

# 研究技術開発室

## Division of Bio-Crystallography Technology

室長 神谷 信夫

KAMIYA, Nobuo

当室は SPring-8 に設置された理研ビームラインの運営にあたり、ビームラインを利用した個別研究についてユーザーへの技術支援を行っている。また独自の利用研究をすすめる過程で技術的ノウハウを蓄積し、利用研究を飛躍的に発展させる研究技術の開発を行う。

1. 理研ビームラインを利用した生体巨大分子結晶構造解析研究のための技術支援(河野, 内藤, 中島, 松, 神谷(信); 足立, 城(生体物理化学研究室); 藤澤, 飯塚, 前田(構造生物化学研究室); 山本, 石川(X線干渉光学研究室); 北村(X線超放射物理化学研究室))

タンパク質や核酸など生体巨大分子の立体構造を解明することは構造生物学の基礎である。当室では、構造生物学研究用理研ビームラインを用いて実施される生体巨大分子の構造解析研究についてユーザーへの技術支援を行っている。

(1) 構造生物学研究用ビームライン; BL45XU-PX

生体巨大分子の結晶構造解析の内、多波長異常分散法による自動解析に特化したビームラインである。本年度は本ビームラインを利用した回折実験におけるユーザー対応を行った。また、タンパク質の紫外-可視吸収測定用の顕微分光装置のビームラインへの設置のために、周辺装置の設計および製作を行った。

(2) 構造生物学研究用ビームライン; BL44B2

BL44B2は生体巨大分子の動的結晶構造解析とX線吸収スペクトロスコピー(XAFS)との兼用ビームラインであり、(i)単色X線を利用した回折実験、(ii)マイクロ秒からミリ秒程度の時間分解能における白色ラウエ回折実験、(iii)蛍光および吸収法によるXAFS実験に利用されている。本年度は新型ゴニオメータの導入を行い、結晶のリモートセンタリングを可能にした。またデータ処理用コンピュータを増設してデータ処理能力の向上を計った。

(3) 構造生物学研究用ビームライン; BL45XU-SAXS

溶液からのX線の散乱情報に基づいて生体巨大分子のドメイン構造やドメイン間での構造変化を追跡するためのビームラインである。本年度のユーザーへの技術支援は構造生物化学研究室に依頼した。

2. 生体巨大分子結晶構造解析(河野, 引間, 内藤, 中井<sup>\*1</sup>, 野尻<sup>\*1</sup>, 古瀬<sup>\*2</sup>, 中島<sup>\*3</sup>, 松, 大須賀<sup>\*4</sup>, 神谷(信); 尾高(バイオ工学研究室); 中山, 瀧尾(生体分子解析室); 井川, 柴田(遺伝生化学研究室); 沈(構造生物物理研究室); 野嶽, 石嶋, 中川, 倉光(ストラクチュローム連携研究グループ); 牧野, 小林(スフィンゴ脂質機能研究チーム))

(1) ニトリルヒドラーゼ(NHase)はニトリル化合物に水を付加して対応するアミド化合物を生成する酵素である。活性中心に3価の非ヘム鉄または非コリノイド・コバルトを含み、鉄型NHaseは一酸化窒素(NO)の光脱離に

よって活性化される。本研究ではNHaseの酵素反応の全行程を時間分割(動的)構造解析によって追跡することを目的としている。本年度は、顕微分光装置を用いてタンパク質結晶中での一酸化窒素の光脱離過程の追跡を行った。

(2) イソニトリルヒドラーゼ(IsoNHase)は基質であるイソニトリル(R-NC)に水を付加してN-ホルムアミド(R-NHC(O)H)を生成する酵素である。その立体構造を解明し、IsoNHaseの水和反応機構を明らかにすることを目的として研究を行っている。本年度はIsoNHaseの分解能1.7 Åにおける結晶構造解析に成功した。

(3) DNA相同組換えを行うRecAタンパク質は協同的にらせん状に単鎖DNAに結合し、単鎖DNAと二重鎖DNAの間の相同性を探索し、相同部位を対合させ、交換するという多彩な機能を有している。既知のものとは異なるらせん構造を持つ結晶を得ることに成功し構造精密化を進めた結果、これまで明らかにされていなかったDNA結合部位の立体構造の決定に成功した。構造情報を基にDNA結合様式を考察すると共に、変異体の調製を進め、機能の解明を進めている。

