

PF-BL17A, PF-BL1A, AR-NE3A, SPring-8 BL41XU, BL44XU

糖非発酵グラム陰性細菌由来
ジペプチジルアミノペプチダーゼ 4 の結晶構造解析
Crystal structure analysis of
Dipeptidyl aminopeptidase IV from
Non-Fermenting Gram-Negative Rods

○六本木 沙織¹、館岡 千佳¹、鈴木 義之³、伊藤 康広³、藤本 真友¹、森澤
さおり¹、飯塚 一平¹、小笠原 渉³、田中 信忠²、阪本 泰光¹、野中 孝昌¹
(¹ 岩手医大薬、² 昭和大薬、³ 長岡技大生物)

ジペプチジルアミノペプチダーゼ(DPP)は、基質ペプチドの N 末端から 2 番目のアミノ酸を認識してジペプチドを産生する酵素である。糖非発酵グラム陰性細菌(Non-Fermenting Gram-Negative Rods: NFGNR)由来 DPP4 は、アラニン、プロリン、ヒドロキシプロリンに特異性があり、プロリンやヒドロキシプロリンを含むコラーゲンを主な栄養源とする NFGNR の生育に非常に重要である。

我々は、NFGNR である *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 DPP4 (PmDAP IV) のアポ体、ペプチドや化合物との複合体の結晶化を行い、モデル分子として多剤耐性菌 *Stenotrophomonas maltophilia* 由来 DPP4 (PDB ID: 2ECF) を用いた分子置換法により PmDAP IV の立体構造を決定した。

我々は、PmDAP IV のアポ体、DPP4 阻害剤複合体、ジペプチド複合体の立体構造をそれぞれ 1.75 Å、2.06 Å、1.79 Å で決定した。また、結晶化条件は同様であるものの、これまで得られた結晶の空間群とは異なる PmDAP IV-ジペプチド複合体について 2.40 Å での立体構造決定に成功した。

本研究により得られた PmDAP IV の立体構造と既知のヒト DPP4 の立体構造比較において、(1)基質ペプチドのプロリンと相互作用するアミノ酸残基が一部異なり、その違いが NFGNR 由来 DPP4 とヒト DPP4 の基質特異性の違いに関与すること、(2)NFGNR 由来 DPP4 は基質結合時にヒト DPP4 では見られない構造変化を起こすこと、(3) 基質ペプチド N 末端の認識に重要なアルギニン残基が、NFGNR 由来 DPP4 とヒト DPP4 で立体構造上ほぼ等価な位置に保存されているものの、そのアルギニン残基を含む二次構造は NFGNR 由来 DPP4 では α ヘリックス、ヒト DPP4 ではループ構造であることが明らかとなった。

これらの知見に基づいて、NFGNR 由来 DPP4 に特異的な阻害剤の探索や設計を進めている。

[1] Ogasawara, W., Tanaka, C. *et al.* (2005). *Protein Expr. Purif.* 41, 241-251.

[2] Ogasawara, W., Ogawa, Y. *et al.* (1996). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 2032-2037.

低エネルギータンパク質構造解析用ビームライン BL-1A の 現状

Current status of the low-energy MX beamline BL-1A

松垣直宏¹、山田悠介¹、原田彩佳¹、平木雅彦²、千田美紀¹、千田俊哉¹

¹KEK-PF 構造生物学研究センター、²KEK 機械工学センター

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、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。我々は高輝度の低エネルギーX線 (3.7 - 4.6 keV) が利用できる KEK-PF BL-1A ビームラインにおいて、検出器までのビーム経路の空気を完全にヘリウムに置換することで、軽原子からの異常分散シグナルを精度よく測定できるシステムを構築した。

4 keV 以下の低エネルギーX線を利用する場合、試料結晶からの回折角の増大に伴い高分解能データの取得が困難になる。そこで二台の二次元検出器 (Eiger X4M、Dectris Ltd.) をヘリウム環境下でV字状に配置して測定できるシステムを導入した。12keV 近傍の通常実験と両立できるよう検出器の配置は容易に切り替え可能である。通常配置とV字状配置で収集した回折データを比較した結果、V字状配置では高分解能データが観測可能というだけでなく、より高い精度で測定できることが分かった。データの完全性が高分解能側で不足する問題は、ミニカップーゴニオメータと組み合わせることで回避できる。その他、サンプルチェンジャーのバーコード対応、アニーリングスクリーンの導入などビームラインのアップデートについても合わせて報告する。

*m*GCN5 PCAF-HD の X 線結晶構造解析 Crystal structure of *m*GCN5 PCAF-HD

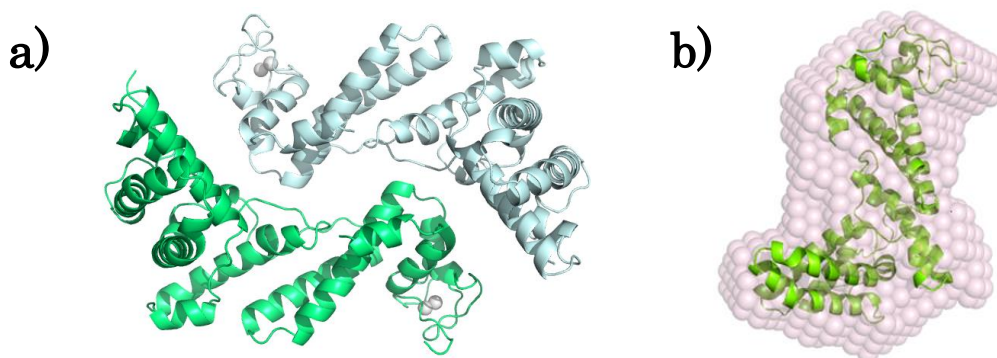
○ 日比亮太¹, 藤間祥子¹, 酒井真志人², 西條慎也³, 清水伸隆³,
松本道宏⁴, 清水敏之¹

¹ 東京大学大学院薬学系研究科・² 核内代謝情報研究室・³ KEK-PF

⁴ 国立国際医療研究センター研究所

近年、2 型糖尿病の原因としてグルカゴンの異常分泌が報告されている。分泌されたグルカゴンは細胞内の転写共役因子 PGC-1 α を活性化し、糖新生系酵素遺伝子の発現を誘導する。ヒストンアセチル化酵素として知られる GCN5 は PGC-1 α をアセチル化することで活性を制御している。我々は GCN5 が 2 型糖尿病を対象とした有望な創薬標的となりうると考え、GCN5 による PGC-1 α 活性制御機構に注目し、GCN5 の構造機能解明の研究に取り組んでいる。

GCN5 はアミノ酸数 837 からなり、PCAF-HD ドメイン、AT ドメイン、ブロモドメインを有する。我々は構造未解明であった PCAF-HD に注目し、結晶構造を 1.8 Å の分解能で決定した。GCN5 PCAF-HD は結晶中の非対称単位に 2 分子存在していた。(図 a)ゲル濾過クロマトグラフィーと多角度光散乱検出器、X 線小角散乱を融合した SEC-MALS、SEC-SAXS を用いることで、GCN5 PCAF-HD が溶液中でモノマーとして存在することを見出した。(図 b)また、アミノ酸配列から予測されなかった Zn フィンガー構造が PCAF-HD に存在することを明らかにした。興味深いことに、本研究で見いだされた Zn フィンガーは過去にあまり例を見ない配位様式をしており、特異な機能があるのではないかと推察される。



図(a)結晶構造解析で得られた *m*GCN5 PCAF-HD。非対称単位内の分子を表示。
(b)SEC-SAXS で決定したダミーアトムモデル。モノマーとの重ね合わせ図

Aspergillus kawachii 由来 β -フルクトフラノシダーゼの 結晶化と構造解析

Crystallization and structure determination of a β -fructofuranosidase from *Aspergillus kawachii*

長屋美香¹、木村美代子¹、郷津佳史¹、平野勝紹²、栃尾巧²、
西河淳¹、殿塚隆史¹

¹ 東京農工大院農応用生命化学専攻、² 物産フードサイエンス

[緒言] 糖質加水分解酵素ファミリーGH32 に分類される酵素は、 β -フルクトフラノシダーゼをはじめ、イヌリナーゼ、レバナーゼなど、構成糖がフルクトースである糖を加水分解する酵素が分類されている。これらの酵素の中には、加水分解活性のみならず、高い糖転移活性を有する酵素が存在し、その構造機能相関に興味を持たれる。私達のグループは、*Aspergillus kawachii* 由来の高い糖転移活性を有する β -フルクトフラノシダーゼ (以下 AkFFase) に着目し、立体構造解析を行ったので報告する。

[方法] AkFFase の cDNA を pET32a に組み込むことでプラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3)株を用いて N 末端側にチオレドキシントグおよび His タグを融合させた酵素として AkFFase を発現させた。Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行い、SDS-PAGE で単一バンドまで精製されたことを確認した。精製酵素は限外濃縮を行い、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。回折データの収集は、AR-NW12A ビームラインにて行った。

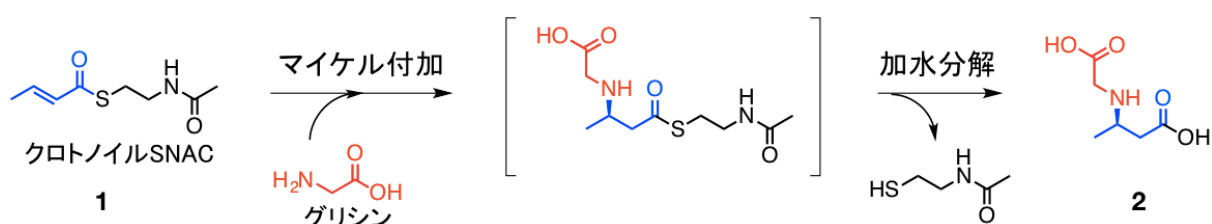
[結果と考察] ギ酸を沈殿剤とした条件で結晶が得られ、空間群は $P3_121$ で、結晶学的非対称単位中に 1 分子の AkFFase が存在した。X線結晶構造解析の結果、N 末端側に融合タンパク質として付加させたチオレドキシントグおよび His タグは、結晶中に存在せず欠失していることが判明した。これは、結晶化に至る過程において大腸菌由来のプロテアーゼで切断されたものと考えられた。AkFFase の全体構造は、N 末端側の 5 枚の β シートから成る β プロペラドメイン、C 末端側の β サンドイッチ、および、これらのドメインをつなぐ α ヘリックスから成るリンカーより構成されていた。活性中心である β プロペラドメインの中心付近に、抗凍結剤として用いたグリセリンが存在することが分かった。

Ⅲ型チオエステラーゼ SAV606 の構造機能解析

Structural analysis of
type III thioesterase SAV606千菅太一¹、宮永顕正¹、工藤史貴¹、江口正¹¹ 東工大理

【目的】

Streptomyces avermitilis 由来のⅢ型チオエステラーゼ SAV606 は α, β -不飽和脂肪酸チオエステルであるクロトノイルチオエステル (1) に対し、グリシンのマイケル付加反応とチオエステルの加水分解反応を触媒するユニークな酵素である (図 1)。この二段階反応機構の解明を目的として SAV606 の X 線結晶構造解析を試みた。



【方法および結果】

SAV606 の組み換えタンパク質は大腸菌にて発現させ、精製酵素を結晶化に用いた。まず、apo 型の結晶構造を分子置換法を用いて分解能 2.4 Å で決定することに成功した。次に、反応機構に関する知見を得るため、基質などとの共結晶化を検討したところ、生成物 (2) との複合体結晶構造を分解能 2.0 Å で決定することに成功した。SAV606 は hotdog fold のモノマーが二量体を形成した double hotdog fold をとっており、生成物は二量体界面に結合していた (図 2)。現在、活性中心のアミノ酸の部位特異変異体解析を進めている。本発表では、この結果をもとに考察したⅢ型チオエステラーゼ SAV606 の反応機構について発表する

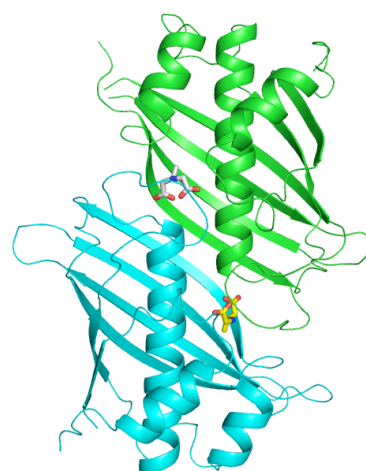


図 2. SAV606 の結晶構造

BL-1A, BL-5A, BL-17A, AR-NW12A, AR-NE3A

タンパク質 X 線結晶構造解析ビームラインにおける全自動測定

Fully automated data collection on macromolecular crystallography beamlines

山田悠介^{1,2}、篠田晃¹、平木雅彦^{2,3}、引田理英^{1,2}、松垣直宏^{1,2}、千田俊哉^{1,2}¹ 高エネ機構 物構研 フォトンファクトリー² 総研大 高エネルギー加速器研究科³ 高エネ機構 共通 機械工学センター

タンパク質 X 線結晶構造解析ビームラインでは回折データ測定の全自動化を進めている。これまで、試料の素性が実験前から良く分かっている創薬研究をターゲットとした全自動測定システムを開発し、主に多量のサンプルからの回折データ収集を必要とする製薬企業を中心に利用されてきた。しかしながら、一般的なデータ測定には不十分な部分が多く、ビームラインでの回折データ測定の全自動化を目指すには多くの改良が必要である。とくに結晶試料を X 線照射位置に位置合わせを行うセンタリングの過程において既存の全自動システムではループ形状のみを認識するループセンタリングと、200 μ m 角程度の比較的大きなサイズのビームとを組み合わせることで実現させてきたが、本来は結晶そのものを認識しセンタリングする必要がある。特に結晶に比べて小さなサイズのビームを利用する場合には、このような結晶のセンタリングが必須である。そこで筆者らはループの 3 次元形状認識と X 線センタリングを導入した新たな全自動測定システム (SIROCC) を開発した。

SIROCC ではループの 3 次元形状認識をすることで、市販されている多種多様な形状をしたループのほとんどでループを認識することが可能である。そして、その認識されたループ領域全体を X 線でスキャンして、回折点を多く生じる部分を特定することで結晶位置を特定することが可能である。

SIROCC は現在も開発が続けられている一方で 2016 年秋より一部ユーザーの協力を得てコミッショニングを開始し、2017 年秋を目標に一般ユーザーの実験にも適応する予定である。

染色体分配に関与する好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* 由来 Separase の構造解析

Structural analysis of *Chaetomium thermophilum* Separase involved in chromosome segregation

