

HIV-1 逆転写酵素阻害剤の結合構造解析

Bonding structure analysis of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors

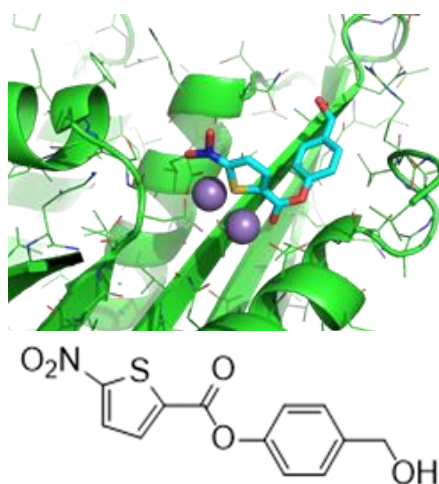
宇佐美琴¹、瞿良¹、額賀路嘉²、星野忠次¹

1 千葉大院薬、2 城西国際大薬

【目的】近年 HIV に対する化学療法において、多剤耐性ウイルスの出現が危惧されており、既存の薬剤と異なる作用点を持つ新たな抗ウイルス剤の開発が強く求められている。本研究では、HIV-1 逆転写酵素に内在する RNase H 活性を標的とする新規抗 HIV 薬の開発を進めている。

【方法】これまでの研究において、RNase H に対する阻害活性を有する数種類の化合物を合成した。HIV-1 逆転写酵素の RNase H ドメインは、その分子量より p15 と称される。p15 を部分タンパク質として発現した場合、RNase H 酵素活性は示さない。HIV-1 の p15 と類似のアミノ酸配列を持つ大腸菌 RNase H のヘリックスの 1 つを HIV-1 の p15 に組み込んだ p15Ec 組換えタンパク質は、RNase H 酵素活性を示すことが知られている。本研究では、p15Ec を改変した p15Ec ΔADKK というベクターを作成し、組換えタンパク質の発現、精製、結晶化を行った。タンパク質結晶に対し合成した化合物をソーキングの技法により導入し、共結晶を作出して、X 線回折データを取得し、結合構造の解析を行った。

【結果・考察】フラン環やチオフェン環を有し阻害活性を示す数種類の化合物との結合構造の解析を行った結果、p15Ec の酵素活性中心における 2 つの Mn^{2+} と各化合物におけるフラン環 (O)、チオフェン環 (S)、加えてニトロ基やカルボニル基等が引き付け合うことで、阻害薬物と標的タンパク質との間に結合が形成されていた (右図)。幾つかの化合物において阻害活性と結合構造の解析を進めた結果、チオフェン環を持つ化合物が、フラン環を持つ化合物に比べ、より強く HIV-1 RNase H 活性を阻害する傾向が見られた。さらに、チオフェン環にニトロ基を持つ化合物が、他の官能基を持つ化合物に比べ、より強く HIV-1 RNase H 活性を阻害する傾向が見られた。上記の結果をもとに更なる構造改変、構造解析を進めている。



ヒト TRPV1 アンキリンリピートドメインの精製と結晶化 Purification and crystallization of human TRPV1 Ankyrin Repeat Domain

田中美葵¹、早川香織¹、小川臨²、黒川竜紀²、松井敏高³、森泰生²、海野昌喜^{1,4}

1 茨城大院理工、2 京都大院工、3 東北大多元研、4 茨城大 iFRC

TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは、刺激受容のセンサーとして多様な生体機能に関わっている陽イオンチャネルである。その中の1つである TRPV1 は、唐辛子の主成分であるカプサイシン、42°C 以上の熱や酸性刺激によって活性化し、痛みや熱さの感知に密接に関わっている。そのため、TRPV1 は疼痛や痛覚過敏の治療ターゲットとして注目を集められている。

TRPV1 は N 末端に ARD (Ankyrin Repeat Domain) と呼ばれる非常に特徴的な構造を持つ。近年の研究で、TRPV1 は N 末端 ARD と C 末端部位との間で、サブユニット間ジスルフィド結合 (Cys258-Cys742) を形成し、その構造がチャネルの開口に関わっていることが示唆された。また、ヒト TRPV1 (hTRPV1) とラット TRPV1 (rTRPV1) との間に異なる特徴があることも示唆されている^[1]。しかし、この報告は質量分析法に基づくものであり、原子レベルの立体構造情報とそれに基づく知見がない。これまでに低温電子顕微鏡による rTRPV1 の構造が報告されているが、低分解能であるうえ試料調製が還元状態で行われているため、ジスルフィド結合の有無を確認できない。そのため本研究では、hTRPV1 の Cys258 を含む N 末端 ARD と Cys742 を含む C 末端部位について、酸化条件下で共結晶化・X 線結晶構造解析を行い、ジスルフィド結合の結合様式を原子レベルで解明することを目的としている。

これまで hTRPV1-ARD 単独での発現・精製・結晶化・X 線回折実験を行ってきた。pGEX 4T-3 ベクターを用いて GST-tag が付加した発現系を構築し、GST アフィニティークロマトグラフィーと Thrombin による tag の切断を行い、1 L 培地から約 6 mg の収量で目的タンパクを得る条件を確立することができた。精製で得られたサンプルについて ESI-MS の測定を行い、目的タンパクであるかの同定と純度を確認した結果、高純度で目的タンパクを得られていることを確認した。また、rTRPV1-ARD の条件^[2]を参考に、結晶化を行ったところ、再現性良く結晶の生成を確認することができ、得られた結晶を用いて X 線回折実験を行った。その結果、目視分解能が 6 Å 程度であり、解析に適したデータを得ることができなかつたため、現在は結晶化条件の最適化を行っている。

本シンポジウムでは、発現から X 線回折実験の初期的な結果について報告する。

[1] Nozomi Ogawa, et al., *JBC*, **291** (2016) 4197-4210.

[2] Polina V. Lishko, et al., *Cell Neuron*, **54** (2007) 905-918.

セリンプロテアーゼの反応速度制御と 阻害剤複合体の中性子用大型結晶化 Control of reaction rate of serine protease and Large crystallization of neutron for inhibitor complex

杉山玲¹, 田中伊知朗^{1,2}

1 茨城大院理工, 2 茨城大フロンティアセンター

【緒言】 酵素としてのタンパク質は、水素原子等のやり取りや様々な構造の変化で、生体内の化学反応を触媒している。しかし詳細なメカニズムについては、はっきりしていないものが多い。その大きな理由の一つは、反応速度が速いため、実際の系による高分解能結晶構造解析ができず、阻害剤等を用いた複合体による疑似的な「反応中間体」を結晶構造解析しているものが多いからである。また、その構造解析は通常、抗凍結剤を用いた低温 X 線測定を行っているので、水素原子の位置情報も入手困難であり、抗凍結剤自体の影響も無視できない。そこで、抗凍結剤フリーかつ実際の系で、高圧凍結により酵素反応を様々な段階でトラップした大型良質結晶を作製し、中性子結晶構造解析を行うことが出来れば、抗凍結剤の影響なく、水素原子の位置情報まで含めた詳細な反応機構解明が期待できる。そのためにまず、酵素反応を遅くする必要があり、溶液状態で条件探索を行った。また、中性子解析用の Trypsin-阻害剤複合体の結晶化も、結晶の大型化を目指して行った。

【反応速度実験】 反応生成物 p-nitrophenol を波長 400nm で定量した。セルに Buffer(pH7.0)1000 μ L を入れ、吸光度を 0 に補正。測定時間を 600 秒に設定後、基質溶液(50mM p-nitrophenyl acetate)20 μ L を加えて測定を開始し、最初の 2 分間は基質の非酵素的分解反応を測定。15mg/mL 酵素溶液 (Chymotrypsin)8 μ L を加えて混合した後、残りの時間約 8 分間測定。加える酵素溶液量を 16 μ L、24 μ L、32 μ L、緩衝液の pH を 6.5、8.0 と変えて各種測定し、それぞれの条件での初期バースト量(μ M)と定常状態速度(μ M/min)を計算。

【結晶解析実験】^{[1][2]}タンパク質は Trypsin 単独と、阻害剤 Benzamidine との複合体の結晶を過去の文献を参考に作成し、PF での回折実験、解析を行った。

【結果】 pH7.0 では定常状態速度 3.734 μ M/min、初期バースト量 14.363 μ M、pH6.5 では 1.571 μ M/min、13.640 μ M、pH8.0 では 9.877 μ M/min、16.709 μ M となった。この結果から、pH を酸性にすることで反応速度を遅らせることができたと言える。また、Trypsin-Benzamidine 複合体の結晶化に成功し、X 線回折実験を行うことができた。比較的高分解能を得ることができ、解析の結果良質なデータが得られた。そして、1mm³ 以上の大きな結晶も 2 つ得ることができた。

【参考文献】 [1] Max H. Nanao, et al., Acta Crystallographica, D61 (2005) 1227-1237 [2] G. Klebe, et al., Nature Communications, (2018) 9:3559

大型タンパク質単結晶高圧凍結法の最適化 Optimization of high-pressure cooling method for protein large single crystals

青木晃次¹・杉山玲¹・新井隆介¹・加藤康平¹・田中伊知朗^{1,2}
茨城大院理工¹・茨城大フロンティアセンター²

一般に X 線と異なりエネルギーの低い中性子では、試料を低温にする必要はない。しかし、反応中間体の観測や結晶損傷防止、動的核偏極を用いた水素検出感度向上の目的で低温にする必要がある[1]。凍結する際に重要となるのは水をアモルファス状に凍らせ、氷晶からの散乱を防ぐことである。その際に必要な要件は小型結晶、瞬間凍結、溶液の粘度が高いことである。通常クライオプロテクトantを用いて常圧下で瞬間凍結を行うが、中性子の場合大型結晶が必要で、この場合一様に瞬間凍結するのが難しい。またクライオプロテクトantの添加によって結晶性が損なわれてしまうことや、クライオプロテクトant自身が基質と競合する場合もあり[2]、適当なクライオプロテクトantの探索は時間と労力を要する。そこで本研究では水の粘度が最大になる 200MPa での高圧凍結をすることで、クライオプロテクトantフリーでの瞬間凍結を試行している[3]。この手法の最適化としてはクライオループやクライオピン、ステージへの固定法を改良した。改良の結果、高圧凍結実験の成功率が上がり、一辺が 1mm 程度の比較的大きな Lysozyme と Glucose isomerase 結晶を高圧凍結し、X 線回折実験まで成功することができた。今後、X 線回折測定したタンパク質の構造解析をし、常圧凍結との構造比較をしていく予定である。

[1] I. Tanaka., et al., Ed by M. Suzuki, Springer Nature Singapore Pte Ltd. (2018) 124

[2] 東浦彰史ら 日本結晶学会平成 30 年度年会ポスター(2018)

[3] I. Tanaka., et al., Acta Cryst. D 74 (2018) 787

リゾチーム-糖複合体の中性子構造解析に向けた 大型良質結晶育成

Large scale high quality crystal growth for neutron structure analysis of lysozyme-sugar complex

後藤亮祐¹, 田中伊知朗^{2,3}

1 茨城大院理工, 2 茨城大フロンティアセンター, 3 茨城大工

【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。しかし、50年以上前からリゾチームの触媒機構は提案されているが、いまだに様々な反応機構が提唱されている[1]。代表的な反応として、共有結合中間体を作成し反応が進む Koshland 機構という反応があるが、これはリゾチームと共有結合を作りやすいリガンドで行った不自然な条件下での結果によるものである。そこで本研究では、リゾチームの反応が生体内で進む際、より自然な系で観察するため、N-アセチルグルコサミンの4量体((NAG)₄)と3量体((NAG)₃)を基質に用いた条件で、酵素反応に関係する水和水の位置情報や触媒基のプロトネーションの有無を確認するために中性子回折実験を計画した。まずはその準備のために、中性子回折を用いたテスト測定にて結晶性の確認、中性子構造解析に向けた大型結晶の作成、軽水を用いて作成した大型結晶の重水ソーキング条件の検討を行った。

【実験】

実験に用いたリゾチームは SIGMA-ALDRICH 社のニワトリ卵白リゾチームを使用し、糖は(NAG)₄、(NAG)₃であり、Dextra Laboratories 社より購入した。X線回折実験は、PF-AR NW12A にて行い、温度は 100K で測定した。BL-03 (iBIX)にて中性子回折を用いたテスト測定を行った。

【結果と考察】

中性子回折実験のテスト測定では(NAG)₄ 目視による分解能 2.42 Å、(NAG)₃ では 1.89 Å の反射を確認できた。今回、(NAG)₄ 実験に用いた結晶は 0.123mm³ と小さい結晶であったが結晶性は良いものだと判断できた。テスト測定後、中性子構造解析に向けた大型結晶の作成にとりかかり、滅菌フィルターを用いた結晶化により、1辺 1mm を超える結晶を得ることが出来た。重水ソーキング条件の検討実験の結果、安定して比較的高分解能回折像が得られることに成功している。さらに結晶性を良好にするソーキングの条件を検討中である。

参考文献[1] D. J. Vocadlo *et al.*, Nature 412 (2001) 835

DAPK タンパク質-ATP アナログ複合体の活性部位の X線構造解析とキナーゼ活性測定

X-ray structure analysis and kinase activity measurement of active site of DAPK protein - ATP analog complex

加藤康平¹・松尾悠平²・田中伊知朗^{1,3}

1 茨城大院理工, 2 秋田大医, 3 茨城大フロンティアセンター

【緒言】

DAPK は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼサブファミリーに属する Ser/Thr キナーゼであり、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。またこのキナーゼは、急性虚血性心疾患、および子宮内膜線癌の治療標的である。これまでの研究において、DAPK キナーゼドメインに含まれる ATP 結合部位の立体構造が X 線結晶解析によって明らかにされている。我々のグループではこれまでに、ATP 結合部位が ATP アナログとの結合時、結合部位に多数の水分子が保存されること、金属イオンが 1 つのみ配位すること、さらには、分解能 1.57~2.26 Å の新規構造 3 つを含む全 8 構造を得ている。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、リン酸鎖が直線状の時に転移が起こると考察できた。しかし、この相互作用様式により、実際に基質に対してリン酸転移反応が行われるかどうかはわかっていない。そこで、結晶化条件下で基質を用いて DAPK 活性測定を行い、これより DAPK-ATP アナログ複合体結晶構造と DAPK 活性との関係を考察することにした。

【実験方法】

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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、ATP 類似体に、Sigma Aldrich 社の AMP-PnP (ANP)、ATP- γ S (AGS)、AMP-PCP (ACP)、ATP、ADP を用いた。金属に MgCl_2 を用い、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 ATP アナログと金属を加え、それをタンパク質溶液とした。X 線回折実験は 100K で低温測定し、Phenix と coot を使用してデータ解析を行った。キナーゼ活性測定には Invitrogen 社の Z'-LYTE™ Kinase Assay Kit - Ser/Thr 13 Peptide、コロナ電気社のマルチグレーティングマイクロプレートリーダー SH-9000Lab を用いた。

【結果】

実験より、精製した DAPK のキナーゼ活性が確認された。今後は DAPK のキナーゼ活性が pH、ATP 濃度に依存するかを検証していきたい。

PF-BL1A, BL5A, BL17A; PF-AR-NE3A, NW12A

レボグルコサン脱水素酵素の結晶構造解析 Crystallography of levoglucosan dehydrogenase

伏信進矢^{1,2}、杉浦正幸¹、中原萌¹、山田千早^{1,2}、荒川孝俊^{1,2}、北岡本光³1 東京大学大学院農学生命科学研究科、2 東京大学微生物科学
イノベーション連携研究機構、3 農研機構・食品研究部門

レボグルコサン(LG)はグルコースの脱水物質(アンヒドロ糖)であり、セルロースや澱粉などのグルコースポリマーの熱分解によって発生する。LGは森林火災由来のPM2.5等に含まれているために環境汚染の指標物質として利用されているだけでなく、近年は微生物変換による有用物質生産の原料として注目されている。LGを代謝する細菌はレボグルコサン脱水素酵素(LGDH)を用いているがその詳細については分かっていなかった。我々は土壌細菌 *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* より LGDH の遺伝子を同定して、その酵素的性質を明らかにした。さらに、PF および PF-AR の構造生物学ビームラインを利用して、LGDH の結晶構造をアポ体、NADH 複合体、LG+NADH 複合体、L-ソルボース+NADH 複合体の4状態において分解能 1.8~2.4 Å で決定した。LGDH は典型的な Gfo/Idh/MocA ファミリーのフォールドをとっており、活性部位での補酵素と基質の相互作用が明らかになった(図参照)。その結果、LG では 3 位の水酸基が、L-ソルボースでは 4 位の水酸基が酸化される反応機構が推定された。本研究により LG が細菌により代謝される機構の一端が明らかになったことから、豊富なバイオマス材料から有用物質への生物変換システムの構築や、LG の鋭敏かつ簡便な検出システムの開発による環境問題解決への貢献などの応用が期待される。

