥子, 島本一史, 長野哲雄, 花岡健二郎,  
王超, 内山真伸, 清水敏之  
東大院薬

硫化水素の生理機能についての研究は近年精力的になされている。硫化水素産生経路の一つに、Cys から 3-メルカプトピルビン酸(3MP)を経て硫化水素を産生する経路があり、3MP からの硫化水素の生成には 3-メル

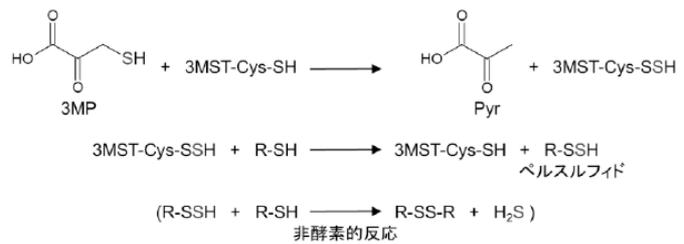


図 1 3MST の関与する硫化水素産生反応

カプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST)が関与している。3MST は 3MP の硫黄をシアニドやチオールに転移させる酵素であり、チオールに転移させる場合、生成したペルスルフィドが他のチオールと非酵素的に反応して硫化水素が産生される(図 1)。3MST の機能解析には選択的な阻害剤の開発がのぞまれているが、これまで 3MP 類似阻害剤( $\alpha$ -ケトグルタル酸 2(AKG)、2-メルカプトプロピオン酸 3(2MPA)と知られている化合物は阻害効果も弱く、選択性も低い。近年、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室によって、(現)東京大学創薬機構の化合物ライブラリーの中から、3MST に選択的阻害作用を持つ物質 A、B(阻害剤 A、B)が見出された。阻害剤 A、B はともに、芳香環-カルボニル-硫黄-4-ピリミドンの共通骨格を持つ。本研究では、既存の 3MP 類似阻害剤と新規 3MST 阻害剤それぞれの 3MST との複合体の結晶構造を明らかにし、それぞれの阻害剤の阻害機構を解明することを目的とし研究とした。

*m*3MST を用いて、1~2Å という高分解能で阻害剤との複合体構造を決定した。得られた構造と生化学的解析から、新規阻害剤は 3MST の一段階目の反応生成物に対して特異的に結合することを明らかにした。また分子起動計算を行い、反応中間体である Cys-SS と新規阻害剤が強い安定化エネルギーを持つ相互作用を形成することを明らかにした。得られ知見はより親和性の高い特異的な 3MST 阻害剤の設計に貢献出来ると考えている。

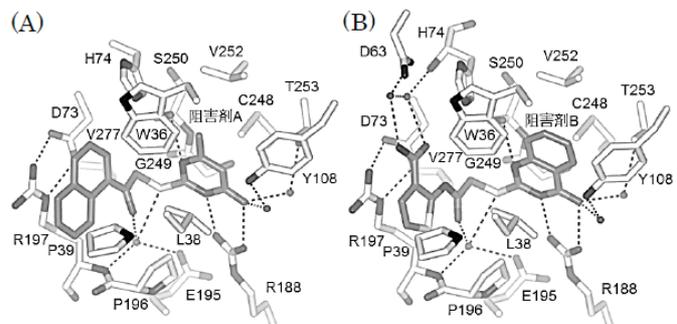


図 2 新規 3MST 阻害に対する認識様式