

全長の LysR 型転写調節因子 CbnR-DNA 複合体の X 線結晶構造解析と転写活性化機構の解明 Crystal structure of the full-length LysR-type transcription regulator CbnR-DNA complex

千田美紀¹、Evdokia-Anastasia Giannopoulou¹、
Maharani Pertiwi Koentjoro^{1,2}、安達成彦¹、小川直人^{2,3}、千田俊哉¹
1 高エネ機構・物構研・構造生物学研究センター、2 岐阜大学、3 静岡大学

細菌の転写調節因子の一つである LysR 型転写因子 (LTTR) は、アミノ酸合成・芳香族化合物分解・病原性関連因子産生・酸化ストレスへの応答など、様々な遺伝子群の発現制御を担っている。我々のグループでは、芳香族塩素化合物分解菌のクロロカテコール分解酵素遺伝子群の転写調節因子である CbnR を研究ターゲットとして LTTR の研究を続けており、全長での LTTR としては世界で初めて結晶構造を決定した(1)。さらに、CbnR の DNA 結合ドメイン (CbnR_DBD) と認識配列 DNA (RBS) との共結晶構造を決定した(2)。これらの結果から LTTR 四量体の4つの DNA 結合部位が V 字型に配置することが示され、その V 字型構造により DNA を大きく折り曲げると考えられたが、全長 LTTR と DNA との安定な複合体の共結晶構造解析の成功例はなく、LTTR がプロモーターDNA を認識し転写を活性化する機構については不明な点が多く残されていた。

そこで我々は全長 CbnR 四量体(1176 残基)とプロモーターDNA (RBS-ABS からなる 56 塩基対の DNA) との複合体の結晶構造を解明し、LTTR による転写制御の分子機構を明らかにすることを目指して研究を進めてきた。全長 CbnR-DNA 複合体の結晶の格子定数は長軸方向が 600 Å もある上に結晶が得られた当初は 6.9 Å 分解能のデータしか得られなかったが、分子置換法による解析で確かに DNA が結合していることを確認できた。その後クライオ条件の最適化により最終的には 3.6 Å 分解能での構造決定に成功した。得られた結晶構造からプロモーターDNA が約 70 度曲がった状態で結合していること、DNA の結合に伴い四量体を形成するドメイン (RD-I, RD-II, DBD) の相対的な位置が変化することが明らかになった。

References

1. Muraoka, S. Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K., Senda, T. (2003). *J Mol Biol* 328, 555-566.
2. Koentjoro, M. P., Adachi, N., Senda, M., Ogawa, N. & Senda, T. (2018). *FEBS Journal*, 285, 977-989, doi: 10.1111/febs.14429

ヒト由来 tRNA^{His} guanylyltransferase の ヌクレオチド認識機構 Nucleotide recognition mechanism 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、Human Thg1 (hThg1)はミトコンドリア tRNA^{His} (mtRNA^{His}) も基質として認識し、G-1 を付加することが明らかになった^{(1), (2)}。興味深いことに、細胞質の tRNA^{His} は G-1 の反対側の鋳型塩基がアデノシン(A73)であるのに対し、mtRNA^{His} はシトシン(C73)である。しかし、hThg1 が鋳型塩基の異なる2種類の tRNA^{His} に対し、どのように GTP を付加するかは不明である。

我々の生化学実験から、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。次に、未だ構造情報が得られていない 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、mtRNA^{His} の一部を含む hThg1 の立体構造を 4.0 Å 分解能で決定することに成功した。得られた hThg1 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。興味深いことに、確認された mtRNA^{His} の一部と思われる電子密度はこの β シート近傍に位置していた。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 D-loop と T-loop の相互作用部位を認識している。このことから、hThg1 においても mtRNA^{His} 認識に β シート領域が関与する可能性が示唆された。得られた生化学実験と立体構造情報の結果を統合することで、hThg1 には鋳型塩基に応じた2種類のヌクレオチド認識機構が存在することを提唱した。

⁽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

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

PF タンパク質結晶構造解析ビームラインでの全自動測定と リモート実験

An automated unattended experiment and a remote interactive experiment at PF macromolecular crystallography beamlines

山田悠介^{1,2}、篠田晃¹、松垣直宏^{1,2}、引田理英^{1,2}、平木雅彦^{2,3}、千田俊哉^{1,2}

¹KEK, IMSS, SBRC, ²総研大高エネ研究科, ³KEK, MEC

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

MXビームラインにおける実験の全自動化、およびリモート化はこれまでも段階的に進めてきたが、新型コロナウイルス感染症拡大の影響もありその重要性・必要性が2020年度一層高まった。そこでビームラインの運用体制を見直し、全ての実験課題において全自動測定やリモート実験といった実験スタイルを利用者が必要に応じて選択できるよう制度変更を行った。その結果、現在ではユーザーが来所をしない全自動測定とリモート実験の実験スタイルが約75%のビームタイムを占めるようになった。

全自動化、リモート化を行う上では実験装置の整備はもとより、ユーザーから送付されてくる試料や測定後のデータを適切かつ正確に取り扱うことも重要であり、このための荷物の流通管理システムやデータバックアップ体制の整備を行い、2020年10月の運転よりユーザーへと供している。本発表では、現在のPFタンパク質結晶構造解析ビームラインにおける全自動測定とリモート実験についての現状と、今後の開発計画について紹介する。

タンパク質結晶核生成を制御可能とする 結晶育成装置の開発

Development of a crystal growth system for controlling protein crystal nucleation

長谷川智紀¹, 斉藤洋也², 田中伊知朗^{1,3}, 新村信雄², 山田貢⁴,
石田卓也⁴, 吉崎泉⁴, 皆川由貴⁵, 根本忠洋⁵, 真栄城正寿⁶

1 茨城大院理工, 2 茨城大工, 3 茨城大フロンティア, 4 JAXA,
5 株式会社化研, 6 北海道大学

タンパク質の構造解析の手法の一つに中性子構造解析がある。これは X 線構造解析に比べ、水素原子の観察が容易になり結晶内のタンパク質の分子構造が崩れることもない。しかしながら、中性子は X 線に比べて強度が小さいので大形良質結晶が必要となる。

ここで結晶化相図を用いれば原理的に大形良質タンパク質結晶を作製することが先行研究で見出されている^[1]。しかし、そのために必要な結晶や結晶化の制御が必要となる。そこで、株式会社化研の先行研究においてマイクロ流路内で結晶が離散的に形成されたことを応用し結晶化制御を可能にすることを見出した。これらを踏まえて 1 次元の微小空間内でタンパク質結晶育成を行い、マイクロ流路内における結晶間隔の再現性の確認、また結晶間距離と流路との関係と法則の解明に向けて実験を行い、大形良質タンパク質結晶作製に必要な少数の結晶核生成手法の確立を目指した。

本研究の実験で用いたマイクロ流路はポリジメチルシロキサン (PDMS) とスライドガラスで構成された流路でそれぞれ深さ

20~95 μm 、幅 20~100 μm の組み合わせになるように作製した。これらの一部の流路の中にリゾチームの

結晶化相図に基づいた条件のリゾチームと結晶化剤 NaCl を含んだ溶液を加えて数日静置し、流路中に生成した結晶の様子を観察を行った。

本研究の実験の結果、先行研究で観察された離散的に結晶が形成される現象を今回用いたマイクロ流路においても同じ現象が見られた。またマイクロ流路内で形成した結晶数とマイクロ流路内の溶液体積、タンパク質濃度に相関が見られた。上記で見られた現象や統計処理の結果を報告する。^[2]

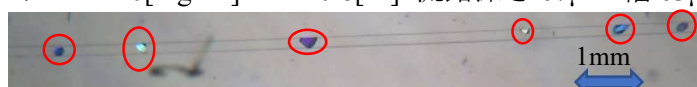
[1] Niimura et al.2011., “Neutron Protein Crystallography Hydrogen, Protons, and Hydration in Bio-macromolecules.” Oxford University Press (2011), p.52

[2] 田中ら, 「マイクロ流路デバイスを用いた結晶製造方法及び装置」.

特願 2020-198815.



リゾチーム:40[mg/ml] NaCl:0.8[M] 流路深さ 67 μm 幅 63 μm



リゾチーム:20[mg/ml] NaCl:0.8[M] 流路深さ 67 μm 幅 100 μm



リゾチーム:15[mg/ml] NaCl:0.8[M] 流路深さ 67 μm 幅 100 μm

リゾチームの糖加水分解速度の制御 Control of sugar hydrolysis rate of lysozyme

梅田 翔希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センター

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加水分解反応機構は提案されているが、いまだに様々な反応機構が議論されている[1]。現在、最も強く提唱されている反応機構は、リゾチームの中間体は共有結合を作成し反応が進むというものであるが、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[2]。X 線自由電子レーザー(XFEL)での高速動画技術を駆使できた場合、上述のような加水分解反応の一瞬を何とかとらえるだけでなく、この反応の最初から最後までをスローモーションのように追跡することが可能となる。最初の反応は 10^{-12} 秒程度と大変早く、ゆがんだ D 鎖の環(オキソカルベニウムイオン)の観測はいまだ誰も成功していない。高速動画撮影によって、どこまで明らかにできるかは、回折分解能に依存するのはもちろん、加水分解反応の微小結晶全体での制御により反応の進行を十分ゆっくりにして、試料(結晶)全体で加水分解反応が同時進行できるようにするところが重要である。加水分解反応速度を低下する条件を検索するために、低 pH 条件、抗凍結剤の混合、重水の使用などを試みた。

実験に用いたリゾチームは SIGMA 社の HEWL(ニワトリ卵白リゾチーム)を使用し、糖は SIGMA 社の *Micrococcus lysodeikticus* を用いて、吸光度計による濁度測定を行った。

pH を変えての濁度測定の結果低 pH 側での加水分解反応速度の低下を確認できた。また抗凍結剤については、グリセリン、スクロース、PEG を混ぜての実験を行い加水分解反応速度の低下がみられた。

Reference

[1] Y. Abe et al., *Prot. Sci.*, 25 (2016) 1637–1647

[2] D. J. Vocadlo et al., *Nature* 412 (2001) 835–838

還元型 Cytochrome *c'* の X 線結晶構造解析 X-ray crystal structure analysis of Reduced Cyt *c'*

鶴野湧也¹、山口峻英^{1, 2}、高妻孝光^{1, 2}

1 茨城大学、2 IFRC

Cytochrome *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。その単量体の構造は4本の α ヘリックスバンドル構造を有しており、活性部位の構造は His120 を軸配位子とする 5 配位構造をとっている。その生理的機能は、NO リザーバー、電子伝達体と考えられている。酸化型 Cyt *c'* の電子状態は、中性 pH 条件においては、中間スピン状態(IS: $S = 3/2$)と高スピン状態(HS: $S = 5/2$)の量子力学的混合状態であると解釈されている。これまで、アルカリ条件($8 < \text{pH} < 12$)においてヘリックス C、D 間の水素結合ネットワークが変化し、ヘム鉄は HS 状態に転移することを明らかにしてきた。さらに、pH 13 付近において Cyt *c'* は Open-bundle 型構造をとり、ヘム鉄の電子状態が 6 配位低スピン状態(6c-LS)に変化することを、X 線結晶構造解析、ESI-MS、MCD、CD、SANS によって明らかにしてきた[1-3]。本研究では、還元型 Cyt *c'* における詳細な構造を X 線結晶構造解析によって検討した。

pH 6.0 に調製した Cyt *c'* を含む母液とリザーバー溶液に、還元剤として 2-メルカプトエタノール、沈殿剤に硫酸アンモニウムを加え、ハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶を作成した。Photon Factory BL-5A を用いて X 線回析実験を行ったところ、得られた結晶は空間群 $P6_522$ に属し、格子定数 $a = b = 52.67 \text{ \AA}$, $c = 182.67 \text{ \AA}$ ($\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$)であった。また、最分解能 1.24 \AA で構造を決定し、現在の R 値は 15.8%、 R_{free} は 18.7%である。

参考文献

- 1: A. Takashina et al., *Bull Chem Soc. Jpn*, **2017**, 90, 169-177
- 2: A. Takashina et al., *Chem Lett*, **2015**, 44, 268-270
- 3: T. Yamaguchi et al., *unpublished results*.

高度好熱菌由来 CoA transferase の制御タンパク質の構造 機能解析

Structural and functional analyses of regulatory protein for CoA transferase from *T. thermophilus*

吉田彩子^{1,2}、山本寛之¹、富田武郎^{1,2}、西山真^{1,2}

1 東大 BRC、2 東大 CRIIM

タンパク質翻訳後修飾の一つであるリジンアセチル化は近年バクテリアにおいても代謝酵素等とその存在が見いだされており、タンパク質アセチル化と代謝調節との関連が示唆されている。我々は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* において高度にアセチル化されているタンパク質として、CoA transferase (CoAT) を同定している。CoAT は、1 分子のアシル CoA を CoA donor として消費し、短鎖脂肪酸から短鎖アシル CoA を ATP などのエネルギー非依存的に合成する反応を可逆的に触媒する酵素である。これまでに *T. thermophilus* の CoAT がアセチル化修飾を受けるだけでなく、alanine dehydrogenase (AlaDH) と相同性を持つもののその活性は示さない alanine dehydrogenase-like protein (ADLP) と相互作用し、NAD⁺ 依存的に活性阻害を受けることを明らかにしている。CoAT 活性は ADLP·NAD⁺ によって阻害されるものの ADLP·NADH によっては影響を受けないことから、ADLP が細胞内の NAD⁺/NADH 比のセンサーとして働くことが示唆された。そこで、我々は ADLP の機能を詳細に明らかにするため、NAD⁺ や NADH に対する結合様式や ADLP の X 線結晶構造解析について解析を行った。

CoAT·ADLP の複合体に対する NAD(H) の結合親和性を ITC (isothermal titration calorimetry) を用いて測定した。その結果、NAD⁺ の CoAT·ADLP に対する K_d が 3.1 μ M であるのに対し、NADH の K_d は 0.34 μ M であり、NADH に対する親和性が高いことが分かった。これと一致して、ADLP 存在下で 1 mM NAD⁺ 添加によって低下した CoAT 活性が、10 μ M の NADH 添加によって阻害が一部解除され、0.1 mM の NADH によって完全に阻害が見られなくなった。このことから、ADLP が NAD⁺/NADH 比にตอบสนองして CoAT 活性を制御することが明らかとなった。また、ADLP と apo 型及び NAD⁺ 結合型での結晶構造を決定することに成功した。ADLP は hexamer 構造をとっており、その fold は典型的な AlaDH のものとよく似ており、NAD⁺ の結合様式についても同様であった。構造比較を行ったところ、NAD⁺ 結合により apo 型に比べ閉じた構造をとることが明らかとなった。NAD⁺ 結合による ADLP の構造変化が CoAT·ADLP 複合体において CoAT の構造変化が誘起され、CoAT 活性の阻害が生じることが示唆された。