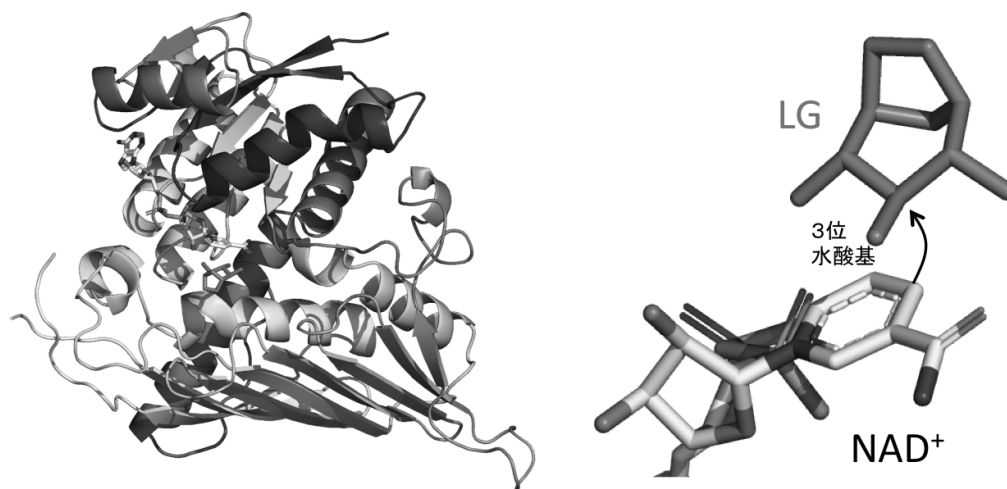


図: LGDH モノマーの全体構造(左)と活性部位(右)

文献: M. Sugiura, M. Nakahara, C. Yamada, T. Arakawa, M. Kitaoka, and S. Fushinobu. Identification, functional characterization, and crystal structure determination of bacterial levoglucosan dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **293**, 17375–17386, 2018

PF BL-17A ,AR-NW12A、

中性子回折に向けた X 線 PF-BL17A マイクロビームによる 大型タンパク質単結晶の結晶品質評価

Crystal quality evaluation of large protein single crystals by PF-BL17A X-ray microbeam for neutron diffraction

新井隆介¹、田中伊知朗^{1,2}

1 茨城大院理工、2 茨城大フロンティア

【緒言】

タンパク質単結晶構造解析のために収集した X 線と中性子の回折データを比較すると、中性子で得られる分解能等のデータ品質が一般的に悪くなることが知られている。その原因は中性子ビームの強度が低いためと考えられるが、測定に使用する結晶の品質、大きさや照射体積にも大きな違いがあり、ビーム品質のみが問題ではない可能性がある。X 線のビームの径は最大でも 0.2mm 程度であり、結晶の大きさも通常、それに合わせるため、試料結晶の体積も 0.01mm³ 程度以下である。これに対して中性子では、ビーム強度を補うために大形の結晶が必要で、使用する中性子ビームの径は 5mm 程度で、試料結晶を完浴させる。そのため結晶全体の品質が平均化して、回折能が決まってくることが予想される。そこで、本研究では大形結晶に対して、径の小さいマイクロビームを用い、結晶品質の場所依存性が、タンパク質の種類、結晶化条件の違い等で生じるかどうか、生じるとしたらどの程度の差かを確認することを目的とする。

【実験】

本実験には Lysozyme と Glucose Isomerase を用いた。結晶内の照射位置による結晶品質を比較するために測定条件に依存しない Wilson plot による Wilson B を用いた。実験は室温測定を基本とし、KEK の PF BL-17 及び AR-NW12A を使用しキャピラリーに封入したタンパク質単結晶に 1 つに対し複数個所 X 線を当て測定、比較を行った。

【結果・考察】

結晶内での場所による品質の差が確認できたが、Wilson B に注目すると誤差を考慮した場合、結晶品質に大きな差はないと言えた。また両結晶とも Wilson B と分解能に大まかな相関関係がみられた。今後は比較を行う結晶の種類を増やすと共にビームの照射時間、ビーム径の変化を行い Wilson B と他のパラメーターとの関連性をより詳細に観察していく予定である。

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

ジペプチジルアミノペプチダーゼ 4 ファミリーの 立体構造比較研究 Structure comparisons of dipeptidyl aminopeptidase IV family

六本木沙織¹、鈴木義之³、館岡千佳¹、藤本真友¹、森澤さおり¹、飯塚一平¹、中村章宏³、
本間宣行³、伊藤康広³、志田洋介³、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(Dipeptidyl aminopeptidase; DPP)は、主に基質であるオリゴペプチドの N 末端から 2 番目のアミノ酸残基を認識し、ジペプチドを産生する酵素である。DPP には、認識する基質アミノ酸残基の違いによっていくつかの種類が存在する。本研究では、プロリン認識にかかわる DPP4 ファミリーに着目した。

DPP4 ファミリーには、哺乳類 DPP4、微生物 DPP4、哺乳類 DPP8/9 などが属する。DPP4 ファミリーの中でも、ヒト DPP4 は、インスリン分泌を促進するインクレチンを不活性化し、血糖調節の役割を担うことでよく知られている。2 型糖尿病治療薬には、このヒト由来 DPP4 を阻害することで、インスリン分泌を高め血糖値をコントロールする薬がある。しかしながら、ヒト DPP4 を阻害する薬は、ヒト DPP4 のオフターゲットであるヒト DPP8/9 も阻害してしまうことで、副作用を引き起こすという懸念点もある。また、同じく DPP4 ファミリーに属する微生物 DPP4 は、タンパク質やペプチドを栄養源とする糖非発酵グラム陰性細菌に存在する。微生物 DPP4 により産生されたジペプチドは、栄養として細菌内に取り込まれる。

本研究では、DPP4 ファミリーの中でも、微生物 DPP4 として *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 DPP4 の立体構造を、X 線結晶構造解析により明らかにした。その結果、Arg106 が、基質の N 末端を認識する Glu208 と塩橋を形成し、間接的に基質の N 末端認識に関与していることなどが明らかになった。また、*Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 DPP4 の立体構造と、構造既知のヒト DPP4、DPP8/9 の立体構造の比較を行った。さらに、微生物 DPP4 の Arg106 を含む二次構造を指標にし他の DPP と比較したところ、本研究対象である *Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来の DPP4 は、ヒト DPP4 よりも、ヒト DPP8/9 に類似していることが明らかになった。

本研究は、微生物 DPP4 を選択的に阻害する抗菌薬、そしてヒト DPP8/9 を阻害せずヒト DPP4 を選択的に阻害する副作用の少ない糖尿病治療薬の開発への貢献が期待される。

PF BL-1A、BL-5A、BL-17A、AR-NE3A、AR-NW12A

細胞内 GTP センサーの進化的解析に向けた
ナメクジウオ PI5P4K の X 線結晶構造解析
**Crystal structural analysis of *Branchiostoma floridae*
PI5P4K for investigation of evolution of GTP sensor**

降旗 大岳^{1,2}、原田 彩佳²、中川 草³、竹内 恒⁴、
佐々木 敦朗⁵、千田 俊哉^{1,2}、加藤 龍一^{1,2}

1. 総研大 物構専攻、2. KEK-PF, SBRC、3. 東海大 医学部、
4. 産総研、5. シンシナティ大

脂質キナーゼ PI5P4K β (Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase β) が、GTP の細胞内濃度を検知し、細胞機能を制御する GTP センサーであることを我々は見出した (Sumita *et al.*, (2016) *Mol Cell* 61, 187-198)。PI5P4K は菌類には存在せず、動物の祖先種と菌類が分岐した後に新たに獲得されたと考えられている。さらに脊椎動物においては PI5P4K が少なくとも 3 種類以上のサブタイプに分岐し、その中でサブタイプ β が GTP センサー機能を有していることが示された。また、サメ、シーラカンスの PI5P4K β はヒトの PI5P4K β よりも弱い GTP 応答性を示すことから、進化の過程で GTP 検知能の変化が起こったと考えられる。そこで、菌類との分岐後から脊椎動物に至るまでで、「いつ、どのように PI5P4K が GTP 検知能を獲得したか」についてを明らかにしようと考えた。具体的には、現存する進化的に古い生物由来の PI5P4K の立体構造を明らかにし、ヒトなどの高等脊椎動物との比較を行うことで、構造と活性がどのように変化して来たのか、その相関を明らかにすることを試みた。本研究では脊椎動物の起源種の一つであるナメクジウオを選び、ヒトとの比較を行った。

ヒトの PI5P4K β との相同性解析で得られた、ナメクジウオの PI5P4K の遺伝子を大腸菌に導入し、発現条件の検討、精製、結晶化を行った。既に結晶構造が得られているサメ由来の結晶化条件を参考にすることで、 $80 \times 250 \mu\text{m}$ の大きさの結晶を得る事ができた。この結晶を用いて、Photon Factory BL-1A にて 1.1 \AA の波長で X 線回折実験を行い、分解能が 2.46 \AA のデータセットを得た。ヒトの PI5P4K β (PDB: 3WZZ) をモデル分子とした分子置換法での位相決定に成功し、構造精密化を行った。本発表では、構造精密化後のナメクジウオ PI5P4K の結晶構造について報告すると共に、それとヒト由来のものとの比較を行い、GTP センサー機能の進化に伴う構造的変化についての考察を行う。

熱安定性による中性子回折用タンパク質良質大型結晶育成条件の探索

Screening the best condition of large and good quality protein single crystal growth for neutron diffraction by its thermal stability

西野宮 良太¹、田中 伊知朗^{2, 3}

1 茨城大工、2 茨城大院理工、3 茨城大フロンティア

中性子回折は X 線ではみること見ることが困難な水素やプロトンを観測することができる。しかしながら、その強度が次世代中性子源の J-PARC を用いても十分でないので、良質な単結晶で、かつその体積を大きくしなければ、十分な統計を持つ分解能データが取得できず、PDB 登録数が X 線に比較すると 1/1000 程度となっている。良質大形結晶を得るためには、大量のタンパク質と多くの条件での試行錯誤による結晶化スクリーニングを行うのが通常のアプローチであり、これには多大の労力と時間、予算を要する。このうち、実際の結晶化を行わずに、タンパク質によらず、非常に短時間(2 時間以内)で、多くの条件探索を可能にするタンパク質溶液での熱安定性の確認により、結晶化条件を絞りこむ手法が確立してきた[1]。本研究では Lysozyme などの標準タンパク質を用いて、これまで結晶化されてきた条件以外にも安定な条件が無いか探索し、その条件で良質大型結晶育成を試みることにした。

使用した装置は、Thermo Fisher Scientific 社リアルタイム PCR (StepOne) を用い、熱変性を蛍光として観測するための試薬は Protein Thermal Shift Starter Kit, ソフトウエアは Protein Thermal Shift、試料容器は 48 穴プレートを用いた。タンパク質は、Lysozyme などの標準タンパク質を用いたほか、Thaumatococcus 由来の Thaumatin, Glucose isomerase も使用して比較する予定である。ポスターでは、これらの結果、判明した安定条件における結晶育成を行い、結晶の品質や大きさを、従来条件と比較する予定である。

【参考文献】

[1] K. Koruza, et al., Arch. Biochem. Biophys. 645 (2018), 26-33.

蛋白質結晶中の巨大な空隙へのタンパク質の包摂 Encapsulation of biomacromolecules into wide space in protein crystals

橋本翼¹，松井崇¹，小川智久¹，田中良和^{1,4}
¹ 東北大院・生命研，⁴JST さきがけ

X線結晶構造解析は，分子の立体構造を精密に決定できる優れた手法である。しかし，X線結晶構造解析を行うためには，構造を解析したい分子の良質な結晶を得る必要があり，この過程が結晶構造解析の大きなボトルネックとなっている。近年，結晶化を必要としない新たなX線結晶構造解析手法である「結晶スポンジ法」が開発された。この手法では，あらかじめ多孔質結晶のフレームワーク（以下ホスト結晶と呼ぶ）を作成しておき，そこに構造を解析したい任意の分子（以下ゲスト分子と呼ぶ）を包摂してX線を照射することで，包摂したゲスト分子ごと構造を決定することが可能である。故に，少量の試料で迅速かつ簡便に目的分子の構造を決定できる革新的な手法と言える。しかし，現行の結晶スポンジ法では，ホスト結晶の孔径が小さく，蛋白質のような大きな分子には適用できていない。そこで本研究では，スルメイカ血リンパ由来の巨大蛋白質ヘモシアニンの結晶を結晶スポンジ法に応用し，大きな分子にも適用可能な「蛋白質結晶スポンジ法」の実現を目指した。

ヘモシアニンは，内部に直径約 110 Å の空隙が存在する円筒状の構造を有している。更に，結晶中ではこれらが縦に積み重なったストロー状の構造となる。このヘモシアニン結晶をホスト結晶として利用するため，3つの包摂手法を開発し，いくつかの蛍光蛋白質をゲスト分子として包摂した。その結果，ヘモシアニン結晶中には，250 kDa までの蛋白質が包摂可能であること，包摂された蛋白質は短期間では大きく移動しないこと，負に荷電したゲスト分子の方が包摂されやすいことなど，様々な特性が明らかとなった。次に，今回開発した手法を用いて緑色蛍光蛋白質(GFP)を包摂した複数のヘモシアニン結晶から，分解能 6 Å 程度のX線回折データを収集した（Photon Factory BL-1A）。得られた複数の回折データはプログラム Kamo を用いてマージし，構造精密化に用いた。ヘモシアニンの5回対称性を利用したNCSアベレーシングにより電子密度の改良を行ったが，内部空間にGFP由来の明瞭な電子密度を確認することはできなかった。これは，結晶中へのゲスト分子の包摂率が低い事，ヘモシアニンの結晶性が悪く，高い分解能を持つ良質な結晶が得られなかったことが原因だと考えられる。今後，これらの課題解決に取り組み，蛋白質結晶スポンジ法の実現を目指す。

球状蛋白質のドメインスワッピングを実現する ループのリデザイン

Loop redesign for domain swapping of a globular protein

○志賀翔多¹, 山中優², 廣田俊², 真壁幸樹¹

1 山形大・院理工・バイオ化学, 2 奈良先端大・物質

ドメインスワッピングは蛋白質分子が分子間で構造領域を交換し多量体化する機構である。天然でドメインスワッピングしている蛋白質が多く確認されているが、溶液中で単量体として存在している蛋白質に変異導入し、ドメインスワッピング多量体をデザインした例もいくつか報告されている。特に、ヒンジループの長さや組成を変化させる変異導入が有効であることが分かっている。しかし、ヒンジループの長さや組成がドメインスワッピングの可否をどのように決定づけているかは明らかになっておらず、ドメインスワッピング多量体の合理的なデザインは困難である。それにも関わらず、ヒンジループのデザインの詳細な検討はほとんど行われていない。本研究では、溶液中で単量体として存在する Outer surface protein A (OspA) をモデル蛋白質として、球状蛋白質のドメインスワッピングを実現するためのデザインを詳細に検討した。デザインの結果、C 末端側の球状ドメイン中のヒンジループ上のアミノ酸 6 残基の欠失とその欠失部位に対する 1 から 7 個の連続した Pro (プロリン) の挿入により OspA の二量体化に成功した。挿入する Pro の個数によって生じる二量体と単量体の割合が変化することを見出した。Pro を 3、5、6、7 個挿入した変異体 (HinΔ6Pro3、5、6、7) において二量体が優勢に存在しており、特に HinΔ6Pro6 において最も顕著な二量体化が見られた。二量体が優勢に存在した変異体の二量体の X 線結晶構造解析を試みた所、HinΔ6Pro3、5、6 の二量体の結晶構造をおのおの分解能 3.0 Å、2.4 Å、2.0 Å で構造解析することに成功した。得られた構造から、二量体はドメインスワッピングしていることが明らかになった。さらに、これらの二量体のポリプロリン部分がポリプロリン II ヘリックス (PPII) を形成していることが明らかになった。PPII は、トランス型の Pro が形成する 3 残基で 1 回転の剛直なヘリックス構造である。この特徴に従って、HinΔ6Pro3、6 はおのおの 1、2 回転の PPII を形成していたのに対し、HinΔ6Pro5 は 1 と 2/3 回転の PPII を形成していた。これにより、HinΔ6Pro5 のスワッピングする構造領域が約 120° 回転し、HinΔ6Pro3、6 とは大きく形状の異なった二量体を形成していた。これは、PPII を構成する Pro の個数を変化させることで、約 120° 単位でドメインスワッピング二量体の配向を制御出来る可能性を示唆している。以上の結果から、ヒンジループの PPII へのリデザインがドメインスワッピング多量体のデザインに有用であることが推察された。