池田 聡人、西野 達哉

東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻

正確な染色体の分配は真核生物の生存に必要不可欠である。染色体の誤分配や異性化は遺伝的不安定性につながり、がんや遺伝病、不妊や流産など細胞や個体の生存に重大な悪影響をもたらす。Separase は姉妹染色分体を接着するコヒーシン複合体を切断するプロテアーゼで、細胞周期中期から後期への移行過程で決定的な役割を担う。Separase の発現や機能の異常は疾患と関連していることから、医学的にも重要である。Separase の活性は Securin と呼ばれる阻害タンパク質の結合、酵素や基質のリン酸化による翻訳後修飾によっても調整されている。現在のところ、Separase の制御機構や反応機構に関する統一的な見解はなく、生化学的な研究・議論が続いている。そこで、構造生物学的な観点から Separase の制御及び反応機構を探るため、Separase の X 線結晶構造解析に向けた研究を行った。Separase はすべての真核生物に保存されており、タンパク質の安定性がより高い好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* 由来の Separase (ctSeparase)を用いて構造解析を目指した。

ctSeparase は全長で約 240kDa の巨大分子である。N 末端側の約 1600 アミノ酸には armadillo repeat domain、C 末端側の約 600 アミノ酸は separase protease domain (SPD) が存在する。まず ctSeparase の触媒活性を担う SPD の発現コンストラクトの作製とタンパク質の発現条件を検証した。その結果、大腸菌を用いた組換えタンパク質発現系により生化学的解析や X 線結晶構造解析に十分なタンパク質量を得ることに成功した。精製タンパク質を用いて結晶化条件を検証したところ、結晶を得ることに成功した。今後は、結晶化条件を改善し、PF の BL を利用して X 線結晶構造解析に臨む。

**GH31 に属する *Flavobacterium johnsoniae* 由来
デキストラナーゼの結晶化と構造解析**
**Crystallization and structure determination of a
GH31 dextranase from *Flavobacterium johnsoniae***

郷津佳史、石川涼一、西河淳、殿塚隆史
東京農工大院応用生命化学専攻

[緒言] 糖質に作用する酵素を一次構造の相同性に基づいて分類する CAZy データベース上において、糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 31 には、主に α -グルコシダーゼが分類されている。しかしながら、近年、 α -グルコシダーゼ以外にもキシロシダーゼや α -グルカンリアーゼなどの酵素が発見されると共に、高い糖転移活性を有する酵素も多く発見され、それらの構造には興味を持たれる。私達のグループは細菌 *Flavobacterium johnsoniae* 由来の GH31 に属するデキストラナーゼ (以下 FjDex31A) の研究を行っており、本酵素は加水分解活性に加え、高い糖転移活性を有することを明らかにしている。今回は FjDex31A の立体構造解析を行ったので報告する。

[方法] FjDex31A の cDNA を pET28a に組み込むことでプラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3) 株を用いて N 末端側に His タグを融合させた酵素として FjDex31A を発現させた。Ni-NTA アガロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行い、SDS-PAGE で単一バンドまで精製されたことを確認した。精製酵素は濃縮後、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を行った。回折データの収集は、PF-BL5A ビームラインにて行った。

[結果と考察] MPD と PEG を沈殿剤とした条件で結晶が得られ、空間群は $P1$ で、結晶学的非対称単位中に 4 分子の FjDex31A が存在した。X 線結晶構造解析の結果、FjDex31A の全体構造は、N 末端ドメイン、 $(\beta/\alpha)_8$ バレルから成る触媒ドメイン、2 つの C 末端ドメインの 4 つのドメインにより構成されていた。また、触媒ドメインを構成する $(\beta/\alpha)_8$ バレルの 3 番目の β -ストランドと 4 番目の β -ストランドの後にそれぞれインサートが見られた。

また、他の GH31 α -グルコシダーゼと基質特異性が大きく異なるにも関わらず、活性中心付近のアミノ酸残基の多くは保存されていた。

紫外線高感受性症候群責任因子 UVSSA VHS ドメインの 構造解析

Crystal structure of VHS domain of UV-sensitive syndrome protein UVSSA

橋本優子¹, 松尾和香¹, 原幸大¹, 菱木麻美¹, 石川吉伸¹, 郭朝万², 中
沢由華², 唐田清伸², 荻朋男², 橋本博¹

1 静岡県大薬・2 名大環医研

【目的】 UVSSA は紫外線高感受性症候群 (UV^S) の責任遺伝子であり、光 DNA 損傷に対する転写共役ヌクレオチド除去修復機構 (TC-NER) に必須なタンパク質である。UV^S は軽微な日光過敏を伴う常染色体劣性の遺伝性皮膚疾患である。日本人の症例から、UVSSA の N 末端に存在する VHS ドメイン内の C32R 変異が UV^S の原因であることがわかっているが、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では UVSSA の立体構造から UV^S の病因を解明することを目指し、UVSSA VHS ドメインの調製、結晶化及び X 線結晶構造解析を行った。

【方法】 N 末端側に His タグを付加させた UVSSA VHS ドメインを、大腸菌を用いて大量発現させ、超音波破碎後、Ni アフィニティー、陽イオン交換、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製タンパク質を濃縮し、シッティングドロップ蒸気拡散法にて 20 °C で結晶化を行った。また、単波長異常散乱法 (SAD 法) による構造解析のため、水銀誘導体結晶を調製した。得られた結晶の回折実験は放射光施設 Photon Factory BL-17A で行った。

【結果及び考察】 結晶化に適した高純度の最終精製品が得られ、X 線結晶構造解析に適した UVSSA VHS ドメインの結晶および重原子誘導体結晶を得ることに成功した。X 線回折実験の結果、ネイティブ結晶で 2.00 Å 分解能、重原子誘導体結晶で 2.11 Å 分解能の回折データを収集し、SAD 法により立体構造を決定した。UVSSA VHS ドメインは、8 本の α -ヘリックスからなる典型的な VHS ドメインのフォールドを形成していた。発表では、得られた構造の詳細について議論する。

遊離セリンをリン酸化する酵素 SerK における反応機構 Reaction mechanism of a free serine kinase

藤橋雅宏¹、永田隆平¹、川村弘樹²、佐藤喬章²、藤田嵩之²、
跡見晴幸²、三木邦夫¹

1 京大院理、2 京大院工

遊離セリンリン酸化酵素 (SerK) は、超好熱性アーキアである *Thermococcus kodakarensis* におけるシステイン生合成に関わる。この酵素は、ADP を利用してセリンをリン酸化し、システインの前駆体であるホスホセリンを生成する。タンパク質中のセリン残基をリン酸化する酵素はよく知られているが、遊離のセリンをリン酸化する酵素が同定されたのはこれが初めてである。また、SerK は既知のリン酸化酵素とのアミノ酸配列の類似性が低いため、その反応機構は既知のものと異なることが期待される。

我々は、SerK の反応機構を明らかにすることを目指し、野生型と変異型酵素の結晶構造を決定した。SerK の全体構造は 2 つのドメインに分かれており、ドメイン間のくぼみにはセリン結合部位が見つかった (図左)。決定した構造のうち、AMP または ADP との複合体構造はくぼみが開いた構造になっていた。一方、酵素と生成物 (ホスホセリンと AMP) との三者複合体は閉じた構造になっており、基質との三者複合体も閉じた構造をとると予想される。ドメイン間のくぼみには、触媒残基と考えられる E30 が存在している。この残基をアラニンに置換した変異体では、酵素活性が野生型と比べて大きく減少した。グルタミンに置換した変異体 (E30Q) と生成物との三者複合体構造では、Q30 がホスホセリンの $O\gamma$ 原子と相互作用していた (図右)。また、E30Q の開いた構造と閉じた構造の比較から、Q30 は構造が閉じることでホスホセリンへ近づくことが分かった。これらの結果から、E30 が構造変化に伴ってセリンへ近づいてヒドロキシル基の脱プロトン化を行い、リン酸化反応が始まると予想される。

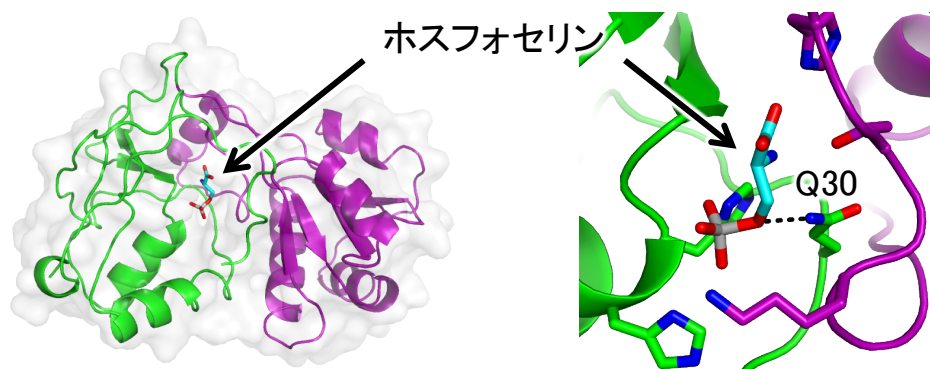


図. SerK 変異体 E30Q の全体構造 (左) とホスホセリン結合部位の構造 (右)

オリゴペプチド結合タンパク質の X 線結晶構造解析 X ray Crystallographic analysis of the oligopeptide binding protein

亀井七海¹, 横山英志², 小西佳史郎¹, 原幸大¹, 石川吉伸¹, 松井郁夫³,
Patrick Forterre⁴, 橋本博¹

1 静岡県大薬・2 東京理大薬・3 産総研バイオメディカル・4 IGM Univ
Paris-Sud

【目的】 ペプチド輸送タンパク質 (Opp) は細菌の生体膜に存在する ABC トランスポーターの一種で、そのサブユニットの一つである OppA はペプチドの細胞外受容体として機能する。真正細菌において、OppA はペプチドをシグナル分子としたクオラムセンシングへの関与が示唆されている。近年、複数の古細菌でウイルス状の膜小胞を形成する現象が報告され、OppA が膜小胞の主要なタンパク質であることが分かった。本研究では、未だ解明されていない古細菌 OppA の構造と機能を明らかにするために、OppA-ペプチド複合体の X 線結晶構造解析を行った。

【方法】 C 末端側に His タグを付加させた OppA (30-753 残基) に 4 箇所の Met 変異を導入し、大腸菌で Se-Met 置換組換えタンパク質を発現させた。菌体を超音波破碎後、85°C の加熱処理、Ni アフィニティー、陰イオン交換、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。また、塩酸グアニジンを用いて非特異的に結合した内在性ペプチドを除去した。OppA とモデルペプチドであるブラジキニンをもル比 1:5 で混合し、シッティングドロップ蒸気拡散法にて 20°C で結晶化を行った。得られた結晶で X 線回折実験を行い、2.4 Å 分解能の回折データを収集し、Se 原子の異常散乱を利用して構造解析を行うことに成功した。

【結果および考察】 OppA の全体構造は、“おにぎり” の様な三角形をしており、25 本の α ヘリックスと 24 本の β ストランドで構成されていた。OppA は、2 つのドメインから成り、それらによって構成される分子中央部のポケットにペプチドの電子密度が確認出来たが、その形状からブラジキニンとは異なるペプチドが OppA に結合していると考えられた。本発表では、OppA による多様なペプチド認識に関する討論を行う。

コンデンシンの制御サブユニットの結晶学的研究 Interaction analysis of ZRANB3 in complex with PCNA in template switching pathway

清水研一郎¹, 原幸大¹, 右田智子¹, 鈴木秀造¹, 平野達也², 橋本博¹
1 静岡県大薬・2 理研

【目的】 染色体の凝縮は、生物が正常な細胞分裂を行う上で重要な生命現象であり、その異常は細胞のがん化や小頭症などの重篤な遺伝性疾患との関連性が示唆される¹⁾。コンデンシン I は、分裂期の染色体を構築する主要なタンパク質複合体であり、染色体凝縮において重要な役割を果たす。コンデンシン I は SMC サブユニット (SMC2、SMC4) と制御サブユニット (CAP-H、CAP-G、CAP-D2) からなるリング状構造を有するタンパク質複合体であり、姉妹染色分体を取り囲むように結合することで、コンパクトな棒状の高次構造である染色体を形成 (凝縮) し、核内に収容する役割を持つ^{2,3)}。本研究では、コンデンシンと染色体の解離を促進することで、誤った染色体凝縮を防ぐ役割を持つ制御サブユニットに着目し、X 線結晶構造解析を目指した試料調製を行った。

【方法】 ヒト由来組換えタンパク質を大腸菌を用いて大量発現させた。その後、超音波破碎し、アフィニティーカラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを使用して高純度に精製した。精製タンパク質を用い、シッティングドロップ蒸気拡散法にて 20°C で結晶化条件の探索を行った。

【結果と考察】 結晶化スクリーニングにより、いくつかの条件で結晶が得られたので、X 線回折実験を行った。タンパク質結晶であることは確認できたが、X 線結晶構造解析に適した分解能は得られなかった。今後は、構造解析に適した結晶を得るために最適化を行う。

参考文献

- 1) Martin et al. *Genes Dev*, 2016
- 2) Piazza et al. *Nature Struct Mol Biol*, 2014
- 3) Kinoshita et al. *Dev Cell*, 2015

心不全に関わる転写因子 GATA4 C-terminal Zinc Finger の結晶構造解析

Crystal Structure of GATA4 C-terminal Zinc Finger, transcription factor related to heart failure

清水聡史¹、原幸大¹、依光奈津美¹、砂川陽一^{1,2,3}、刀坂泰史^{1,2,3}、和田啓道²、
長谷川浩二²、橋本博¹、森本達也^{1,2,3}

1 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府

2 京都医療センター 臨床研究センター 展開医療研究部

3 静岡県立総合病院 臨床研究部

[目的]心筋細胞肥大や心不全の発症・進展には心臓特異的転写因子 GATA binding protein 4 (GATA4)が重要な役割を担っている。GATA4 は二つの Zinc Fingerドメイン(ZF)をもち DNA 上の GATA 配列を特異的に認識する。これまでの研究により、GATA4 のホモ二量体を形成することが転写活性化に重要なプロセスであることを見出した。しかしながら GATA4 の二量体形成メカニズムや DNA 認識機構は不明である。そのため GATA4 の二量体形成と DNA 認識機構を解明し、その部位をターゲットとした創薬を目指し、本研究では GATA4 の二量体形成部位を同定し、すでに報告されている DNA 結合に必要な部位の両方を含む部位の X 線回折実験を行った。