CENP-SX 複合体による新規クロマチン形成 Novel chromosomal architecture 'CENP-SX chromatin'

伊藤翔¹、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

セントロメア局在タンパク質 CENP-SX 複合体(CENP-SX)はヒストンフォールドを有し、キネトコア形成および DNA 修復で相互作用相手を変えて機能する。キネトコアは染色体セントロメア領域に形成され、細胞分裂時に微小管と染色体をつなぐインターフェースとして機能する。CENP-SX は CENP-TW と CENP-TWSX 複合体を形成し、正常なキネトコア形成に重要である。一方、DNA 修復経路においては FANCD1 遺伝子(Fanconi Anemia 修復経路と呼ばれる二重鎖切断修復経路で機能する遺伝子)のひとつである FANCD2 と相互作用して機能していることが知られている。FANCD2 と CENP-SX の相互作用が失われると正常な DNA 修復経路の活性化が行われない。CENP-SX の変異体解析より、CENP-SX の DNA 結合が重要な役割を担っているが詳細な DNA 認識機構は不明である。本研究では、先行研究のゲルシフトアッセイで明らかとなった CENP-SX による規則的な DNA 結合を詳細に解析し、CENP-SX の DNA 認識機構解明のため DNA との共結晶構造解析を試みた。PF-BL1A にて X 線回折データを取得し、構造決定は CENP-SX と DNA を使って分子置換法により行なった。結晶構造中では3分子の CENP-SX が一本の直線的な二重鎖 DNA に対して規則的に結合していた。規則的な DNA 結合には、(1)CENP-S の天然変性領域、(2)CENP-SX 4 量体による DNA 結合界面の正電荷アミノ酸、(3)3 分子の CENP-SX 間に生じる静電相互作用が重要であることがわかった。CENP-SX と DNA によって形成される非対称的なユニットは DNA 修復やキネトコア形成に重要な相互作用因子のリクルートにおいて重要であると考えられ、カノニカルなヌクレオソームとは異なる新規なクロマチン形成を示唆する。今後は規則的な DNA 結合が CENP-TW や FANCD2 との相互作用にどう影響するかを検証していく。

Class IB 大型テルペン合成酵素の基質-金属イオン複合体 の結晶構造解析

Crystal structure of the class IB large terpene synthase in complex with ligand and metal ion

金本壮平¹、佐藤努²、品田哲朗³、三木邦夫¹、深井周也¹、藤橋雅宏¹
(¹京大・院理, ²新潟大・農, ³阪市大・院理)

テルペン合成酵素は反応開始様式や motif 配列の違いにより 2 つのクラスに分類される。大型テルペン(C₂₅ 以上)の合成を触媒する BsuTS¹ は Class I 型の反応開始様式を示すが、Class I に共通する motif 配列が見られないため新たなサブクラス Class IB に分類される。この BsuTS のホモログである BalTS も Class IB に分類され、C₃₅ テルペンの反応を触媒する。我々のグループは BalTS の基質非結合型構造² 及び基質結合型構造³ を決定したが、その基質結合型構造において反応に必須な Mg²⁺ を同定できていない点が問題となっていた。

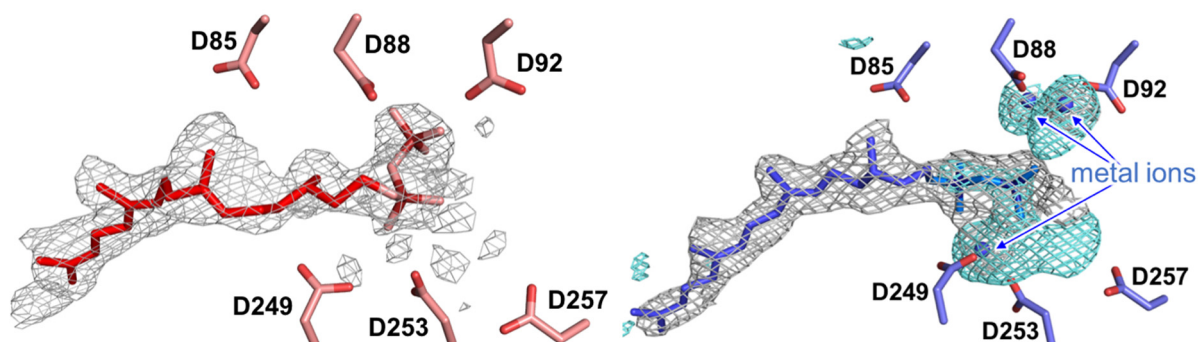


図 1. BalTS の基質認識部位

左:金属イオン非結合型³, 右:金属イオン結合型。灰色は $F_o - F_c$ omit 電子密度図(左 3.0σ , 右 3.5σ)、水色は異常分散差フーリエ図(3.0σ)を示している。

図 1 右は、新たに得た結晶の基質認識部位であるが、図 1 左には存在しない金属イオンと考えられる電子密度が見られた。異常分散差フーリエ図を通してこの金属イオンのイオン種の同定を行った上で構造精密化を行い、Class IB 酵素における反応機構の決定に繋がりたいと考えている。

文献

1. Sato, T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*(2011), **133**, 9734-7.
2. Fujihashi, M. *et al.*, *Chem. Sci.* (2018), **9**, 3754-8.
3. Stepanova, R. *et al.*, *ACS Chem. Biol.* (2020), **15**, 1517-25.

納豆菌由来 YabJ タンパク質の1アミノ酸変異による 四次構造変化

Alteration of the quaternary structure of *Bacillus subtilis* YabJ protein by one amino acid mutation

藤本 瑞、岸根 尚美、ル ティ テウ ホン、木村 啓太郎
農研機構・解析セ/農研機構・食品研

納豆菌 *Bacillus subtilis* (natto)の生産するポリ- γ -グルタミン酸 (poly- γ -glutamate; γ PGA) は、グルタミン酸が γ -カルボキシル基と α -アミノ基の間で重合した分子量約 200 万ダルトン(2MDa)にも及ぶポリペプチドであり、その生産はクオラムセンシングとその後の複雑なカスケード機構により制御されている。degQ 遺伝子は γ PGA 合成に関わる1因子でありその破壊株は γ PGA 生産能を失う。 γ PGA 生産制御に関わる新たな因子を探索するため degQ 遺伝子破壊株の γ PGA 生産を回復させる復帰抑制変異のスクリーニングを試みたところ、得られた抑制変異株では yabJ 遺伝子に1アミノ酸置換変異が存在した。変異型 yabJ 遺伝子を親株(degQ 遺伝子破壊株)に導入したところ、 γ PGA 生産と γ PGA 合成遺伝子発現の回復が確認された。

YabJ タンパク質は高度に保存された YjgF/YER057c/UK114 ファミリーに属するエナミン・イミン化合物の解毒(脱アミノ化)酵素であると報告されている。納豆菌においては、YabJ タンパク質は酵素ではなく、シグナル伝達のカスケード機構内の位置役割を担うと考えられているが、YabJ タンパク質のアミノ酸置換変異により yabJ 遺伝子産物が活性型となり、 γ PGA 合成を直接制御する下流の転写因子である DegU の発現量を増加させたと推定された。

1999 年に決定された結晶構造によると YabJ はホモ 3 量体を形成しており、そのサブユニット間に形成される空隙内で脱アミノ反応を行う酵素であることが後に報告されている。見出された変異体を作成し大腸菌で発現したところ、脱アミノ反応活性については確認されなかったが、Native 電気泳動およびゲル濾過クロマトグラフィーでは変異体タンパク質は野生型タンパク質よりも大きな分子量を有することが示され、変異が入ることによってその立体構造や多量化機構に変化が生じた可能性が示唆された。1アミノ酸変異によりどのような立体構造変化が起こり、 γ PGA の生産回復が引き起こされるのかを明らかにするために、機能獲得変異型 YabJ の立体構造解析を行なった。1アミノ酸変異により異なる多量化構造となるメカニズムを立体構造により考察する。

新規祖先型 L-アミノ酸酸化酵素の構造機能解析 Structural and functional analysis of ancestral L-amino acid oxidase

中野祥吾^{1,2}、小塚康平¹、南野優季¹、烏田裕香¹、長谷部文人¹、伊藤創平¹
1 静岡県大食栄、2 JST さきがけ

近年、ペプチド医薬品に代表される中分子医薬品が注目されており、その前駆体となる光学純度の高いアミノ酸誘導体の合成法の確立が求められている。中でも D-アミノ酸酸化酵素と還元剤を組み合わせた化学-酵素反応系による動的光学分割法は、ラセミ体のアミノ酸誘導体から L-体を高い光学純度で合成可能な手法として、広く利用されてきた。D-体のアミノ酸誘導体の合成に関して、酵素を L-アミノ酸酸化酵素 (LAAO) に変えて同様の反応を適用することで可能となる。しかし LAAO は大腸菌発現系を用いた大量発現が難しく、今日までその応用が停滞していた。

我々は先行研究により、独自のアミノ酸配列解析手法を用いて、配列データベース上より新規 LAAO を発見、祖先型設計により大腸菌発現系にて大量発現可能かつ D-体のアミノ酸誘導体の光学分割に適用可能な LAAO (AncLAAO) の設計に成功した (1)。AncLAAO の反応機構に興味を持たれたが、Blastp 解析の結果、AncLAAO と E 値が 0.001 未満で一致する PDB データは存在せず、新規な活性中心構造を有することが示唆された。しかし AncLAAO の結晶を得ることはできず、その構造は未決定のままであった。

AncLAAO の立体構造を決定するため、祖先型設計を用いて系統樹上に存在する計 5 つの AncLAAO を復元・発現させ、結晶化実験を行った。結果、AncLAAO-N5 と名付けた祖先型酵素について良質な結晶を得ることができ、かつヨウ素 SAD 法による位相決定に成功した。L-Trp や L-Phe 複合体も含めて 2.2-2.6Å 分解能で立体構造を決定した (図 1)。AncLAAO-N5 の立体構造から活性中心を同定、その情報を基に合理的設計を行い、本酵素の基質選択性を変換することに成功した (2)。本研究により、AncLAAO を用いた D-アミノ酸誘導体の合成法開発への貢献が期待される。

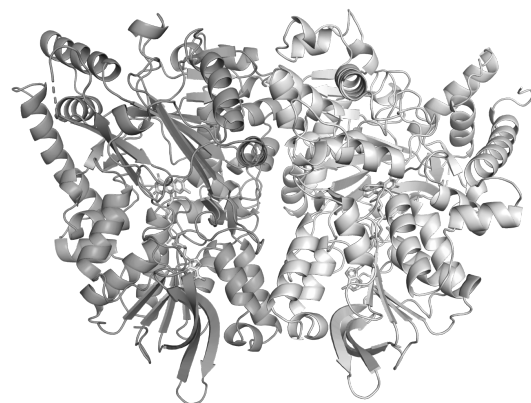


図 1, AncLAAO-N5 の全体構造。活性中心に FAD を有する。

参考文献

- [1] S. Nakano *et al.*, *ACS Catalysis*, (2019), **9**, 10152-10158,
[2] S. Nakano *et al.*, *Communications Chemistry*, (2020), **3**, 181

全自動多点測定システムと MR Native-SAD 法を用いた構造決定 Structure determination using full-automated small-wedge data collection system and MR Native-SAD phasing method

小林 淳、山田 悠介、篠田 晃、
松垣 直宏、引田 理英、千田 俊哉、加藤 龍一
KEK・物構研・構造生物

X 線結晶構造解析で生体高分子の立体構造を決定する場合、一定の大きさの単結晶1つから 1 つの完全なデータを収集する手法が長らく主流であった。しかしながら、近年我々が立体構造を決定したターゲットの中には、結晶成長が困難なケースも多々あり、1つの結晶から1つの完全なデータを収集することが難しい微結晶しか得られないものが複数あった。このようなサンプルについては、SPring-8/ZOO 全自動測定システムを用いて多数の微結晶（露光点）から少しずつデータを収集し、それらをマージすることによって構造決定を行うことができた。

このような背景のもと、(1) PF のタンパク質結晶構造解析ビームラインにも全自動多点測定システムを導入すること、(2) PF のビームライン、特に BL-1A の強みである、微弱な異常分散シグナルを高精度に収集し、より迅速かつ簡単に構造決定を行えるようにすること、を目的としたシステムの開発を進めている。

本発表では、そのシステムの評価を行った結果について報告する。評価用のサンプルは、SPring-8/ZOO システムで既に構造決定済みの微結晶とした(抗体 L 鎖のみ、 $P6_322$, 8 硫黄原子/227 アミノ酸、1 分子/ASU)。微結晶サンプルは複数個をループでラフに拾い、液体窒素で凍結した。ループ上の微結晶の位置を 2D スキャンで確認し、一定分解能以上の各露光点について、波長: 1.9 Å、ビームサイズ: $13 \times 13 \mu\text{m}^2$ 、Total ϕ : 40° (osc. 0.1°)、Dose: 5 MGy としてデータ収集を行った。得られた各データは KAMO によりマージし、統計値から 3.0 Å 分解能のクラスターを 1 つ選び、解析データとした。

上記データをアミノ酸配列相同性 40%の別の抗体 L 鎖を template として、(1) Phaser + AutoBuild を用いた MR 単独、(2) CRANK2 を用いた MR-SAD、(3) Phaser-EP + AutoBuild を用いた MR-SAD を行い、構築されたモデルの質を R_{free} で評価した。結果として、CRANK2 で MR-SAD を行った場合に、MR 単独と比べて R_{free} が 10%以上低い良好なモデルを構築することができた。当該モデルは問題なく精密化・最終化できた。位相の改善には Met95 の硫黄原子を使用していた。

これらの結果から PF における全自動多点測定システムにより、MR Native-SAD による構造決定の迅速化/簡便化が達成できることを示せた。まもなく外部ユーザーへの供用を開始する予定である。

Clostridium acetobutylicum 由来 Rubrerythrin の構造解析 Structure analyses of Rubrerythrin from *Clostridium acetobutylicum*

伊藤拓未¹、川崎信治²、庄村康人¹

1 茨城大学 大学院 理工学研究科、2 東京農業大学 生命科学部

【目的】 Rubrerythrin(Rbr)は分子量約 20,000 の過酸化水素分解能を持つ非ヘム鉄タンパク質である。N 末端側に 2 核鉄部位を含む Ferritin 様ドメインを、C 末端側に Rubredoxin(Rd)様ドメインを持ち、生理的に 2 量体を形成する。一方で偏性嫌気性細菌 *Clostridium acetobutylicum*(Ca)を低酸素濃度条件下で生育させた時に酸素によって誘導される Rbr^[1]は、N 末端側に Rd 様ドメイン、C 末端側に Ferritin 様ドメインと順序が逆に配置されている。本研究では、Ca-Rbr の構造を解析し、既知の Rbr(硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris*(Dv)由来と超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* (Pf)由来)との比較を行った。