タマネギ由来催涙因子合成酵素の構造・機能解析 Structural and Functional Analysis of Lachrymatory Factor Synthase from Onion

佐藤優太¹、荒川孝俊^{1,2}、高辺潤平¹、正村典也³、加藤雅博³、青柳守紘³、
鴨井享宏³、柘植信昭³、今井真介³、伏信進矢^{1,2}

1 東大院・農・応生工、2 東大微生物連携機構、3 ハウス食品・中央研究所

【背景】催涙因子合成酵素 LFS は、タマネギの催涙因子 *syn*-プロパンチアール *S*-オキサイド(PTSO)を合成する反応を触媒する。PTSO は基質である 1-プロペンスルフェン酸(PSA)とともに珍しい含硫官能基をもち、LFS はこれらの化合物が関わる反応を触媒する興味深い酵素である。本研究では LFS の触媒機構を明らかにするため、結晶構造解析と構造情報を元にした機能解析を行い、LFS の触媒機構の提唱を目指した。

【方法・結果】大腸菌で異種発現したタマネギ LFS を Ni アフィニティおよびゲル濾過カラムクロマトグラフィによって精製した。PSA アナログを含む複数の条件で精製 LFS を結晶化した。LFS 結晶を用いて X 線回折実験を行い、フリー構造および PSA アナログ分子との複合体構造を 1.7-2.0 Å の分解能で決定した。LFS 分子中央にあるポケット内に、PTSO に似た配向をとった PSA アナログ分子の電子密度が観測された。PSA アナログ分子の認識に関わっていた残基について変異体を作製し、PTSO 合成活性を測定することで、各残基の役割を推定し LFS の触媒機構を提唱した。

***Aspergillus niger* 由来の糖転移活性を有する
新規 α -グルコシダーゼの結晶化
Crystallization of a novel α -glucosidase having
glucosyltransferase activity from *Aspergillus niger***

堤賢太¹、石川涼一¹、西河淳¹、松本雄治²、安武望²、殿塚隆史¹

1 東京農工大学大学院農学府応用生命化学専攻、

2 昭和産業(株)基盤技術研究所

オリゴ糖は整腸作用や免疫力向上など様々な機能が報告されており、人の健康の維持・増進に有用であることから、新規なオリゴ糖製造酵素の取得が囑望されている。私達のグループでは、糖質加水分解酵素ファミリー31 (GH31) に属する α -グルコシダーゼの糖転移活性に着目し、糖転移によって機能性オリゴ糖を生成する酵素の構造と機能の研究を行っている。本研究では、GH31 に属する *Aspergillus niger* 由来の α -グルコシダーゼに着目した。本酵素は α -1,4-結合を持つ糖質に対して活性を持ち、maltose を基質としたとき α -1,2-結合や α -1,3-結合を主体とする生成物を生産することが明らかになっている。本研究は、このように特徴的な糖転移活性を有する本酵素の立体構造を解析することにより、その構造と機能との相関を得ることを目的としている。

本酵素は、*A.nidulans* を宿主とした発現系にて His-tag 融合タンパク質として発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、SDS-PAGE によって確認した。

結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によってクエン酸三ナトリウム緩衝液、PEG300、PEG5000MMe、酢酸アンモニウムをリザーバーとした条件において行った。PF-AR NW12A においてX線回折強度測定を行い、3.2 Å 分解能のデータを収集した。現在、重原子を含む結晶の作製を行っている。

鉄硫黄クラスターが関与する tRNA チオ化修飾酵素の 詳細な反応機構解明を目指した研究

Studies for Detailed Reaction Mechanism of tRNA Thiolation Enzymes Involved in Iron-Sulfur Cluster

石坂優人¹、陳明皓¹、奈良井峻¹、堀谷正樹²、田中良和^{1,3,4}、姚閔¹

1 北大院生命、2 佐賀大農、3 東北大生命、4 JST さきがけ

運搬リボ核酸(tRNA)は翻訳に関わる重要な分子だが、デオキシリボ核酸(DNA)から転写された直後の未成熟 tRNA はその機能を持たない。そのため塩基修飾など一連の転写後修飾によって成熟化される。チオ化は塩基修飾の一種であり、ヒト tRNA³⁴(Wobble 位)がチオ化されなければ、MERRF や MELAS など難病のミトコンドリア病を発症することが知られている¹。この tRNA チオ化は酸素感受性補因子である鉄硫黄クラスターを持つ酵素 Ncs6 と硫黄ドナータンパク質 Urm1 が担うことが知られている²。しかしながら、その詳細な反応機構は未だ明らかになってはいない。

2-チオウリジン合成酵素 A(TtuA)は真正細菌における Ncs6 ホモログであり、立体構造が解明された唯一の鉄硫黄クラスター型 tRNA チオ化酵素である³。TtuA と Ncs6 のアミノ酸配列の類似性は 56%であり、どちらも TtuA/Ncs6 スーパーファミリーに属する。さらに、TtuA とともに働く硫黄ドナータンパク質 TtuB は Urm1 と同様にユビキチンに酷似しており、TtuB と Urm1 の配列類似性は 52%である。したがって本研究では、既に結晶化条件が確立している TtuA に焦点を当てることにより、鉄硫黄クラスターが関与する tRNA チオ化の詳細な反応機構解明を目指す。

これまでに、TtuA は硫黄ドナータンパク質 TtuB から硫黄を受け取ることが知られていたが、TtuA に結合している鉄硫黄クラスターへと硫黄がどのように転移するのかはまだ明らかになっていなかった⁴。そこで、鉄硫黄クラスターの電荷変化に伴う TtuA の構造変化や TtuA 活性に重要な残基を明らかにするために、X 線結晶構造解析と変異体実験を行った。今回はこれらの結果を基に得られた TtuA の詳細な反応機構を報告し、Ncs6 の反応機構を議論する。

参考文献

- 1 T. Yasukawa, et al. *EMBO J.*, 2001, **20**, 4794–4802
- 2 S. Leidel, et al. *Nature*, 2009, **458**, 228–233
- 3 M. Chen, et al. *PNAS*, 2017, **114**, 4954–4959
- 4 N. Shigi. *Front. Microbiol.*, 2018, **9**, 1–9

ハイグロマイシン B リン酸化酵素の 基質認識機構の解明

Structural basis for the substrate recognition of hygromycin B kinase from *Streptomyces hygroscopicus*

竹野谷美穂子¹、山中隆司²、足立祐也²、伊藤晋作¹、佐々木康幸¹、
中村顕³、矢嶋俊介¹

1 東農大生命バイオ、2 東農大院バイオ、3 筑波大生命環境

【背景・目的】 ハイグロマイシン B (hygB) は、アミノグリコシド系抗生物質の1つであり、分子生物学実験試薬として広く用いられている。hygB は、4 位または7"位の水酸基がリン酸化されることで薬剤活性が失われる。これまでに4位の水酸基をリン酸化する酵素である *Escherichia coli* 由来ハイグロマイシン B 4-O-リン酸化酵素 (HPH)/Aminoglycoside 4-phosphotransferase-Ia (APH(4)-Ia) について、ATP アナログである 5'-adenylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP) と hygB との三者複合体結晶構造を我々は報告している。今回、7"位に対するリン酸基転移酵素である *Streptomyces hygroscopicus* 由来ハイグロマイシン B 7"-O-リン酸化酵素 (HYG)/APH(7")-Ia の結晶構造解析を行うことで、HPH との基質認識機構の差異を比較することを目指した。

【方法・結果】 HYG と HPH はどちらも hygB を基質とするものの、アミノ酸配列の相同性は低く、分子置換法により解を得ることができなかった。そこで、セレノメチオニン置換を行った HYG を用い AMP-PNP、hygB との三者複合体結晶を得た。Se-SAD 法により位相決定を行い分解能 2.6 Å にて結晶構造を解くことに成功した。HYG の全体構造は HPH を含む APH ファミリー酵素と同様の N-lobe と C-lobe の2つのドメインからなる構造であった。また HYG と HPH を含む APH ファミリーや真核生物の蛋白質リン酸化酵素でも保存されている Brenner motif (HxDxxxxN) で HYG と HPH の立体構造重ね合わせると、全体的によく重なった。このとき hygB のリン酸基転移部位である 7"位または4位の水酸基は、それぞれ HYG または HPH の Brenner motif 中に保存されている触媒残基のアスパラギン酸の近傍に位置した。一方で hygB 分子の配置は、C-lobe 上においてアスパラギン酸残基から HYG と HPH では反対方向に伸びていた。

PF-AR NE3A, PF BL5A, SPring-8 BL41XU, SPring-8 BL32XU

TLR7 のリガンド認識機構の構造基盤 Structural basis of TLR7 ligand recognition mechanism

張志寛¹、大戸梅治¹、清水敏之¹

1 東京大学大学院薬学系研究科

Toll-like receptor (TLR) は病原体の分子を認識し、自然免疫を活性化させる一回膜貫通タンパク質である。TLR7 はウイルス ssRNA の受容体として同定され、様々なウイルス感染症や自己免疫疾患と関連付けられている。TLR7 は 2 つのリガンド結合部位を有し、それぞれ低分子リガンドと ssRNA を認識する。我々は先行研究において、TLR7 の guanosine-polyU 結合型および合成低分子リガンド R848 結合型の結晶構造を報告し、これらの立体構造により、TLR7 が強力な合成リガンドによって、または guanosine および ssRNA のシナジー効果によって活性化される分子機構を解明した(1)。

しかし、TLR7 について未解明の課題が多く残されている。例えば、ssRNA 配列特異性や、新規ファーマコフォアの認識や、真の内因性リガンドなどについて様々な議論がある。本研究では、Photon Factory および SPring-8 の強力な放射光 X 線を使用し、計 22 個の TLR7 とリガンドとの複合体構造を解明した(2)。この一連の複合体構造により、詳細な ssRNA 配列特異性、典型的な合成リガンドや新規合成リガンドの結合様式が明らかになった。また、2',3'-cGMP が TLR7 の新規内因性リガンドとして作用することを見出した。これらの結果は、TLR7 をターゲットする創薬研究の構造基盤となるものである。

1) Zhang *et al.*, *Immunity*, **45**, 737-748 (2016)

2) Zhang *et al.*, *Cell Reports*, **25**, 3371-3381 (2018)

***Streptomyces* sp. Sp080513GE-23における非リボソームペプチド合成酵素FmoA3のX線結晶構造解析**

X-ray crystal structure analysis of non-Ribosomal peptide synthase FmoA3 from *S. Sp080513GE-23*

原田 彩佳¹、曾根 薫²、勝山 陽平^{2,3}、大西 康夫^{2,3}、千田俊哉^{1,4}

1. KEK-PF, SBRC、2. 東大院 農学生命、3. 東大・微生物イノベ連携機構、
4. 総研大 物構専攻

非リボソームペプチド(NRP)は、生体内でリボソームを経由せずに合成されるペプチドの総称であり、主に細菌や真菌により生産される。細胞内でのNRPの合成を担うのが、非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)である。NRPSは機能の異なる複数のドメインにより構成されるが、NRPの合成に必須なドメインは アデニル化(A)、ペプチジルキャリアタンパク質(PCP)、縮合(C)、チオエステラーゼ (TE)の4種類である。JBIR-34, -35は放線菌 *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23が生産するNRPであり、天然では珍しい4-メチルオキサゾリン環を有する。これまで多くのNRPSの構造解析がなされ、それらの基質認識や触媒作用の仕組みが調べられてきたが、 α,α -二置換アミノ酸を基質とするNRPSの構造および基質認識の仕組みは未解明であった。JBIR-34, -35の生合成遺伝子クラスターにコードされている5つのNRPSのうち、FmoA3は、 α,α -二置換アミノ酸である α -methyl-L-serineを基質とする。そこでFmoA3に着目し、FmoA3の構造解析によってNRPSが α,α -二置換アミノ酸を認識する普遍的な仕組みを分子レベルで解明することを目指した。

結晶化条件のスクリーニングの結果、Index#59 (0.02 M MgCl₂, 0.1M HEPES pH 7.5, 22% (w/v) Polyacrylic acid sodium salt 5100 (以下PAA))で0.2 mm程度の板状の結晶が得られた。Index#59の条件をもとに結晶化条件の検討をおこなったところ、0.1M MgCl₂, 0.1M HEPES pH 7.5, 30% (w/v) PAAにおいて、0.3 × 0.3 × 0.01 mm³の板状結晶を得ることができた。PF BL1A及びPF BL17Aを利用し、アポ型、 α -methyl-L-serine-AMP結合型の結晶構造をそれぞれ2.48 Å, 3.25 Åの分解能で決定することができた。他の既知タンパク質との相同性が30%以下であったが、分子置換法における位相決定を試みたところ、モデル分子の工夫を行うことで位相決定に成功した。今回はその工夫や結果について発表する予定である。

PcyA D105N-BV 中性子結晶構造解析

PcyA D105N-BV Neutron Crystal Structure Analysis

(茨城大・院理工¹，久留米大・医²，久留米高専・生命³，宮崎大・医⁴，大阪大・工⁵，茨城大・フロンティア⁶)

○堀江和輝¹，五十嵐啓介¹，杉島正一²，萩原義徳³，和田啓⁴，福山恵一⁵，矢野直峰⁶，山田太郎⁶，日下勝弘⁶，海野昌喜^{1,6}

フェレドキシン依存性ビリルジン還元酵素 PcyA はビリベルジン(BV)を出発物質としてフィコシアノビルリン(PCB)生合成反応を触媒する^[1]。この反応の特徴は、PcyA が BV の異なる2か所を一定の順序で特異的に還元することである^[2, 3]。このメカニズムを解明するために、先行研究において WT-BV の中性子結晶構造解析が進められ、結晶構造において Asp105 がプロトン化 & 脱プロトン化のダブルコンホメーションを持ち、BV とプロトン化した BVH⁺が混在していると考えられた^[4]。これは、以前から提唱されている吸収スペクトルと BV のプロトン化状態の相関^[5]を反映している。また、Asp105Asn(D105N)変異体は可視光領域において WT とは異なる吸収スペクトルを持っている。本研究では D105N-BV 複合体の中性子結晶構造解析を行い、Asn105 と BV の状態を調べることで PCB 生合成における特異的な反応機構解明とスペクトルと BV のプロトン化状態の相関解明を目指した。MLF-BL03 の iBIX 装置を用いて D105N の大型結晶の中性子回折実験を行い STAR Gazer によって処理した。また、同一結晶を用いて PF-BL5A において常温で X 線回折実験を行い、HKL2000 によってデータ処理を行った。X 線と中性子線回折データを用いて Joint Refinement を行い、構造精密化を進めた。D105N 結晶構造の Asn105 のコンホメーションや、BV のプロトン化状態を occupancy と B-factor を用いて解析することで D105N の吸収スペクトルと中性子構造の相関を調べた。