[方法]大腸菌にて発現させた GATA4 全長並びにドメイン欠失変異体を用い、GST Pull-down 法及びグルタルアルデヒド化学架橋法を行い、二量体形成部位を同定した。同定した二量体形成部位と DNA 結合部位を含む C 末端側の ZF(C-ZF)に GST タグを付加させたタンパク質を大腸菌にて大量発現させた。得られた菌を溶菌後、GS4B にて Affinity 精製を行い、HRV3C を用い GST タグの切断を行った。その後、陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製を行った。その精製したタンパク質を濃縮し、GATA 配列を含む DNA との混合後 4℃で一晩静置した。この溶液を用いて結晶化スクリーニング、結晶化条件の最適化を行った。得られた結晶を用いて、Photon Factory BL17A にて X 線回折実験を行い、回折データを取得した。

[結果と考察]GATA4 は C-ZF の 308-326 部位で二量体形成していることがわかった。また結晶化に適した高純度の最終精製品が得られた。さらに結晶化スクリーニングと結晶化条件の最適化をしたところ X 線回折実験に適した結晶を得ることに成功し、X 線回折実験の結果タンパク結晶特有の回折像を得ることができた。今後、データの解析により二量体形成、DNA 認識メカニズムを解明し、その部位をターゲットとした新規心不全治療薬の開発につながると期待される。

染色体分配に関わる Mad2L2-CAMP 複合体の X 線結晶構造解析

Crystal structure of Mad2L2 in complex with CAMP involved in chromosome segregation

田原迫奨大¹, 原幸大¹, 菱木麻美¹, 石川吉伸¹, 菅野新一郎², 田中耕三²,
橋本博¹

1 静岡県大薬・2 東北大加齢研

【目的】 Mad2L2 は、様々なタンパク質と複合体を形成することで DNA 修復や転写、細胞周期など重要な細胞機能に関与している。Mad2L2 と結合するタンパク質として CAMP が同定された。CAMP ノックダウン細胞では、分裂期での染色体の紡錘体中央への整列に異常が見られ、CAMP が微小管と動原体の結合の維持に必要であることは明らかになった¹⁾。しかし、その詳細なメカニズムや構造基盤は明らかになっていない。本研究では、Mad2L2-CAMP 複合体の相互作用メカニズムを構造生物学的に解明することを目指し、Mad2L2-CAMP 複合体の試料調製、結晶化、X 線結晶構造解析を行った。

【方法】 N 末端側に His タグを付加させた Mad2L2 と CAMP の共発現系を構築し、大腸菌を用いて過剰発現させた。大腸菌破碎液を Ni アフィニティー、陰イオン交換、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製タンパク質を濃縮し、シットティングドロップ蒸気拡散法にて 20 °C で結晶化スクリーニングを行った。得られた結晶を用いて Photon Factory BL17-A にて X 線回折実験を行った。その後、Mad2L2 をサーチモデルとしてプログラム PHASER を用いた分子置換法により構造解析を行った。

【結果と考察】 結晶化に適した高純度の最終精製品が得られ、結晶化スクリーニングと結晶化条件の最適化によって、X 線結晶構造解析に適した Mad2L2-CAMP 複合体の結晶を得ることに成功した。得られた結晶の空間群は、*I*422、格子定数は $a = 106.49$ 、 $b = 106.49$ 、 $c = 127.43$ Å であった。X 線回折実験の結果、分解能 2.2 Å の回折データが得られ、分子置換法による構造解析に成功した。得られた構造から、CAMP は Mad2L2 の“シートベルト”領域に包まれるように結合していることが明らかとなった。発表では、得られた構造の詳細について議論する。

参考文献

1) Itoh *et al.* & Tanaka, *EMBO J.* (2011)

セルロース合成酵素 C サブユニットの柔軟なドメインの構造解析

The structure analysis of flexible domain of CeSC

野島慎五¹、藤島あゆみ¹、加藤公児^{1,3}、田島健次²、姚閔^{1,3}

1 北海道大学生命科学院 X 線構造生物学的研究室、2 北海道大学工学研究
院高分子化学研究室、3 北海道大学理学部高分子

セルロースは地球上に最も多く存在する多糖であり、高等植物だけでなく藻類・バクテリアの一部・ホヤ類など多種多様な生物種で合成されている。特に、酢酸菌を代表とするバクテリアが生産するセルロース(バクテリアセルロース, BC)は高強度・高純度・高保水性といった性質を有しており、材料工学の分野で注目を浴びている物質である。BC の合成・排出を担っているセルロース合成酵素複合体 TC(Terminal complex)は、細菌の内膜から外膜に渡って存在する膜タンパク質複合体であり、その構造を解明し、合成・排出の分子メカニズムに関する知見を得ることは BC 生合成の生産性向上に繋がることが期待される。TC の主要構成成分には、BC の合成・制御に関わる CesA, CesB, 排出に関係するとされている CesD, CesC がある(図 A)。この内、CesC の構造および機能は解明されていない。CeSC は1次配列から膜貫通ドメインと、34 残基のモチーフ構造が繰り返されたテトラトリコペプチドリピート(TPR)ドメインの2つのドメインから構成されていると予測されている。本研究は CeSC の糖鎖排出に関わるメカニズムの解明のために TPR ドメインの構造解析を行った。TPR ドメインは精製後も経時的に分解する性質があるため、トリプシン限定分解により安定的な N 末断片(TPR-NTD)を同定し、この断片の結晶から PF-BL5Aにて3.3 Åの回折データが得られた。さらに、Se-SAD 法でTPR-NTD の構造を決定することに成功した。得られた TPR-NTD の構造では、TPR モチーフの繰り返しの間に、TPR モチーフに属さない領域が挿入されていた。また非対称単位中に5分子の TPR-NTD が含まれており、それらは 3 種類のコンフォメーションをとっていた。これらの構造を比べることで、非 TPR 領域にある 108 番目のロイシンの周辺で構造変化が起きていることが判明した(図 B)。この TPRドメインの柔軟性は糖鎖排出に関わる挙動に関わると考えられる。

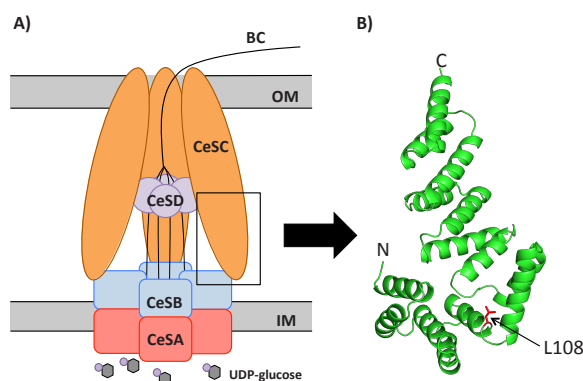


図 A) TC モデル B) TPRドメイン N 末端の構造

テンプレートスイッチに関わる ZRANB3 と PCNA の相互作用 解析

Interaction analysis of ZRANB3 in complex with PCNA in template switching pathway

内田雅之¹, 原幸大¹, 田形梨紗¹, 菱木麻美¹, 石川吉伸¹, 横山英志^{1,2},
橋本博¹

1 静岡県大薬・2 東北大加齢研

【目的】 テンプレートスイッチ(TS)は複製中の DNA 損傷による複製阻害を回避する細胞機能であり、無傷の新生鎖を鋳型とした DNA 合成である。ZRANB3 は TS における鋳型鎖の切り換えに関わるマルチドメインタンパク質であり、PCNA 相互作用領域を介して、PCNA と結合することで損傷部位にリクルートされる¹⁻³。しかし、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、ZRANB3 と PCNA との相互作用を明らかにするために、PCNA-ZRANB3 ペプチド複合体の X 線結晶構造解析と構造に基づく相互作用解析を行った。

【方法】 大腸菌を用いて PCNA を過剰発現させ、陰イオン交換カラム、硫安分画、疎水カラム、ゲル濾過カラムを用いて PCNA を精製した。精製した PCNA と ZRANB3 ペプチドを混合し、シッティングドロップ蒸気拡散法で共結晶化を行った。得られた結晶の X 線回折強度データは、つくば放射光施設 Photon Factory のビームライン BL-17A で収集し、分子置換法を用い PCNA-ZRANB3 ペプチド複合体の X 線結晶構造解析を行った。さらに、PCNA 相互作用領域に変異を導入した GST 融合 ZRANB3 を大腸菌を用いて過剰発現させ、GS4B アフィニティー精製を行った。精製した GST 融合 ZRANB3 を用いて、プルダウンアッセイを行い、PCNA と ZRANB3 との相互作用を解析した。

【結果及び考察】 X 線結晶構造解析に適した PCNA-ZRANB3 複合体の共結晶を得ることに成功した。分子置換法を用いた構造精密化を行い、複合体の立体構造を決定することに成功した。また、ZRANB3 変異体を用いたプルダウンアッセイによって、相互作用に重要なアミノ酸残基を同定し、PCNA 相互作用領域を介した ZRANB3 と PCNA との相互作用メカニズムを明らかにした。

参考文献

- 1) Ciccia *et al.*, & Elledge, *Mol. Cell*, **47**, 396-409 (2012)
- 2) Yuan, Ghosal & Chen, *Mol. Cell*, **47**, 410-421 (2012)
- 3) Weston, Peeters & Ahel, *Genes Dev.*, **26**, 1558-1572 (2012)

ビタミンD受容体共有結合型リガンドの創製と結合様式解明 Discovery of ligand covalently binding to vitamin D receptor and analysis of the binding mode

吉澤麻美¹、堀竜也¹、伊藤俊将¹、山本恵子¹

¹ 昭和薬大

【目的】共有結合型医薬品には、アスピリン、オメプラゾールなどがあり、薬理活性の持続が特徴である。しかしオフターゲットの問題から、共有結合能を有する化合物は医薬品候補としては避けられる傾向にあり、共有結合型リガンドに関する情報は乏しい。創薬ターゲットである核内受容体については、少ないながら共有結合型リガンドが報告されている。それらはいずれもシステインと共有結合している。我々はビタミンD受容体(VDR)リガンド開発の一環として、求核性をもつヒスチジンと共有結合するリガンドの創製を行い、それらの結合様式解明を目的とした。

【方法】ヒスチジンとの共役付加反応を期待し、求電子基としてエノンをも有する化合物を設計・合成した。VDR との共有結合形成の有無をエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)にて測定し、X線結晶構造解析より結合様式の解明を行った。

【結果・考察】ESI-MS の結果、時間依存的に VDR とリガンド間に共有結合が形成されることが示された。またリガンドの側鎖構造の違いにより、結合の速さに差が観測された。さらに VDR-LBD とリガンド複合体のX線結晶構造解析から、リガンドは His301 と 1,4-共役付加により共有結合を形成していた。また結晶構造中には非共有結合型のリガンドも存在した。非共有結合型リガンドのエノン部分の配座は安定な *s-cis* 配座であった。結晶構造から共有結合形成には *s-trans* 配座へ変換が必要となり、その駆動力はアミノ酸残基との立体反発であることが示唆された。

ヘムタンパク質シトクローム *c'* のスピン転移機構 Spin Transition Mechanism of a Heme Protein, Cytochrome *c'*

高妻孝光、高階明子、山口峻英、海野昌喜・茨城大院理工

シトクローム *c'* (Cyt *c'*) は脱窒菌や好色光合成細菌などのペリプラズムに見出される *c* 型ヘムタンパク質である。Cyt *c'* のヘム鉄は、異常な電子状態を示し、中性 pH 条件下においては中間スピン状態 ($S = 3/2$) と高スピン状態 ($S = 5/2$) の量子力学的混合状態となっている[1]。吉村らは、脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* 由来の Cyt *c'* (AxCyt *c'*) の EPR スペクトルより高スピン状態の寄与は、中性条件下においておよそ 89% であり、pH に依存して、その寄与が変化する事が報告されている[2]。pH 12 以下のアルカリ性 pH 条件下においては、中性条件下から pH が高くなるに連れて高スピンの寄与が高くなる一方で、pH 13 においては $S = 1/2$ の低スピン状態をとる。本研究では、AxCyt *c'* の pH に依存したスピン転移機構の検討を、X 線結晶構造解析、MCD スペクトル、CD スペクトル、ESI-MS スペクトルによって行った。

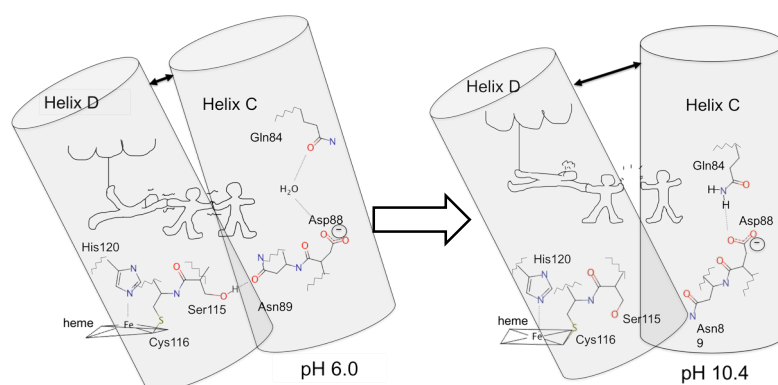


Figure 1. X 線結晶構造解析より明らかになった AxCyt *c'* のアルカリ性構造転移

pH 6.0 (1.1 Å 分解能) と 10.4 (1.48 Å 分解能) における X 線結晶構造解析を行ったところ、Helix C と Helix D の間には、Ser115 と Asn89 間の水素結合がある。また、Helix C には、Asp88 と Gln84 間に H₂O が架橋水素結合を形成している。これらの水素結合ネットワークがヘムに結

合している Helix D 上の Cys116 にテンションをかけ、ヘムが歪んでいるために、(3/2, 5/2) の Quantum Mechanical Admixture となっていると説明される。アルカリ性になると、Asp88 は Gln84 とが直接水素結合を形成していることが明らかとなったが、これは、Asp88 と Gln84 間を架橋していた H₂O は、負電荷を有する OH⁻ となり、Asp88 のカルボキシル基の負電荷と反発したことに起因する。この結果、Ser115 と Asn89 間の水素結合が切れ、ヘムのテンションが解消され、5/2 の高スピン状態のみになったと解釈できる[3, 4]。

References.