【方法】 タンパク質の産生には大腸菌の発現系を用い、N 末端側に挿入した Strep タグを利用したアフィニティーカラムおよびゲルろ過カラムによる精製を行い、最終精製標品とした。その後得られた精製標品を用いて結晶調製、X 線結晶構造解析、および X 線小角散乱測定を行った。

【結果・考察】 結晶構造解析の結果、Ca-Rbr 野生体は結晶中で Trimer of dimers の 6 量体を形成し、2 量体同士の界面に亜鉛イオンが配位していた。しかし亜鉛結合部位に変異を入れた 2 点変異体(Rbr(H155S/H159S))では、野生体と同様に 6 量体を形成していたが、2 量体界面に亜鉛は結合しておらず、6 量体形成に亜鉛イオンが関与しないことが示唆された。また両構造は活性部位や Ferritin 様ドメインの α -helix の歪みなどの違いがみられ、生理的な環境を考慮すると 2 点変異体の構造が本来の構造に近いと考えられる。

Ca-Rbr と既知の構造との比較では、2 量体形成時に Ca-Rbr に見られるドメインスワッピング構造は、Pf-Rbr と同様であった。一方で RMSD 値は Dv-Rbr の構造と近いことを示唆し、これらの活性部位は 1 箇所の Glu-Ala 間の位置の反転を除いてほぼ同じ配位様式を取っていた。

Ca-Rbr の結晶構造からは Rd ドメインの電子密度が観測されなかったが、これは Ca-Rbr の 6 量体形成によって Dv-Rbr の Rd ドメインの位置では立体障害が生じ、同様の構造を取れないことが関係していると考えられる。小角散乱測定の結果と散乱曲線に対応した Rd ドメイン予測モデルの計算により Rd ドメインの位置に関するアンサンブルが得られたことから、Ca-Rbr の Rd ドメインは溶液中で特定の位置に配向していないことが示唆された。

【参考文献】

[1] Kawasaki. S et al. AEM. 2009. 75. pp. 1021-1029

ヒト VASH1/SVBP 複合体の構造解析 The structural analysis of human VASH1/SVBP

池田聡人¹、浦田せいあ¹、安藤格士²、鈴木康弘³、佐藤靖史³、西野達也¹

1 東京理科大学 基礎工学部 生物工学科 西野研究室

2 東京理科大学 基礎工学部 電子工学科 安藤研究室

3 東北大学未来科学技術共同研究センター(NICHe)および東北大学加齢医学研究所腫瘍循環研究分野

vasohibin は血管内皮細胞が産生する血管新生因子として同定された。ヒトにおいて2つのサブタイプ vasohibin1(VASH1) と vasohibin2(VASH2) が存在し、どちらも small vasohibin binding protein(SVBP) と安定に複合体を形成し、細胞外へと分泌される。特に発生初期段階の血管内皮細胞で血管内皮細胞増殖因子(VEGF)によって誘導され、VASH1 は血管新生に抑制的、VASH2 は亢進的に働くことが知られている。特にがんにおいては細胞増殖と共に血管新生は重要な役割を果たしており、多くのがん細胞で VASH2 の発現量の向上がみられた。

近年、血管新生やがんとは別に神経細胞伸長の領域において、vasohibin は α -チューブリンの脱チロシン化酵素として同定された。この報告を皮切りに、複数の結晶構造が報告された。結晶構造の決定により、SVBP との複合体形成や基質の認識、酵素活性の分子機構が明らかとなった。創薬ターゲットとしてより現実的な議論が可能になった一方で、vasohibin 酵素活性の制御や他の協働する因子との関係性、細胞外への分泌経路など不明な点が多く残っている。

本稿で明らかにした vasohibin の結晶構造は、報告された複数の結晶構造と全体的な構造は一致していたが、N 末端領域に大きな差異があった。そこで、詳細に比較して結果、本結晶構造においては、結晶中の 2 回転対称軸の隣接 VASH1 分子と N 末端領域を介してヘテロ四量体を形成していることが明らかとなった。ヘテロ四量体は 56 番目から 67 番目のアミノ酸残基から成る N 末端領域を相互に交換し合うことで安定化していた。N 末端領域の水素結合および疎水性結合のパターンは、ヘテロ二量体を形成する他の構造と異なることも明らかになった。さらに、分子動力学シミュレーションを行ったところ、ヘテロ四量体は全体構造の安定性が示唆されたことに加え、ヘテロ二量体に比べて N 末端領域の変動が抑制されていた。

本研究より、VASH1/SVBP 複合体において新規なヘテロ四量体の形成と N 末端領域の可動性が発見されたことで、酵素活性の制御機構ならびに細胞外分泌経路に関する新たな可能性が示唆された。

ヒトリゾチームの原子分解能構造解析に向けた 結晶化条件の探索

Screening of crystallization condition for atomic resolution structural analysis of human lysozyme

○中屋 美咲¹、菊池 愛¹、吉田 裕貴¹、菅野 晴香¹、
阪本 泰光¹、野中 孝昌¹

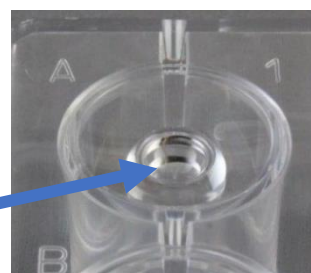
○Misaki Nakaya¹, Ai Kikuchi¹, Yuuki Yoshida¹, Haruka Kanno¹,
Yasumitsu Sakamoto¹, Takamasa Nonaka¹

1. 岩手医科大学薬学部構造生物分野

1. Sch. Pharm, Iwate Med. Univ.

リゾチームは、ムラミダーゼとも呼ばれ、グラム陽性細菌の β -1,4'グリコシド結合で交互につながった N-アセチルムラミン酸(NAM)と N-アセチルグルコサミン(NAG)からなる細胞壁のペプチドグリカンを分解し溶菌する加水分解酵素である。リゾチームは、ニワトリの卵白、ヒトの涙、唾液、痰や鼻汁に含まれており、ヒトでは 130 個、ニワトリでは 129 個のアミノ酸残基からなる。

ヒトリゾチームの結晶構造解析の最高分解能は、1.04 Å (PDBID 2NWD)であり、1 Å 分解能を超えるヒトリゾチームの構造解析によるヒトリゾチームの反応機構および基質認識機構の原子分解能での理解を目指し、コメ発現リコンビナント ヒトリゾチームを用いて、結晶化条件のスクリーニングおよび結晶化条件の最適化をハンギングドロップ蒸気平衡拡散法で実施した。得られた結晶を用いて、放射光施設 SPring-8 BL44XU にて回折強度データを収集し、1 Å を超える原子分解能でのデータ収集に成功した。現在、構造精密化と多糖との複合体構造解析に加えて、さらに高分解能の回折強度データの収集を目指している。ハンギングドロップ法ではドロップの液量が少量(数~数 10 μ l 程度)に限られてしまう。現在は結晶の大型化を目指し、ドロップの液量が数~数 100 μ l 程度に設定できるシッティングドロップ蒸気平衡拡散法を用いて試みている。シッティングドロップ蒸気平衡拡散法では、プレートがポリスチレン製で水との接触角が 68° であり、結晶を取り出す際に結晶が中央のくぼみ(→)に付着してしまう可能性があるため、水との接触角が 170° となる超撥水性バイオミメティック素材であるトーヤルロータスをくぼみに貼ることで結晶のくぼみへの付着の改善を試みている。今後は、得られた結晶を放射光施設にて測定を行い、解析をしていく予定である。



蛋白質脱イミノ化酵素 PAD3 の構造機能相関解明 Elucidation of the structure-function relationship of peptidyl arginine deiminase type 3

澤田瑞季¹、舟橋一真¹、高原英成^{2,3}、海野昌喜^{1,3}

1 茨城大院理工、2 茨城大農、3 茨城大フロンティア

【緒言】タンパク質脱イミノ化酵素(PAD)は、Ca²⁺依存的に、タンパク質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する反応(シトルリン化)を触媒する酵素の総称である。哺乳類の PAD には 5 つのアイソザイムが存在し、それらの中には関節リウマチや多発性硬化症等の様々な病気の発生に関与しているものもある。そのため、アイソザイム選択的阻害剤の設計が強く望まれる。また、PAD4 は自身もシトルリン化することが以前に報告されているが[1]、PAD3 が自己シトルリン化反応を触媒するかは報告されていない。Ca²⁺結合型 PAD3 の構造を明らかにし、PAD3 に関する機能を調査することで、構造と機能の相関を解明し、アイソザイム選択的阻害剤に関する新たな洞察を与える。

【実験】大腸菌発現系で遺伝子を発現し、PAD3 を 3 種類のクロマトグラフィーで精製し、蒸気拡散法で結晶化した。前任者が構造解析した Ca²⁺結合型の PAD3 は高濃度 Ca²⁺との共結晶化で得られ、アーティファクトであると考えられたため、本研究では結晶に低濃度 Ca²⁺をソーキングすることで改善を試みた。SLS での全自動測定で得た回折データをもとに X 線結晶構造解析を行った。また、PAD3 の機能を調べるために活性測定を様々な条件下で行い、自己シトルリン化の有無を調べるためにウエスタンブロットを行った。

【結果と考察】X 線結晶構造解析の結果、Ca²⁺結合型 PAD3 の構造を分解能 2.82 Å で得ることに成功した。低濃度 Ca²⁺存在下で得られた構造では、高濃度 Ca²⁺存在下での構造とは異なり、Ca²⁺が他の PAD アイソザイムと同じ位置に結合し、活性部位が形成されることが分かった。この構造と PAD アイソザイムの構造や活性部位の大きさや電荷について比較することで、PAD3 選択的阻害剤設計に新たな洞察を与えた。また、Ca²⁺濃度と反応時間に依存して自己シトルリン化が起こることを確認した。さらに、自己シトルリン化した PAD3 の活性が野生型 PAD3 と比較して約 4 割減少することや阻害剤 Cl-amidine を添加した場合、以前報告された PAD3 に対する Cl-amidine の IC₅₀ 値[2]と概ね一致することが分かった。

【参考文献】

[1] F. Andrade, et al. 2010. Arthritis Rheum. 62(6). 1630–1640.

[2] J. E. Jones, et al. 2012. ACS Chem Biol. 7(1). 160–165.

DNA 酸化損傷修復酵素 hOGG1 の 塩基除去機構の解明に向けた構造生物学的研究 Structural Biology for elucidation base excision mechanism of DNA oxidative damage repair enzyme, hOGG1

箕輪希海¹, 小室智稀¹, 田中好幸², 海野昌喜¹
茨城大¹, 徳島文理大²

【緒言】ヒト 8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ(hOGG1)は DNA の酸化損傷塩基である 8-オキシグアニンの除去を行うグリコシラーゼ反応に加え、この反応によって生じる脱塩基部位の 3' 末端側を切断する β リアーゼ反応を行う二機能グリコシラーゼである。このうち β リアーゼ反応については Lys249 が関与する触媒機構が明らかとなっている [1]。それに対してグリコシラーゼ反応については、Lys249 及び Asp268 が触媒残基として同定されているが、その触媒機構は未だ不明である。本研究ではグリコシラーゼ反応において脱離する 8-オキシグアニンに対しプロトン供与を行うと推察されている Lys249 をヒスチジンに変異し、活性を pH 依存的なものとした K249H 変異体を用いることで、グリコシラーゼ反応中間体を X 線構造解析で直接観察し、グリコシラーゼ反応触媒機構を解明することを目的として hOGG1K249H の精製を行った。

【実験】形質転換した大腸菌を培養したのち、His-tag アフィニティークロマトグラフィー、HRV3C プロテアーゼによる His-tag の切断、His-tag アフィニティイオン交換連結クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行い、hOGG1K249H の試料を得た。

【結果と考察】培養培地 1 L あたりおよそ 4.15 mg の hOGG1K249H 精製試料が得られた。吸光度測定の結果 A260/A280 比は 0.528 であった。hOGG1WT (野生型) の精製時(収量 7.4 mg/L、A260/A280 比 0.514)と比較して収量はおよそ 6 割ほどであった。また、A260/A280 比は上昇したが両者ともに純度の指標である 0.55 を下回っており、精製中にタンパク試料に結合する DNA を十分に取り除けていると判断した。又、ゲル濾過クロマトグラフィー前後で A260/A280 比が低下していたことから本タンパクの精製におけるゲル濾過クロマトグラフィーのステップは DNA 複合体の調製を目的としたこの精製に必要であることが分かった。今後は今回精製した試料を用いて 8-オキシグアニン含有 DNA との複合体を調製し、結晶化条件[2]の最適化及び X 線構造解析とともに野生型と阻害剤複合体の結晶化条件の探索を行う予定である。

【参考文献】

- [1] Fromme, J.C. *et al. Nat. Struct. Biol.* 10, 204-211 (2003)
- [2] 小室智稀, 修士論文, 茨城大学 (2019)

<L. 生物物理、生物化学(結晶構造解析)>
P2-110L 欠番

30K 付近でのタンパク質結晶回折実験の実用化 Practical operation of MX experiment at around 30K

松垣直宏、引田理英、山田悠介、千田美紀、千田俊哉
KEK-PF SBRC

ガス吹き付け法は、試料の温度を制御する簡便な方法として広く利用されてきた。放射光によるタンパク質結晶回折データ収集は、高輝度ビームによる放射線損傷を低減する目的で、試料を低温にした状態で行われる。試料回りの自由度の高さや簡便性から、ほぼすべてのタンパク質結晶構造解析用ビームラインにおいて 100K 付近に冷却した窒素ガスを試料に吹き付ける方式が採用されている。

試料をさらに低い温度に冷却するためにはヘリウムガスを用いる必要がある。しかし、ガス吹き付けが解放空間で行われるため、高価なヘリウムガスを大量に消費することになる。30~50K でのデータ収集が放射線損傷に対してより有効であるとの結果も報告されたが、費用対コストの観点から実際の利用は限定的なものにとどまってきた。

KEK-PF の BL-1A では、4keV 近傍での低エネルギー回折実験を精度良く行うため、試料を含む回折計全体が常時ヘリウムガスを満たした閉空間内に置かれている。経済的な運転のため、試料に吹き付けられた低温ヘリウムガスは循環・再利用される。循環するヘリウムガスに不純物(主に窒素・酸素)が含まれるため、これまで試料への吹き付けガス温度は 100K 付近とする必要があったが、循環経路にガス純化装置を導入することで、30K 付近までの低温測定が可能となった。さらに、純化装置の再生が必要となる約 10 時間、連続して測定が可能である。一方、純化装置の再生のためには 2~3 時間を要し、その間は 30K での低温測定は中断される。運転と再生の切り替えは自動で安全に行われるよう、システムを構築した。

発表では、30K での吹き付けガス運転の詳細および、実際のタンパク質結晶構造解析における放射線損傷への効果について、報告したい。

タンパク質の核偏極中性子回折実験 Protein diffraction experiment with dynamic nuclear polarization