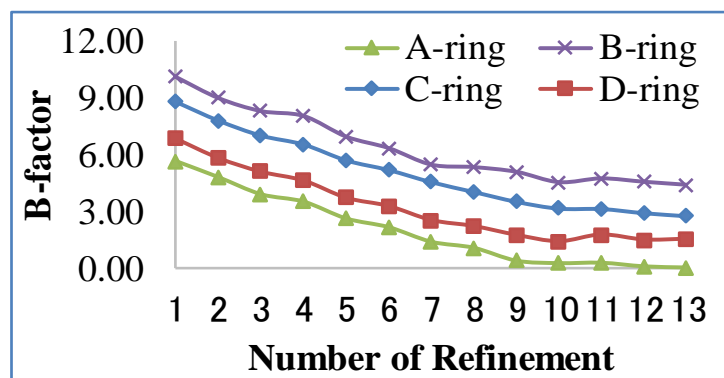


図 1. D105N-BV 中性子結晶構造

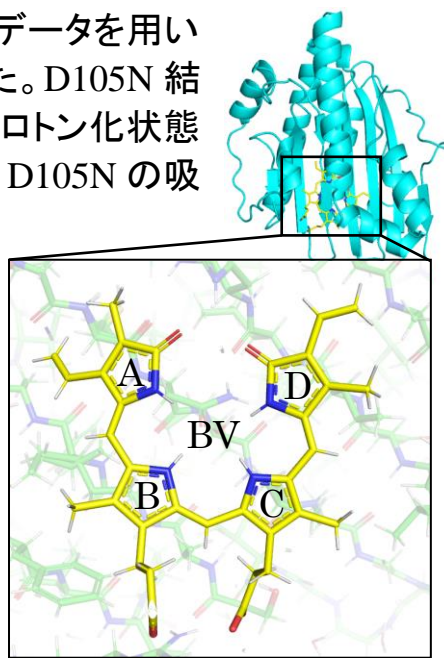


図 2. D105N-BV 中性子結晶構造

[1] Schluchter, W. M *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 13562

[2] Stubbe, J., *et al.*, (1998) *Chem. Rev.*, **98**, 705 [3] Nakamura, Y., *et al.*, (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 6

[4] Unno, M., *et al.*, (2015) *J.A.C.S.*, **137**, 5455-5458 [5] Hagiwara, Y., *et al.*, (2016) *FEBS Lett.*, **590**,

3425-3434

ヒト由来 tRNA^{His} guanylyltransferase の立体構造解析

Crystal structure of human tRNA^{His} guanylyltransferase

中村彰良

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

tRNA^{His} guanylyltransferase (Thg1)は、真核生物に共通して存在し、細胞質 tRNA^{His} 前駆体の 5' 末端に GTP を基質としてグアニン塩基(G-1)を付加する酵素として同定された。この G-1 は、ヒスチジル tRNA 合成酵素による認識に必須であり、翻訳に欠かせない。近年、哺乳類ミトコンドリア tRNA の解析が進み、ミトコンドリア tRNA^{His} (mtRNA^{His}) も転写後に G-1 が付加されることが明らかになった。加えて、Human Thg1 (hThg1)は細胞質とミトコンドリアへ両局在することが報告されている。これらの知見から、hThg1 の mtRNA^{His} 成熟への関与が予想されるが、その詳細は明らかになっていなかった。そこで、本研究ではこれまでに mtRNA^{His} に対する hThg1 の反応機構解析を行い、hThg1 が mtRNA^{His} に G-1 を付加することを報告した^{(1),(2)}。さらに興味深いことに、これまで真核生物の Thg1 は全て共通だと考えられてきたが、細胞質のみで機能する真菌由来 Thg1 と、細胞質とミトコンドリア両方で機能する hThg1 では tRNA および GTP 認識機構が大きく異なることが示唆された。

我々は hThg1 の mtRNA^{His} の認識機構を解明すべく、hThg1-mtRNA^{His} 複合体の結晶化を試みたが、結果として hThg1 単体の立体構造を 4.5 Å 分解能で決定することに成功した。得られた hThg1 単体の立体構造はこれまでに報告されている hThg1 とは全く異なる空間群 P3(1)21 に属し、4 量体を形成していた。さらに、既知構造の hThg1 ではディスオーダーしていた領域が、本構造では長いβシートを形成していた。このβシート領域は古細菌由来 Thg1 ホモログタンパク質では tRNA の認識部位として機能していることから、hThg1 においても mtRNA^{His} 認識に関与する可能性が示唆された。

⁽¹⁾ Nakamura A., Wang D., Komatsu Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018) **503** 2015

⁽²⁾ Nakamura A., Wang D., Komatsu Y., *RNA* (2018) **24** 1583

**細胞周期チェックポイントに関わる
9-1-1 と RHINO の複合体の結晶化
Crystallization of 9-1-1 in complex with RHINO
involved in DNA-damage checkpoint**

飯田奈央¹、原幸大¹、櫻井ひとみ¹、菱木麻美¹、石川吉伸¹、橋本博¹
1 静岡県立大学薬学部

【目的】

ゲノム DNA は様々な要因により絶えず損傷を受けている。細胞周期チェックポイントは細胞周期の進行を監視し、DNA 損傷などの異常を感知すると細胞周期の進行を停止あるいは遅延させ、DNA を修復するための時間を稼ぐ。9-1-1 は RAD9、HUS1、RAD1 で構成されるリング状のヘテロ三量体である。RHINO は 9-1-1 と相互作用し、チェックポイント機構の活性化を促進させる重要なアダプタータンパク質である。本研究では、未だ解明されていない 9-1-1 と RHINO のタンパク質間相互作用を明らかにするために、9-1-1 と RHINO ペプチドの複合体の調製と X 線結晶構造解析を行った。

【方法】

N 末端側に His タグを付加した HUS1、C 末端領域を欠失させた RAD9、RAD1 を大腸菌内で共発現させた。菌体を超音波破碎後、破碎液の遠心上清をヘパリンカラム、陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供し 9-1-1 を精製した。得られた組換えタンパク質と RHINO ペプチドをモル比 1:10 で混合し、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて 20°C で共結晶化条件の探索と結晶化条件の最適化を行った。得られた結晶を用いて X 線回折実験を行い、回折データを収集した。プログラム XDS により回折データの指数付けと積分処理を行い、空間群と格子定数を決定した。その後、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。

【結果および考察】

9-1-1 と RHINO の複合体の共結晶化条件の探索の結果、ポリエチレングリコールを沈殿剤とした複数の条件で微結晶が得られた。X 線回折実験に適した結晶を得るために、結晶化条件の最適化を行ったところ、ジチオトレイトール (DTT) を添加した条件でサイズの大きい良好な単結晶が得られた。X 線回折実験を行った結果、2.4 Å 分解能の回折データを収集した。空間群 ($P2_12_12_1$) と格子定数 ($a=52 \text{ \AA}$ 、 $b=136 \text{ \AA}$ 、 $c=154 \text{ \AA}$) を決定した。分子置換法により構造解析を行った結果、サーチモデルとして使用した 9-1-1 とは異なる電子密度を 9-1-1 の 3 つのサブユニットのうち、1 つのサブユニットで確認できた。現在、RHINO ペプチドのモデル構築と構造精密化を進めている。

**高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来グルタミン酸脱水素
酵素のアロステリック調節機構の解析**
**Allosteric regulation of glutamate dehydrogenase
from *Thermus thermophilus***

富田武郎^{1,2}、西山真^{1,2}

1 東京大学生物生産工学研究センター、2 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構

Thermus thermophilus 由来のグルタミン酸脱水素酵素 TtGDH は互いに46%の相同性を持つ2つのサブユニット GdhA と GdhB からなるヘテロ6量体である。TtGDHにおいてGdhBが触媒サブユニットとして働くのに対し、GdhA は酵素活性を持たず、ロイシンによるアロステリック活性化を仲介する調節因子として働く。最近我々はアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼホモログ APRTh が TtGDH と複合体形成することを見出し、TtGDH/APRTh複合体はロイシンだけでなくAMPによっても活性化を受けることを発見した。哺乳類由来のGDHもADPやGTP、ロイシン等様々な代謝化合物を感知することで複雑なアロステリック調節を受けており、このことが様々なレベルでの生体の恒常性維持に重要であると考えられている。これまで哺乳類由来のGDHのみが複雑な調節を受けると考えられてきたが、バクテリア由来のTtGDH/APRTにおいても一部それと類似した調節機構が存在することが明らかになった。

SACLA を利用した PcyA-BV 複合体の X 線と中性子構造 の矛盾点の解決に向けた研究

Research for solving the contradiction between X-ray and
neutron structures of PcyA-BV complex using SACLA

池田篤史¹、堀江和輝¹、杉島正一²、萩原義徳³、和田啓⁴、福山恵一⁵、平田
邦生⁶、山下恵太郎⁷、吾郷日出夫⁶、海野昌喜¹

1 茨城大学、2 久留米大学、3 久留米高専、4 宮崎大学、5 大阪大学、6 理化学
研究所、7 東京大学

ビリル色素の一つであるフィコシアノビルリン(PCB)は、ヘム分解産物である
ビリベルジン(BV)から酵素 PcyA によって生合成される。PcyA は BV の異なる
二つの部位を一定の順序で部位特異的に還元するという特徴を持つ。我々
は常温の PcyA-BV 複合体の中性子結晶構造を解明し、BV や二重コンホメ
ーションをもつ Asp105 のプロトン化状態を明らかにした[1]。しかし、この中性
子構造解析では、第一プロトドナーと考えられていた Glu76 のプロトンが観
られなかったことや、X 線構造解析では観られなかった axial water が観られ
たことなど、今までの研究と矛盾する点があった。本シンポジウムでは、その
ような矛盾点を解決すべく行った実験と結果について報告する。

上記 2 つの矛盾が生じた原因として、X 線照射還元や温度の違い、可視光
の照射の影響が考えられた。まず X 線照射の影響の有無を検討するため、
SPring-8 BL26B2 を用いて X 線照射量(dose)を変化させた低温下での回折
データから電子密度を求めた。その結果、axial water の電子密度は X 線の照
射量に応じて小さくなっていくことが確認できた。また、SACLA で実験を行うこ
とで、X 線照射還元の影響を排除し、可視光照射の影響を探った。その結果、
可視光照射の影響で、低温でも Glu76 のコンホメーションが変化することが示
唆された。

この結果は、axial water の存在を確かなものにした。また、試料調製や回
折実験時の光の照射を可能な限り抑え、低温で中性子結晶構造解析を行うこ
とができれば Glu76 上のプロトンが可視化できる可能性を示している。

**HBV 型に改変した HIV-1 逆転写酵素の構造と
抗 HBV 薬結合機構の解析**
**Structures of HBV-mimicking HIV-1 reverse
transcriptase provides the basis of anti-HBV drug
binding**

安武義晃¹・服部真一郎²・田村範子¹・松田幸樹²・向後悟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)は抗ウイルス薬が作用する重要な標的タンパク質である。そのため、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、RT の立体構造情報は重要な役割を担う。B 型肝炎ウイルス(HBV)は世界で2億人以上に持続感染し、年間約 100 万人が死亡している。現在治療に使用されている抗 HBV 薬は全て RT をターゲットとした核酸アナログ製剤であるが、HBV RT は著しい不溶性の性質を持つ酵素として知られ、その立体構造解析は遅々として進んでいない。一方、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)RT は安定な酵素として知られ、結晶解析により酵素薬剤間相互作用の詳細を調べるために現実的な材料である。そこで私たちは HBV RT と HIV-1 RT の配列を比較し、HIV-1 RT の活性部位(薬剤結合部位)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た。その結果、抗 HBV 薬であるエンテカビルやラミブジン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。またこれら変異体のいくつかを用いて、テンプレートプライマーDNA およびエンテカビル三リン酸との3者複合体結晶解析を行った。この構造解析により、エンテカビルの結合機構および酵素がエンテカビル耐性に変化する仕組みが明らかになった。また、近年注目されている4位修飾核酸アナログをこの構造に対してモデリングしたところ、HIV/HBV の4位修飾核酸アナログに対する感受性の違いを明瞭に説明することができた。これらのことから、私たちが設計した改変 HIV RT の活性部位構造は、HBV RT のそれをよく再現していると考えられる。これら変異体構造は、種々の核酸アナログのインシリコンモデリングを行うための新たな基準であり、新規抗 HBV 薬設計のために重要な構造情報を提供することが期待される。

***Microbacterium sp.* 由来 ABC トランスポーター基質
結合サブユニットの基質認識機構**
**Structural basis of substrate recognition mechanism
of ABC transporter substrate binding subunit from
*Microbacterium sp.***

島村香穂¹、秋山友了¹、竹野谷美穂子²、伊藤晋作²、
佐々木康幸²、矢嶋俊介²

1 東農大院バイオ、2 東農大生命バイオ

【背景・目的】ヒドラジド化合物は天然にはほとんど存在しないため、多くの生物は代謝する機構を持たないと考えられている。ゆえに生体内での代謝、生合成機構等は未解明な部分が多い。近年、ヒドラジド化合物を代謝可能な *Microbacterium hydrocarbonoxydans* が単離され、それに対する分解活性を有する hydrazidase が同定された。Hydrazidase 遺伝子の前後には、センサー型転写因子と ABC トランスポーターがコードされていた。その構成因子の 1 つである基質結合サブユニット(Substrate Binding Subunit: SBS)はトランスポーターの基質特異性を決めるという重要な役割を担っている。そこで、SBS の基質認識機構の解明を目的として、ヒドラジド化合物との複合体の立体構造解析を行った。

【方法】*M. hydrocarbonoxydans* 由来 SBS (Mi-SBS : 515 アミノ酸) のうちシグナル配列を除き、N 末端に His-tag をつけた遺伝子を大腸菌 B834(DE3) に導入した株を用いた。精製タンパク質を濃縮し、ハンギングドロップ蒸気拡散法により 20 °C で結晶化を行った。約 5 日ほどで、1.0 mm 長の棒状結晶が得られた。X 線照射実験は Photon Factory の BL1A にて行った。また、ヒドラジド化合物との複合体の取得は、ソーキングより行った。我々はすでに基質非結合型 SBS の立体構造を得ているが、その構造をもとにした分子置換法では解が得られなかったため、Se-Met 置換結晶を用い、SAD 法により位相決定を行った。位相決定、自動モデリングは CRANK2、ARP/wARP を用い、最終的に 2.2 Å 分解能で構造を得ることに成功した。

【結果】得られた構造は基質非結合型の構造と比べ、リガンドと結合するための広いキャビティが閉じていることが観察された。これは、配列の相同性からも予測された構造既知のオリゴペプチドトランスポーターの SBS (OppA) と同様のコンフォメーション変化であった。しかし、リガンドとの結合様式を比べてみると Mi-SBS と OppA では違いが観察された。

グルタミンアミドトランスフェラーゼ CAB 複合体の X線・中性子線結晶構造解析 X-ray and neutron crystal structure analysis of glutamine amidotransferase GatCAB

尾瀬農之¹，李龍¹，安達基泰²，姚閔¹

1 北大院生命，2 量研機構

古細菌と多くの真正細菌ではグルタミンとそれに対応する tRNA (tRNA^{Gln}) を結び付けるグルタミル tRNA 合成酵素 (GlnRS) が存在しない。これらの生物では、GluRS が、tRNA^{Glu}、tRNA^{Gln} の両方を認識して、両方の tRNA にグルタミン酸を結合する。引き続き、ミスチャージとして結合した Glu-tRNA^{Gln} は、アミドトランスフェラーゼ (Glu-AdT) の働きにより、正常な Gln-tRNA^{Gln} へと変換される。真正細菌の Glu-AdT は GatC, GatA, GatB の 3 つのサブユニットからなり (GatCAB)、古細菌では GatD, GatE の 2 つのサブユニットからなる (GatDE)。私達は GatCAB によるグルタミン加水分解とそれに続くアンモニア輸送、およびアミド基転移反応に興味を持ち、X線および中性子回折による研究を進めている。

分子内トンネルを使用したアンモニアの輸送機構は古細菌、真正細菌、真核生物に普遍的に見られる現象であるが、分子メカニズムの詳細は謎のままである。とりわけ、輸送に必要な水との協調作用を知る上では水分子と明確に区別する必要がある。通常の到達分解能において、X線結晶解析や電子顕微鏡解析により水分子とアンモニア分子を見分けることは困難である。そのため、トンネル内には多くの球状電子密度が見られるが、どれがアンモニア分子であるのか、アンモニアはイオン化しているのかどうか、また、トンネル内水分子との相互作用を論じるには、これらを区別することができる中性子線結晶構造解析が欠かせない。すでに GatCAB、および基質 Gln との複合体の結晶巨大化 (3 - 5 mm³) に成功しており、中性子回折データおよびX線回折データを使用した joint refinement からアンモニア (或いはアンモニウムイオン) 候補の核密度が得られている。反応中間体の構造などから、新たに得られた知見を議論したい。

L-glucose を基質とする *scyllo*-inositol dehydrogenase の 基質特異性に関する解析

Substrate specificity analysis of *scyllo*-inositol dehydrogenase catalyzing L-glucose