(4) ストラクチュローム連携研究に協力して、主にグリシン開裂系、金属活性中心を持つエネルギー伝達系と解糖系のタンパク質群を中心にして網羅的構造解析を進めている。本年度は2種類のタンパク質の発現・精製と10種類のタンパク質の結晶化および構造解析を進め、2種類のタンパク質の構造を決定した。

(5) 光化学系II粒子は葉緑体のチラコイド膜上において太陽光のエネルギーを吸収し、水を分解して酸素を発生させる。本年度は好熱性らん藻から単離された光化学系II粒子の結晶について、3.7 Å分解能における構造解析を進めた結果、光化学系II粒子を構成する4種類の主要な膜貫通サブユニットについて、その可溶性ループ部分の構造を決定することに成功した。また3種類の可溶性サブユニットの内、12 kDaタンパク質の立体構造を世界で初めて同定することに成功し、可溶性サブユニット間の相互作用の様式を明らかにした。

(6) イネ萎縮ウイルス(RDV)のRNA結合タンパク質(P7)の構造解析

P7はRDVがmRNA合成を行う際の構造的および機能的な基盤となる分子である。本研究はP7の構造解析を行うことによりRDVのmRNA合成機構の仕組みを明らかにしようとするものである。本年度はP7の大量発現系の構築を行って今後の精製・結晶化への道筋をつけた。

(7) ライセニン はミミズの粘液に大量に含まれ、生体膜の主要な構成要素の1つであるスフィンゴミエリンを特異的に認識することで生体膜の多様な機能を制御していると考えられている。その構造生物学を目指して、本年度は大腸菌による大量発現系の構築を試みた。

3. 構造生物学に関わる諸技術の開発 (引間, 河野, 内藤, 神谷 (四), 中島, 松, 大須賀<sup>\*4</sup>, 三城<sup>\*5</sup>, 神谷 (信))

#### (1) タンパク質の結晶化に関する技術

新規の生体巨大分子を結晶化するには、多数の結晶化条件を試行し結晶化の可否を観察する必要がある。この一連の作業を完全自動化するために試作したタンパク質結晶化および自動観察装置を基に、共同研究相手のメーカーにて市販化用の新型装置が開発された。

#### (2) 結晶化チップ利用技術

近年のタンパク質 X 線回折実験は液体窒素温度での低温条件下で行うことが主流となっている。結晶化用のタンパク質と沈澱剤の混合溶液のドロップをそのまま低温回折実験に用いることを可能とする X 線マウント兼用結晶化チップの開発を行い市販化した。このチップの利用により X 線回折装置への結晶のマウントの簡易化、迅速化が可能となりタンパク質構造解析のハイスループット化に有効である。

#### (3) タンパク質結晶試料のハンドリング技術

低温条件下での X 線回折実験用に凍結された結晶試料は凍結保存することにより再測定も可能であり長距離の運搬も容易である。凍結保存された結晶の回折装置へのマウントと回収の自動化といったハイスループット化への要求も大きい。既設の X 線回折装置に設置可能な結晶マウントロボットを開発し、ビームラインと、実験室用の X 線回折装置の両方に対して、その設置と動作試験を行った。

#### (4) タンパク質分子の誘電特性を利用した結晶化制御

タンパク質は分子表面に様々な極性を持つアミノ酸残基を有しており、溶媒中では永久双極子を持つ誘電体として振舞っている。外部電場を印加することで溶媒中でのタンパク質分子の会合状態に揺動を与え、結晶化を促進する試みを開始した。加えて結晶化溶液の誘電特性を測定し、タンパク質結晶化過程の動的変化の解明を進めている。

#### (5) 結晶解析用回折計の高度化

大きな角度の回転結晶 (LOT) 法は、回折像の記録に要する時間を分オーダーまで短縮することにより、単色 X 線を用いた時間分割結晶構造解析を可能にする。本年度は BL45XU-PX の回折計制御ソフトウェアを改作して LOT 法によるデータ収集を可能とし、エラストラーゼを標準試料として良好な結果が得られることを示した。また LOT 法で必要となる結晶の軸立てを行うために新規のミニカップゴニオメーターを開発して BL45XU-PX の回折計に設置した。