1. R. Weiss, A. Gold, J. Turner, *Chem Rev*, (2006), **106**, 2550.
2. T. Yoshimura, S. Suzuki, H. Iwasaki, M. Masuko, T. Matsubara, *Biochem. Biophys. Acta*, (1985), **831**, 267.
3. A. Takashina, M. Unno, T. Kohzuma, *Chem. Lett.*, (2015), **44**, 268.
4. A. Takashina, M. T. Tiedemann, M. Unno, T. Yamaguchi, M. J. Stillman, T. Kohzuma, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (2017), **90**, 169. (Selected Paper)

ヒト HP1 の構造機能解析

Structural and functional analysis of human HP1

佐久間 佳織¹、迫 洸佑² 広田 亨²、西野 達哉¹

1 東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻、

2 がん研究所 実験病理部門

HP1(ヘテロクロマチンプロテイン 1)は真核生物で高度に保存されたタンパク質で、細胞核の様々な重要な機能を担う。一例としてヘテロクロマチン形成による遺伝子抑制や転写の活性化、染色体セントロメア領域へのコヒーシン複合体の局在や核膜近辺への染色体の隔離などが挙げられる。HP1 は染色体や他のタンパク質と相互作用し、機能するがその詳細は不明な部分が多い。HP1 ファミリータンパク質は N 末端にクロモドメイン、C 末端にクロモシャドードメインが存在し、二つのドメインはヒンジ領域で連結されている。ヒトは α 、 β 、 γ という 3 つの HP1 パラログが存在し、HP1 α はがんとの関係が明らかにされつつある。HP1 結合タンパク質としては INCENP や Sgo1 のような染色体分配関連因子タンパク質が知られており、それらの基質タンパク質には PxVxL/I モチーフが存在する。このモチーフは CSD と主に相互作用するが、CSD 以外の領域による結合や調節機構も提唱されている。

本研究では HP1 と基質タンパク質、特に INCENP や Sgo1 との結合様式を生化学的、構造生物学的に明らかにすることを目的としている。これまでに大腸菌を使った組換えタンパク質発現系を構築し、それぞれのタンパク質を大量に調整することに成功した。ゲルろ過や ITC(恒温滴定型カロリーメトリー)を使った解析により HP1 と INCENP 及び Sgo1 との相互作用が確認できた。今後は HP1 と INCENP の複合体結晶化を目指すべく、PxVxL/I モチーフを含む HP1 結合領域を特定する。

染色体接着を阻害する PCNA 変異体の構造解析 Structural analysis of PCNA mutant that inhibits the sister chromatid cohesion

鈴木麻里子¹, 原幸大¹, 東寅彦², 升方久夫², 高橋達郎³, 橋本博¹

1 静岡県大薬・2 大阪大理・3 九州大理

【目的】 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) は、ホモ三量体リングを形成するタンパク質であり、DNA 複製や修復、姉妹染色分体の接着などに関与する様々なタンパク質と相互作用することで、これらのタンパク質を DNA 鎖につなぎとめる役割を持つ。本研究では、姉妹染色分体の接着に必須の sororin タンパク質の DNA 鎖へのリクルート阻害を起こすことで、染色体接着を阻害する PCNA(P129E)変異体(PCNA^{P129E})の X 線結晶構造解析を行った。

【方法】 アフリカツメガエル由来 PCNA^{P129E}(xPCNA^{P129E})組換えタンパク質を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化条件の探索を行った。スクリーニングで得られた結晶を用いてつくば高エネルギー加速器研究機構放射光施設 Photon Factory ビームライン BL-17A にて X 線回折実験を行った。得られた回折データを用い、ヒト由来 PCNA(hPCNA)の既知構造をサーチモデルとし、分子置換法により xPCNA^{P129E}の構造解析を行った。

【結果および考察】 構造解析の結果、xPCNA^{P129E}は野生型同様、三量体リング構造をとっていた。そこで、xPCNA^{P129E}の各サブユニット間、または hPCNA と xPCNA^{P129E}とを Cα 原子を用いた構造の重ね合わせを行ったところ、構造のずれを示す Root mean square deviation は 1.0 Å 以下となり、変異体と野生型との間で、全体構造に大きな違いは見られなかった。以上の結果から、P129E 変異は PCNA の全体構造には影響を与えないが、129 番目の Proline が sororin をリクルートするうえで重要な足場となる可能性が考えられる。

ブルー銅タンパク質シュウドアズリンの電子移動経路 Electron Transfer Pathway of a Blue Copper Protein, Pseudoazurin

酒井千尋、菊池茉衣、玉置彩緒理、山口峻英、高妻孝光
茨城大院理工 量子線科学専攻

シュウドアズリンは、脱窒菌において亜硝酸還元酵素と亜酸化窒素還元酵素への電子伝達体として機能している。活性中心に存在する Cu(II) イオンには Cys78、Met86、His40、His81 が配位し、歪んだ四面体型構造をとっており、近年、Axial/Rhombic の構造二重性を有することが明らかとなった。His81 残基近傍には、配位に関与しない Met16 残基が存在し、弱い相互作用を通して活性中心の電子状態を制御している。Met16 を他のアミノ酸に置換することにより Axial/Rhombic 成分の割合が変化する[1]。Met16 を脂肪族アミノ酸である Ile、Val に置換すると、Axial/Rhombic 成分は、ほぼ 100% Rhombic 型へと転移する[2]。

本研究では、活性中心近傍の Met16 残基を脂肪族アミノ酸である Ile、Leu、Val に置換した Met16AlI 変異体を作成し、電気化学的性質と電子移動反応経路に関する研究を行った。

Met16AlI 変異体と亜硝酸還元酵素との電子移動反応速度は、野生型で $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であったのに対し、Met16Val PAz、Met16Ile PAz、Met16Leu PAz では $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $7.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $7.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。X 線結晶構造解析を行なったところ、His81 と 16 番目のアミノ酸間の平均距離は、野生型と Met16Ile 変異体では、それぞれ 3.87 Å と 4.32 Å であり、16 位アミノ酸の側鎖と活性中心の銅原子間の距離が長くなると、電子移動反応速度が小さくなることが考えられ、16 位アミノ酸の側鎖が電子移動経路形成に重要な役割を果たしているものと考えられる。

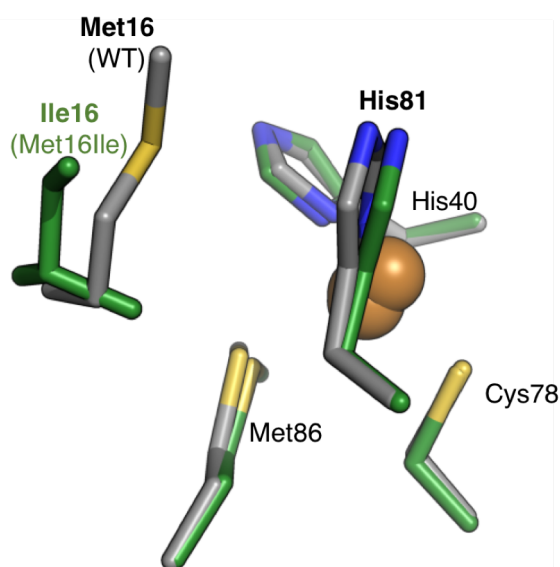


図 1. 野生型と Met16Ile 変異体の活性中心および第二配位圏の構造

参考文献

1. Fitzpatrick, M. B. *et al.* J. Inorg. Biochem. (2010), 104, 250–260.
2. Abdelhamid, R. F. *et al.* J. Biol. Inorg. Chem., 12, 165–173 (2007).

リジニバチルス菌由来毒素タンパク質 Bin toxin の構造解析 Structural analysis of Bin toxin from *Lysinibacillus sphaericus*

松本勇¹, 加藤公児^{1,2}, Panadda Boonserm³, 田中良和^{1,2}, 姚閔^{1,2}

1 北海道大学生命科学院, 2 北海道大学先端生命科学院,

3 Mahidol University, Thailand

真正細菌の一種であるリジニバチルス菌は、毒素タンパク質である Bin toxin を産生する。Bin toxin は、マラリアやジカ熱を媒介する蚊の幼虫に対してのみ毒性を発揮することから、蚊を抑制する生物殺虫剤としての利用が期待されている。Bin toxin は 前駆体の proBinA と proBinB からなる二成分性の毒素であり、細菌の体内中に結晶として産生される。細菌から放出された結晶は、幼虫の中腸に達すると、その塩基性条件下において溶解される。続いて、前駆体は宿主酵素による部分切断を受けて、活性型の Bin toxin となる。そして、活性型の BinB が宿主受容体へと結合することによって細胞内へと移行し、最終的に、BinA が中心となり細胞傷害活性を与える。既に、Bin toxin は、細胞膜を破壊する膜孔形成毒素の一種であると考えられているが、細胞傷害活性に関する分子機構の解明には至っていない。

本研究では、proBinA の単量体構造を分解能 2.7 Å で明らかにした。得られた構造を、既知の pH 依存性の proBinA・proBinB のヘテロ二量体構造と比較した。その結果、proBinA の膜孔形成への構造変化に重要だと考えられている Asp342 の側鎖は、pH 7 の配置とは異なり、pH 10 の配置と同様に反対方向に配置されていた (図)。また興味深いことに、Tyr299 の側鎖

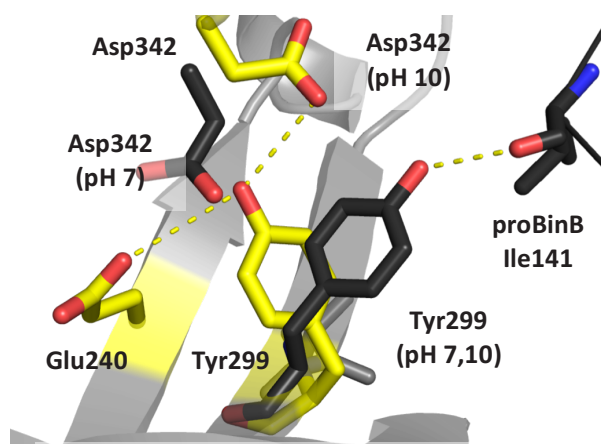


図. 構造比較

の向きに有意な違いが見られた。ヘテロ二量体構造では、Tyr299 は、proBinB の Ile141 の主鎖と水素結合を形成していたが、本研究の構造では、Glu240 と Asp342 の間に入り込んで弱い水素結合を形成していた。この proBinA の Tyr299 は、ヘテロ二量体ではプロトマー間で水素結合を形成して結晶を安定化させ、また結晶の pH 上昇に伴う溶解の後には、Glu240 と Asp342 の配置を維持することで、膜孔形成への構造変化に影響していることが示唆された。

昆虫グルタチオン S-転移酵素 Noppera-bo と阻害化合物の 構造生物学的解析

Biostructure analysis of insect glutathione S-transferase Noppera-bo with inhibitor compounds

○稲葉和恵¹・小祝孝太郎²・諸橋香奈¹・塩谷天¹・小島宏建³・岡部隆義³・長野哲雄³・井上英史⁴・藤川雄太⁴・湯本史明²・千田俊哉²・丹羽隆介¹
(筑波大・生命環境¹・高エネ研・物構研・構造生物²・東大・創薬機構³・東京薬大・生命科学⁴)

昆虫ステロイドホルモンであるエクジステロイドは、脱皮と変態の誘導に重要である。エクジステロイドは脊椎動物や植物のステロイドホルモンと異なる構造を示すため、エクジステロイドの生合成を阻害する薬剤は環境に優しい農薬となり得る。

エクジステロイドは食餌由来のコレステロールを出発点として、複数の酵素により生合成される。エクジステロイド生合成を担う酵素の 1 つである Noppera-bo(Nobo)は、コレステロールの挙動を調節するグルタチオン S-転移酵素(GST)である。一般の GST 同様に、Nobo タンパク質は大腸菌を用いた発現系とアフィニティーカラムを用いた精製システムによって容易に大量精製できる。また、Nobo の酵素活性の検出のために、すでに我々は高感度 GST 酵素活性蛍光プローブ 3,4-DNADCF を用いた試験管内アッセイシステムを構築している。そこで我々は、組換え Nobo タンパク質と 3,4-DNADCF を用いて、大規模化合物ライブラリーの中から Nobo 阻害剤を探索し、新規農薬の候補となる化合物を探索した。

我々は、東大創薬機構のコア化合物ライブラリーに含まれる 9,600 種類の低分子化合物を対象に阻害剤探索を行った。その結果、キイロショウジョウバエ、ハマダラカ、コナガおよびネッタイシマカに由来する 4 種の Nobo のいずれをも阻害する十数種の化合物を得た。

次に、Nobo と阻害剤の作用機序を解明するため、Nobo タンパク質の X 線結晶構造解析を行った。その結果、キイロショウジョウバエおよびネッタイシマカ由来の Nobo タンパク質の結晶化に成功し、立体構造を明らかにした。Nobo は一般的な GST と同様に二量体構造を示し、GSH 結合サイトおよび基質結合サイトが確認された。さらに、Nobo と阻害剤との複合体の結果より、阻害剤の 1 つである β エストラジオールは、Nobo の基質結合部位に結合することが分かった。同様に、ほとんどの阻害剤が基質結合サイトに結合することが確認された。現在、ネッタイシマカ由来の Nobo と阻害剤候補化合物の複合体の構造解析および異種間での Nobo での GSH 結合サイトと基質結合サイトの周辺アミノ酸残基の比較を試みている。

DAPK キナーゼタンパク質と ATP 類似体複合体に おける結合様式の構造学的研究

Structural study of binding mode in kinase protein DAPK and ATP analog complexes

松尾悠平²・田中伊知朗^{1, 3}

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】

DAPK は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 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。これまでの研究で X 線構造解析により、DAPK のキナーゼドメインに含まれる ATP 結合部位の立体構造が明らかにされている。DAPK の特徴として、ATP 結合部位には多数の水分子が存在しており、ATP 類似体結合後も半数以上の水分子がそのまま結合部位に保存されているということと、金属イオンが1つしか配位しないことが分かっている(1)。そのため、もう 1 つの金属イオンの代わりに、水分子や DAPK の残基が ATP のリン酸基を安定化させ、リン酸転移をサポートすると考えられる。そこで、DAPK と ATP および様々な ATP 類似体との複合体の X 線構造解析により、ATP のリン酸転移機構の考察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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、ATP 類似体には、Sigma Aldrich 製の AMP-PNP (ANP) と ATP- γ S (AGS) および AMP-PCP (ACP)、その他にも ATP と ADP を用いた。金属には MgCl_2 を用いて、pH は 6.5 と 8.0、温度は 293K の条件でハンギングドロップ法により結晶化した。また、モル比が DAPK:ATP 類似体: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 BL5A で 100K の低温で行い、Phenix と coot を使用してデータ解析を行った。

【結果】

分解能 1.57~2.26 Å の新規構造 3 つを含む全 8 構造を得ることが出来た。それぞれの構造における DAPK と ATP 類似体との結合様式の比較により、ATP 類似体の 2 つの結合様式と重要な水の保存が確認され、 α 、 β 、 γ リン酸が直線状の時に転移が起こると考察できた。また、DAPK-ATP-Mg 構造により、リン酸転移直前の構造の相互作用様式を考察することが出来た。

【参考文献】

(1) A.Yamaguchi *et al.*, JPS Conf.Proc. 8, 033008(1-6) (2015).