鈴木麻佑¹、深野和紘¹、小澤国生¹、國分将矢²、竹野谷美穂子²、伊藤晋作²、
佐々木康幸²、中村顕³、矢嶋俊介²

1 東農大院・バイオ、2 東農大・生命・バイオ、3 筑波大・生命環境

【背景・目的】L-グルコースは生命の主要なエネルギー源である D-グルコースの鏡像異性体である。L-グルコースは D-グルコースとは対照的に天然にはほとんど存在しないため、それを資化する生物はいないと考えられていた。しかし近年、L-グルコースを資化可能な微生物が複数単離され、その中の一つである *Paracoccus laeviglucosivorans* から、NAD⁺依存的に L-グルコースを酸化する活性を有する *scyllo*-inositol dehydrogenase (PI-sIDH) が単離された。生物が栄養源とすることが無いとされていた L-グルコースと反応することから、その反応の仕組みを解明することで、糖と酵素の反応における新たな知見が得られると考えられた。我々は既に、野生型 PI-sIDH の NAD⁺ が結合していない apo 型および補酵素と基質が結合した 3 者複合体の立体構造を報告している。その結果から、活性部位の入り口付近にある 178 番目のアルギニン残基が基質結合に重要な役割を果たしていることが予想された。そこで今回、そのアルギニン残基の役割を明らかにすることを目的とし、アラニン置換変異体を作成し、立体構造解析を行った。また基質となることが既に明らかとなっている *scyllo*/*myo*-inositol、L-glucose などの糖との活性測定を試み、比較を行った。

【方法】ハンギング・ドロップ蒸気拡散法により 20 °C で結晶を得、最終的に 1.7 Å 分解能で構造を得ることに成功した。酵素活性測定は、生成する NADH の量の変化を波長 340 nm にて吸光度を計測することによって行った。

【結果】得られた構造は、非対称単位に 4 つのサブユニットが含まれており、R178A 変異体と野生型との間で大きな構造の変化は見られなかった。蓋のように働いていたアルギニン残基がなくなり基質結合部位に広がりが見られ、これが野生型と R178A 変異体との間で酵素活性測定の結果の違いを引き起こしていると考えられた。

メタロ β -ラクタマーゼ阻害剤の結合安定性の解析 Analysis of the binding stability of inhibitors for metallo- β -lactamase

黒田圭一¹、加茂大知¹、額賀路嘉²、星野忠次¹

1 千葉大薬、2 城西国際大薬

β -ラクタム剤を分解する β -ラクタマーゼは A,B,C,D の4つのクラスに分類される。その中でもクラス B のメタロ β -ラクタマーゼはほとんどすべての種類の β -ラクタム剤を分解するため、薬剤耐性の点から危険視されている。我々はこれまでにメタロ β -ラクタマーゼの酵素活性を阻害する化合物を同定した。今回、同定した化合物とメタロ β -ラクタマーゼの共結晶構造解析を行い、結合構造の安定性を分子動力学シミュレーションで調べた。

β -ラクタマーゼの1種である IMP-1 に対し、同定した化合物との X 線結晶構造解析を行ったところ、同定した化合物構造(化合物1)とラクタム環が開裂した構造(化合物2)の2種類の結合構造が観測された。そこで、それぞれの結合構造に対し、200ナノ秒間の分子動力学シミュレーションを行い、分子の構造の安定性を解析した。

シミュレーション中における初期構造からのずれ(RMSD)を求めると、化合物2の方が変動の度合いが小さかった。また、メタロ β -ラクタマーゼの活性中心に存在する亜鉛原子と化合物の距離を測定したところ、シミュレーションの進行とともに、化合物1は結晶構造の結合位置より大きく変化し、酵素の活性ポケットから遠ざかった。それに対して化合物2は、亜鉛原子との距離にほとんど変化が見られなかった。以上の結果より、ラクタム環の開裂した化合物2の結合構造は、より阻害活性の高い化合物を作り出すための有効な指針になると期待される。

**染色体凝縮を担うヒト由来コンデンシン I の
CAP-G-H 制御サブユニットの構造基盤**
**Structural basis of human condensin I CAP-G-H
subcomplex responsible for the chromosome
condensation**

石口晃平¹、原幸大¹、木下和久²、右田智子¹、村上慧¹、
清水研一郎¹、竹内康造²、平野達也²、橋本博¹

1 静岡県立大学・薬学部、2 理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室

【目的】

ヒトの遺伝情報を担うゲノム DNA は、細胞周期の分裂期に凝縮され、染色体と呼ばれる高次構造を形成する。この過程を染色体凝縮と呼ぶ。染色体凝縮の機構に異常が生じると、娘細胞への DNA の均等な分配が行えず、細胞のがん化や小頭症などの遺伝性疾患を引き起こす。染色体凝縮において重要な役割を担うものの1つがコンデンシン I という分子量約 700 kDa のリング状のタンパク質複合体である。コンデンシン I は SMC2、SMC4、CAP-D2、CAP-G、CAP-H の 5 つのサブユニットで構成される。これらのサブユニットのうち、CAP-D2、CAP-G、CAP-H は制御サブユニットと呼ばれ、正常な染色体軸構造の形成に必須である。本研究では、CAP-G-H 制御サブユニットに注目し、X 線結晶構造解析とサブユニット間の相互作用解析を行った。

【方法】

重原子同型置換結晶を用いた単波長異常散乱法により、ヒト由来 CAP-G-H 複合体の立体構造を決定した。その後、酵母ホモログとの構造やサブユニット間の相互作用について比較を行った。複合体形成に重要なアミノ酸残基をアラニンなどに置換した変異体や、相互作用領域を欠損させた変異体を調製した。これらの変異体を用いてプルダウンアッセイを行い、サブユニット間相互作用について、野生型との比較を行った。昆虫細胞を用いて再構成したコンデンシン I をアフリカツメガエルの卵抽出液に導入し、野生型と CAP-G-H 相互作用を欠損させた変異型の染色体凝縮能を比較した。

【結果および考察】

ヒト由来 CAP-G-H 複合体と酵母ホモログの構造を比較した結果、ヒトホモログは“開いた”構造を形成しているのに対して、酵母ホモログでは“閉じた”構造を形成していた。2 つの保存された芳香族アミノ酸残基がホックのように機能することで、開閉を制御することを明らかにした。また、3 つの保存された芳香族アミノ酸残基が複合体形成に必須であることをプルダウンアッセイにより示した。再構成コンデンシン I を用いたアッセイ系により、CAP-G-H 相互作用が染色体凝縮に必要な不可欠であることを示した。

***Bacillus thermoproteolyticus* フェレドキシンの結晶大型化と中性子構造解析**

Crystal growth and neutron structure analysis of *Bacillus thermoproteolyticus ferredoxin*

小林賢二¹、和田啓²、福山恵一³、矢野直峰¹、日下勝弘¹、海野昌喜¹

1 茨城大学、2 宮崎大学、3 大阪大学

フェレドキシンは生物に普遍的に存在する電子伝達タンパク質であり、よく研究されているにも関わらず、その酸化還元電位の制御機構は完全には理解されていない。*Bacillus thermoproteolyticus* 由来 4Fe-4S 型フェレドキシン (BtFd) はクラスターとタンパク質主鎖の間に特徴的なループ構造 (Cys-X-X-Cys-X-X-Cys) を持つ。このタンパク質の酸化還元電位の制御機構として鉄硫黄クラスター周辺の水和構造・水素結合が関わっているという説がある[1]。構造中の水素原子の位置情報獲得は重要であるが、高分解能の X 線構造解析でも水分子の水素原子可視化は容易ではない。このため、中性子構造解析を行う。

また、BtFd は、同様に 4Fe-4S をもつ高電位鉄硫黄タンパク質 (HiPIP) とよく比較されてきた[2]。この二つのタンパク質は酸化還元電位が大きく異なり、酸化型 HiPIP の構造との比較のため、還元型 BtFd の構造を得る必要がある。

本シンポジウムでは、中性子構造解析を目指した大型結晶成長と中性子構造解析の結果について報告する。

BtFd の結晶化にはボタン透析法を用いた。再現性は悪いが、ボタン透析法で 2 mm³ を超える良質な結晶を得ることができた。結晶作製後、還元型のデータ収集を見据えて、J-PARC MLF の iBIX で低温での中性子回折実験を行った。しかし、大型結晶の凍結条件を確立することができず、回折像は得られなかった。そこで、常温での回折実験も行った。常温では目視で 1.2 Å 分解能程度の非常に綺麗な回折像を得ることに成功した。テスト測定から本測定までの期間が空いたことで結晶が劣化し、分解能が落ちてしまったが、最終的に 1.6 Å の高分解能中性子回折データを得ることができた。構造解析の結果、タンパク質中に Tyr や Ser、Thr 由来の OH との水素結合をいくつか確認することができた。このうち鉄硫黄クラスターとバルク水をつなぐような核密度を確認できた。また、鉄硫黄クラスターとループ構造を形成する Cys の主鎖アミドの水素原子に残余中性子散乱長密度を確認できた。

[1] Dey A., et al., *Science*, (2007). 318, 1464-1468

[2] Langen R., et al., *J Biol Chem*, (1992). 267, 25625-25627

植物ホルモン・ブラシノステロイド情報伝達における
マスター転写因子の X 線結晶構造解析
Crystal structural analysis of the master
transcription factor of brassinosteroid signalling

野崎翔平¹、宮川拓也¹、徐玉群¹、中村顕¹、平林佳¹、
浅見忠男¹、中野雄司²、田之倉優¹

1 東大院農、2 理研 CSRS

ブラシノステロイド (BR) は生長・発達および環境シグナル応答を制御する植物ホルモンである。BR の情報はマスター転写因子 BIL1/BZR1 に伝達され、活性化した BIL1/BZR1 は数千の BR 応答遺伝子を直接制御する。BIL1/BZR1 は basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子様の DNA 結合ドメインをもち、植物特異的な BZR 転写因子群に分類される。BZR 転写因子は典型的な bHLH 転写因子と同様に、ゲノム上に点在する G-box 配列 (CACGTG) を認識するが、 C_1A_2 塩基に対する認識の厳密さが緩いという点で bHLH 転写因子とは異なる塩基配列認識の特異性をもつ。しかし、BZR 転写因子と bHLH 転写因子の特異性の違いを説明する理由はこれまで不明であった。そこで本研究では、BZR 転写因子に特徴的な塩基認識の仕組みを明らかにするため、モデル植物・シロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインと G-box 配列を含む DNA との複合体の X 線結晶構造解析を試みた。

結晶化においては、結晶化促進タグとしてマルトース結合タンパク質 (MBP) を BIL1/BZR1 に融合させたキメラタンパク質を利用した。MBP と BIL1/BZR1 を繋ぐリンカーの長さ、および標的 DNA の長さ・形状・塩基配列・対称性を検討することで、高分解の X 線回折データを与える結晶の作製に成功した。構造既知の MBP を鋳型にした分子置換法により位相を決定し構造解析を行うことで、分解能 2.17 Å の MBP 融合 BIL1/BZR1 および標的 DNA との複合体の立体構造の決定に至った。BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインの C 末端領域は既知の bHLH 転写因子とは異なる構造をとることで、これまでに例のない二量体構造が形成されていることがわかった。興味深いことに、この二量体形成様式の違いに伴い、DNA に対する BIL1/BZR1 の塩基認識残基を含む α ヘリックスの配向が既知の bHLH 転写因子の配向と比べて大きく傾いていた。さらに、この α ヘリックスの配向変化に伴う DNA の構造制限と BIL1/BZR1-DNA 複合体内で形成される特徴的な塩橋・水素結合ネットワークによって、 C_1A_2 塩基認識に係わる残基の配向が微調整され、 C_1A_2 塩基の認識を緩めていることがわかった。

カルバゾール 1,9a-ジオキシゲナーゼにおける
核間二水酸化反応の構造基盤
**Structural insight into the mechanism of angular
dioxxygenation in carbazole 1,9a-dioxygenase**

Yixia Wang¹, Jun Matsuzawa¹, Joydeep Chakraborty¹, Zui Fujimoto²,
Chiho Suzuki-Minakuchi^{1,3}, Kazunori Okada¹, Hideaki Nojiri^{1,3}
1 BRC, UTokyo, 2 AAC, NARO, 3 CRIIM, UTokyo

[Objective] Rieske non-heme iron oxygenases (ROs) catalyze the incorporation of one (monooxygenation) or both (dioxxygenation) atoms of O₂ into an aromatic ring, thus playing a crucial role in the biodegradation of various recalcitrant aromatic pollutants in nature. Carbazole 1,9a-dioxygenase (designated as CARDO), a three-component RO consisting of ferredoxin reductase, ferredoxin (Fd) and homo-trimeric terminal oxygenase (Oxy), initiates the degradation of carbazole (CAR) by angular dioxxygenation to yield 2'-aminobiphenyl-2,3-diol (ABP-diol). To illustrate the mechanism of angular dioxxygenation in CARDO, catalytic cycle of CARDO has been proposed by our lab based on the determined structures of CARDO and other ROs. The objective of this work is to determine the structures of substrate binding, product formation and release in the proposed catalytic cycle of CARDO by X-ray diffraction. **[Results]** Structures of CARDO with substrate, oxygen, intermediate and product have been solved at resolutions of 1.9-2.3 Å, revealing the conformational changes in the catalytic cycle of CARDO. Substrate binds at the active site in such a conformation that the carbon atoms at the angular (C9a) and its adjacent (C1) are exposed to attack by O₂. Binding of CAR at the active site results in closure of the catalytic pocket by the movement of residues L202-T214 and D229-V238 (especially F204 and I231). O₂ binds side-on or skewed side-on to the non-heme iron, causing little conformational changes. To get structure of product formation, crystals of CAR-bound reduced Oxy were incubated with pure O₂. The obtained structure shows that a presumed tricyclic alkylperoxo intermediate binds to the non-heme iron in one of the subunits, while in the other two, the bicyclic product (ABP-diol) binds at the active sites with both oxygen atoms coordinated to the iron. Formation of alkylperoxo intermediate initiates the opening of the previously closed catalytic pocket caused by substrate binding. Furthermore, generation of ABP-diol results in wide re-opening of the catalytic pocket by movement of residues L202-T214 and D229-V238 (especially F204 and I231) back to the initial positions. Structures with biphenyl-2,2',3-triol (ABP-diol analogue) indicate high flexibility of protonated product after reduction of the non-heme iron. Product release causes a shift of residues A259-I262 inwards, leading to slight contraction of the entrance of the catalytic pocket. The resultant resting Oxy initiates the next turnover.