西野妃香¹・山内秀輝²・能田洋平^{2,3}・前田知貴³・小泉智^{2,3}・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センター

【緒言】中性子回折実験における、水素のさらなる検出感度向上法として、動的核偏極(DNP)法がある。これにより、水素からの散乱長が従来の最大約 8 倍となり、軽水素試料でも高 S/N 比のデータが得られる。このためには、試料結晶中にラジカルを導入し、高磁場(数 T)かつ極低温(1K 程度)の条件にする必要がある。本研究では、以前常伝導マグネット(2.5T)で TEMPOL 50mM のリゾチーム多結晶にて DNP 実験を行い、22.3%の偏極率を達成している[1]。さらに高偏極率を実現するために MLF BL20 に設置されている 7T マグネットを用いて、中性子ビームが出ていない条件でのタンパク質多結晶の核偏極実験を行い、50mM TEMPOL 濃度で最大偏極率は正負で約 40%を達成した。今回は、中性子ビームを用いて回折実験を行い、粉末ピークの強度変化がみられるかを試した。

【実験】Sigma-Aldrich 社より購入したリゾチームとラジカル TEMPOL を、TEMPOL が 100mM、50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5、NaCl 9%、リゾチーム 60mg の 1.5mL スケールでの室温バッチ法にて共結晶化し、沈殿部の約 100mg の多結晶に対して抗凍結剤としてグリセロールを 30%(w/v) 混合し、テフロンと石英窓のセルに封入した。MLF 出力は 600kW、入射中性子 93%、試料 +68%(4h)、-59%(2.5h)、0%(1h; 無偏極; 4.2K 平衡状態)の偏極率で BL20 にて中性子回折実験を行い、磁場 7T、温度約 1.2K、マイクロ波 188GHz の DNP 条件であった。なお、この試料は、PF 実験で粉末パターンが確認されている。

【結果】動径方向の中性子強度グラフ($I(q)$)から、 $q=0.1\sim 0.2\text{ \AA}^{-1}$ 付近に粉末ピークが数本確認できた。また、試料偏極率によって、バックグラウンドと各粉末ピーク強度に違いが出ており、非干渉性散乱の変化によるバックグラウンドの変化及び特に水素の中性子散乱長の変化による回折ピーク強度の変化から、偏極度を解析する予定である。また、リゾチーム結晶が正方晶($P4_32_12$; $a=b\approx 80\text{ \AA}$, $c\approx 40\text{ \AA}$)だとすると、 $q=0.1\text{ \AA}^{-1}$ の最大ピークは(110)反射に相当し、約 60 \AA の面間隔に相当する。

参考文献

[1] Tanaka et al., Acta Cryst. D74 (2018) 787-791.

TGF- β シグナル伝達系にみられる 転写因子複合体の構造多様性 Structural diversity of transcriptional factor complexes in TGF- β signaling.

宮園健一¹、和田ひかる¹、森脇沙帆¹、大野陽介¹、伊藤友子¹、深津由衣²、
栗崎晃^{2,3}、浅島誠²、田之倉優¹

¹東大院・農生科、²奈良先端大・先端科学技術、³産総研

TGF- β は、細胞の増殖・分化、細胞死、免疫応答、細胞外マトリックス産生等の制御を担う多機能性のサイトカインである。TGF- β のシグナルは、細胞表層において、SMAD2 および SMAD3 (SMAD2/3) のリン酸化へと変換される。リン酸化を受け活性型となった SMAD2/3 は、別の転写因子 SMAD4 とヘテロ複合体を形成し、シグナル依存的な遺伝子発現の制御を行う。

SMAD2/3 の機能は、多様な別のタンパク質 (SMAD2/3 補因子) によって厳密に制御されている。SMAD2/3 に対し特異的に結合する補因子は 300 種以上存在することが知られているが、それら補因子には共通する SMAD2/3 結合モチーフがほとんど存在せず、なぜ多数の補因子が SMAD2/3 に対して特異的に結合できるかは不明であった。

本研究では、SMAD2/3 を中心とする多様な転写因子複合体 (転写因子 FOXH1 複合体、転写抑制因子 SKI 複合体、転写活性化因子 CBP 複合体、脱リン酸化促進因子 MAN1 複合体) の構造を決定した (下図)。得られた複合体構造を精査すると、SMAD2/3 の分子表面上には補因子結合性の疎水性小領域が複数存在しており、各補因子はそれらの 1 つないし複数を利用することによって、SMAD2/3 に対して結合するという新たな機構が明らかになった。TGF- β シグナルの異常は、がんや線維症などの重篤な疾病へとつながる。

SMAD2/3 を中心とした転写因子複合体のネットワークが明らかになれば、疾病の治療につながる新たな知見が得られることが期待される。

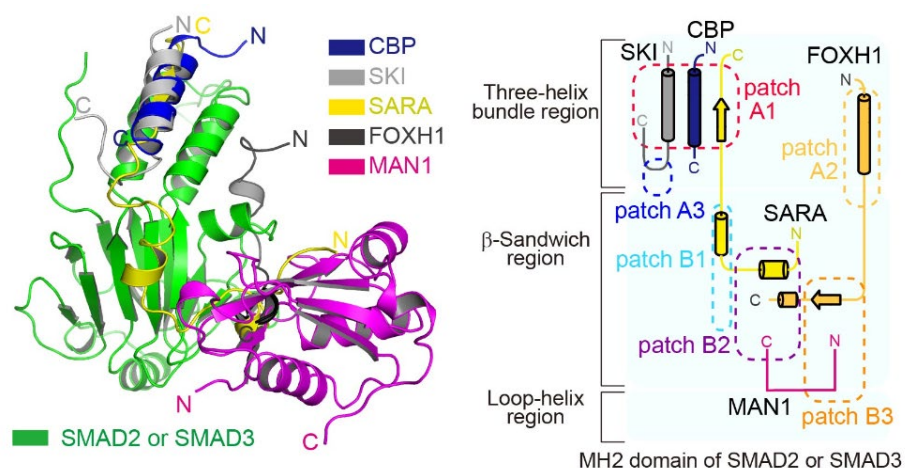


図: SMAD2/3-補因子複合体の立体構造とそのモデル図

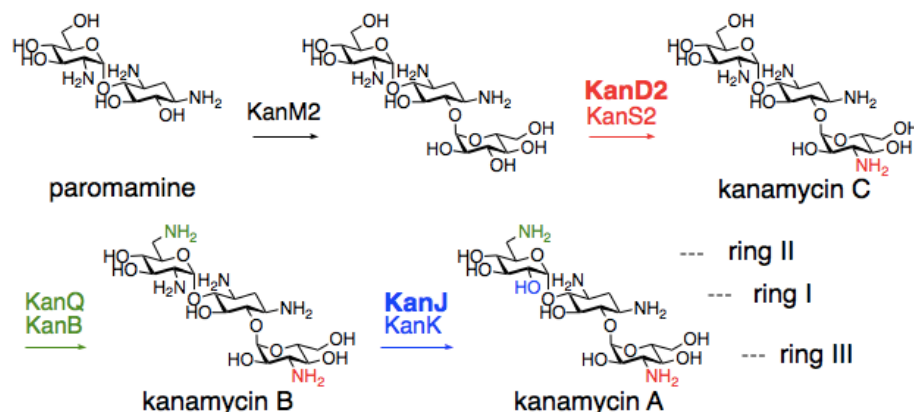
カナマイシン生合成酵素 KanD2 と KanJ の結晶構造解析 Structural analysis of kanamycin biosynthetic enzymes KanD2 and KanJ

宮永顕正¹、北山幸延¹、工藤史貴¹、江口正¹
1 東京工業大学理学院

アミノグリコシド抗生物質は、カナマイシンやストレプトマイシンなどが知られており、古くから重要な抗生物質として使用されてきた。その化学構造は、アミノサイクリトール骨格にアミノ糖やデオキシ糖が複数連結した擬似オリゴアミノ糖であり、組み合わせにより多種多様なアミノグリコシド抗生物質が知られている。アミノグリコシド抗生物質の大多数は、アミノサイクリトール部位に 2-デオキシストレプタミン (2-DOS) を有している。これら 2-DOS 含有型アミノグリコシド抗生物質の生合成においては、パロマミンを共通中間体として生成した後、糖転移やアミノ化などそれぞれの生合成経路に特徴的な修飾反応を受け、多種多様な構造を有するアミノグリコシド抗生物質が構築されると考えられている。

当研究グループでは、これまでに放線菌 *Streptomyces kanamyceticus* が生産するカナマイシンの生合成研究を進めてきた。その結果、以下の生合成経路を明らかにした (図)。すなわち、糖転移酵素 KanM2 が UDP-グルコースを糖供与体として、パロマミンを配糖化し擬似三糖骨格を形成する。次に、酸化酵素 KanD2 とアミノ基転移酵素 KanS2 が、導入されたグルコース部位 (ring III) の 3' 位水酸基をアミノ基へと変換する。酸化酵素 KanQ とアミノ基転移酵素 KanB が ring II の 6' 位水酸基をアミノ基へと変換し、最後にジオキシゲナーゼ KanJ と還元酵素 KanK が ring II の 2' 位アミノ基を水酸基へと変換することによってカナマイシン A が生成する。

KanD2 は単糖類であるグルコースには作用しないことから擬似三糖骨格を認識していると考えられるが、その認識機構は不明であった。また、KanJ は ring II の 6' 位にアミノ基を有する基質を好んで認識することが明らかになっているが、その認識機構は不明であった。そこで、KanD2 と KanJ の基質認識機構を明らかにすることを目的として結晶構造解析を行った。本発表ではその詳細について議論する。



シュウドアズリン Met16 変異体の X 線結晶構造解析および QM/MM 計算

X-ray Crystal Structure Analyses and QM/MM Calculations of Pseudoazurin Met16 Variants

山口峻英¹、タボロシ アティラ¹、森 聖治¹、高妻孝光¹
¹ 茨城大学

The effects on the structure and function of non-covalent weak interactions at the second coordination sphere of blue copper protein, Pseudoazurin (PAz) WT and Met16 (Phe, Leu, Val, Ile) variants were studied (Figure 1). The X-ray crystallographic analyses combined with quantum mechanical calculations allowed us to identify the S- π /CH- π (Wild Type), face-to-face or face-to-edge π - π (Met16Phe), double CH- π (Met16Leu) and single CH- π (Met16Val and Met16Ile) interactions in the second coordination sphere of Met16X PAz. Definite correlation between the calculated interaction energies and the previously reported spectroscopic/electrochemical properties [1,2] clarified the tuning of the Cu active site and the protein stability through these non-covalent weak interactions.

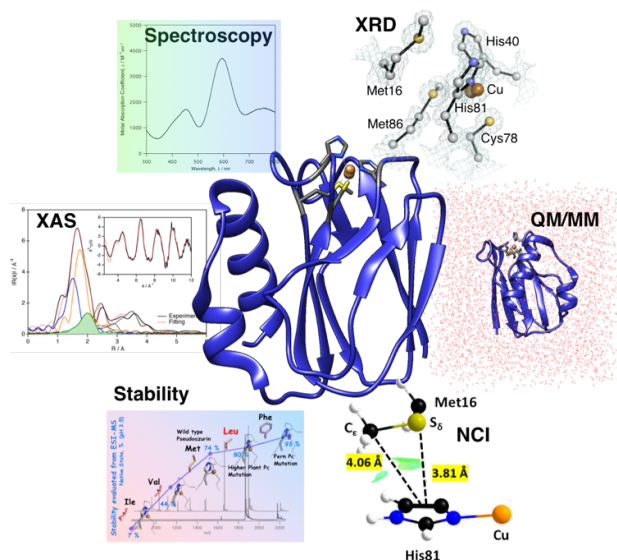


Figure 1. Integrative studies of non-covalent weak interaction in blue copper protein, pseudoazurin.

References

- [1] R. F. Abdelhamid, *et al.*, *J. Bio. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 165–173.
- [2] T. Yamaguchi, *et al.*, *Protein Science*, **2017**, *26*, 1921–1931.

糖転移反応を触媒する glycoside hydrolase family 35 酵素 の機能構造解析

Structural and functional analysis of a glycoside hydrolase family 35 enzyme catalyzing transglycosylation

小林海渡¹、田口速男¹、中井博之²、中島将博¹

1 東京理科大学 理工学部、2 新潟大学 農学部

(目的、方法) β -1,2-グルカンは天然に存在する希少な糖鎖であり、それゆえに β -1,2-グルカンの合成や分解に関わる酵素に関する報告は少ない。近年、 β -1,2-グルカンをエンド型で分解する β -1,2-グルカナーゼ(SGL)遺伝子が同定されたことにより、 β -1,2-グルカン関連酵素探索が容易になった。グラム陰性菌 *Ignavibacterium* はゲノム上に SGL 遺伝子をもち、その周辺が遺伝子クラスターを形成している。その遺伝子群には glycoside hydrolase family 35 に属する遺伝子(SGT)が含まれているが、その大半は β -ガラクトシダーゼであり、グルコシドに作用する酵素は報告されていない。そこで、この SGT 遺伝子産物を大腸菌を宿主として生産し、その機能と構造の解析を行った。

(結果) SGT の各種グルコオリゴ糖に対する活性を調べたところ、 β -1,2-グルコオリゴ糖に対してグルコシドを糖転移する活性を示し、他の基質に対して活性を示さなかった。そこで、 β -1,2-グルコオリゴ糖に対する酵素反応速度論量を調べたところ、糖質関連酵素としては低い活性を示したため、ソホロース(β -1,2-グルコ二糖)を糖供与体として各種グルコシドを用いて糖受容体の探索を行った。その結果、芳香環を有するグルコシドに対して高い活性を示した。次にこの酵素の X 線結晶構造解析を行い、2.0 Å の分解能で立体構造を得ることに成功した。SGT 結晶にグルコースをソーキングしたところ、サブサイト +1 のみにグルコースが明確に観察された。また、活性を欠失した変異体にソホロースをソーキングしたところ、サブサイト -1 と +1 にソホロースが明確に観察された。しかし、 β -1,2-グルコ三糖との複合体ではサブサイト +2 のグルコース部分は基質ポケットとやや立体障害になる位置に存在しており、これが糖転移活性を低くする構造的要因と考えられる。芳香環を有するグルコシドとの複合体構造を取得したところ、グルコシド結合のアノマーにかかわらず、グルコース部分はサブサイト +1 に結合していた。また、アグリコン部分は疎水性残基で囲まれた領域に結合していた。以上より、SGT が β -1,2-グルコオリゴ糖を基質として、芳香環を有するグルコシドにグルコースを転移する酵素であることが明らかとなった。

***Burkholderia stabilis* 由来**
コレステロールエステラーゼの結晶構造
Crystal structure analysis of *Burkholderia stabilis*
cholesterol esterase