ニワトリ FANCM-CENP-SX 複合体の X 線結晶構造解析

X-ray structural analysis of chicken FANCM-CENP-SX complex

伊藤 翔、西野 達哉

東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻

真核生物が生命活動を維持するためには、細胞分裂時に染色体が正確に分配されることが極めて重要である。染色体上のセントロメア領域に形成されるキネトコアは染色体と微小管を接着し、正確な染色体分配に必須な役割を果たす。キネトコア形成不全は細胞死や遺伝病を招くことが知られているが、キネトコアの形成機構はいまだ不明な点が多い。キネトコアは層状の巨大タンパク複合体で、外層は分裂期での微小管との結合、内層はセントロメア領域との結合を担っている。CCAN(構成的セントロメア結合ネットワーク)は内層を構成するキネトコア構成タンパク複合体でこれまでに 16 の因子が同定され細胞周期を通してセントロメアに局在する。CCANに属する因子のうち CENP-SX と CENP-TW はヒストンフォールドを有しており CENP-TWSX 複合体を形成する。CENP-TWSX 複合体は外層のキネトコア構成因子と相互作用しキネトコア構築に重要な役割を果たすことが示唆されている。一方で、CENP-SX は DNA 二重鎖修復にかかわる FANCM と複合体を形成することも知られている。CENP-SX の 2 つの作用経路がどのように制御されているかを解明することはキネトコアの形成機構に関する新たな知見につながると考えられる。そこで 2 つの経路における CENP-SX の DNA 認識機構や構造の違いをみるために、まずは FANCM-CENP-SX の X 線結晶構造解析を行うこととした。

CENP-S の天然変性領域を除いた FANCM-CENP-SX を精製し、結晶化したところ、異なる条件から複数の結晶を得ることができた。PF にて X 線回折データを測定し CENP-SX を探索モデルとして分子置換法を行ったところ FANCM-CENP-SX 複合体および CENP-SX 複合体の立体構造を決定することができた。続いて全長 CENP-S を含む FANCM-CENP-SX 複合体を精製し DNA と混合して結晶化を試みた結果、六面体の結晶が得られた。PF にて X 線回折データを測定したところ分解能は 5 Å であった。先ほどと同様に分子置換法による立体構造解析を試みたが位相決定に至らなかった。今後はセレノメチオニン置換体を作成して移送決定を行うとともに結晶化条件の最適化を進め立体構造決定を目指す。

漢方生薬ゴシュユ由来Ⅲ型ポリケタイド合成酵素の X 線結晶構造解析

Crystal structure analyses of plant type III polyketide synthases cloned from *Evodia rutaecarpa*

松井崇¹、児玉猛¹、只腰哲弘¹、森貴裕²、
野口博司³、阿部郁朗²、森田洋行¹
¹富山大・和漢研、²東大院・薬、³静岡県立大・薬

冷え症などで処方される温経湯や当帰四逆加呉茱萸生姜湯に含まれる漢方生薬ゴシュユの基原植物 *Evodia rutaecarpa* からは、漢方の効能を示す化合物以外にも抗菌作用を示す 2-アルキルキノロン類が多数単離されている。これらの化合物が持つキノロン骨格は抗生物質等の医薬品や医薬品リード化合物として有用な骨格である。そこで、2-アルキルキノロンの生合成酵素を構造情報をもとに改変し、生理活性を持つ非天然型キノロン化合物を創出する目的で、はじめに *Evodia rutaecarpa* の 2-アルキルキノロン生合成に関与すると予想されたⅢポリケタイド合成酵素 (PKS) の構造・機能解析を実施した。

Evodia rutaecarpa より得られた 2 つの新規Ⅲ型 PKS であるアルキルジケチド CoA 合成酵素 (ADS) と 2-アルキルキノロン合成酵素 (AQS) について、ADS は C₈ から C₁₂ の脂肪酸 CoA とマロニル CoA を縮合させアルキルジケチド CoA を生成した。また、AQS は非酵素的に加水分解されたアルキルジケチド酸と *N*-メチルアントラニロイル CoA の反応を触媒して 2-アルキルキノロンを合成することがわかった (図 1)。一方、ADS は他の炭素鎖長の脂肪酸 CoA ではジケチド CoA を生産できなかった。また、AQS は *N*-メチルアントラニロイル CoA とマロニル CoA が縮合したキノリノン を合成できなかった。ADS と ADS 変異体の構造比較から、ADS は活性中心キャビティに特徴的に存在する W332 により活性部位の容積と形状が制限され、C₈-C₁₂ 脂肪酸 CoA のみジケチド CoA へ変換できる事がわかった。一方、AQS と AQS Y215V 変異体の構造比較から、Y215 が形成する細い CoA-binding channel のために、AQS は CoA エステルではなくジケチド酸を基質とし、ADS と AQS の共同的な生合成により 2-アルキルキノロンを生産することが明らかとなった。

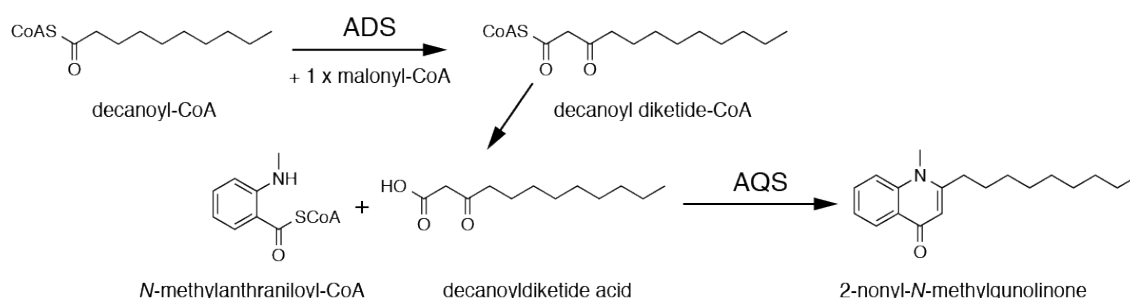


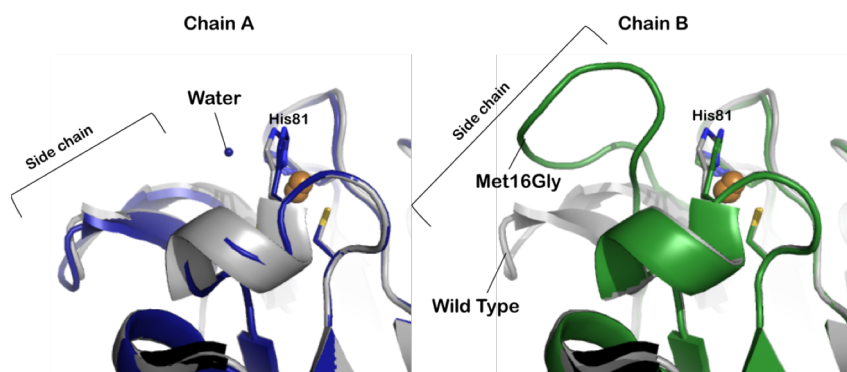
図 1. ADS と AQS による 2-アルキルキノロンの生合成

ブルー銅タンパク質シュウドアズリンにおける 芳香環—水分子間相互作用の効果 The Effect of Aromatic Ring-Water Interaction in Blue Copper Protein, Pseudoazurin

赤尾康平、玉置彩緒理、大下宏美、山口峻英、高妻孝光
茨城大院理工 量子線科学専攻

脱窒菌 *Achromobacter cycloclastes* 由来のシュウドアズリンは、脱窒過程において電子供与体として機能している。活性中心の第二配位圏には 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。本研究では、Met16 を側鎖のない Gly に置換した Met16Gly 変異体を作製し、構造や電子移動反応に及ぼす効果について検討した。

酸化型 Met16Gly 変異体 (pH 7.5) の結晶の晶系は斜方晶系であり、空間群は $P2_12_12_1$ 、分解能 1.8 Å であった。Gly に置換した 16 位周辺構造は、Met16Gly の結晶は単位胞中に 2 分子存在しており、Chain A では Met16 側鎖のあった位置に水分子と考えられる電子密度が見出された。見出された水分子は、His81 から約 3 Å 離れた位置に存在しており His81 のイミダゾール環と弱く相互作用していると考えられる。Chain B では Asp9 から Met16 に至るループ (サイドループ) が活性中心に覆いかぶさるような構造となっていた。



Met16Gly 変異体と亜硝酸還元酵素との電子移動反応速度定数は $1.73 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、野生型 ($1.42 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) よりも遅くなっていることが判明した。Met16Gly 変異体と亜硝酸還元酵素間の電子移動反応が遅くなったのは、Met16Gly 変異体の酸化還元電位が 50 mV 高くなったこと、また、活性中心に覆いかぶさってきたサイドループが有効な電子移動パスウェイをブロックしたことによるものと考えられる。これらのことから、Met16 は His81 との弱い相互作用を通じてサイドループを安定化させ、有効な電子移動反応経路の形成に寄与しているものと考えられる。

PF-BL1A, PF-BL17A, PFAR-NE3A

糖転移酵素 POMGnT1 の機能同定と糖鎖認識機構解析

A novel carbohydrate binding domain of POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan

桑原直之¹, 萬谷 博², 山田 健之², 舘野 浩章³, 金川 基⁴, 小林 千浩⁴, 赤阪-萬谷 啓子², 弘瀬 友理子⁵, 水野 真盛⁵, 池口 満徳⁶, 戸田 達史⁴, 平林 淳³, 千田 俊哉¹, 遠藤 玉夫², 加藤 龍一¹

¹ 高エネ研・物構研・構造生物, ² 都健康長寿医療センター研, ³ 産総研・創薬基盤, ⁴ 神戸大院・医, ⁵ 野口研, ⁶ 横市大・生命医

ジストロフィン糖タンパク質複合体は、細胞膜と基底膜を結合させる働きによって筋肉の維持など様々な生命現象において重要な働きしている。この細胞膜と基底膜の結合には、 α -ジストログリカン(α -DG)と呼ばれる細胞膜表面に局在するサブユニットの O-マンノース型糖鎖とラミニンとの結合が重要であることがわかっている。実際に α -DG に修飾された O-マンノース型糖鎖の一種であるキシロース(Xyl)-グルクロン酸(GlcA)の繰り返し構造がラミニンとの直接相互作用することがわかっている。さらに Xyl-GlcA 繰り返し構造およびその足場となる糖鎖構造形成に関わる酵素の遺伝子群が先天性筋ジストロフィーの原因遺伝子と同定されており、本研究ではその原因遺伝子の一つである POMGnT1 (protein O-mannose β -1,2-N-acetylglycosaminyltransferase)に注目した。これまで POMGnT1 は GlcNAc- β 1,2-Man-O-構造形成に関わる糖修飾酵素であるため、POMGnT1 の機能と疾患との関連は不明であった。結晶構造から POMGnT1 には二つのドメイン(ステムドメイン、触媒ドメイン)を持つことを明らかにした。Man-O-ペプチド複合体との構造から、触媒ドメインは特定のアミノ酸配列を認識することはなく、ペプチドの疎水性を認識し、GlcNAc- β 1,2 を修飾することが明らかになった。さらに結晶構造解析およびその構造に基づく機能解析を行った結果、ステムドメインが糖鎖を認識できることを明らかにした。ステムドメインは β 結合した GlcNAc に特異性を持ち、細胞内では POMGnT1 の酵素生成物である GlcNAc- β 1,2-Man-O-および Xyl-GlcA 繰り返し構造の足場構造(GalNAc- β 1,3-GlcNAc- β 1,4-Man(-6-phospho)-O-)を結合できることを示した。この発見から α -DG における GlcNAc- β 1,2-Man-O-サイトのクラスタリング機構、さらに POMGnT1 による疾患発症機構を提唱した。(N. Kuwabara et al., *PNAS* 113 9280-5 (2016))

Glucose isomerase の反応機構解明に向けた 中性子結晶構造解析

Neutron crystal structure analysis for elucidation of the reaction mechanism of glucose isomerase

矢本早紀¹, 小松崎直也¹, 日下勝弘², 矢野直峰²

奥田夏樹³, 佐々木昭雄³, 田中伊知朗^{2,4}

1 茨城大院理工, 2 茨城大フロンティアセンター, 3 (株)V.I.C., 4 茨城大工

Glucose isomerase は、glucose と fructose の互変異性を触媒する金属酵素タンパク質である。TIM バレル構造を持つホモ 4 量体で、バレルの中心に活性部位がある。糖の互変異性は、開環、異性化、閉環の3段階反応からなる。この反応のうち、異性化反応において glucose の C2 から C1 への水素移動反応が伴うと考えられているが、その詳細な水素移動反応機構は明らかになっていない。そこで今回は、重水バッファーを用いて重水素交換をした glucose isomerase、金属、glucose の 3 成分複合体結晶を共結晶化し、X 線・中性子結晶構造解析によって反応機構を解明することを目的とした。

Glucose isomerase タンパク質は Hampton Research の HR7-102 (*Streptomyces rubiginosus* 由来) を購入した。結晶化剤に硫酸アンモニウムを用いて、279K で結晶化した。金属 Mg とリガンドとなる glucose はソーキングによって結晶へ導入し、3 成分複合体結晶を準備した。なお、結晶化からソーキングはすべて重水下で行った。室温中性子回折データと室温 X 線回折データはそれぞれ J-PARC MLF BL-03 (iBIX)、PF-BL5A で測定した。中性子回折測定 of データ処理は STARGazer、X 線回折測定 of データ処理は HKL2000 を使用した。

Glucose isomerase、金属 Mg、糖 glucose の 3 成分複合体結晶(1.1mm³)が得られた。測定の結果、X 線・中性子とも空間群は $I 222$ 、 $a = 97.09 \text{ \AA}$ 、 $b = 99.69 \text{ \AA}$ 、 $c = 102.92 \text{ \AA}$ で、分解能はそれぞれ $1.39 \text{ \AA}$ 、 $2.0 \text{ \AA}$ でデータセットを得た。P HENIX を用いた X 線・中性子同時精密化による結晶構造解析を行った。基質の glucose と 2 つの Mg 原子が活性部位に結合しているのが確認できており、詳細は解析中である。