DNA 修復にかかわる FANCM-CENP-SX 複合体の構造解析に向けた コンストラクト作製

東京理科大学基礎工学部生物工学科

博士1年 伊藤 翔

1. 目的

FANCMはFA(Fanconi Anemia)原因遺伝子のひとつでFA経路と呼ばれるDNA修復経路活性化において重要な役割を果たしている。FANCMはN末端側にHelicase Domain, C末端側にNuclease-like Domainをもち、その間に長い天然変性領域が存在する。FANCMが損傷を受けたDNAに局在し、FA経路を活性化するにはHelicase Domainが大きくかかわっているが、その詳しいメカニズムは解明されていない。Helicase Domainの直後にはキネトコア構成タンパク質でもあるCENP-SXが結合することから、両者は損傷DNA認識において協調的に作用すると考えられるが、その詳細は不明である。本研究ではHelicase DomainとCENP-SXおよびDNAとの複合体の立体構造を明らかにすることでFA経路活性化メカニズムへの新たな知見獲得を目指す。

2. 実験方法

コンストラクト構築はPCRを使った平滑末端クローニングにより遺伝子挿入や、載せ替えを行なった。FANCM(以下Fm), CENP-S, CENP-Xを単一プラスミド(pMal-c2xもしくはpRSFduet)上にコードし、発現プロモーターはtacやT7などを試した。これらのプラスミドを大腸菌に導入し、IPTGによるタンパク質の発現誘導を行なった。得られた大腸菌の抽出液をSDS-PAGEにかけ、ベクターやプロモーターの違い、遺伝子の配置順の違いで発現量や可溶性、精製の可否について検討した。

3. 結果

タンパク質の発現量においてpMalとpRSFの間で大きな違いはなかった。一方、三つの遺伝子の挿入方向は発現量に影響した。Fm Helicase domainのコンストラクトでは天然変性領域を除くと可溶性が向上した。一方、CENP-Sの天然変性領域がFmの可溶性向上に寄与していることが分かった。Amp耐性の大腸菌培養においては本培養、プレ培養ともにOD=1.0を超える場合にはAmpを添加することで目的プラスミドを持たない大腸菌の増殖が抑えられ目的タンパク質の回収量が向上した。タグ切断後は陽イオン交換カラムに通すことで目的タンパク質を高純度で回収することができた。

4. 考察、今後の展開

安定的に発現するベクターを構築できたので今後は得られたタンパク質の結晶化を進める。さらにDNAとの相互作用を調べるためにゲルシフトアッセイやDNAとの共結晶化も進めていく。FmとCENP-SXの複合体ではFmの天然変性領域が切断されることが多いので完全長での回収のために精製ステップの見直しを行なっている。

Vasohibin/SVBP の構造機能解析

東京理科大学基礎工学部生物工学科

博士2年 池田 聡人

1. 目的

Vasohibin は Small vasohibin-binding protein(SVBP) と結合し、細胞外に分泌されて血管新生を抑制する。(H. Sonoda et al., 2006) がん細胞では Vasohibin の発現が正常細胞に比べて低下しており、新生血管が生じやすい状況になっているが、Vasohibin の一過性発現により血管新生抑制及びがん細胞の増殖低下が見られる。細胞質内では神経細胞の分化に重要な微小管伸長の抑制(Aillaud et al., 2017)ならびに、細胞の酸化ストレス耐性の獲得にも関与している(Miyashita et al., 2012)。Vasohibin はカルボキシペプチダーゼ活性を有すが、現時点で基質として知られているのは微小管(α -tubulin)のみで、血管新生時の基質や作用機序は不明である。本研究では Vasohibin/SVBP 複合体の構造生物学的な解析を行い、機構解明を目指した。

2. 実験方法

共同研究者より供与された vasohibin/SVBP 遺伝子より複数の発現コンストラクトを作製した。Vasohibin/SVBP は大腸菌を用いた MBP 融合組み換えタンパク質として発現させた。プロテインインヒビター存在下で大腸菌を超音波破碎し、His タグを用いたアフィニティー精製を行なった。TEV protease を用いて MBP 精製タグを切断した後、陽イオン交換カラムを用いて精製を行なった。最後にゲル濾過カラムを用いて精製し、結晶化を行なった。

3. 結果

二次構造予測を元に天然変性領域を除いた複数の発現コンストラクトを作製し、有力なコンストラクトの発現精製条件を確立した。タンパク質の発現は温度や継代の影響を受けやすく、発現状態の安定化が重要であった。濃縮したタンパク質溶液を用いて結晶化スクリーニングを行った結果、多くの条件で相分離がみられた。今後はさらなる結晶化条件の検討を行う。

4. 考察、今後の展開

大腸菌における組み換え vasohibin 単独での発現は不溶性画分として得られ、SVBP と融合することで可溶性画分を得られた。このことは vasohibin と SVBP が細胞中で相互作用し、複合体を形成することと一致する。同条件により vasohibin パラログの発現精製も可能であることから、パラログの精製を行い、結晶構造解析を目指す。また現在知られている vasohibin の基質である α -tubulin の配列を使用して切断活性を測定するとともに基質ペプチドとの共結晶も試みる。

脂質抗原提示分子 CD1d の結晶構造解析

Crystal structure analysis of lipid presenting molecule CD1d

喜多 俊介¹⁾、日下 裕規¹⁾、Md. Imran Hossain²⁾、花島 慎弥²⁾、井貫 晋輔³⁾、田所 高志¹⁾、新山 真由美²⁾、杉山 成⁴⁾、相羽 俊彦^{2,3)}、尾瀬 農之¹⁾、黒木 喜美子¹⁾、深瀬 浩一²⁾、藤本 ゆかり³⁾、村田 道雄²⁾、前仲 勝実¹⁾

1 北海道大学・薬学研究院、2 大阪大学・理学研究科化学専攻、3 慶應義塾大学・理工学部化学科、4 高知大学・理工学部

本文

CD1d は非古典的主要組織適合遺伝子複合体クラス I の仲間であり、内在性及び外来性の脂質を提示する。CD1d-抗原複合体はナチュラルキラーT (NKT)細胞を活性化し、Th1、Th2 および Th17 サイトカインの産生を誘導する。NKT 細胞のサイトカイン産生は CD1d によって提示される抗原の種類に依存しているが、抗原の化学構造と産生されるサイトカインの選択性との関係は十分に明らかとなっていない。多型を持たない CD1d が多様な抗原を認識し、異なる免疫応答を引き起こす分子機構を解明するため、我々は CD1d と抗原複合体の立体構造解析を進めている。本発表では、CD1d の調製方法やリガンド複合体の形成方法、さらに解析した結晶構造について報告する。

ヒト CD1d およびマウスホモログの CD1d1 は、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて調製した。カイコ体液より精製した CD1d はカイコの内在性脂質を結合していたため、化学合成したリガンドと置換する条件を検討し、酸性条件下でリガンドの置換が促進されることを見出した。CD1d とリガンドの複合体には、CD1d の代表的な抗原として知られる糖脂質 α -Galactosylceramide (α -GalCer) のアシル鎖にアミド基を導入した誘導体 α -GalCer amide を用いた。アミド基を導入した α -GalCer 誘導体は、サイトカイン産生能が α -GalCer より高くなることが知られている。ヒト CD1d、マウス CD1d1 の両方について α -GalCer C20amide、 α -GalCer C26amide との複合体をそれぞれ作製し、X 線結晶構造を行った。本発表では、ヒトとマウスの構造の違い、 α -GalCer 複合体構造と α -GalCer amide 複合体構造の違いについて詳細に議論したい。

メチル化 DNA 修復酵素の 活性部位における構造化学的研究

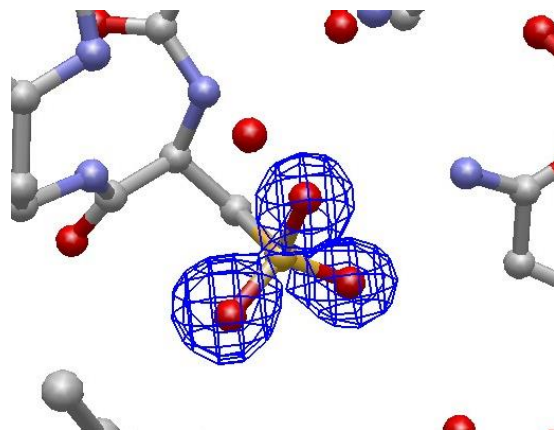
Structural analysis on active site of methylated DNA repair enzyme

菊池 槿子¹、飯塚 康人²、山内 崇浩³、馬籠 将³、
金成 麗奈³、長谷川 さとみ³、角田 大^{1,3}

(1 いわき明星大院理工、2 福島労災病院、3 いわき明星大薬)

メチル化されたグアニンは DNA の複製において癌や突然変異の原因になると考えられ、生物はメチルグアニンを修復するメチル化 DNA 修復酵素(以下 MGMT)を持っている。メチルグアニンのメチル基を酵素の Cys 残基の SH 基に転移させ、グアニン 6 位の酸素原子の二重結合をもとに戻すことで DNA のメチル化されたグアニン塩基を修復する。過去の研究から好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 由来 MGMT では、メチルグアニン 3 位の窒素原子と Tyr91 の OH 基との間の水素結合が形成されており、他の生物種でも Tyr91 は保存されている。そこで Tyr91 は基質特異性に関与しているのではないかと考え、Tyr91 の役割を検討した。

野生型および Tyr91 を Phe に変異させた S α MGMT Y91F、Y91F の変異に加えてメチル基が転移される Cys120 を Ser に変異させた S α MGMT Y91F/C120S の結晶化をハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。得られた結晶を基質溶液に浸すソーキング法で O⁶-methylguanosine と反応させ、X 線回折実験を行った。野生型ではメチル基の転移が観察されたが、活性部位に基質の電子密度は観察できなかった。S α MGMT Y91F/C120S ではメチル基の転移は見られず、O⁶-methylguanosine が活性部位に入り込んでいる様子が観察できた。S α MGMT Y91F では活性部位に基質の電子密度は観察できなかった。またメチル基の転移が起こらないだけでなく、Cys120 の SH 基が SO₃H 基に酸化されていた。Cys120 の酸化は S α MGMT Y91F 単体の結晶構造からも観察された。S α MGMT Y91F/C120S の活性部位に O⁶-methylguanosine が観察されたことから、Tyr91 の基質特異性への関与は低いと考えられる。S α MGMT Y91F の Cys120 の酸化は酵素単体の構造でも観察されたことから、Tyr91 には何らかの酸化剤から Cys120 の SH 基を保護する役割があることが示唆された。



S α MGMT Y91F の Cys120 に結合している
酸素原子

PF-BL5A、PF-BL17A、PF-AR-NW12A

**根寄生植物ストライガ由来 HTL タンパク質群の
リガンド認識選択性の構造基盤**
**Structural basis for ligand specificity of HTL proteins
from parasitic weed Striga**

徐玉群、宮川拓也、野崎翔平、中村顕、呂瑩、中村英光、浅見忠男、田之倉優

東大院農

ストライガは、サハラ以南のアフリカに広く生息しており、重要な穀物に寄生し、甚大な被害を及ぼす根寄生植物である。ストライガ種子は、宿主植物の根から分泌されたシグナル物質であるストリゴラクトン(SL)を感受して発芽する。ストライガを防除するために、根寄生植物の SL 受容機構の解明が重要である。ストライガの種子発芽で機能する SL の受容体は ShHTL と考えられており、11 個の ShHTL をコードする遺伝子が存在している。この重複した ShHTL は機能とアミノ酸配列から、3 つのクレード(保存型クレード、中間型クレード、多様型クレード)に分類されている。これらの ShHTL は高い配列相同性をもつにも関わらず、SL とカリキン(KAR)に対して異なる応答性を示すが、実際に ShHTL がどのようなリガンド特異性をもつかは不明であった。本研究では、ストライガ ShHTL の 3 種類のクレードとそのパラログである ShD14 のリガンド特異性及び立体構造を解析し、リガンド特異性の構造基盤について比較解析を行った。

まず、KAR 結合能と SL 加水分解活性を解析し、3 つのクレードにまたがる ShHTL と ShD14 のリガンド特異性をタンパク質レベルで初めて明らかにした。次に、ShHTL と ShD14 の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、全体構造が類似していることが明らかになった。しかしながら、基質結合ポケットの入口を構成する α D1 ヘリックスと α D2 ヘリックスの配向に明確な違いが見られ、これにより多様型クレード ShHTL ではポケットの入口が大きく開口していた。さらにポケット内部を構成するアミノ酸残基を比較したところ、シロイヌナズナの HTL、ストライガ ShHTL の保存型クレード及び中間型クレードでは嵩高い残基をもち、多様型クレードでは側鎖が比較的小さな残基をもつことがわかった。以上のような各クレードに特徴的なアミノ酸残基の違いにより、KAR のような小さな分子を特異的に認識する ShHTL ではポケットが小さく、多様な SL を認識できる ShHTL 及び D14 ではポケットが大きくなっていた。

こうした詳細な構造比較により見出された構造基盤は、 α D1 ヘリックスの配向とポケット内部の残基の嵩高さにより規定されるポケットの大きさがリガンド特異性と密接に関連していることを強く示唆している。解明したリガンド選択性の構造基盤は根寄生植物の発芽を制御する化合物の設計等に役立つと期待される。

ヒト DNA 酸化損傷塩基除去修復酵素 hOGG1 の X 線結晶構造解析

X-ray crystal structure analysis of human 8-oxoguanine glycosylase 1

小室智稀¹, 服部良一², 田中好幸², 海野昌喜^{1,3}

(¹茨城大学院理工学研究科, ²徳島文理大学薬学部, ³茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター)

ヒト 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) は酸化損傷塩基である 8-oxoguanine (8oxoG) を除去修復する酵素である。hOGG1 は 8oxoG の脱塩基反応 (グリコシラーゼ反応) に続き、脱塩基部位の DNA 鎖切断反応 (β リアーゼ反応) の2つの反応を触媒する。これまでに、hOGG1 の触媒残基として Lys249 と Asp268 が同定されている。Lys249 は基質との共有結合中間体の観測から、 β リアーゼ反応の触媒残基であることが示されている (Verdine et al., *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 204)。近年、Asp268 がグリコシラーゼ反応の触媒残基であることを見出したが (*Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 5231)、Asp268 の触媒機構における役割は未知であり、hOGG1 の触媒機構の理解には反応中間体や変異体構造解析が必須である。そこで本研究では、グリコシラーゼ反応の中間体を結晶学的に直接観測し、Asp268 の触媒機構上の役割を解明することを目的とする。

反応中間体観測のために Lys249Tyr 変異体 (K249Y) と Lys249Cys / Cys253Lys 変異体 (KCCK) を選択した。K249Y は不活性型変異体であることが確認されている。KCCK においては、グリコシラーゼ活性のみを有し、 β リアーゼ活性を失った単機能化された変異体であることが報告されている (Bjørn Dalhus et al., *Structure.* **2011**, 19, 117)。しかし、活性測定条件によっては野生型より活性は低い、 β リアーゼ活性も有するという結果も得られている。

中間体の観測に先立ち、K249Y および KCCK の精製および結晶化を行い基質フリーでの結晶を得た。得られた結晶で X 線回折実験を行い (Photon Factory BL-1A, BL-17A, AR-NW12A)、K249Y と KCCK の回折データを得た。本シンポジウムでは、今回決定された hOGG1 変異体の基質フリーにおける結晶構造について議論する。

タンパク質中性子結晶解析に向けた核偏極用ドーパ剤の影響 Effect of doping agents of nuclear polarization for analyzing protein neutron crystal

小澤夏子¹, 田中伊知朗^{2,3}
茨城大工¹, 茨城大院理工², 茨城大フロンティア³

タンパク質の結晶構造解析にはX線回折と中性子回折がある。X線は電子によって散乱され、中性子は原子核によって散乱されるという特徴があり、中性子回折はX線ではみることができない水素やプロトンを観測することができる。中性子回折を行うにあたり、軽水素原子からの強いバックグラウンドを防ぐために重水素置換をする必要がある。しかし重水素によって同位体効果が起こり化学反応速度が低下してしまうため、高等生物は重水中では生存できない。そこで重水素を用いずバックグラウンドを防ぎ、かつ水素に対する感度を上昇させる方法として、水素原子の核偏極がある。

水素原子の核偏極を行うための現状で最も現実的な方法が動的核偏極(DNP)である。DNPを行うには1K以下の極低温と3T以上の高磁場、かつラジカル分子(ドーパ剤)の導入が必要となる。またラジカルの導入ではタンパク質の構造を壊さずに行う必要がある。本実験ではラジカル導入のためのドーパ剤としてTEMPOLを用いて、ドーパ剤の濃度がタンパク質構造に及ぼす影響について調べた。

ドーパ剤濃度がある程度高くなるとタンパク質の主鎖構造にずれがみられた。^[1]水素の検出感度が向上してもタンパク質構造が変化してしまえば構造解析の意味がない。上記の先行研究では側鎖での構造比較は行っていないため、ポスターでは構造に大きくずれが発生しない濃度範囲の特定、また各濃度における主鎖と側鎖へのドーパ剤の影響について報告する。

[1]小松崎等, 第34回PFシンポジウムポスター(2017)

シアノバクテリアのビオチン生合成経路に見出された
新規脱水素酵素の機能と構造に関する研究
**Structural and functional analyses of a novel
dehydrogenase involved in biotin biosynthesis of
cyanobacteria**