安武義晃^{1,2}, 小西健司^{3,4}, 村松周治³, 吉田圭太郎¹, 油谷幸代^{1,2,5},
酒瀬川信一³, 田村具博^{1,2,4}

1 産総研・生物プロセス、2 CBBDOIL、3 旭化成ファーマ(株)、4 北大院農、
5 産総研・細胞分子工学

グラム陰性細菌 *Burkholderia stabilis* が細胞外に分泌するコレステロールエステラーゼ (BsChe) は、よく知られた細菌トリアシルグリセロールリパーゼ (Lip) のホモログである。BsChe は、高い安定性と実用的な Che 活性を示す希少な Lip の一種であり、現在、総血清コレステロール値を測定するための臨床診断用酵素として使用されている。BsChe がなぜ Che 活性を発露できるのかを構造学的側面から詳細に調べるため、BsChe の X 線結晶構造解析を行った。その結果、既知 Lip 構造では報告例のない活性部位のクレフトに局所的な構造変化が見られ、これは基質結合と生成物の放出に関係している可能性が示唆された。一方、基質あるいは生成物との複合体結晶の取得が困難であったため、解析した BsChe 構造と基質であるリノール酸コレステロールエステル (CLL) の分子ドッキング計算を行った。その結果、CLL のエステル結合の炭素原子が BsChe の触媒残基 Ser87 に隣接するように結合したドッキングポーズは全て、ステロール部位が Leu266 と Ile287 によって形成される特定の活性部位クレフト表面に集まる様子が観察された。これらアミノ酸に変異導入を行ったところ、Che 活性が消失したことから、これら2アミノ酸が Che 活性の決定因子であることが示された。またこれらの Leu/Ile 残基を近縁の Lip ホモログに導入したところ、特に *Burkholderia cepacia* および *Burkholderia ubonensis* の Lip は、野生型酵素と比較して、それぞれ 50 倍、500 倍高い Che 活性を示した。これらの結果は、*Burkholderia* が持つ Lip 酵素群の基質結合機構と選択性についての新たな知見を与えるものである。

PcyA D105N-BV 中性子結晶構造解析に 向けた結晶大型化 Crystal growth for PcyA D105N-BV Neutron Crystal Structure Analysis

茨城大学¹・久留米高専²・久留米大学³・宮崎大学⁴・大阪大学⁵
七澤諒太¹, 堀江和輝¹, 萩原義徳², 杉島正一³, 和田啓⁴,
福山恵一⁵, 海野昌喜¹

フェレドキシン依存性ビリルジン還元酵素 PcyA はヘム分解産物であるビリベルジン(BV)を出発物質として2段階の還元反応によりビリルジン色素の1つであるフィコシアノビリルジン(PCB)の生合成反応を触媒する。この反応の特徴はPcyAが基質 BV の異なる2つの部位を一定の順序で特異的に還元することである。我々は野生型(WT)PcyA-BV 複合体の中性子結晶構造解析により、BV とプロトン化した BVH⁺が混在し、その付近に存在する Asp105 もプロトン化、脱プロトン化しそれぞれが別のコンホメーションをとっていることを見出した^[1]。BV の2つのプロトン化状態は計算科学的に予測されていた PcyA-BV 複合体の吸収スペクトルとの相関関係と一致する結果であった^[2]。また、Asp105Asn(D105N)変異体および Ile86Asp(I86D)変異体と BV との複合体の吸収スペクトルでは、WT で見られた長波長側のピークがそれぞれ消滅および増大していた。本研究の目的は、D105N-BV 複合体の中性子構造解析を行い BV や周辺アミノ酸残基のプロトン化状態を明らかにし、PcyA-BV や I86D-BV との比較により、吸収スペクトルとの相関関係を証明することである。

本研究室では PcyA D105N-BV 複合体の中性子構造解析を行ったが、分解能やデータの質が悪く、BVのプロトン化状態について決定することができなかった。そこでより高分解能の回折データを得るために結晶化の検討を行い、測定に十分な大きさの良質結晶が複数得られた。本発表では中性子回折強度データ収集に向けた良質な大型結晶の作製および中性子回折実験の結果について報告する。

【参考文献】

[1] Unno, M., *et al.*, (2015) *J.A.C.S.*, 137, 5455–5458

[2] Hagiwara, Y., *et al.*, (2016) *FEBS Lett.*, 590, 3425–3434

高分解能 X 線解析によるリゾチーム加水分解機構の再検討 Re-examination of lysozyme hydrolysis mechanism by high-resolution X-ray structural analysis

西野宮良太¹, 田中伊知朗^{1,2}, 茶竹俊行³

1 茨城大院理工, 2 茨城大フロンティアセンター, 3 京都大複合研

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間のグリコシド結合を切断する酵素で、50 年以上前に構造が決定されたものであり、これまで様々な触媒機構が提案されている。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[1]。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)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水素結合等を X 線回折実験を行い解析した。

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、糖は Megazyme 社の(NAG)₄をそれぞれ使用した。50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.5 (重水を使用)、NaCl 0.7M、リゾチーム 40mg の 5+5 μL スケールでの室温ハンギングドロップ法にて共結晶化し、抗凍結剤としてグリセロールを 30% (w/v) 混合した。X 線回折実験は、PF-AR NW12A, 5A, NE3A にて行い、温度は 100K で測定した。また、中性子回折 BL-03 (iBIX)にて室温でのテスト測定も行った。

X 線解析では、1.03 Å 高分解能データ解析ができ、問題の触媒反応機構に関係する基質とアミノ酸との相互作用が明らかになった。リゾチームの触媒残基 Asp52 の側鎖と(NAG)₄の C1 の距離は結合するには長すぎると考えられること、Asp52 側鎖に対して周辺の水素結合が比較的強く形成されているので、C1 との共有結合に必要な Asp52 側鎖の回転が起こりにくいことが推測できた[2]。今後、中性子解析にて、これらの水素結合等を詳細に明らかにする予定である。

参考文献

- [1] D. J. Vocadlo et al., Nature 412 (2001) 835.
- [2] I. Tanaka et al., Acta Cryst. D (2021) in press.

カルボニルストレスを伴う統合失調症における CRMP2 タンパク質の機能異常解析

Enhanced carbonyl stress induces irreversible multimerization of CRMP2 in schizophrenia pathogenesis

蔣 緒光^{1*}・豊島 学^{2*}・小川 覚之¹・吉川 武男^{2§}・廣川 信隆^{1§}

1 東京大学大学院医学系研究科 細胞生物・解剖学教室 2 理化学研究所脳
神経科学研究センター 分子精神遺伝研究チーム * 筆頭著者 § 責任著者

カルボニルストレスは生体内で反応性カルボニル化合物がタンパク質を非酵素的に修飾し、終末糖化産物(AGEs)の蓄積を促進する。近年およそ2割の統合失調症患者においてカルボニルストレスの亢進が報告され、カルボニルストレスの除去機構に関わる酵素 *GLO1* 遺伝子の変異が統合失調症患者で見つかっている。しかし、カルボニルストレスがどのようなメカニズムで統合失調症に関わるのかは不明のままであった。本研究は iPS 細胞を用いてカルボニルストレスの影響を分子レベルまで詳細に調べ、カルボニルストレスの分子病態を明らかにした。まず、カルボニルストレスを伴う統合失調症患者で変異が確認された *GLO1* 遺伝子に着目し、患者由来 *GLO1* 変異 iPS 細胞と、*GLO1* KO iPS 細胞を作製した。これらの iPS 細胞を用いてニューロスフィアや神経細胞を作製すると、*GLO1* 遺伝子の異常によりニューロスフィアの生育が悪く、神経細胞の突起伸長も低下した。*GLO1* KO iPS 細胞において強くカルボニル化修飾を受ける主要なタンパク質を探索し、神経突起の伸長に関わる CRMP2 を同定した。さらに質量分析により iPS 細胞内の CRMP2 タンパク質の 60 箇所にあぶカルボニル化修飾の位置を決定した。このカルボニル化修飾は CRMP2 の (1) 表面電荷を大きく変化させること、(2) 複合体形成に重要な部位に密集し、カルボニル化 CRMP2 では微小管との結合や微小管を束ねる活性が失われていた。このカルボニル化 CRMP2 複合体の構造を X 線結晶解析によって詳細に調べると、AGE 修飾によって CRMP2 複合体内部で不可逆的に架橋が形成されており、CRMP2 のダイナミックな動きの喪失が示唆された。サイズ排除クロマトグラフィーによって CRMP2 複合体のサイズを解析すると、修飾のない CRMP2 が 4 量体を形成するのに対し、カルボニル化 CRMP2 は大きな不可逆的多量体を示した。この多量体は *GLO1* KO iPS 細胞においても検出され、更にピリドキサミン添加により多量体が軽減した。これらの結果から、カルボニルストレスを伴う統合失調症の患者細胞内では、カルボニル化修飾を強く受けた CRMP2 が不可逆的に多量体化して微小管の束化機能が失われ、神経の形態形成を正常に行えないという分子病態が明らかとなった。

Crystal structure analysis on the binding modes of inhibitors for HIV-1 RNase H activity

Huiyan Lu, Koto Usami, Tyuji Hoshino

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Reverse transcriptase of HIV-1 converts viral RNA into DNA in host cell. When RNA is no longer needed, it is degraded by a nuclease active domain that is inherent in reverse transcriptase. The nuclease active domain contains two bivalent metals and is central to the catalytic function of cleaving nucleic acids. The action caused by the nuclease active domain of HIV-1 is called RNase H activity because it cleaves only RNA in a complex of single-stranded DNA and RNA.

To search for inhibitory molecules, reverse transcriptase recombinant proteins were expressed in *E. coli*. and purified by column chromatography. Chemical screening was performed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) method, using a probe with a fluorochrome conjugated to the RNA and with a light absorber added to the DNA. From the screening, it was found that a compound having a nitro-furan skeleton structure has an activity inhibiting effect. Analogues were obtained by organic synthesis and structure-activity relationships of the identified active compounds were examined. Nitro-thiophene was also found to have RNase H inhibitory activity.

In order to carry out a drug modification design for improving the inhibitory activity, a nuclease activity domain was expressed and purified to produce a single crystal, and then an inhibitory compound was introduced by soaking to obtain a binding structure with the X-ray crystal analysis. The protein crystal was also produced under the condition of the coexistence of the inhibitory compound. The crystal structure revealed that the nitro group and its adjacent carbonyl oxygen were chelated with two divalent metals in the active domain and attached to the metal site. Furthermore, some synthetic compounds do not inhibit human RNase H, but block the viral RNase H activity. The structure-activity relationship and X-ray crystallographic analysis provided a guide for the development of compounds that inhibit only viral RNase H.

Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase PM α の構造と機能 Structure and function of Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase PM α

大倉和貴¹, 森真司², 伊藤和央², 米澤健人³, 清水伸隆³, 神谷信夫⁴, 宮原郁子¹
(¹大阪市大院理・物質分子, ²大阪市大院理・生物地球,
³KEK 物構研, ⁴大阪市大・人工光合成セ)

我々は、native な糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離する Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase の探索、機能・構造解析を行っている。

P.melaninogenica の産生する Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase PM α (Endo PM α) は、アスパラギン結合型糖鎖のうち複合型糖鎖に特異的に作用し、糖鎖転移活性を示す。Endo PM α は、糖質加水分解酵素ファミリー 85(GHF85)に分類され、1009 アミノ酸残基から構成されるモノマー酵素である。今回、Endo PM α の結晶構造を、2.1 Å 分解能で N 末端の膜貫通ドメインを除く 28~1008 残基について決定したので報告する。

Endo PM α は、5つのドメインから構成されており、N末端側からドメイン I~V とした。ドメイン I は、触媒ドメインとされる (α/β)₈ バレルで構成されており、さらに β ドメインであるドメイン II, III がドメイン I のバレルの側面に配置していた。ドメイン I~III を含む構造は、GHF85 に属する EndoA とドメイン間の相対配置を含め非常に良く似ていることが明らかとなった。また、EndoA で酸塩基触媒と想定されている Glu と Asn の空間配置も一致していたことから、EndoPM α でも同じ部分が触媒部位と考えられた。C 末端の 50 アミノ酸残基からなるドメイン V は、独立した1つの β ドメインを構成しており、この領域を欠損しても活性に関与しないことや、アミノ酸配列の相同性から外膜移行シグナルとして働く領域と推測された。ドメイン IV は、これまでに明らかとなっている GHF85 に属する酵素には存在しない、約 170 アミノ酸残基から構成される β バレル構造である。ドメイン III と IV の間には約 30 アミノ酸残基からなる長いループ構造が存在し、ドメイン IV は触媒部位を覆うように、ドメイン I の上側に存在していた。ドメイン IV を欠損させると活性が消失することから、ドメイン IV は糖鎖の基質認識にかかわると考えられた。Autodock Vina を用いて、今回得られた構造の糖鎖結合モデルを作成し、基質特異性について考察をおこなった。複合型糖鎖の五糖母核構造部分は、推測される触媒残基で反応が進行するように触媒部位にドッキングすることが出来、ドメイン II に存在する残基との相互作用を明らかにすることが出来た。しかし、糖鎖の側鎖部分がドメイン IV と衝突してしまうことが分かった。一方、SAXS 実験で得られた EndoPM α の構造は、結晶構造とは異なっており、溶液状態ではドメイン IV の位置が結晶構造とは異なっていると考えられた。

昆虫グルタチオン S-転移酵素 Noppera-bo を標的とした 阻害剤の構造活性相関解析 Structure-activity relationship analysis of inhibitors targeting mosquito glutathione S-transferase Noppera-bo

稲葉和恵¹、海老原佳奈¹、小祝孝太郎²、吉野龍ノ介³、広川貴次⁴、
今村理世⁵、小島宏建⁵、岡部隆義⁵、長野哲雄⁵、井上英史⁶、藤川雄太⁶
佐久間知佐子⁷、嘉糠洋陸⁷、湯本史明²、千田俊哉²、丹羽隆介⁸

1 筑波大・生命環境、2 高エネ研・物構研・構造生物、3 筑波大・医学医療、
4 産総研・創薬分子プロファイリング研究セ、5 東大・創薬機構、
6 東京薬大・生命科学、7 慈恵医大・熱帯医学、8 筑波大・TARA セ

ネッタイシマカ *Aedes aegypti* は Dengue 熱や黄熱などの感染症媒介虫として問題となっており、ネッタイシマカ駆除に用いることができる殺虫剤の開発は世界的に強く求められている。本研究では、こうした殺虫剤開発のターゲットとして、昆虫の脱皮と変態の誘導に必須の脱皮ホルモンであるエクジステロイドの生合成に着目した。エクジステロイドは節足動物特異的なステロイドホルモンであり、食餌由来のコレステロールを出発点として生合成される。本研究ではエクジステロイド生合成制御酵素の中で、2014 年同定されたグルタチオン S-転移酵素(GST)である Noppera-bo (Nobo) (Enya et al. *Sci. Rep.* 2014) を新規殺虫剤開発の標的として、阻害剤との相互作用の解明を試みた。