シュウドアズリンにおける Asn9 の外圏効果 Outer-sphere Effect of Asn9 in Pseudoazurin

舟久保 暖、山口峻英、高妻孝光
茨城大院理工 量子線科学専攻

シュウドアズリンは、脱窒過程において亜硝酸還元酵素への電子供与体として機能しているが、シュウドアズリンのような電子伝達タンパク質を中心として、タンパク質の構造と機能との相関を考えるために、活性中心近傍での水素結合ネットワークについての検討が行われつつある。近年、ハイブリッド密度汎関数法によってシュウドアズリンの活性中心構造と電子状態について検討したところ、X 線吸収分光法によって得られた活性中心構造および電子状態を計算機科学的に再現するためには、銅に直接配位するアミノ酸残基 (His40, Cys78, His81, Met86) 以外に、外圏に存在する Asn9 を含めて計算することが重要であることが判明した[1]。このように分光学的知見および計算機科学的知見から、シュウドアズリンの外圏に存在する Asn9 残基の活性中心構造と電子状態の調節機構のメカニズムを知ることにより、タンパク質における外圏構造が機能や物性発現にどのように寄与していることを知ることにつながる。

1.1 Å 分解能で解析した野生型シュウドアズリンの X 線結晶構造では、Asn9 は銅の配位に関与する His40 と水素結合を有し、近傍の Lys38とも水分子を介して水素結合を形成していることが示されている(図1)[2]。本研究では Asn9 を側鎖の位置で水素結合を形成しないフェニルアラニン(Phe)に置換した Asn9Phe 変異体を作成し、シュウドアズリンにおける Asn9 の役割について検討を行った。

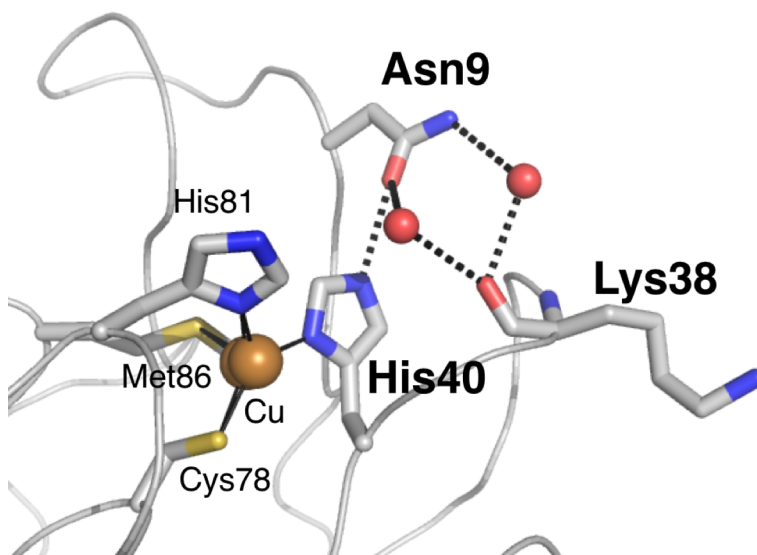


図1. シュウドアズリンの活性中心および Asn9 周辺の構造

【参考文献】

- [1] T. Yamaguchi et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2015**, 88, 1642–1652.
- [2] T. Yamaguchi, et al., *RSC Adv.*, **2016**, 6, 88358–88365.

リゾチームー糖複合体の中性子構造解析に向けて Preparation of sugar-Lysozyme complexes for neutron structure analysis

後藤亮祐¹、日下勝弘²、矢野直峰²、田中伊知朗^{1,2}

1 茨城大工, 2 茨城大フロンティアセンター

【緒言】

リゾチームは細菌の細胞壁ペプチドグリカンの N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンの間のグリコシド結合を切断する酵素である。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、リゾチームの触媒機構は解明されていない部分が多く、様々な反応機構が提唱されている。本研究では、中性子構造解析によって同定が期待される、プロトネーションの有無や水素原子ドナー相手を直接確認できる方向性が決定された水和水の位置情報を用いて、反応機構解明に役立たせることを目的とする。まずはその準備のために、X 線解析による複合体の概要および近く予定されている中性子テスト実験により、結晶品質や回折能の確認を行う。

【実験】

今回実験に用いたリゾチームは SIGMA-ALDRICH 社の HEWL(ニワトリ卵白リゾチーム)を使用し、糖は N,N',N',N'-Tetraacetylchitotetraose((NAG)₄)と N,N',N'-Triacetylchitotriose ((NAG)₃)であり、Dextra Laboratories 社より購入した。リゾチーム-((NAG)₄),((NAG)₃)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 30mg/mL、NaCl 結晶化剤濃度は 0.6M、緩衝溶液(酢酸ナトリウム):0.050 M pH 4.5、温度 293 K にて結晶育成を行った。X 線回折データは低温(100K)で PF-BL5A で測定した。また、中性子回折データは、pD 4.1 の重水置換結晶を室温にて J-PARC MLF BL-03 (iBIX)で測定する予定である。

【結果】

X 線構造解析によってリゾチーム-((NAG)₄),((NAG)₃)の複合体の活性部位に糖が見えていることを確認することができた。続けて、中性子テスト測定に向け重水バッファを用いて結晶化を行ったところ、一辺約1mmに達する大型の結晶を作成することができた。この結晶を用いて、間もなく中性子テスト測定を行うので、ポスター発表ではその結果の評価とともに、高分解能 X 線解析の結果についても発表したいと思う。

タンパク質における構造と物性の加成性 Additivity of the Structure and Properties in Protein Molecule

山口峻英、小野 新、高妻孝光
茨城大院理工 量子線科学専攻

タンパク質の構造と物性は、ペプチド結合、水素結合、非共有結合性相互作用が組み合わさり発現されている。脱窒系電子伝達タンパク質シュウドアズリンにおいて、活性中心近傍での非共有性の弱い相互作用の重要性について研究が行われてきた[1]。シュウドアズリンは、Cys78からMet86に至るフロントループにCys78、His81、Met86のCu原子への配位アミノ酸を有し、Thr36からHis40までのバックループ上にもCu原子に配位するHis40残基を有している。これまでに、フロントループ上のHis81近傍に存在するMet16が、シュウドアズリンの電子状態を制御し、シュウドアズリンのAxial/Rhombicの二重構造性は、16位のアミノ酸の側鎖によって系統的に変化することが明らかとなってきた[2]。Met16を芳香環を有するアミノ酸に置換すると、活性中心の構造はAxial側へと転移する。また、バックループ上のThr36は、シュウドアズリンの酸化還元に伴うプロトンの出し入れに関与しているHis6残基と水素結合を形成しているが、His6がプロトン化した状態と同様の効果を与えるThr36Lysも、Axial側へと転移する[3]。複次的な構造形成の機構をしることは、有用なタンパク質を創成することに寄与すると考えられ、シュウドアズリンで見出された独立した構造転移因子の加成性について、本研究では、Met16Phe/Thr36Lys二重変異体を作成し、構造と分光学的性質を検討した。

EPRから、野生型ではAxial型成分が34%であるのに対し、Met16Phe、Thr36Lysでは、Axial型成分は、それぞれ55%と50%であったのに対し、Met16Phe/Thr36Lysでは64%となった。このことより、2つの相互作用様式は、加成的にシュウドアズリンの物性を変化させることが判明した。X線結晶構造解析から、Met16Phe/Thr36LysにおけるCu-S_{Met86}の距離は、2.76 Åであり、EXAFSによって得られた2.48 Å[4]よりも顕著に長くなっていることが判明した。このように、2つの独立した構造転移因子には、加成性があることが初めて見出された。現在、この加成性の機構について検討を行っている。

参考文献

1. M. B. Fitzpatrick et al., *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, *104*, 250–260.
2. R. F. Abdelhamid et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, *12*, 165–173.
3. P. Gast et al., *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *137*, 57–63.
4. T. Yamaguchi et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2015**, *88*, 1642–1652.

タンパク質の高圧凍結法の汎用化 Generalization of high-pressure freezing method of proteins

杉山玲¹, 小松崎直也², 後藤亮祐¹, 田中伊知朗^{1,3}

1 茨城大工, 2 茨城大院理工, 3 茨城大フロンティアセンター

【緒言】 タンパク質結晶を X 線で測定する際、放射線損傷軽減のために、結晶を凍結する必要がある。また、タンパク質結晶を凍結すると結晶内部や外側に含まれる水分子が氷の結晶となり膨張し、結晶が壊れてしまう。そのため、抗凍結剤を結晶化母液と混合してタンパク質結晶を浸すことで、水分子をアモルファス状に凍結することができる。

しかし、抗凍結剤を使用するとタンパク質に影響を及ぼすことがあるので、最適な種類や濃度等にしてやる必要がある。また、中性子回折実験用の大型結晶を凍結する際、結晶内部と外部の大きな温度差から、瞬間凍結することが難しい。そこで、これらの問題を解決するために、高圧条件下(200 MPa)で結晶を凍結する方法(高圧凍結法)に注目した。

【実験】 タンパク質結晶を高圧凍結するために、いばらき量子ビーム研究センター(IQBRC)に設置された米国 ADC 社製の高圧凍結装置 HPC-201 を用いて実験を行った。この装置はヘリウムガスによって、200 MPa まで昇圧してから凍結することが可能である。まず、ループで母液から結晶を取り出し、凍結ピンに入れた。凍結ピンの下部には鉄が埋め込まれているため、事前に磁石を圧力管にセットしておくことで、凍結ピンを圧力管に入れた際に、ピンが磁石の位置で留まる。次に、圧力管を高圧凍結装置にセットし、200 MPa まで加圧した。磁石を外すと凍結ピンが圧力管下部に落ちる。常圧に戻し、開放装置を使って、圧力管下部のネジを開放する。凍結した結晶を液体窒素中から取り出し、少し温度の高い約-180℃の窒素気相中で操作可能なライカ製 EM-CPC に移動させ、ループをキャップに立ててから専用容器に入れ、液体窒素中に保存するという手順を取った。

【結果】 結晶の落下等の問題を防ぐためにループや凍結ピンの改良を行い、凍結の成功率を上げた結果、6 mm φ の内径の大型結晶用の圧力管も用いて、抗凍結剤を使わずに、Lysozyme、Lysozyme-NAG4 複合体、TEMPOL を含む Lysozyme、Ferritin、Thaumatococcus、DAPK の単結晶の高圧凍結に成功した。また、いくつかの結晶では、X 線回折実験まで成功させることができた。

【謝辞】 実験に協力してくれた茨城大院理工の松尾悠平、矢本早紀、茨城大工の白川寛悟、茨城大フロンティアの日下勝弘、二宮聖治、廣木淳一の各氏に感謝する。

PPAR α と γ に対する 17-oxoDHA の共有結合形成

17-oxoDHA forms a covalent bond with PPAR α and γ

○伊藤 俊将¹, 江川 大地¹, 山本 恵子¹

¹ 昭和薬科大学

リピッドセンサーとして考えられている PPARs は核内受容体の一員であり、 α, γ, δ の3種のサブタイプがある。そのうち PPAR α はフィブラートに代表される高脂血症治療薬の標的分子であり、PPAR γ は TZD と呼ばれる2型糖尿病治療薬の標的分子である。

一方、生体内のリガンドは脂肪酸あるいは脂質と考えられており、PPAR γ や PPAR α を活性化する様々な脂肪酸が報告されている。以前、我々は 4-oxoDHA をはじめとする電子吸引性基を有する高度不飽和脂肪酸が PPAR γ を活性化し、さらに共有結合を形成することを報告している。

今回我々は、4-oxoDHA とその異性体、17-oxoDHA に関して、oxo 基の位置の違いによる影響を検討する目的で、PPAR α, γ, δ のサブタイプの遺伝子転写活性化能と共有結合形成能を比較した。

4-oxoDHA は PPAR γ サブタイプのみ活性化したが、17-oxoDHA は PPAR α および γ を活性化するデュアルアゴニストであることが明らかになった。また、17-oxoDHA は PPAR α に対して強い活性化能を示したが PPAR γ に対してはパーシャルアゴニスト活性を示した。

ESI-質量分析を行った結果、4-oxoDHA は PPAR γ と共有結合したが PPAR α とは共有結合を形成しなかった。しかし、17-oxoDHA は PPAR α および γ の両サブタイプと共有結合することが判明した。

活性化機構を解明するため、17-oxoDHA/PPAR γ 複合体と 17-oxoDHA/PPAR α 複合体の X-線結晶構造解析を行った。

これまでに脂肪酸/PPAR α の共結晶化の例がなく、既知の結晶化条件では 17-oxoDHA/PPAR α の共結晶は得られなかった。しかし、co-activator を添加することで、共結晶化に成功した。これにより、初めて脂肪酸/PPAR α の複合体の結晶構造を明らかにすることができた。

PPAR γ においては 17-oxoDHA は 4-oxoDHA の結合部位である Cys285 と共有結合を形成していたが、脂肪酸の配向が一般的なものと反対であったため活性化に重要なヘリックス 12-カルボン酸間の水素結合が欠如していた。しかしヘリックス 12 は脂肪酸の末端と疎水性相互作用による中程度の安定化を受けていた。そのため、パーシャルアゴニスト活性を示したと考えられる。

一方、PPAR α では、17-oxoDHA の共有結合部位は γ には保存されていない Cys であり、カルボン酸は、ヘリックス 12 と水素結合を形成していた。共有結合する Cys の位置の違いにより、脂肪酸の配向が異なったため、サブタイプ間でアゴニスト活性に違いが現れたと説明できる。

好熱性真菌 HP1 タンパク質の構造機能解析 Structural and biochemical analysis of *Chaetomium thermophilum* HP1

杉田 紗織、西野達哉

東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻

真核生物において、高度に凝集したヘテロクロマチンは、遺伝子発現を制御のみならず染色体の様々な機能に重要な役割を果たしている。ヘテロクロマチン結合タンパク質 1 (HP1) はヘテロクロマチン領域に結合し、染色体の構造と機能に重要な働きを示すが、その詳細は不明な部分が多い。HP1 には保存されたクロモドメイン(CD)と呼ばれるメチル化したヒストン H3 を認識して結合する領域、クロモシャードメイン(CSD)と呼ばれる二量体形成及び基質タンパク質が結合する領域が存在し、両者はヒンジ領域で連結されている。私たちは HP1 による染色体構造の制御機構および機能を解明するため、安定性のより高い好熱性真菌 *Chaetomium thermophilum* 由来の HP1 の構造機能解析を行っている。