榑 溪¹、大石恵太¹、清水哲¹、小林一幾³、富田武郎^{1,2}、田中寛³、
葛山智久^{1,2}、西山真^{1,2}

1 東大・生物生産工学研究センター、2 東大・CRIIM、3 東工大・化生研

ビオチンは水溶性ビタミンであり、糖や脂肪酸代謝に関与する複数のカルボキシラーゼの補酵素として機能し、全ての生物が利用している。ビオチンの生合成では出発物質が異なる 3 種類の経路が知られているが、経路の後半部は共通の酵素群 (BioF, BioA, BioD, BioB) が反応を触媒し、ビオチンを生合成する。我々は、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム中に *bioF*, *bioD*, *bioB* は含まれるものの *bioA* が存在しないことを見出し、*bioA* の機能を代替するものとして *bioU* と名付けた新規遺伝子を同定した。BioA はビオチン生合成の後半部における 7-keto-8-aminopelargonic acid (KAPA) から 7,8-diaminopelargonic acid (DAPA) への変換を触媒する PLP 依存型アミノ基転移酵素であり、その次の反応を担う BioD は DAPA から反応中間体 DAPA-carbamic acid を経由してビオチン前駆体 dethiobiotin を生成する。我々は、BioU が BioA のようなアミノ基転移反応を触媒するのではなく、NADH 存在下で Lys124 残基を介し KAPA と共有結合し BioU-DAPA 共有結合体を形成することを明らかにした。BioU-DAPA 共有結合体は炭酸付加の後、NAD⁺ の作用によって DAPA-carbamic acid を生合成中間体として生成することも明らかとなった。さらに、BioU と BioD のカップリング反応において外因性のアミノ基供与体の非存在下で dethiobiotin が生成したことから、BioU の Lys124 残基の ϵ -アミノ基が生合成中間体へと供与され、その過程で自身はセミアルデヒド化することが示唆された。MS 分析の結果、Lys124 残基を含むペプチドフラグメントにおいてセミアルデヒド化に相当する質量減少が検出されたことから、BioU は Lys124 残基の ϵ -アミノ基が生合成中間体への内因性のアミノ基供与体として機能する自殺酵素であることが判明した。本研究では、結晶構造解析により BioU-DAPA 共有結合体の形成を視覚的に証明し、さらに生合成中間体 DAPA-carbamic acid のアナログ分子と BioU (K124A) 変異体の複合体結晶構造解析及び変異体解析により、His233-Asp235 catalytic dyad が BioU-DAPA 共有結合体からの生合成中間体 DAPA-carbamic acid の生成に重要であることを明らかにした。以上のように、BioU は NAD(H) 依存酵素でありながらも、既知の脱水素酵素とは全く異なる反応を触媒する新規の酵素であることが明らかとなった。

PF-BL1A、PF-BL5A、PF-BL17A、PFAR-NW12A、PFAR-NE3A

結晶化に向けたピロリ菌 CagA タンパク質-細胞内標的分子 複合体の安定性解析

Stability analysis of *Helicobacter pylori* CagA -intracellular target complex for crystallization

長瀬里沙、千田美紀、千田俊哉

高エネ機構・物構研・構造生物学研究センター

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)は世界人口の約半数が感染していると推定されるグラム陰性螺旋状桿菌で、胃がんを含む種々の胃粘膜病変を引き起こす。特に、ピロリ菌が産生する CagA タンパク質は胃がんの発症に重要な役割を果たすと考えられている。CagA は胃上皮細胞内に侵入後、Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化される。CagA はリン酸化依存的にがんタンパク質として知られる SHP2 チロシンホスファターゼと特異的に結合し、SHP2 を異常に活性化する。一方で、CagA はリン酸化非依存的に細胞極性の主要制御因子である PAR1 キナーゼと特異的に結合して酵素活性を抑制する。その結果、タイトジャンクションが破壊され、上皮細胞極性が失われる。このようにして CagA は細胞内シグナルを攪乱することにより、胃上皮細胞をがん化すると考えられている。そこで本研究では、X 線結晶構造解析により CagA-SHP2-PAR1 からなるシグナル攪乱複合体の立体構造を解析することで、CagA による発がんメカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、CagA の SHP2 結合部位および PAR1 結合部位を模したペプチド(CagA ペプチド)と SHP2 の CagA 結合部位である N-SH2 ドメインならびに PAR1 の CagA 結合部位である触媒ドメイン(PAR1KD)を用いて、結晶化条件の探索を行った。いくつかの条件で結晶が得られたため、X 線回折実験を行なった。データを解析した結果、これらの結晶は N-SH2 ドメイン単独あるいは PAR1KD 単独の結晶であることが確認された。この結果から、結晶化に用いた条件下においては CagA ペプチド-N-SH2-PAR1KD 複合体は安定性が低いため、結晶化の間に複合体が解離してしまう可能性が考えられた。そこで、この複合体がより安定化する条件を検討した。まず、緩衝液の種類、pH、NaCl 濃度を変化させて、示差走査蛍光定量法(DSF)により CagA ペプチド-N-SH2-PAR1KD 複合体の熱安定性を解析した。その結果、リン酸緩衝液、pH7.0-8.5 において安定性が高くなる傾向があった。次に、緩衝液の種類、pH、NaCl 濃度、複合体を形成させてからの時間および温度を変化させてゲル濾過クロマトグラフィーを行うことで、複合体がより安定化する条件を検討する。

PF-BL1A、PF-BL5A、PF-BL17A、PF-AR NW12A、PF-AR NE3A

好熱性古細菌由来 PCNA2 の結晶構造解析

Crystal structure analysis of PCNA2 from thermophilic archaea

山内 崇浩¹、菊池 槇子²、石川 暁志¹、角田 大^{1,2}

1 いわき明星大薬、2 いわき明星大院理工

【背景】DNA の複製に関与するスライディングクランプと呼ばれる増殖細胞核抗原(PCNA)はリング状の三量体を形成し、複製に関与する種々の因子のDNA上への固定を助ける。本研究では好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来のPCNA(A_p PCNA)の立体構造をX線解析で明らかにし、その複雑な動きを可能にする分子装置の全貌を解明することを目的とする。一部の古細菌はヘテロな三量体を形成することが知られている。これまでの研究でゲノム上に存在が確認されている3種の A_p PCNA(A_p PCNA1,2,3)のうち A_p PCNA1 の結晶構造解析を行った。

【目的】 A_p PCNA ヘテロ三量体の立体構造を解析し、DNA や複製関連因子との相互作用について検討することを目的とする。

【方法】*Aeropyrum pernix* のゲノムより A_p PCNA2 をコードする遺伝子を PCR 法で増幅し、プラスミドベクターにサブクローニングした。これを用いて大腸菌を形質転換し、目的タンパク質の大量発現系を構築した。熱処理、硫酸分画、カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、目的タンパク質の純度を高めた。得られたタンパク質で蒸気拡散法により結晶化を行った。

【結果】目的タンパク質を電気泳動的に均一に精製することができた。結晶化条件検索により0.3mm程度の大きさの単結晶を得ることに成功した。X線回折実験の結果、空間群 $C222_1$ 、格子定数 $a = 119.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 172.6 \text{ \AA}$ 、 $c = 172.1 \text{ \AA}$ 、最大分解能 2.0 \AA のデータが得られた。

【考察】非対称単位内のモノマー数が多く、分子置換法では解を得ることはできなかった。結晶化に用いたタンパク質溶液の紫外吸光スペクトルには260nmの吸収ピークが存在した。観測された260nmの吸収が核酸のものであることを疑いSEMに付属しているEDSを用いて元素分析を行った結果、リンが検出された。含量を精査したところ、核酸が混入している可能性が高いことが示唆された。今後は三量体の構造解析と並行し、さらに良質なモノマーの結晶を得るために精製プロトコルを見直す予定である。また、現在 A_p PCNA3 の発現系構築に取り組んでいる。



A_p PCNA2 の結晶写真

PF-BL1A、PF-BL5A、PF-BL17A、PFAR-NW12A、PFAR-NE3A

良質なタンパク質結晶と回折データを効率的に 得るための戦略

A comprehensive strategy to obtain high quality crystals & diffraction data

千田美紀、千田俊哉

高エネ機構・物構研・構造生物学研究センター

結晶化の初期スクリーニングで得られた結晶をそのまま用いても目標をクリアする回折データが得られるとは限らない。そのため、得られた結晶の性質を効率良く改善する技術が必要とされている。我々は、共同研究を通じて多くのタンパク質の結晶構造を決定する過程で、各々の結晶の回折能を最大限に引き出すための試みを行い、結晶改善についての経験を蓄積してきた。クライオプロテクトANTの最適化や化合物へのソーキング実験の際には多くの結晶が必要となるため、まずは結晶化条件の最適化を行い、再現性良く結晶を得ることが必須である。また、最も一般的なクライオプロテクトANTであるグリセロールを用いて目標とする分解能までの回折が得られない場合には 10 種類程度のクライオプロテクトANTから各々のタンパク質結晶に最適なものを探索することが有効である。特に創薬のターゲットとなるタンパク質の研究では、膨大な種類の化合物へのソーキング実験を行い多くの回折データを収集しなければならないため、効率的な回折データ収集のためには、初めに結晶化条件やクライオ条件を最適化しておくことが重要である。本発表では、クライオプロテクトANTへのソーキング条件を最適化することで結晶の質を大きく改善し結晶構造解析に成功した例のほか、化合物へのソーキング実験の実例についても紹介したい。

References

1. M. Senda & T. Senda (2016) Screening of cryoprotectants and the multistep soaking method. *Advanced methods in Structural Biology*. Springer, pp.139–152.
2. M. Senda *et al.*, Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality for protein crystals. (2016) *Crystal growth & Design* 16, 1565–1571.
3. K. Sumita *et al.* The Lipid Kinase PI5P4K β is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis. (2016) *Molecular Cell* 61, 1–12.
4. Hayashi, T. *et al.* (2012). Tertiary structure and functional analysis of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cell Host and Microbe*. 12, 20-33.

好熱性細菌 TT_C1864 のタンパク質発現精製と結晶構造解析

東京理科大学基礎工学部生物工学科

学部4年 鈴木 浩斗

1. 目的

TT_C1864 は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 由来の dCTP deaminase をコードしている遺伝子である。dCTP deaminase は核酸の生合成経路の下流で働く酵素であり、dCTP を加水分解することによって脱アミノ化し dUTP を産生する。本研究では *Thermus thermophilus* HB27 由来 dCTP deaminase (Tth-DCD) の構造機能解析を行い、基質である dCTP の認識機構について X 線構造解析を用いて明らかにし、変異体解析を通じて反応機構を解明する。

2. 実験方法

Thermus thermophilus HB27 由来 TT_C1864 遺伝子を Tth ゲノムより PCR 法により増幅し、遺伝子を pMalht3 ベクターに挿入した。タンパク質発現用大腸菌 BLSS(BLStar(DE3)pRARE2LysS)にて組み換えタンパク質を発現し、His&MBP 混合カラムを用いて精製した。精製したタンパク質溶液に基質として dCTP/dUTP と補欠分子として MgCl₂ を加え、1:1 の割合で沈殿剤(0.2M Lithium sulfate, 0.1M CHES pH 9.5, 1.0M Sodium/Potassium tartrate)を混合し、結晶化させた。得られた結晶に KEK の放射光施設で X 線を照射し、回折データを取得した。回折データは HKL2000, Phenix, Coot を用いて解析した。

3. 結果

Tth-DCD を大腸菌の組み換えタンパク質発現系で大量発現精製することができた。精製途中でタンパク質が一部分解する傾向が観察され、トリプシンの限定分解でも同様であった。タンパク質の二次構造予測より、C 末端領域に天然変性領域が存在し、この部分が精製途中で切断されていると考えている。Tth-DCD の結晶の分解能は現時点では 1.6 Å である。HKL2000 および XDS による処理の結果、空間群は H32 であると考えられ、2 分子の TthDCD が非対称単位中に存在した。立体構造が既知で Tth-DCD に配列相同性が約 60%ある *Burkholderia thailandensis* の dCTP deaminase(PDB:4dhk)を用いて分子置換を行ったところ R-free は 20.5%まで減少した。しかし、TthDCD の活性部位に dCTP(基質) や dUTP(阻害剤)の電子密度を確認できていないのが現状である。

4. 考察、今後の展開

TthDCD 単体での構造を解くことはできたが、基質結合状態の構造を見ることはできなかった。その要因としては、以下の3つが考えられる。

1. 酵素の活性部位に沈殿剤として用いた酒石酸が入り込んで邪魔をしている。
2. 構造決定に用いた TthDCD の C 末端が切れてうまく基質をトラップしきれていない。
3. そもそも TthDCD に dCTP deaminase 活性がない。

そのため、今後はそれぞれの可能性を遺伝学的、生化学的、物理化学的アッセイを用いて厳密に議論していきたい。

イネ蛋白質酸化還元酵素の立体構造解析 Structural Analysis of Rice Protein Disulfide Isomerase

藤本 瑞、岸根 尚美、桜井 睦、門間 充、山崎 俊正、川越 靖
農研機構・解析セ/生物研

蛋白質酸化還元酵素である PDI は、リボソームで合成されたタンパク質のジスルフィド結合形成や、ミスフォールドしたタンパク質の巻き戻しを担う分子シャペロンの役割を有する。PDI は一般的に分子内に複数のチオレドキシン (Trx) ドメインを有しており、活性中心は Trx ドメイン内の自信のジスルフィド結合である。

植物にも PDI は存在し、その1つであるイネ PDIL2-3 は、胚乳ではプロテインボディ PB-I の表面に局在しプロラミンなどイネ胚乳の貯蔵タンパク質の集積を促進する。米の貯蔵タンパク質含有量は、米の味や米粉などを利用した食品の食感に関わり、PDIL2-3 も貯蔵タンパク質の集積を通して米の品質に影響を及ぼす一因であることが明らかになってきた。そこで、PDIL2-3 の機能や、基質、酸化酵素との相互作用機構を詳細に明らかにすることを目的に、まず、X線結晶解析法による PDIL2-3 の立体構造解析に取り掛かることにした。

PDIL2-3 は分子内に3つのチオレドキシン (Trx) 様ドメイン (N 末から a, a', b) を有している。活性を担うジスルフィド結合はドメイン a とドメイン a' にのみ存在する。大腸菌で発現させた PDIL2-3 全長の結晶化を試みたが、結晶を得ることができなかった。そこで、PDIL2-3 をドメイン a とドメイン a'-b ドメインに分割し、それぞれを大腸菌で発現させ、結晶化を行ったところ、どちらも結晶を得ることができた。高エネルギー加速器研究機構放射光施設 (PF、PF-AR) において X 線回折データを取得し、ヒト由来の PDI の立体構造を鋳型とした分子置換法により立体構造を決定した。

イネ PDIL2-3 のドメイン a は、1つの Trx ドメイン構造、a'-b は2つの Trx 様ドメインがタンデムに続いた構造を持ち、どちらも2量体として存在していた。2量体のインターフェースは活性部位である分子内ジスルフィド結合の近傍に存在した。PDIL2-3 は全長では、2量体または4量体を形成するが、2つの立体構造から、PDIL2-3 は複数の Trx ドメインが長く伸びた多量体構造をとることが推定された。

昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 Noppera-bo の 機能に重要なアミノ酸残基の同定

Pharmacological and crystallographic approaches reveal a crucial amino acid residue for *in vivo* function of the insect steroidogenic regulator Noppera-bo

稲葉和恵¹・小祝孝太郎²・諸橋香奈¹・塩谷天¹・荒井怜奈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

中村輝⁵・湯本史明²・千田俊哉²・丹羽隆介¹

1 筑波大・生命環境 2 高エネ研・物構研・構造生物

3 東大・創薬機構 4 東京薬大・生命科学 5 熊本大・発生医学研

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必須である。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酵素の 1 つが、グルタチオン *S*-転移酵素の Noppera-bo (Nobo) である。nobo 機能欠損ショウジョウバエは、エクジステロイド不全となり、成虫になれずに致死となることが報告されている(Enya et al. *Sci. Rep.* 2014)。しかし、Nobo の内在性基質はこれまでのところ明らかになっていない。そこで本研究では、Nobo と結合する化合物をモデル化合物として、結合様式の解明および相互作用に重要なアミノ酸残基の解析を試みた。今回は、Nobo の酵素活性を阻害する化合物の 1 つとして、所属研究室の先行研究において得られた β -エストラジオールをモデル化合物として実験を行なった。まず、 β -エストラジオールとの結合様式を解明するため、キイロショウジョウバエ由来の Nobo タンパク質の X 線結晶構造解析を実施し、Nobo と β -エストラジオールの複合体構造を追究した。その結果、Nobo の 113 番目のアスパラギン酸残基(D113)は β -エストラジオールと水素結合していることが明らかになった。次に、この水素結合の重要性を調べるために、D113 をアラニン残基に置換した変異 Nobo タンパク質(D113A)を作製して生化学的実験を行った。その結果、 β -エストラジオールは D113A 変異タンパク質に対して阻害活性を失うことが明らかになった。また、SPR法を用いて Nobo に対する β -エストラジオールの解離定数を算出したところ、Nobo 野生型では 0.50 μ M であったのに対し、D113A 変異型は算出できない程度まで高濃度となった。さらに、ショウジョウバエを用いた実験から、D113A 変異型 nobo ノックイン個体は致死になることが明らかになった。一連の研究から、Nobo は D113 との水素結合を介して化合物と結合すること、さらに D113 が生体内の機能においても重要であることが明らかになった。今回得られた知見を基に、今後は Nobo の D113 と相互作用する化合物の探索を行い、内在性基質の同定を目指す。

マイクロチップを用いた良質大型タンパク質結晶育成

High-quality protein crystal growth in microtip

佐藤 允則¹、田中 伊知朗²、新村 信雄²

¹茨城大工 ²茨城大学院理工

【序論】タンパク質とは生体を構成する重要な成分の一つであり、近年、タンパク質の生体内での働きを解明するためにタンパク質の立体構造解析が急速に進んでいる。構造解析法の一つである中性子回折はまずタンパク質の構造を解析する前にタンパク質を結晶化させる必要があるが未だ結晶化制御は確立されていない。このような背景からタンパク質結晶の結晶育成を確立することはタンパク質の構造解析の効率を向上させるうえで重要であり、延いては人類の創薬を新たに開発する可能性を秘めている。北海道大学の真栄城らが微小液滴内で少数のタンパク質結晶の核の生成を制御することに成功した[1]。それを受け今回、微小液滴という0次元ではないマイクロ流路という一次元でタンパク質結晶の育成を試み、微小空間パラメータと結晶化との関係を調べることにした。

【実験操作】流路幅 200 μl と 75 μl の異なる二つのマイクロプレートを用意した。リゾチームタンパク質溶液をマイクロプレートに通す前に、流路に実際に通るか結晶化剤溶液を用いて確かめた。さらに予めリゾチームをハンギングドロップで結晶化し、結晶化する最適なタンパク質溶液濃度と結晶化剤濃度を探索した。

【結果・考察】流速が 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ のとき溶液を押し出すマイクロシリンジから漏れ出すことなく、200, 75 μl どちらのマイクロチップの流路内にも結晶化剤溶液を通すことができた。ハンギングドロップについてはタンパク質溶液濃度は 25~35mg/ml, 結晶化剤溶液濃度 0.6~0.8mmol の時に比較的数の少ない結晶が生成した。今後、この範囲の濃度でマイクロチップを用いた結晶化実験を行っていく予定である。また今回の実験ではマイクロプレートはガラス製を用いたが、タンパク質結晶の付着の少ないPDMSの材質のマイクロプレートを採用する予定である。

[1] M. Maeki *et al.*, *Chem. Lett.*, **40**, 825 (2011).