まず、*in vitro* の酵素活性測定系にてハイスループットスクリーニングを行い、Nobo を阻害する化合物が複数得られた。それらの中で、フラボノイド骨格を持つ化合物に注目したスクリーニングを行い、最終的に 11 種のフラボノイド阻害化合物を得た。次に、これら阻害化合物の Nobo に対する結合様式を明らかにするために X 線結晶構造解析を行った。その結果、2 つの阻害化合物との複合体構造を、それぞれ 1.95Å と 1.75Å の最大分解能で決定することに成功した。これらの構造情報を基に構造活性相関解析を行い、阻害において重要な Nobo のアミノ酸残基および阻害化合物の構造的特徴を明らかにした。さらに、これらの阻害化合物が、10 ppm の濃度でネッタイシマカの幼虫に対して殺虫効果を発揮することが明らかになった。

今回得られた Nobo と阻害化合物の相互作用に関する化学的知見は、人や環境に影響の少ない昆虫発育阻害剤の探索・創出の基礎となると考えられる。

糖質加水分解酵素ファミリー65 に属する α -1,2-グルコシダーゼの基質認識機構の解明 Structural analysis of substrate recognition mechanism in α -1,2-glucosidase

中村駿太郎¹、宮崎剛亜^{1,2}

1 静大院・総合科技・農、2 静大グリーン科技研

[目的] 糖質加水分解酵素ファミリー65 (GH65) は加リン酸分解酵素と加水分解酵素の両方が分類されているファミリーであるが、既報のバクテリア由来 GH65 酵素は全て加リン酸分解酵素であった。我々はこれまでに GH65 に属する *Flavobacterium johnsoniae* 由来のタンパク質 (FjGH65A) が天然に希少であるコージビオースを特異的に加水分解する α -1,2-グルコシダーゼであることを明らかにした [1]。本研究では FjGH65A の X 線結晶構造解析によって、その基質認識や反応機構を立体構造から明らかにすることを目的とした。

[方法・結果] N 末端側に His-tag を融合させた組換え FjGH65A の結晶をハンギングドロップ蒸気拡散法により作製し、PF AR-NW12A および BL5A ビームラインにおいて X 線回析強度測定を行った。位相の決定は KAuCl_4 にソーキングした単結晶を用いた単波長異常分散法により行い、FjGH65A のアポ構造とグルコースとの複合体構造をそれぞれ 1.8 Å と 1.4 Å 分解能で決定した。FjGH65A の全体構造は他の GH65 酵素と共通しており、N 末端側に β -サンドイッチ構造の N-ドメイン、 $(\alpha/\alpha)_6$ バレルの触媒ドメインおよび C 末端側の β -シートドメインで構成されていた。FjGH65A のアポ構造とグルコース複合体構造の RMSD は 0.172 Å であり、主鎖に大きな差異は認められなかった。グルコース複合体では、FjGH65A 1 分子につき β -グルコースが 4 分子結合しており、そのうちの 3 分子は活性部位に結合していた。サブサイト-1 の β -グルコースの 1 位の炭素原子とサブサイト+1 の β -グルコースの 2 位の酸素原子が最も近接していた。サブサイト+1 の β -グルコースと水素結合をとる Glu472 とサブサイト-1 の β -グルコースと水素結合をとる Gln539 はアポ構造と比較するとコンフォメーションが変化していた。

参考文献

[1] 中村駿太郎、宮崎剛亜、朴龍洙、日本応用糖質科学会 2020 年度大会要旨集、2020 年

阻害剤を用いた β -L-アラビノフラノシダーゼの研究 Inhibitor-based studies on β -L-arabinofuranosidase

味木 智子¹、澤野 孝太¹、成田 覚^{2,3}、鈴木 健裕³、荒川 孝俊^{1,4}、山田 千早^{1,4}、堂前 直³、藤田 清貴⁵、石渡 明弘³、伊藤 幸成^{3,6}、伏信 進矢^{1,4} (¹東大院・農生科・応生工, ²芝浦工大院理工、³理研、⁴東大・微生物連携機構、⁵鹿児島大院農、⁶阪大院理)

ビフィズス菌は植物細胞壁を構成する糖タンパク質である β -L-アラビノオリゴ糖を分解する酵素群を有する。そのうち、GH127 に属する β -L-アラビノフラノシダーゼ (HypBA1) は、その立体構造から Cys417 を求核性触媒残基とした糖質加水分解酵素初のシステイングリコシダーゼであると提唱された。この仮説の検証を行うため、活性中心の Cys と共有結合を形成する不可逆的阻害剤 (ブromoアセトアミド基を有する α/β -L-アラビノフラノシルアミン誘導体、 α/β -Br amide) を合成した。先行研究において、 α/β -Br amide との複合体の結晶構造解析が行われ、 β 体は Cys417 と共有結合していたのに対し、 α 体は隣接する Cys415 と共有結合していた。なお、Cys415 は保存されておらず C415S/A 変異体は完全には活性を失わない。今回は、質量分析と変異体を用いた複合体の結晶構造解析を行い、さらなる検証を行った。

LC-MS/MS を用いて、阻害剤が結合したアミノ酸残基を特定し比率を調べた結果、野生型酵素では α 体、 β 体ともに主に Cys415 がラベルされていたが、Cys417 へのラベルも観測された。変異体を用いた場合、C415S では 50%以上の Cys417 がラベルされており、C417S では 20~30%程度の Cys415 がラベルされていた。変異体との複合体構造では、活性中心に Br amide の電子密度マップは確認されなかった。また、リガンドが結合していない HypBA1 の構造と同様に、活性中心部分とそれを覆うループがディスオーダーしていたことから、結晶化したのは Br amide が結合していない一部の變異体 HypBA1 である可能性が高いと考えられる。

加えて、同様の阻害形式を取ると考えられる β -L-アラビノフラノシル型シクロフェリトール阻害剤との複合体構造を 1.75 Å の分解能で決定した。活性中心にこの阻害剤と考えられる電子密度が存在し、阻害剤の 1 位の炭素と Cys417 が共有結合していることを確認した。

新規レクチン様タンパク質の結晶構造解析と 糖との結合解析

Crystal structure analysis and sugar binding analysis of a novel lectin like protein

影山大夢¹、小野寺かこ¹、松井崇^{1,3}、小川智久^{1,2}、横山武司¹、田中良和¹
1 東北大院・生命、2 東北大院・農、3 北里大・理

本研究では、熱帯地方の海綿抽出物中に見出された新規レクチン様タンパク質の構造と機能の解析に取り組んだ。まず、大腸菌発現系を用いて調製したレクチン様タンパク質を結晶化し、PF-BL5AにてX線回折データを収集した。既知のレクチンの構造を用いた分子置換法による構造決定を試みたが、位相決定できなかつたため、AR-NW12 に併設された結晶加工装置にて結晶を円柱状に加工し、これを用いてPF-BL1Aにて2.7 Åの波長のX線回折データを収集した。硫黄の異常散乱効果を利用したSAD法により位相決定し、その構造を1.4 Åの分解能で決定した。得られた構造は既知のレクチンと類似した構造を有していたが、ベータシートの一部の向きが異なっていたことから、分子置換法の並進関数の計算において隣接分子と立体障害が起きるために、分子置換法では構造決定できなかつたと考えられる。次に、生化学的解析により糖結合活性を評価した。糖結合カラムを用いた実験からフコース、マンノースと結合することが確認できた。そこで、これらの糖との複合体の結晶構造解析を行い、糖の結合様式を明らかにした(図)。いずれの糖も3つの水酸基がCa²⁺イオンを介して認識されており、このレクチン様タンパク質の糖鎖特異性を明らかにできた。さらに、等温滴定型熱量測定(ITC)および表面プラズモン共鳴(SPR)によりフコース、マンノースとの結合の詳細を評価したところ、フコースにはK_D=4μM程度の強さで結合するものの、マンノースに対する結合性はフコースに比べて著しく低いことがわかった。糖結合カラムや結晶構造解析では2つの糖鎖の結合に差異は確認されなかつたのに対し、ITCやSPRによる精密相互作用解析では大きな違いが確認されたことは注目すべき点である。

これらの結果は、高濃度の試料を用いて行う生化学実験や結晶構造解析で得られる結果が、必ずしも正しい分子特性を示さないことがあることを意味しており、構造解析と精密な物理化学解析を並行して実施することの重要性が改めて示された。

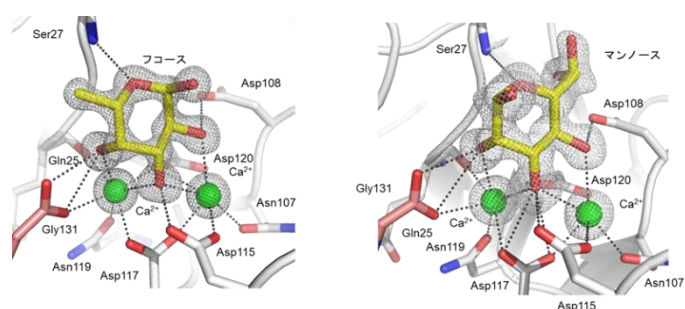


図 レクチン様タンパク質とフコース(左)及びマンノース(右)の複合体結晶構造

高度好熱菌由来 Mn-カタラーゼの結晶構造解析 Crystal structure analysis of Mn-catalase from *Thermus thermophilus* HB27

高木 夕里圭¹, 高野 紗和², 高橋 果林¹, 山田 太郎³, 庄村 康人^{1,2,3}

1 茨大・工・生体分子機能工, 2 茨大・院理工・量子線科学,
3 茨大・フロンティアセンター

【背景】過酸化水素がもつ殺菌・漂白等の作用は、廃水処理や半導体の洗浄など幅広い分野で工業的に利用されている。Mn-カタラーゼは活性部位に二核 Mn クラスタをもつ過酸化水素分解酵素で、廃水中に含まれる過酸化水素を分解する触媒としての利用が期待されているが、その触媒機構の詳細は解明されていない。本発表では、X線・中性子結晶構造解析による Mn-カタラーゼ触媒作用の反応機構の解明に向けた発現系の構築、培養条件の最適化、および X線結晶構造解析の結果について報告する。

【実験方法】高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 由来カタラーゼ遺伝子発現ベクターにより形質転換した同株を TB 培地で培養し、タンパク質を産生させた。目的タンパク質の精製は Strep-tactin アフィニティーカラムおよび陰イオン交換カラムにより行い、結晶化標品とした。得られた結晶の X線回折データ測定は Photon Factory にて、中性子回折予備実験は J-PARC BL03 にて行った。

【結果・考察】まず宿主である HB27 株野生体のゲノム中の Mn-カタラーゼ遺伝子をカナマイシン耐性マーカーで破壊し、さらにマーカーレス破壊株とした。Mn-カタラーゼの発現はカナマイシン耐性遺伝子をもつシャトルベクター pMKE2 にて行った。精製を簡便にするために Strep-tag をループ領域に挿入した 2 種と、C 末端に挿入した合計 3 種のベクターを作製し、それぞれについて結晶化まで行ったところ、256 番目の残基の後に Strep-tag を挿入したタンパク質からのみ、良質な結晶が得られた。すでに報告されている中性子結晶構造解析では、Mn の占有率が低いという問題が見られたため¹⁾、培養条件の最適化を行ったところ、誘導時の温度を下げることによってこの問題は改善された。また、他のグループによって報告されている X線結晶構造解析の結果では、放射線損傷によると考えられる構造変化が見られていたが²⁾、データ測定中の吸収線量を数百 kGy に抑えることによって X線照射による構造への影響は見られないことが分かった。一方、中性子結晶構造解析に向けた予備実験では、3.3 分解能までの回折点を観測することができた。

1) Yamada, T., et al. (2019) *J. Appl. Crystallogr.*

2) Antonyuk, S. V., et al. (2000) *Crystallogr. Reports*

高度好塩菌 *H. salinarum* 由来チオレドキシンの 立体構造と高塩濃度適合機構

Tertiary structure and haloadaptation mechanism of thioredoxin from extreme halophile *H. salinarum*

新井栄揮¹、柴崎千枝¹、清水瑠美¹、安達基泰¹、
石橋松二郎²、徳永廣子²、徳永正雄²
1 量研・量子生命科学領域、2 鹿児島大・農学部

塩湖や塩田などの高塩濃度環境に生息する極限環境生物・高度好塩菌は外界との浸透圧調整のために細胞内に飽和濃度の塩(~35% K⁺)を保有する。高度好塩菌が産生する蛋白質(以下、好塩菌蛋白質)はそのような高塩濃度環境においても機能を保持する。好塩菌蛋白質の高塩濃度適合機構は、高含量の酸性アミノ酸による高い可溶性と、低含量の疎水性アミノ酸(Val, Leu, Ile, Phe)による構造の可塑性(塩析の効果によるコア構造の安定化)などの特徴に基づくことが知られる。しかし、それらの特徴は必ずしも普遍的ではない[1]。また、好塩菌蛋白質の高塩濃度適合機構は、例えば有機溶媒中のような低水分活性環境下でも機能する酵素触媒システムなど、新たなバイオテクノロジーの開発に応用できると期待される。これらの背景から、様々な好塩菌蛋白質について更なる構造・機能研究が求められている[1]。

我々は当該研究の一環として、既知の好塩菌蛋白質の中でも特に酸性アミノ酸含量が高い[(Asp + Glu)/(Arg + Lys + His)= 9.0] 高度好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* NRC-1 由来チオレドキシ(以下、HsTRX-A)について X 線結晶解析及び円偏光二色性解析により立体構造・溶液構造を明らかにし、高塩濃度適合機構の解明を試みた[2]。PF BL17A および SPring-8 BL38B1 を利用して決定した HsTRX-A の立体構造(PDB ID: 6KIL、分解能 1.6Å)を相同性のチオレドキシと比較した結果、HsTRX-A の活性残基(Cys45 および Cys48)の周辺には他の TRX には見られない水和水ネットワークが存在することが明らかになった。この水和水ネットワークは触媒反応に必要なプロトン輸送を効率化し、高塩濃度・低水分活性環境での機能発現に寄与すると推察された。また、HsTRX-A は長く柔軟な N 末端領域(Ala2-Pro17)を有し、この領域が酸性アミノ酸含量の増大や高塩濃度下における構造安定性・可溶性・酵素活性の向上に寄与することが明らかになった。更に、この N 末端領域は活性部位を阻害しない位置に伸長しており、HsTRX-A は高塩濃度適合のために合理的な分子進化を遂げたことが示唆された。