全長 HP1(CthHP1)、CD(CthHP1CD)や CSD(CthHP1CSD)を発現する大腸菌組換えベクターを構築した。その結果、CthHP1、CthHP1CD、CthHP1CSD を大量に得ることに成功した。それぞれ結晶化を行ったところ、CthHP1CD より放射状結晶を得ることができた。残念ながら単結晶ではないため、回折データを得ることはできなかったが、今後結晶化条件を改善し、構造決定可能な結晶を作成する予定である。また、ヒストンや基質タンパク質との相互作用解析を行い、その結合の詳細を立体構造解析する予定である。

ファミリー4 ウラシル DNA グリコシラーゼ-DNA 複合体の
立体構造に基づく酵素反応機構の解明
The catalytic mechanism and structure of
family 4 uracil-DNA glycosylase in complex with DNA

河合聡人¹、中村照也²、山縣ゆり子³、宮本秀一¹

1 崇城大学薬学部、2 熊本大学大学院先導機構、

3 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。また、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。そのため、円滑にDNA複製を実施するには、DNA中からウラシルやヒポキサンチンが滞りなく除去される必要がある。そこで我々は、DNA中のウラシルの除去に重要なウラシル DNA グリコシラーゼ(UDG)に注目し、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ている。X線結晶構造解析法を用いたこれまでの研究で *stoUDG* 単体およびウラシル複合体の立体構造を 1.7 Å 分解能で解明した[1]。その結果、*stoUDG* の全体構造は他の 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類似していることが明らかになった。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、DNAとの結合時には構造変化することが推察された。しかし、*stoUDG* の leucine intercalation loop のループ構造は3アミノ酸残基と短く、その両端には α ヘリックスがつながっていて、現状ではその構造変化について予想することが難しい状況だった。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、X線回折実験を実施した。その結果、昨年度の段階で 2.6 Å 分解能で複合体構造を決定することに成功していたが、本年度さらに結晶化条件の最適化を進めたことで 2.1 Å 分解能まで向上させることに成功した。そこで、本発表では決定した *stoUDG*-DNA 複合体の立体構造の詳細と *stoUDG* の酵素反応について報告したい。

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

高硫化水素産生口腔細菌由来 cysteine (hydroxyl) lyase の立体構造と反応機構 Structure and reaction mechanism of a cysteine (hydroxyl) lyase from a high H₂S-producing oral pathogen

○毛塚雄一郎¹、石田哲夫²、吉田康夫³、野中孝昌¹

1 岩手医大・薬、2 琉球大・理、3 愛知学院大・歯

硫化水素は口臭の主要な原因物質であり、低濃度においても強い細胞毒性を示すため、歯周病を進行させる一因と考えられている。*Fusobacterium nucleatum* は、口腔細菌の中でも特に高い硫化水素産生能を有しており、他菌には見られない特有の硫化水素産生酵素 (Cysteine (hydroxyl) lyase) を発現する。この酵素は、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補因子として持ち、L-システインの β -置換反応によって硫化水素と L-セリンを生成する (Yoshida *et al.*, *Microbiology*, 2011)。この置換反応では、基質である L-システインの SH 基が脱離して生じる α -アミノアクリル酸中間体に対して、水分子が付加する過程が必要となるが、水分子の求核性の程度を考慮すれば、この付加反応は通常起こりにくいと考えられる。したがって、この酵素は、水分子を活性化させる仕組みを備えていると推察される。

Cysteine (hydroxyl) lyase 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、PLP はこれらにより形成されるチャネルの底部で Lys46 とシッフ塩基を形成していた。PLP の近傍には、fold-type II の PLP 依存性酵素群で保存されているアミノ酸残基が見られたことに加え、チャネルの側面には、この酵素に特有の Asp232 が見出された。この残基に対する変異酵素 D232N は、L-システインの β -置換反応に対する活性を消失し、L-システイン存在下での構造解析によって α -アミノアクリル酸中間体の電子密度を与えた (図 1)。さらに、ラピッドスキュア分光法により得た酵素反応溶液の吸収スペクトル変化を解析することによって、Asp232 は β -置換反応に必須であり、水分子からプロトンを引き抜く塩基の役割を果たすことが明らかとなった。

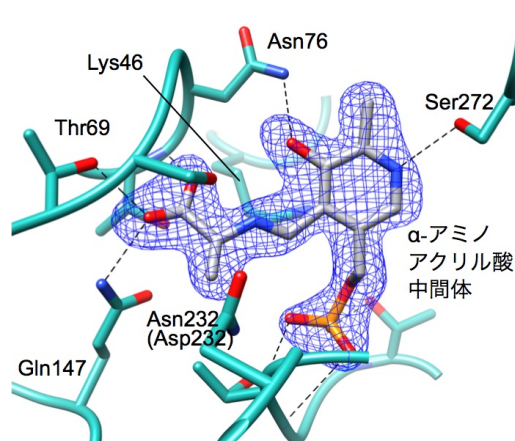


図 1 D232N 変異体に結合した α -アミノアクリル酸中間体
チャネルの外部から内部方向に投影

X 線結晶構造解析を用いた創薬スクリーニングのための 自動精密化および評価プログラムの開発

○小祝 孝太郎 1・山田 悠介 1・諸橋 香奈 2・稲葉 和恵 2・湯本 史明 1・
丹羽 隆介 2・千田 俊哉 1

(1 高エネ機構物構研 PF・2 筑波大生命環境)

近年、立体構造情報に基づいた薬剤開発における X 線結晶構造解析の需要がますます高まっている。X 線回折データの測定とその解析は、標的タンパク質に対する低分子化合物の結合を探るスクリーニングとして用いられるため、新規タンパク質の結晶構造解析とは異なる新たな解析技術が必要となる。そのため多くの放射光施設では、標的タンパク質と低分子化合物との複合体の結晶構造解析のために、自動測定・解析システムを構築し、ハイスループットで複合体の結晶構造を解析する技術開発が試みられている。

高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory では、自動結晶交換システム Photon Factory Automated Mounting System (PAM)と、回折実験データベース PF Remote Monitoring System (PReMo) による自動測定・自動データ解析システムが運用されており、創薬のため X 線回折実験基盤を整備している。現行の PReMo は、ビームラインにおいて測定された X 線回折データを XDS と CCP4 package の pointless および aimless を使って自動処理し、得られた反射強度ファイルをユーザーに提供できる。しかしながら、上記のような創薬スクリーニングにおいては、同一の鋳型構造モデルを用いた分子置換法による位相決定、構造精密化、および電子密度図の目視による低分子化合物結合の有無の判定は必ず行われる工程であり、その一連のパイプライン化はスクリーニングを大規模に展開する場合には必須である。

今回我々は PReMo によって提供された反射強度ファイルから、ctruncate を経て molrep による分子置換、refmac5 による自動精密化、coot による予想結合領域周辺の電子密度画像の取得を行い、結晶学的統計値と構造精密化の統計値とともに HTML 形式で提供するプログラムを構築した。これにより、全自動データ収集された多数のデータセットの中から、ヒットに該当する化合物の種類と実験条件を効率的に同定することが可能になった。

本プログラムを用いて、これまでに、ケーススタディとして用いたタンパク質では、20 種類の低分子との複合体構造を決定するだけでなく、ヒットに該当しない条件も同様のクライテリアで判定することで新規低分子の合成展開への展望が見出された。本発表では、その成果を発表するとともに、今後改良すべき点についても議論したい。

PF-BL17A, PF-AR-NE3A, PF-AR-NW12A

改変 HIV-1 逆転写酵素と DNA アプタマー 複合体の結晶解析

Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase mutants complexed with DNA aptamer

安武義晃¹・田村範子¹・服部真一郎²・林宏典²・松田幸樹²・前田賢次²・満屋裕明^{2,3}

1 産総研・生物プロセス、2 国立国際医療研究センター・研究所、3 National
Cancer Institute, National Institutes of Health

逆転写酵素(RT)は抗ウイルス薬開発において重要な標的タンパク質であり、薬剤結合機構、薬剤耐性機構を詳細に理解するため、また新規薬剤設計を行うために、本酵素の原子分解能での立体構造情報が求められている。

B型肝炎ウイルス(HBV)は世界全人口の6%に相当する約4億人に持続感染していると推定されており、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌、肝不全を発症し、年間100万人以上が死亡している。新たな抗HBV薬の探索を行うため、これまでにHBV RTの大量発現取得が広く試みられてきたが、著しい不溶性の性質のため、決定的な成果は得られていない。一方、RTの結晶学的研究はヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)のRTで広く行われており、またHBV RTとHIV-1 RTの活性部位(薬剤結合部位)はアミノ酸の保存性が見られることから、ポケットの構造は互いに類似していることが推測される。私たちは、HIV-1 RTの活性部位を形成するアミノ酸をHBV RTのアミノ酸に置換した様々な変異体を作成し、その中に抗HBV薬であるエンテカビルに対して薬剤感受性を示すHIV-1 RT変異体を見出すことに成功した。そこで、抗HBV薬との複合体立体構造を解析するため、まずRT変異体と鋳型RNA/プライマーDNA鎖を模して設計された修飾DNAアプタマーとHIV-1 RT変異体との複合体結晶化を行った。最初に得られた結晶は、分解能5.4 Å程度に留まったが、p51サブユニットのN末端配列を最適化することで、最大2.6 Å分解能程度の回折データ取得に成功した。分子置換法による解析の結果、DNAアプタマーに相当する明瞭な電子密度が観察され、DNAの3'末端がRT分子の活性部位(薬剤結合部位)に位置するように、確からしい方位で結合していることが確認された。

茨城県生命物質構造解析装置 iBIX —開発現状、成果及び今後の展望—

Current status, results and future prospects of IBARAKI Biological Crystal Diffractometer iBIX

日下勝弘¹, 山田太郎¹, 矢野直峰¹, 細谷孝明¹, 大原高志², 田中伊知朗¹,
片桐政樹¹

1 茨大 iFRC・2JAEA J-PARC センター

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)に生命物質構造解析装置 iBIX が開発・建設された(2008 年)。この際、パルス中性子源に対応した波長シフトファイバー型シンチレータ-2 次元検出器を開発することに成功した。2012 年度に検出器の高度化がなされ、検出効率が 58%と飛躍的に改善され、タンパク質の構造解析の精度が上がり、本格的な供用実験が開始された。

中性子構造解析は、水素原子が低分解能(2 Å 前後)でも観測しやすく、X 線解析では困難なプロトンの観測が可能であるが、タンパク質に対する特徴としては以下のものが挙げられる。

1. 互変異性を見つけ出す手段となる。
2. 水素結合があるかを見つけ出す手段となる。
3. Ala、Ser を代表とする残基の側鎖の水素原子の位置の決定ができる。
4. 放射線ダメージを与えない測定が可能である。

2015 年の初めには、これらの特徴を生かした研究で2件のプレス発表が行われた。それは、互変異性の観測として、触媒活性アスパラギンのイミド酸型の観測、長年の未解決であったラクタム型かラクチム型かに対して、水素原子が存在しないことによるラクタム型の決定、更には、ケト型-エノール型互変異性を含むカチカチ玉型反応機構の提唱がある。また、Ala、Ser を代表とするアミノ酸残基の側鎖の水素原子の位置(向き)の決定等もなされている。

本発表では、iBIX 開発の現状、測定精度向上への取り組み、多様なユーザーニーズに対応した試料周辺環境装置の開発、中性子の特徴を生かして得られた最近の成果について報告する。また、当初の目標を達成した iBIX を用い、2018 年度以降の 10 年間にどのような課題に取り組む予定かを示し、それが多くの方の興味へ繋がることを期待したい。

また、今後の目標としては加速器出力が 1MW 達成時に、標準試料サイズ 1mm³ の測定が可能となるよう更なる精度の向上を目指す。

飛行時間法により収集されたタンパク質中性子回折データに対するプロファイルフィッティング法の適用

Application of profile fitting method to neutron time-of-flight protein single crystal diffraction data

矢野直峰¹、山田太郎¹、細谷孝明^{1,2}、大原高志³、田中伊知郎^{1,2}、日下勝弘¹

1 茨大フロンティア、2 茨大・工、3 原研・J-PARC センター

茨城県生命物質構造解析装置 iBIX は飛行時間法(TOF)により単結晶の中性子回折データを測定する装置である。回折能の低い蛋白質単結晶の中性子回折データから水素原子やプロトンの構造情報を最大限に引き出すためには、弱い反射の積分強度を高精度に抽出する必要がある。そこで、プロファイルフィッティング法を用いた積分強度抽出法の開発を行った。

iBIX はビーム強度を優先し結合型減速材のビームラインに設置されており、得られた中性子回折データの TOF 方向の強度分布は非対称となる。そこで、iBIX で測定された中性子回折データに対して、既存の非対称な TOF プロファイル関数を複数検索した結果、粉末結晶用データ処理プログラム GSAS で用いられている指数関数と gauss 関数を畳込んだ関数は強度分布との一致が良く、パラメータ数が 5 個と少ないため、最も適した関数であると判断した。弱い反射の積分強度をプロファイルフィッティング法により求めるアルゴリズムを考え、プログラムを試作した。蛋白質試料のフルセット回折データに対して、プロファイルフィッティング法を適用した。summation 法と強度データの R_{merge} , R_{pim} 、構造精密化後の R , R_{free} を比較したところ、高分解能領域で改善が見られた。標準的な試料であるリボヌクレアーゼ A (リボ核酸を分解する酵素の一種) を例とした場合、 R_{merge} が最も強度の弱い回折斑点群で 0.375 から 0.280 へと絶対値で 9.5%低下した。

開発した方法は回折データ処理ソフト STARGazer に実装され、iBIX のユーザーが容易に利用出来るようにした。現在、ソフトはマニュアルと共にユーザーに対して配布している。

水素高感度検出に向けたタンパク質単結晶の 動的核偏極と高圧凍結

Dynamic nuclear polarization and high-pressure freezing of protein single crystals for high sensitivity hydrogen detection

小松崎直也¹・田中伊知朗^{2,3}・岩田高広⁴・宮地義之⁴・茶竹俊行⁵・
日下勝弘³・新村信雄³

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, 5 京大原子炉

【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、水素からの中性子散乱長が最大で従来の約 8 倍となるという利点がある。この技術の実現には試料結晶中にラジカルを導入し、高磁場 (約 3 T) かつ極低温 (約 1 K) の条件が必要である。本研究ではラジカル TEMPOL をリゾチーム結晶に高濃度で導入し、DNP 実験を行い偏極率の測定を行った。また、中性子実験に向けて、大型結晶の凍結が必要となるので、抗凍結剤を用いずに大型結晶を凍結できる高圧凍結を行った。