Ni 置換型ルブレドキシンの X線・中性子結晶構造解析

X-ray and neutron crystal structure analysis of Ni-substituted rubredoxin

横山優花¹、庄村康人¹

¹ 茨城大学 大学院理工学研究科

[目的]

ルブレドキシンは多くの細菌で見出されており、生体内では電子伝達に関与するタンパク質である。このタンパク質は本来酸化還元中心に Fe を 1 つ持っている (FeRd) が、これを人工的に Ni に置換した Ni 置換型ルブレドキシ (NiRd) は水素合成反応を触媒する機能を持つことが分かっている^[1]。しかしその反応機構の詳細はまだ報告されておらず、解明することでより効率的な水素合成法の開発に繋がると期待されている。

本研究では、X 線および中性子を用いた結晶構造解析によって酸化型・還元型・反応中間体についての構造情報を得ることで、NiRd の水素合成触媒機構の解明を目指している。本発表では酸化型 NiRd の X 線・中性子結晶構造解析の結果について報告する。

[方法・結果]

好熱菌 *Caldanaerobacter subterraneus* 由来の FeRd を大腸菌発現系を用いて大量発現させ、その後アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。得られた FeRd に対し Ni 置換を行った後、陰イオン交換クロマトグラフィーを行い NiRd を精製した。その後シッティングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化を行い、体積が 0.8 mm³ 程度の大型の酸化型 NiRd 結晶を作製した。結晶を重水および重水素化硫酸アンモニウムで置換した後、J-PARC の MLF-BL03 および Photon Factory の BL-5A で回折実験を行い、それぞれ分解能 1.3 Å、0.8 Å 程度の中性子および X 線高分解能回折データを得ることができた。現在、これらのデータを基に X 線・中性子結晶構造解析を進めている。構造精密化の初期段階では良好な結果を示しており、X 線では観測できなかった、水和水やアミノ酸残基の水素 (または重水素) 原子とみられる散乱長密度マップが確認されている。酸化還元中心付近にもいくつかの水素原子が確認されており、これらは反応に関わっている可能性がありその位置情報は反応機構解明において重要であると考えられる。今後は還元型 NiRd 結晶の調製方法を検討し、最終的に酸化型との構造比較を行うことで、反応機構の解明に繋げていきたいと考えている。

Reference

[1] Pascal Saint-Martin et al. PNAS. 1988, 85, pp. 9378-9380

クラス IB テルペン合成酵素の基質認識機構の解析 Analysis of ligand-recognition mechanism of class IB terpene synthase

稲木隼人¹・佐藤努²・保野陽子³・品田哲郎³・三木邦夫¹・藤橋雅宏¹
¹京大院理・²新潟大農・³阪市大理

テルペンは自然界で数万種が知られている大きな化合物群であり、その生体内での役割は多岐にわたる。このテルペンの炭素骨格を組み替える酵素はクラス I とクラス II の 2 種類のファミリーが知られており、それぞれに保存モチーフ配列が存在する。

これまでの研究で、我々は *Bacillus subtilis* から 2 種どちらのファミリーのモチーフ配列も持たない新型テルペン合成酵素 (TS) を発見し¹⁾、このファミリーに属する *Bacillus alcalophilus* 由来の TS (BaITS) の結晶構造を 1.64 Å 分解能で決定した²⁾。決定した構造から、TS には既知の 2 種類のファミリーとは異なるアスパラギン酸に富むモチーフ配列が存在することや、TS がテルペン合成酵素の新しいサブクラスであるクラス IB に属する事が示された。しかし、基質複合体の構造が得られていないため、クラス IB に属する酵素と基質との詳細な結合様式についてはほとんど不明である。

本研究では BaITS と基質の複合体の結晶構造解析に取り組んだ。はじめに基質複合体の結晶化条件をスクリーニングによって決定した。続いて 2 種類の基質アナログを用いて基質複合体結晶を作製し、X 線結晶構造解析によって基質結合型構造を 1.9 ~ 2.0 Å 分解能で決定した。精密化した構造から、BaITS のアスパラギン酸に富むモチーフ配列と基質が、マグネシウムイオンを介して相互作用していることが明らかになった。さらにクラス IB 酵素で保存されている残基で構成されているクレフトが基質の炭素鎖部位を認識していたことから、Class IB 酵素に特徴的な炭素数 25 を超える大型のテルペン認識に重要なクレフトの構造上の特徴が示された。

発表ではクラス IB 酵素における基質結合様式の詳細を報告し、クラス IB 酵素の基質認識機構と反応機構について議論する。

文献

- 1) Sato, T. et al. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9734-7
- 2) Fujihashi, M. et al. (2018) *Chem. Sci.*, **9**, 3754-8

格子長 135 Å マンガンカタラーゼの中性子結晶構造解析 A neutron protein crystallographic analysis of manganese catalase with 133 Å unit cell axes using iBIX

山田太郎、矢野直峰、日下勝弘
茨城大学

茨城県生命物質構造解析装置 iBIX はタンパク質等の生体高分子や有機小分子の結晶構造を明らかにするために J-PARC MLF BL03 に設置された TOF 中性子単結晶回折計である。iBIX は格子長 $a = 135 \text{ \AA}$ の立方晶系結晶の回折データの取得が可能となるように設計されている。この格子体積はこれまでに報告されている中性子結晶構造解析例の最大のもの2倍超とかなり大きい。現在タンパク質結晶構造データベース PDB に登録されている X 線結晶構造解析の少なくとも 6 割がこの格子長の範囲に入る。しかし格子が大きくなると回折強度が小さくなるだけでなく、回折点同士の重なりのために構造解析に必要なデータが得られなくなる可能性がある。本研究では iBIX の目標性能を証明するために高度好熱菌 *T. thermophilus* 由来マンガンカタラーゼの中性子回折実験を行い、X 線と中性子回折データを併用した結晶構造解析を行った。回折強度の見積もりを行う際に、回折点を取り囲む直方体状の積分領域の大きさを TOF プロファイルフィッティングから得られるピーク幅と $1/\sigma(\lambda)$ 最大法を組み合わせることにより最適化した。さらに近傍の積分領域が侵入する体積の割合を計算した。今回、 $d_{min} = 2.4 \text{ \AA}$ である回折データセットを得た。このうち 13% の回折点の積分領域がなんらかの重なりを持っていた。しかし、直方体積分領域は実際の回折点より大きいこと、異なる回折条件で等価反射の測定が可能であることなどから、軽度の重なりを無視したり、重なりが大きい回折点の強度データを棄却したりすることで、重水素等が観測できる中性子回折データを得ることができた。中性子回折データの平均回折強度は小さいものの、諸統計値はデータ精度に大きな問題がないことを示していた。またこのマンガンカタラーゼ結晶は非対称単位に独立な二分子が存在するが、XN 結合精密化により得られた中性子散乱長密度はほぼ再現されており、得られた中性子回折データが構造解析により水素原子を観測するのに十分に使用可能であることがわかった。

PF AR-NW12A におけるオフライン分光装置開発の現状と 今後の高度化について

The Development of Offline Spectroscopic System at PF-AR NW12A

引田理英^{1,2}、山田悠介^{1,2}、松垣直宏^{1,2}、平木雅彦^{2,3}、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

タンパク質の機能メカニズム解析研究において、タンパク質の分子・原子レベルでの立体構造は不可欠であり、高輝度放射光源を利用した X 線結晶構造解析法は、タンパク質の立体構造を原子レベルで解明するための強力なツールである。一方、振動分光学的方法によれば、タンパク質を構成する原子の化学的諸性質を決定する化学結合を精密に解析することができる。近年では、X 線結晶構造解析法と振動分光法を組み合わせ、これら 2 つの相補性を利用した研究が展開されるようになってきている。そこで KEK-PF のタンパク質結晶構造解析用ビームラインである AR-NW12A では、これまでに行っていたタンパク質結晶の X 線回折実験と併せて、レーザー光や白色光を光源としたタンパク質結晶の分光実験が可能な装置開発及び環境整備を行っている。これまでに、AR-NW12A のコントロールキャビンに分光実験専用のレーザーブースが建設され、レーザーや分光器が導入されている。オフライン紫外可視吸収測定装置については開発が終了し、ユーザー利用が始まっている。本装置では、結晶に照射する白色光は 100 μ m 程度まで集光できており、室温・低温どちらでも測定が可能となっている。現在は結晶のラマン分光測定が可能な装置の開発を進めている。本ポスターでは、オフライン顕微分光装置の現状と今後の高度化予定について紹介する。

ホスホリパーゼ A₂ アナログの立体構造解析と SDS による多量体化

Structure analysis of phospholipase A₂ analogue and its SDS-induced oligomerization

松井 崇¹, 鎌田しずか¹, 石井健太郎², 丸野孝浩³, ガーネム ノーラン¹, 内山 進^{2,3}, 加藤晃一^{2,4,5}, 鈴木淳巨⁶, 上田直子⁷, 小川智久¹, 田中良和^{1,8}
¹ 東北大院・生命研, ² 自然科学研究機構・生命創成探究セ, ³ 大阪大院・工, ⁴ 名古屋市大院・薬, ⁵ 自然科学研究機構・分子研, ⁶ 名古屋大院・工, ⁷ 崇城大・薬, ⁸ JST さきがけ

ホスホリパーゼ活性に重要な Ca²⁺結合部位 Asp49 が Lys へと置換したホスホリパーゼ A₂ (PLA₂)アナログは, 安定な2量体を形成する. 特に強力な変性剤である SDS により自発的に多量体化が起こり, 加熱や 6 M 尿素変性剤存在下でも安定な構造をとることが判明した. 今回, この PLA₂ の安定な多量体構造の謎を明らかにするため, Lys49PLA₂ の X 線結晶構造, Native MS および超遠心分析法など生物物理学的手法により解析した.

精製した Lys49PLA₂ を 0.1 M 酢酸ナトリウム pH 4.2, 0.5 M 硫酸アンモニウム, 32.5%(w/v) PEG4000 条件で結晶化した. 結晶構造は Photon Factory BL-17A にて, 分解能 2.57 Å でデータセットを取得し, 分子置換法により決定した. その結果, Lys49PLA₂ は非対称単位中に 4 分子存在していたが(図), 隣接分子間はカチオンに富んだ領域同士で接しており, 分子間を強固に繋ぐような構造は存在しなかったため, 単量体として存在すると結論した.

さらに, Native MS および超遠心分析法での解析により, SDS 非存在下では X 線結晶構造と同様単量体で存在することが判明した. しかし, SDS-PAGE では2量体を形成し, さらに 1%SDS 存在下での精密超遠心分析法から, Lys49PLA₂ は, SDS が 42 分子結合した2量体および 63 分子結合した3量体 (それぞれ 33.1 kDa および 48.3 kDa) で存在することが判明した. Lys49PLA₂ が SDS により自発的に多量体化するという興味深い特性が確認された.

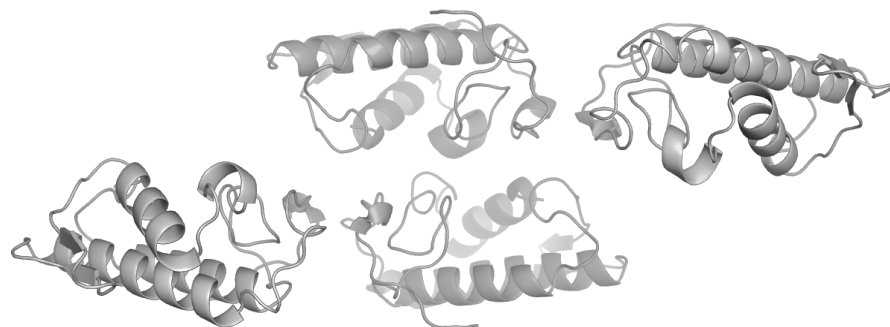


図 Lys49PLA₂ の非対称単位 of 4 分子の単量体構造.

X線結晶構造解析を利用した GTP センサーPI5P4K の分子進化の解明に向けて

Toward for molecular evolution of GTP sensor, PI5P4K using X-ray crystal structure analysis

此下亜椰^{1,2}、原田彩佳²、中川草³、竹内恒⁴、佐々木敦朗⁵、千田俊哉^{1,2}

1 総研大 物構専攻、2 KEK-PF SBRC、3 東海大 医学部、4 産総研、5 シンシナティ大

我々はヒトがもつ脂質キナーゼの一種 PI5P4K β が、代謝やがんの増殖を司る GTP センサーであることを見出した。これまでの研究から、ヒト PI5P4K β と相同性の高い遺伝子は菌類には存在しないことが明らかになっており、PI5P4K は進化の過程において菌類と多細胞動物が分岐したあとに獲得された可能性が高いと考えられている。また、NMR 法を用いた加水分解活性測定によりサメ、シーラカンスの PI5P4K β はヒト PI5P4K β よりも弱い GTP 応答性を示すことが明らかとなっていることから、進化の過程で GTP 検知能の変化が起こっていると考えられる。進化系統樹において、多細胞生物として最も初期に分岐したと考えられているセンモウヒラムシ (*Trichoplax adhaerens*)も PI5P4K 遺伝子を持つことから、センモウヒラムシ PI5P4K の X 線結晶構造解析を行うことで、菌類との分岐後から脊椎動物に至るまで、いつどのようにヒト PI5P4K β が GTP センサーとしての機能を獲得したのかについて知見を得ることにした。

センモウヒラムシ PI5P4K の遺伝子を大腸菌に導入し、発現条件の検討、精製結晶化スクリーニング、結晶化条件の最適化を行ったところ、還元剤 5 mM 2-mercapto ethanol を使用した条件において結晶は得られなかったが、還元剤 2 mM DTT を用いた条件のみでセンモウヒラムシ PI5P4K の結晶が得られた。この結晶を用いて、Photon Factory BL-1A, BL-17A および SLSX06-SA において回折強度データを収集し、分解能 3.7 Å のデータセットを得た。ヒト PI5P4K β を初期モデルとして分子置換法での位相決定に成功した。

本発表ではセンモウヒラムシ PI5P4K の大量発現から結晶化、位相決定までの実験方法と平板動物特有の電子密度が観測されたことについて報告する予定である。