[1] Karan R et al., (2012) *Aquat. Biosyst.* 8, 4

[2] Arai S et al., (2020) *Acta Cryst.* D76, 73

互いに光学異性体関係にある二つの主要な B 型肝炎ウイルス逆転写酵素阻害剤に対する共通の薬剤耐性機構

Common structural basis for the resistance of reverse transcriptase against chirally distinct anti-HBV nucleoside analogues

安武義晃^{1,2}・服部真一郎³・田村範子¹・松田幸樹³・向後悟³・

前田賢次³・満屋裕明^{3,4}

1 産総研・生物プロセス、2 CBBDOIL、3 国立国際医療研究センター・研究所、4 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り、薬剤結合機構、薬剤耐性機構を詳細に理解するため、さらには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 は著しく不安定な酵素で、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 は結晶解析により酵素と薬剤の相互作用の詳細が広く調べられており、RT 構造研究を行うための現実的な材料である。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キメラ酵素を作成し、抗 HBV 薬であるエンテカビル(ETV)やラミブジン(3TC)に対して薬剤感受性を示す HIV-1 RT キメラを見出すことに成功した。このキメラをコードする HIV-1 にすでに知られている HBV RT の薬剤耐性変異を導入することで、これら二剤に対し HIV-1 が耐性化することを見出した。ETV(D 体)と 3TC(L 体)は互いに光学異性の関係にある核酸アナログであり、これまで L-核酸アナログが結合した RT の結晶構造は報告されていなかった。本研究では、HBV 型 HIV-1 RT キメラに 3TC 三リン酸が結合した状態の結晶解析を行い、L-核酸アナログの活性ポケットへの結合様式を初めて明らかにした。解析の結果、ETV/3TC はともに、ポケット底部のメチオニン(Met184)側鎖を押し込み、移動させるように結合する様子が観察された。このような特殊な結合様式は、なぜ M184V が両剤に対してウイルスの感受性が大きく低下するのかを合理的に説明する。これら構造情報は、薬剤耐性を克服する新規抗 HBV 薬設計に重要な役割を果たす。

サリドマイドの水酸化代謝物による C2H2 型 ジンクフィンガー分解選択性の構造基盤

Structural bases for the degradation selectivity of C2H2 zinc finger by thalidomide metabolite

○降旗 大岳¹、山中 聡士²、本田 敏章³、柴田 哲男³、
田之倉 優¹、澤崎 達也²、宮川 拓也¹
(¹東大院農生科、²愛媛大 PROS、³名工大院工)

サリドマイド(Thal)は、催奇性などの副作用を示すものの、免疫調節薬(IMiD)として再発難治性の多発性骨髄腫の治療に使用されている。Thalの生体内における受容体CRBNはE3ユビキチンリガーゼの構成要素の1つであり、Thal依存的に標的タンパク質(ネオ基質)を結合して分解に導く。C2H2 ZF型転写因子のSALL4とIKZF1がThalによる催奇性と免疫調節作用にそれぞれ関わるが、最近、生体内でThalのフトルイミド環の5位が水酸化された代謝物(5HT)がSALL4の分解のみを引き起こすことが見出された。本研究では、ネオ基質に対するThalの選択性が体内代謝で変化する仕組みに着目し解析を行った。

Thalと5HTは鏡像異性体(*R*体及び*S*体)をとるため、まず各鏡像異性体がSALL4とCRBNの相互作用を誘導する効果を評価したところ、*S*体が低濃度で作用することが示された。次に*S*体のThal及び5HTの存在下でSALL4の2番目のzinc fingerドメイン(ZF2)とCRBNのサリドマイド結合ドメイン(TBD)の複合体を形成させ、それらの立体構造をX線結晶構造解析により決定した。その結果、どちらの化合物もSALL4 ZF2とCRBN TBDをつなぎとめる“分子のり”の役割を果たしていた。複合体構造において、Thalと5HTの結合位置は同じであったが、5HTの5位水酸基がCRBN TBDと水を介した水素結合を形成し、複合体形成を促進する要因であることがわかった。一方、5HTの5位水酸基は複合体構造中でSALL4 ZF2のβヘアピンの2番目(P2)と9番目(P9)のアミノ酸残基の近くに位置しており、IKZF1ではこれら残基の種類が異なることが見出された。実際にSALL4とIKZF1の残基を入れ替えると5HTはSALL4ではなくIKZF1に作用できるようになり、特にP2がネオ基質に対する5HTの選択性の鍵となる構造であることが明らかになった。

フラクトオリゴ糖を分解する GH32 酵素とフルクトースとの複合体の立体構造解析

Crystal structure of a GH32 fructooligosaccharide-hydrolyzing enzyme in complex with fructose

窪田有紗¹、川合礼華¹、松浦明香¹、藤井匡²、栃尾巧²、
西河淳¹、殿塚隆史¹

¹ 東京農工大院農、² 物産フードサイエンス研究開発センター

[緒言] フラクトオリゴ糖は、三糖 1-kestose や四糖 nystose などのフルクトースを構成糖とするオリゴ糖の総称である。このうち、1-kestose は特にプレバイオティクスの機能が高いことが報告されている。我々は、1-kestose を生産する過程で一緒に生成する nystose について、これを分解する酵素を探索した。その結果、ミツバチの腸内細菌 *Frischella perrara* 由来の糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 32 に属する β -フルクトフラノシダーゼ (以下 FperFFase) が、nystose およびスクロースに対する分解活性が大きく、かつ 1-kestose に対する分解活性が小さいことを見出した。GH32 に分類される酵素の多くは、二糖スクロースを加水分解する酵素である。FperFFase がどのような機構で、三糖 1-kestose よりも四糖 nystose や二糖スクロースに対し高い分解活性を示すのか解析するため、フルクトースとの複合体の立体構造を決定した。

[方法] FperFFase の遺伝子を PCR で増幅し、pET44a を用いてプラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3) 株を用いて Nus タグ融合タンパク質として発現させた。Ni-NTA アガロースにより精製し、スロンビン処理によってタグを切断後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製 FperFFase を得た。ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化し、フルクトースを含む溶液にソーキングした結晶を用いて、X線回折強度測定を行った。

[結果] FperFFase とフルクトースとの複合体の立体構造を 2.0-Å 分解能で決定した。FperFFase は、他の GH32 酵素と同様、N 末端側の β -プロペラドメインおよび C 末端側の β -サンドイッチドメインから構成されていた。また、フルクトースは活性中心に 1 分子結合していることが分かった。FperFFase の活性中心には、他の酵素では見られないトリプトファン残基が存在し、1-kestose は結合しにくいような構造であることが判明した。

緑膿菌由来の酸素結合タンパク質 マイクロヘムエリスリンの構造解析

Structural analysis of microhemerythrin, an oxygen-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa*

南本晃希¹, 北西健一², 海野昌喜³

1 茨城大工、2 東京理科大理、3 茨城大フロンティア

【緒言】タンパク質ヘムエリスリン(Hr)は、海洋無脊椎動物や一部の環形動物がもつ酸素運搬タンパク質である。この Hr の単量体は X 線結晶構造解析により 4 つの α ヘリックスの中心に二鉄が酸素に架橋された構造^[1]をもち、還元型、酸素結合型、酸化型の酸素結合様式^[2]が提唱されている。しかし、X 線構造解析では水素原子の可視化が難しくこの結合様式を実験的に見ることは難しい。そこで、我々は *T. dyscrita* 由来の Hr を用いて水素原子可視化が可能な中性子構造解析を目指した。しかし、実験等からこの Hr は中性子構造解析に向かないと判断した。

そこで、最近になり発見された緑膿菌由来のヘムエリスリン(マイクロヘムエリスリン: Mhr)で中性子構造解析を行うことにした。Mhr の構造を明らかにすることは Hr の酸素結合様式を明らかにし、同時に緑膿菌の増殖を抑えるのに新たな抗菌薬に変わる酸素結合阻害剤の開発などにつながることを期待される。

この Mhr については X 線結晶構造さえも未報告であることから本研究では、そこから取り掛かかった。

【実験】大腸菌発現系で Mhr の遺伝子を発現し、Ni アフィニティ及びゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製し、PEG を組成に含むリザーバーを用いてシットティングドロップ蒸気拡散法で結晶化した。得られた結晶からスイスの SLS での X 線回折データをもとに X 線結晶構造解析を行った。

【結果】結晶化スクリーニングとその条件の最適化の結果、酸化型及び azide 結合型 Mhr の結晶を得ることができた。酸化型 Mhr の結晶から最高分解能 2.47 Å の X 線回折データを得ることに成功し、鉄の異常散乱を用いた方法で構造を決定した。Mhr はゲル濾過分析により単量体と予測されており、非対称単位には 2 分子が存在した。得られた構造は他の Hr と同様に 4 つの α ヘリックスに鉄二核中心の構造をもち、二鉄は 5 つのヒスチジン、グルタミン酸とアスパラギン酸と配位していることを確認した。

[1] Margaret A. H., et al. (1991) J. Mol. Biol., 218, 583-593

[2] Kelvin H.-C. C. et al. (2015) J. Inorg. Biochem., 150, 81-89

KEKにおける日常的な全自動測定システムの利用 Daily use of full automated measurement system in KEK

篠田 晃¹, 山田 悠介¹, 平木 雅彦², 松垣 直宏¹, 千田 俊哉¹
1 KEK・物構研, 2 KEK・機械工学センター

全自動測定システムではサンプルを結晶交換ロボット(PAM)で次々と交換し、自動でセンタリング、スナップショットを測定し反射を評価し一定以上の分解能があればデータセットの測定を行う。KEKでは2018年度から全自動システム(SIROCC)を一般ユーザーに公開し運用してきた。公開当初こそは全自動測定用ビームタイムでのみ全自動測定を受け付けていたが、現在では来所実験、リモート実験、ラピッド測定(全自動測定用ビームタイム)のいずれでも全自動測定を利用する事が可能となっている。また、2020年はコロナ禍で来所実験が減り、全自動測定を利用するユーザーが増加した。特にラピッド測定を利用するユーザーが増加したことで1つのビームタイム内に複数のユーザーのサンプルを連続して測定可能となり、ビームタイムの利用効率が改善された。自動測定に持ち込まれる多数のドライシッパーや測定データを保存するHDDを効率よく、また間違いなく扱うためにユーザー毎の測定とドライシッパー及びHDDをQRタグで紐付けを行っている。

自動測定システムはユーザーからの要望に応じてアップデートを繰り返している。これまでにループ位置が画面外に大きくズレている場合にセンタリングが失敗する事例が一日に数例発生していたが、2020年冬のアップデートで画面外に外れたループに対しても画面の中心付近に移動させるシステムを導入して改善している。また、複数の要望があった1つのループ内に複数の結晶がある場合にも反射の出る複数結晶からデータセットを取得する測定システムを開発しており2021年から利用可能となっている。同時期にsmall wedge測定にも対応し、特にBL-1Aの長波長と小さなビームを利用した実験に特に有効であると考えられる。

今後ともより使いやすい自動測定システムを提供出来るよう開発を進めていく予定である。

リボソーム A サイトは tRNA をどう正確に受け入れるのか How does A site of ribosome accept tRNA precisely?

○丹澤豪人^{1,2}, Matthieu G. Gagnon²

¹大阪大学蛋白質研究所, ²テキサス州立大学医学部

全ての生物での翻訳開始段階において、開始 tRNA のアンチコドン UAC は原則 P site の AUG 開始コドンと認識し相互作用して、タンパク質合成を開始する。しかしながら、開始 tRNA は非 AUG コドンからも翻訳を開始することができる。真正細菌では、GUG と UUG は近同族 (near-cognate) 開始コドンとして存在し、全遺伝子の 1 割以上で使用されている。これら 3 種類の開始コドンに加えて、存在数が少ないながらも CUG, AUU, AUC, AUA も非同族 (non-cognate) 開始コドンとして知られている。しかしながら、P-site 上における AUC 開始コドン認識の X 線結晶構造解析がこれまでに報告されている唯一の先行研究であるため、非 AUG 開始コドン認識に対する理解は充分とは言えない。

近年のリボソームの生化学解析により、mRNA の A/P site のコドンのねじれ (kink) に配位した Mg^{2+} イオンが A site のコドン位置を安定化させることが示唆されたが、その詳細な機能については未だ明らかにされていない。

本研究では *Thermus thermophilus* 由来の 70S リボソーム・AUG/非 AUG mRNA・tRNA^{fMet} 複合体を X 線結晶構造解析を用いて明らかにし、翻訳開始段階における P site 上での非 AUG 開始コドンの解読メカニズムの洞察を提供する。本発表では特に非 AUG コドン-アンチコドン相互作用の詳細を紹介するとともに、非 AUG コドンと kink- Mg^{2+} の関係から、A site コドンの構造的安定性に対する P site がもたらす影響について議論する。

硫酸アンモニウムによるタンパク質の結晶化に対する静電ポテンシャルの影響

Influence of Electrostatic Potentials on the Proteins Crystallization by Ammonium Sulfate

郭 艶¹、瞿 良¹、西田 紀貴¹、星野 忠次¹

¹ 千葉大学大学院薬学研究院 薬品物理化学研究室

Aim: Ammonium sulfate (AS) and polyethylene glycol (PEG) are popular precipitants in protein crystal growth. Some proteins are easily crystallized by AS, while others are not. In this work, we examined the electrostatic potentials for 140 kinds of protein structures to clarify the reason for precipitant preference in protein crystallization. Among the 140 structures, 100 were grown by AS at high concentrations, and 10 were by AS at low concentrations. For comparison, 20 structures were crystallized by PEGs, 6 were by high concentrations of sodium formate, and the rest 4 were by glycerol, ethylene glycol, and sodium chloride. The difference in the shape of electrostatic potential was quantitatively evaluated. Based on the information of the electrostatic potential on crystal growth, we attempted the AS crystallization for a protein whose crystal structure was obtained by the PEG-growth in a previous report. Furthermore, the molecular arrangement in the crystal packing was contrasted to the iso-surfaces of electrostatic potentials.

Results: For the proteins preferably crystallized by AS at high concentrations, the iso-surfaces of the electrostatic potentials displayed a common shape that the positive and negative areas were distinctly separated and their contact area was neat. On the contrary, the separation between the positive and negative areas was unclear for the proteins that are preferably crystallized by PEGs. These findings suggested that AS-crystallization was possible even for a PEG-crystallized protein when the electrostatic potential exhibited a clear separation between the positive and negative areas. The relationship between the electrostatic potential and the molecular packing in the crystal indicated no overlap between the large value areas of electrostatic potential and the contact sites of protein molecules. AS ions tended to gather at the areas where the absolute values of the electrostatic potential were high. Protein molecules made contact with the surrounding molecules in the areas where the electrostatic potential were low. Hence, the shape of the electrostatic potential was highly responsible for the molecular arrangement in crystal and the preference of precipitant in the crystal growth. Further, we attempted to

estimate the shape of the electrostatic potentials quantitatively. The estimation indicated that the amplitude of the averaged separation of the electrostatic potential was high for the proteins that are preferably crystallized by the strongly hydrated ions like AS.