【実験】

DNP では、ニワトリ卵白リゾチームとラジカル TEMPOL を結晶化ドロップ内 TEMPOL が 50 mM になるようバッチ法にて共結晶化し、300 mg の結晶を集めて 2.5 T、0.5 K の条件で DNP 実験を行った。高圧凍結ではニワトリ卵白リゾチームを TEMPOL 50 mM、0 mM でシッティングドロップ法にて共結晶化し、一辺が 1.0 mm 以上の大型の結晶を内径 6 mm Φ の圧力管を用いて 200 MPa で抗凍結剤無しで高圧凍結し、PF BL-5A およびあいち SR BL21S にて約 100 K の低温で X 線回折および解析を行った。

【結果】

DNP 実験の結果、リゾチーム結晶の偏極に成功し、約 90 分で最大偏極率は約 22.3% を達成した。今後は条件を変えて、より大きな偏極率を得られる条件を調査する。高圧凍結実験の結果、約 80% の確率で凍結に成功した。また、X 線回折実験では約 1.4 Å の分解能のデータが得られた。ただし、ループをキャップにうまく固定できないために X 線測定時にループが外れる等、安定な測定ができないものが多かった。今後は成功率 100% を目指して総合的な改良に努め、より確実に大型結晶を凍結できる方法を確立する。

Glucose isomerase 中性子座標データ 10 個を用いた ヒスチジンのプロトネーション解析 Protonation analysis of histidine using 10 Glucose isomerase neutron coordinate data

君山真陸¹、田中伊知朗^{1,2}

1 茨城大学工、2 茨城大フロンティアセンター

【緒言】

タンパク質の反応機構を理解するために、水素原子や水素結合の情報を知ることが重要である。また、HIS のプロトン化状態を観測することは、酵素の反応機構を解明するうえで重要である。複数のプロトン化状態のパターンを持つ HIS が、どのような条件で、どのプロトン化状態をとるのか、その傾向や理由を解析するため、今回は HIS を有するタンパク質のうち、最も中性子座標データ数が多かった Glucose isomerase 分子中の HIS 残基に焦点を当て、プロトネーション状態の解析を行った。

【解析方法】

PDB にある 10 個の Glucose isomerase の中性子座標データを用いて、計 100 個の HIS 残基のプロトネーション状態、占有率、温度因子についてのデータを調査した。次に COOT を用いて、各 HIS 残基側鎖の N が関与する水素結合の強さ、周辺残基の様子を調査した。その後、CCP4 の AREAIMOL (ASA 計算ルーチン) および PROPKA を用いて、各 HIS 残基の溶媒接触面積や pK 値の計算をそれぞれ行った。これらの情報を用いて Glucose isomerase 中の HIS 残基のプロトネーション状態について統計的な解析および考察を行った。

【結果・考察】

本解析において、結晶化条件 pH から予想されるプロトネーション状態とは異なる状態の HIS 残基が 60 個見つかった。これは、各 HIS 残基の局所的な pH が周囲の分子環境によって変動したためと考察した。実際に HIS54 では、10 個のどのデータでも側鎖の $N_{\delta 1}$ 、 $N_{\epsilon 2}$ の両方ともプロトン化することが分かった。 $N_{\delta 1}$ では ASP57 の O と $N_{\epsilon 2}$ では基質・阻害剤・ D_2O 分子の O と $ND\cdots O$ 水素結合をしていた。計 100 個の HIS 残基を解析した結果、HIS 側鎖の N は周辺に D_2O の O などの負電荷が近接している場合にプロトン化し、 D_2O の D や OH 基の H などの正電荷が近接している場合は脱プロトン化するという傾向があることが分かった。

【謝辞】 茨城大フロンティアセンターの新村信雄氏には、中性子データにおけるプロトネーション解析でアドバイスを受けた。

PF-BL5A、PF-NE3A、PF-BL17A、PF-NW12A など

CK2 α 2 の結晶多形とその構造解析

Crystal structures of CK2 α 2 in new crystal forms

露口正人¹、仲庭哲津子²、仲西功³、木下誉富¹

1 大阪府大院理、2 大阪大蛋白研、3 近畿大薬

Casein Kinase 2 (CK2) は、数多くの基質のリン酸化を介して様々な細胞プロセスに参与するセリン・スレオニンキナーゼである。CK2 の活性サブタイプとして CK2 α 1、CK2 α 2 の 2 つのサブタイプが存在する。CK2 α 1 は全身で発現しており、異常によってがんをはじめとした様々な疾病の原因となるため、がんなどの疾患の創薬ターゲットである。一方、CK2 α 2 は阻害により精巢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る。我々はこれまでに CK2 α 1 について平均 1.5 Å 分解能で Apo 体及び複合体について多数の結晶構造解析に成功しており、最高分解能 1.06 Å の構造を報告している。しかしながら、CK2 α 2 については、3 Å 程度の分解能の結晶構造しか得られていない。この結晶は針状結晶であり、成長性が悪いことが分解能向上の障害であると考えた。そこで、本研究では、高選択性阻害剤創出を促進する目的で、新規結晶形の探索を行った。

Apo 体について検討したところ、リザーバーに Polyethylene glycol 4000 (PEG4K) と Lithium Sulfate を含む結晶化条件下で複数の結晶を得た。PEG4K の濃度と Lithium Sulfate の濃度の変化に応じて粒状結晶、板状結晶、および針状結晶が得られることがわかった。また、同様の結晶化条件下、同じドロップ内でも外見が似ているが空間群が異なる結晶 ($P2_12_12$, $P2_1$, $P2_12_12_1$) が存在することが分かった。当発表においては、空間群が異なる 3 つの結晶から得られた、1.89 ~ 2.24 Å 分解能での結晶構造について報告する。

ソーマチンの中性子結晶構造解析を目指した重水置換体の X線解析

X-ray analysis of Thaumatin crystals grown in heavy water buffer for the neutron crystal structure analysis

白川寛悟¹、田中伊知朗^{1,2}

1 茨城大学工、2 茨城大学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に見出されたタンパク質であり、極めて強い甘味を有し、ショ糖の10万倍の甘味を呈する。この強い甘味の発現機構を解明するために、ソーマチン分子が受容体と相互作用すると思われる表面のアミノ酸のプロトン化状態や水和の様子を中性子解析で調べることが目標としているが、この実験では水素原子は、中性子と強く相互作用してしまい、バックグラウンドとなる。そこで非干渉性散乱断面積が水素原子に比べ約1/40の重水素に置換することができればデータの質は大きく向上する。そこで本実験では重水置換の有無、異なる測定温度、pHの各条件で、ソーマチン結晶のX線解析データを比較して、中性子実験の基礎データを得ることを目的とした。

【実験】

ソーマチンはWako社より購入したものをそのまま用いた。室温測定の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、MES-NaOH pH6.5で室温、ハンギングドロップ法で行った。低温測定(100K)は結晶化剤として酒石酸ナトリウムカリウムを用いて、HEPES pH7.0で室温、ハンギングドロップ法で行った。凍結直前にそれぞれpD6.6, pH3.5, pD3.1, pH3.0, pD2.6の緩衝液と抗凍結剤で順にソーキングを行った。室温測定、低温測定ともにKEK-PF BL-5AでX線回折を行った。

【結果・予定】

X線回折の結果、室温条件の結晶、低温条件のpH7.0, pD6.6, pH3.5, pD3.1, pD2.6の結晶について回折データがとれた。室温条件の結晶については分解能1.68 Åのデータがとれたので解析を進め低温条件のものと比較していきたい。低温条件の結晶についてはそれぞれ対応する軽水条件、重水条件での比較と中性、酸性条件での違いを確かめる予定である。

大腸菌酸素センサータンパク質 YddV のリガンド認識機構 Structural basis of globin domain of a heme-based oxygen sensor enzyme, YddV from *Escherichia coli*

五十嵐城太郎、松岡有樹
福島医大・医

グロビン結合型センサー (GCS) は、ヘムを含むグロビンドメインと酵素ドメインなどが融合したタンパク質である。YddV は大腸菌に由来する GCS の 1 つであり、N 末端のグロビンドメインと C 末端のジグアニル酸シクラーゼが融合している。YddV はヘム鉄が 2 価の状態やヘム鉄 2 価に酸素が結合した状態において、2 分子の GTP から c-di-GMP の合成を触媒する。一方、ヘム鉄 3 価にシアン結合した際にも活性が上昇した。

本研究では、YddV のグロビンドメインのみ (YddV-heme) を大量発現、精製し、結晶構造解析を行った。マイクロシーディングによって得られた結晶は、空間群 $P2_12_12_1$ ($a = 51.6 \text{ \AA}$, $b = 66.1 \text{ \AA}$, $c = 83.2 \text{ \AA}$) に属した。YddV-heme の構造は分解能 $1.37 \text{ \AA}$ でヘム鉄を利用した多波長異常分散法 (MAD) によって解かれ、非対称単位に 2 分子の YddV-heme が存在した。また、YddV-heme にシアンが結合した YddV-heme の構造も分解能 $1.60 \text{ \AA}$ で決定した。

YddV-heme の構造は N 末端の Z ヘリックスに加えて 7 つのヘリックス (A~H、D ヘリックスは欠損) から形成されていた (図 1)。シアンの結合によって C ヘリックスと E ヘリックス間のループ領域に違いが見られた。また、変異体解析より重要性が示唆されていた Tyr43 はシアン結合に伴い、水素結合ができる位置へと移動していた (図 2)。このことから、YddV の酵素活性は Tyr43 と水素結合できるリガンドが結合することで調節されることが示唆された。

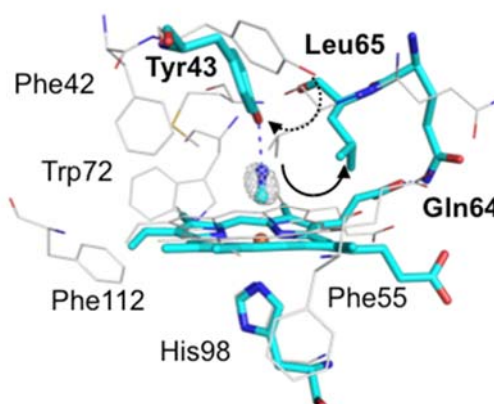
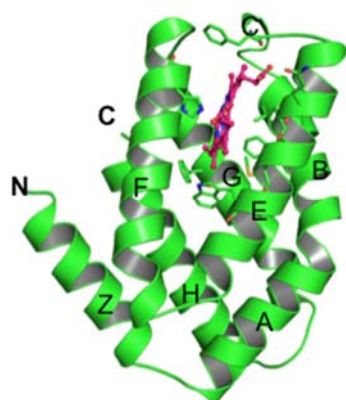


図 1 : YddV-heme の全体構造 図 2: シアン結合型のヘム近傍構造

イネ顆粒結合型デンプン合成酵素の糖鎖複合体構造解析 Structure analysis of the sugar-complex of rice granule-bound starch synthase I

藤本瑞、岸根尚美、門間充
農研機構・解析セ

顆粒結合型デンプン合成酵素 (GBSS) は、ADP-グルコースのグルコースをアミロースの非還元末端側に α -1,4 グルコシド結合により付加することにより、デンプンの伸長を司る酵素である。育種学的には、GBSS の欠損による waxy (ワキシー) と呼ばれる劣性変異遺伝子の表現型がモチ米である。また、GBSS に欠損ではない変異の入った品種であるミルキークイーンなどの低アミロース米は、ウルチ米よりも粘り強く食味が良いため近年人気品種になっており、GBSS は穀物品種育種上の重要なターゲットとなっている。そこで、イネ GBSS のデンプン合成機構を詳細に明らかにすることを目指し、構造機能解析に取り組んでいる。

大腸菌で発現させたイネ GBSS-I の結晶を作製し、高エネルギー加速器研究機構放射光施設 (PF) において X 線回折データを取得した。糖転移酵素ファミリー 5 に属する微生物由来のグリコーゲン合成酵素 (EcGS) の構造を鋳型として用い、分子置換法により立体構造を決定した。さらに、合成反応機構を解明するため、酵素の基質となる ADP-グルコース、受容体であるマルトオリゴ糖との複合体の構造解析に取り組んでいる。

イネ GBSS-I の全体構造は EcGS と非常に類似し、N 末、C 末に2つのロスマンフォールドからなる2ドメイン構造を有していた。ADP-グルコースの複合体構造解析の結果、活性中心は、2つのドメインの間の溝にあることが明らかとなった。一方で活性中心付近には、フレキシブルで観察できないループ領域があり、この領域がマルトオリゴ糖の結合部位であることが示唆された。また、他の酵素にはこれまで見られていない新規なジスルフィド結合が2つのドメイン間に存在することが明らかとなった。

iBIX によるマンガンカタラーゼの中性子回折実験 Neutron Single Crystal Diffraction Experiments of Manganese Catalase using iBIX

山田太郎、矢野直峰、日下勝弘
茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター

茨城県生命物質構造解析装置 iBIX はタンパク質および低分子単結晶用の飛行時間型中性子回折装置である。iBIX の装置性能目標の一つは三軸が 135 Å を超える単結晶の回折データを取得することである。大きな格子長を持つ結晶の場合、回折斑点が重なることが予想され、ピーク分離技術の開発が必要である。高度好熱菌由来のマンガンカタラーゼの結晶(立方晶系 $a = 133$ Å)の場合、予備回折実験に基づく検討により、飛行時間型中性子回折法の利点と高い結晶対称性を活かして、積分領域が 10% 重なっている反射を無視しても、2.0 Å 分解能の回折強度データの取得が可能であることがわかっていて、今回、中性子構造解析を行うことを目標として、重水溶液中 pD9.6 にて重水素化硫酸を結晶化剤として大型結晶を育成した。iBIX を使用して約 2.4 Å 分解能で全方位の回折データを取得した。これまでの予備実験でも 2 θ が 90° 以下の領域にある検出器で回折斑点が重なることが予想されていたが、実際に強度を持つ重なった回折斑点を取得することができた。これにより今後ピーク分離技術開発に必要な実データが得られたことになる。現在、このデータセットについて回折強度積分を行っており、その結果を報告する。

マンガンカタラーゼは活性部位に酸素架橋二核マンガン錯体を有しており、反応状態や酸化状態により架橋酸素のプロトン化状態が異なることが示唆されている。この金属イオン近傍の酸素原子のプロトン化状態を中性子単結晶構造解析で決定することが目標である。酸性度 pD6.4 及び pD9.6 における X 線結晶構造解析を行ったところ、これまでに報告されている結晶構造と架橋酸素の状態が異なるものが得られた。pD6.4 結晶では架橋酸素の一つが硫酸イオンに置換されており、提唱されている反応機構の一つの状態と類似していた。一方、pD9.6 結晶では架橋酸素原子が乱れた構造をとっているが、今後、中性子結晶構造解析を行うことにより、新たな構造情報が得られるものと期待する。