マウス IFN α 結晶構造と受容体相互作用残基の同定 Crystal structure of mouse IFN α and identification of a receptor-interacting residue

○渡邊 ほか^{1,2}、和田 俊樹³、小内 伸幸³、海野 昌喜^{1,2}

1 茨城大院理工、2 茨城大 iFRC、3 金沢医科大免疫学

抗ウイルス免疫に関与する形質細胞様樹状細胞(pDC)の過剰反応によるインターフェロン(IFN) α の異常な分泌は、自己免疫疾患の増悪化に影響する。近年、pDC における IFN α 分泌に関わるキャリア分子として Sortilin が同定され¹、Sortilin の pH 依存的二量体化が IFN α 分泌に何らかの形で関わっていることが明らかになった²。我々はこれまでにマウス Sortilin (mSortilin)二量体の結晶構造解析に成功した²が、Sortilin の pH 依存的な構造変化や IFN α の分泌機構との相関には不明な点が残る。そこで、本研究ではマウス Sortilin-IFN α (mSortilin-IFN α)複合体の X 線結晶構造解析によって IFN α の分泌機構を原子レベルで解明することを目的としている。

まず、マウス IFN α (mIFN α)の結晶構造を 2.1Å 分解能で決定し、ヒト IFN α や IFN β との構造的差異やシグナル伝達時の構造変化を明らかにした。次に、mSortilin と mIFN α の共結晶化を行い、酸性条件下で得られた結晶の電気泳動により複合体が形成されていることを示唆する結果を得た。その結晶化条件を精密化し、3.0 Å 程度の X 線回折強度データを収集することが出来たが、構造解析の結果、ほぼ同一条件下で mSortilin と mIFN α がそれぞれ単独で結晶化していることが明らかになった。その後、新たな条件を探索しても同様の条件でしか結晶は得られず、複合体の構造は未だ得られていない。そこでドッキングシミュレーションにより mSortilin と mIFN α の相互作用部位や様式を予測した結果、mIFN α は二量体 mSortilin とは相互作用しにくく、単量体 mSortilin と相互作用することが示唆された。特に mIFN α の Arg22 が重要な残基であることが示唆され、この残基を欠損させた変異体の細胞内分泌をフローサイトメトリーで解析した。その結果、R22A 変異体の細胞内分泌量が野生型と比較して明らかに増加し、mIFN α の Arg22 が mSortilin との相互作用に寄与していることが示唆された。

今後、Arg22 の相互作用との相関を解析することで親和性を増大した mSortilin-IFN α 複合体の X 線結晶構造解析が期待できる。

本発表では、分泌に重要なアミノ酸残基の同定に至るまでの研究成果を報告する。

【参考文献】

1. Yabe-Wada T., et al., *Sci. Rep.* 6, 26566 (2016)
2. Yabe-Wada T., et al., *FEBS. Lett.* 592, 2647–2657 (2018)

安定保存型グルコースイソメラーゼのソーキングによる基質交換

Substrate exchange by soaking of stable-preserved glucose isomerase

石黒陽香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

[緒言]

グルコースイソメラーゼはアルドース—ケトース間の異性化を触媒する金属酵素であり, 商業的には, 甘味料やバイオ燃料の生産に重要な役割を果たしている. また, グルコースイソメラーゼは, X線や性子回折実験などにおいて, 標準タンパク質として使用されている. しかし, 現在容易に入手できるグルコースイソメラーゼには, 安定化阻害剤のソルビトールが導入されており, そのままで自由には使用できない. 本研究で用いた, NagaseChemteX社のSPEZYME GIpfのグルコースイソメラーゼ溶液にもソルビトールが入っている. そこでまずは, グルコースをソーキングすることで, 基質であるソルビトールとグルコースの基質交換を目指した.

[実験方法]

NagaseChemteX社から入手した SPEZYME GIpfを用いて作成したグルコースイソメラーゼ結晶を含むドロップ 14 μ L に, 最終糖濃度が 500mM となるように, 2.5M のグルコース溶液を 2.8 μ L 加えた. ソーキングをしていない GI 結晶(GI-original)と, グルコースをソーキングした GI-Glo 複合体結晶(GI-Glo)の低温X線回折実験を PF/AR-NE3A にて自動測定で行った.

[実験結果]

GI-original の基質であるソルビトールは, アルデヒド基を持たないため, 直鎖状構造しかとれない. 一方で, ソーキングしたグルコースはアルデヒド基を持つため, 環状構造も直鎖状構造もとれるが, X線回折実験によって得られた差フーリエマップより, 直鎖状構造であると推測された. また, 直鎖状グルコース(PDB ID:3KCO)とソルビトール(PDB ID:4DVO)のグルコースイソメラーゼ複合体中性子モデルに対して今回測定した GI-Glo の差フーリエマップを比べたところ, グルコースのアルデヒド基の C1 付近の電子密度が認められたため, グルコースに交換された可能性が示唆された.

In situ データ測定によって得られたタンパク質 X 線回折データ の解析

Structure determination from datasets collected with the in situ data collection system at BL-17A

菅原隆広^{1,2}、山田悠介^{1,2}、田辺幹雄^{1,2}、加藤龍一^{1,2}、千田俊哉^{1,2}

1. 総研大・高エネルギー加速器科学研究所、2. KEK・IMSS・構造生物学
研究センター

E-mail: tsugawa@post.kek.jp

X 線結晶構造解析はタンパク質の 3 次元構造を原子レベルで解析することができる手法のひとつであり、構造生物学において重要な解析方法である。典型的な X 線結晶構造解析の流れは以下の通りである。(1)結晶化プレート内でタンパク質を結晶化する、(2)結晶化プレートから単一の結晶を取り出し凍結する、(3)凍結結晶を X 線回折計へマウントし、低温冷却下で X 線回折データ収集を行う、(4)位相決定、電子密度図計算と分子モデル構築などのデータ解析を行う。この流れにおいてはいくつかの課題が挙げられる。まず(2)の結晶の取り出しと凍結では結晶に負担をかけ、得られる回折像に影響を与えるおそれがある。加えて、結晶の取り出しが困難な結晶化法もあるため、その場合測定が困難となってしまう。また、結晶を一つずつ回折計にセットしていくため、大量の結晶の結晶性を調査したい場合には大きな律速となる。そこで、我々はこれらの課題を解消するため、結晶をプレートから取り出さずに X 線照射実験を行う in situ データ測定法の開発を行っている。通常回折データ収集は低温下で行われるのに対して、この in situ データ測定では室温下で行われる。この影響を調べるため、複数のタンパク結晶の in situ データ測定で得られたデータを解析し、低温下の測定で得られた構造との比較を行った。回折データの処理に KAMO を用いた結果、タンパク質 A では最外殻 2.12~2.0 Å で $I/\sigma=1.12$ 、 $R_{meas}=155.5$ 、 $CC1/2=55.6$ となる強度データを得ることが出来た。一方、タンパク質 B では、最外殻 2.12~2.0 Å で $I/\sigma=2.51$ 、 $R_{meas}=116.5$ 、 $CC1/2=90.6$ となる強度データを得ることが出来た。さらに構造比較の結果、全体構造に違いはないものの、いくつかのアミノ酸残基の側鎖でコンフォメーションの違いが見られた。

ディープラーニングを用いたリガンドとタンパク質の結合解析 Analyzing ligand-binding of protein with deep learning

○Zhizhen Xu¹, Jian Yu¹, Toyoyuki Ose¹, Min Yao¹

¹ Graduate School of Life Science, Hokkaido University

The binding mechanisms between proteins and ligand are central to clarifying the function of proteins, allowing cells to sense their surroundings and respond appropriately. Thus, the recognition of binding possibility is of great importance to many different fields, such as drug discovery and enzyme design.

The experimental assay is the approach for analyzing the characterization of ligand-protein interactions of a possible ligand. However, it is daunting due to the enormous costs and time involved. The method of machine-learning-based binding-analysis *in silicon* is rapidly evolving to alleviate those pressures with the recent increase in protein-ligand interaction and structure datasets. Deep learning architectures such as deep neural network, can learn some low-level-simple features in the shallow layers. Then the low-level features will be moved to higher-level features in the deeper layers. This characteristic allows them to perform better feature extraction and pattern recognition. By now, deep learning has shown performance matching or even exceeding the other machine learning methods.

Here, we developed a tool by using deep learning to analyze the ligand-binding of protein. We have completed the construction of neural network and obtained good prediction performance of binding ability (Figure).

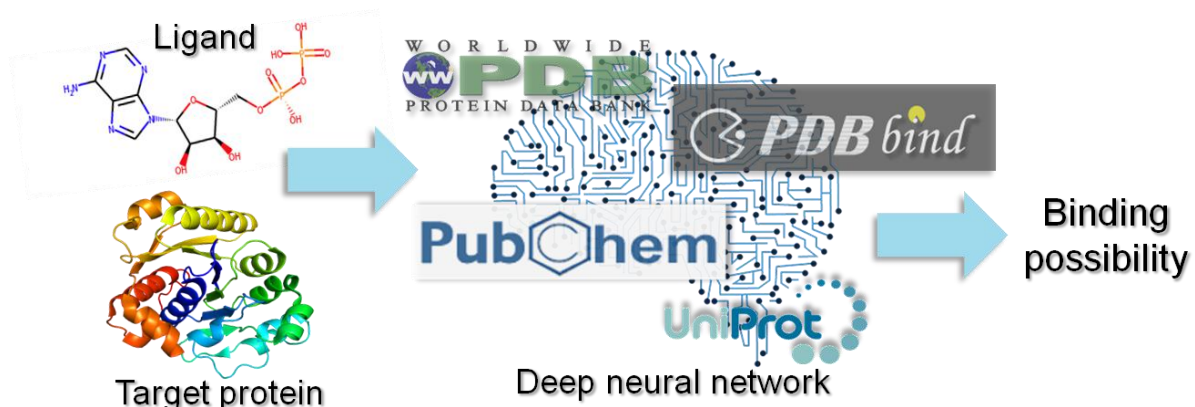
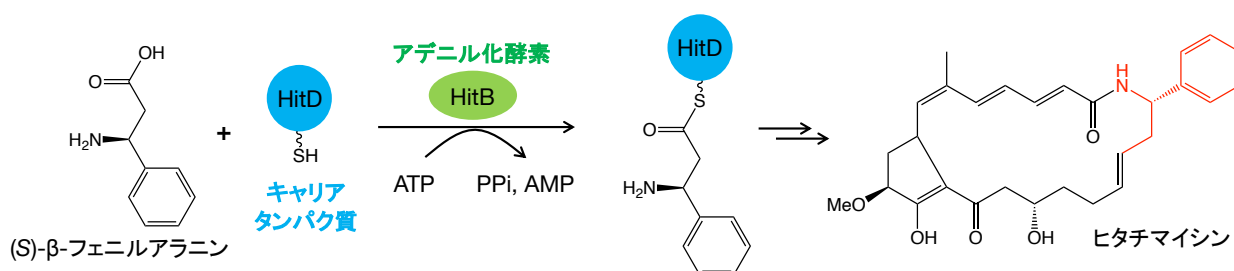


Figure. The sketch of analyzing the ligand-binding with deep learning.

マクロラクタム抗生物質ヒタチマイシン生合成における アデニル化酵素とキャリアタンパク質間相互認識機構 Recognition between adenylation enzyme and carrier protein in the biosynthesis of macrolactam antibiotic hitachimycin

千菅太一¹、宮永顕正¹、栗原将平¹、安達成彦²、川崎政人²、守屋俊夫²、
千田俊哉²、工藤史貴¹、江口正¹
1 東工大・理学院 2 KEK・物構研・構造生物



ヒタチマイシンは放線菌 *Streptomyces scabrisporus* KM-4927 が生産するマクロラクタム抗生物質であり、HeLa 細胞に対する細胞毒性やグラム陽性菌・真菌への生物活性を示す。ヒタチマイシンの生合成では、アデニル化酵素 HitB が生合成開始基質である(S)-β-フェニルアラニンを選択し、キャリアプロテイン (CP) HitD へと受け渡す反応を触媒する。細胞内という複雑系においてヒタチマイシンが生合成されるには共存する様々な CP のうちから HitD のみを HitB が選び取る必要があるが、このタンパク質間の相互認識機構は明らかとなっていなかった。

HitB-HitD 間の相互認識は両タンパク質間の表面相互作用によると予想されるが、生合成開始基質受け渡しの瞬間にのみタンパク質同士の接触がなされる性質上、その相互作用は非常に弱く解析は困難と考えられた。そこで、本研究では、HitB-HitD が相互作用した瞬間を捉えるため、タンパク質間を共有結合で結ぶクロスリンク反応により HitB-HitD 複合体を調製、その構造解析を基に相互認識機構の解明を目指した。

まず、反応性官能基を有する合成プローブを結合させた修飾 HitD を調製し、HitB と反応させることによりクロスリンク複合体を得た。このクロスリンク複合体について X 線結晶構造解析¹ およびクライオ電子顕微鏡での単粒子解析を行い、HitB-HitD 間の相互認識機構を明らかとすることに成功した。

[1] A. Miyanaga, *et al.*, *ACS Chem Biol.*, **2020**, *15*, 1808-1812.

脂質抗原提示分子 CD1b の X 線結晶構造解析 X-ray crystal structure analysis of lipid antigen presenting molecule CD1b

Cong Tian¹、Hiroki Kusaka¹、Takashi Tadokoro¹、Shunsuke Kita¹ and Katsumi Maenaka¹

1 Hokkaido University, Faculty of Pharmaceutical Science

CD1b is one of glycoproteins expressed on surfaces of various antigen-presenting cells. CD1b is related to Major Histocompatibility Complex (MHC) class I molecules, and is involved in the presentation of lipid and lipid-based molecules to activate T cells. Classical MHC class I molecules can present peptide antigens and trigger adaptive immunity. On the other hand, MHC-independent adaptive immune system is also necessary for effective host defense, therefore, human CD1b molecule is responsible for such an immune response. In this presentation, we will report the method for preparing CD1b proteins, and the X-ray crystallographic analysis of CD1b.

Human CD1b ectodomain was prepared using the silkworm-baculovirus expression system. CD1b forms a heterodimer with β -2-microglobulin (β 2m), which is essential for proper folding and stability of CD1 proteins. To make stable CD1b proteins, the C-terminal residue of CD1b was fused with the N-terminal residue of β 2m to form a single chain CD1b (scCD1b). The purified scCD1b protein was successfully crystallized using commercially available crystallization screening kit. The X-ray diffraction experiment was performed at BL-17A at Photon Factory in Tsukuba. The X-ray diffraction dataset up to 2.5 Å was collected and the structure of scCD1b was solved by molecular replacement method. The electron density map of scCD1b showed the presence of endogenous ligand in binding pocket, which was co-purified from silkworm hemolymph. The details of scCD1b structure are discussed in the poster presentation.