#### (6) 動的結晶構造解析に必要な周辺技術

動的結晶構造解析では、タンパク質結晶中で変化する状態をモニターするために顕微分光装置が必要となる。本年度は昨年度に引き続き装置の改良と周辺整備を進めた。特に本装置のビームラインへの設置のため、周辺装置の設計および製作を行った。

#### (7) 非結晶学的対称を利用した位相決定法の開発

タンパク質複合体の構造解析を通じて新たな解析方法の開発を目指している。解析に適したタンパク質複合体 (非

結晶学的対称を持つ) に位相フィルターを適用して、類縁構造からの位相や実験的な位相測定を必要としない方法の検証を行った。

<sup>\*1</sup> 基礎科学特別研究員, <sup>\*2</sup> 協力研究員, <sup>\*3</sup> 研修生 (姫工大大学院), <sup>\*4</sup> 研修生, <sup>\*5</sup> 共同研究員

Our division has recently launched several new initiatives in user support and development of new technologies at the RIKEN Structural Biology beamlines at SPring-8. Several research and development programs are already under way, and these will contribute to the expanding program in structural biology research at the RIKEN Harima Institute.

### 1. Technical support for users of the RIKEN beamlines dedicated to structural biology

BL45XU is an undulator beamline designed for protein crystallography using the multi-wavelength anomalous dispersion technique (experimental hut; BL45XU-PX) and for small-angle X-ray scattering of biological macromolecules (BL45XU-SAXS). We support user experiments at BL45XU-PX with improved beamline devices. Of special note, a microspectrophotometer was designed and installed at BL45XU-PX this year. The maintenance and user support services for BL45XU-SAXS have been entrusted to the Structural Biochemistry Laboratory.

BL44B2 is a bending-magnet beamline designed for three applications: time-resolved protein crystallography with white X-rays, conventional structure analysis of protein crystals with monochromatic X-rays, and X-ray absorption fine structure analysis of biological macromolecules. We have supported users of BL44B2 by designing and installing a remote centering system for sample crystals in the experimental hut.

### 2. X-Ray crystal structure analyses of biological macromolecules

Photosystem II (PSII) is a multi-subunit membrane protein complex that carries out light-induced electron transfer and water-splitting reactions, leading ultimately to the formation of molecular oxygen. We obtained the crystal structure of PSII from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. The structure revealed four major transmembrane (TM) subunits: D1, D2, CP47, and CP43, as well as several low molecular mass TM subunits and three hydrophilic extrinsic proteins: 33- and 12-kDa proteins and cytochrome c550. This structural analysis yielded much information concerning the molecular interactions within this large protein complex.

The RecA protein in *Escherichia coli* plays an important role in homologous genetic recombination. We determined a new crystal structure for this molecule, and were able to visualize its DNA binding loops. The structure of these loops had not been reported in the literature previously because they were disordered in the other crystal forms. Several mutations in the DNA binding loops have been associated with deficiencies in homologous genetic recombination.

Nitrile Hydratase from *Rhodococcus* is an enzyme capable of catalyzing hydration of nitriles, and it contains a mononuclear non-heme iron as its reaction center. The iron center is activated by photo-driven NO release. To gain a deeper understanding of structures, intermediates,

and dynamics along the reaction pathway, we are developing techniques of time-resolved crystallography. This year we also observed a photo-activated process in a crystal using a newly developed microspectrophotometer.

In cooperation with the Structurome Research Group, we determined crystal structures of proteins in the glycine cleavage system, the energy transfer system, and the glycolysis system of *Thermus thermophilus*. Isonitrile Hydratase is a novel enzyme in *Pseudomonas putida* that catalyzes the conversion of isonitriles to the corresponding N- substituted formamides. We determined its crystal structure at 1.7 Å resolution and elucidated the structural basis of its biochemical function. In order to reveal the molecular mechanism of mRNA synthesis in a Rice Dwarf Virus (RDV), we constructed a large-scale expression system for the mRNA binding protein P7 of RDV, using *E. coli* as host cells.

### 3. Development of new techniques for structural biology research

We developed a protein crystallization support system utilizing the vapor diffusion technique, termed "Crystal Finder", which consisted of two parts: (1) automatic preparation of screening solutions and (2) observation of protein crystallization drops. A polymer-based micro array device (PBMD) was developed for high-throughput protein crystallization and simple mounting of the resulting crystals on a goniometer head for X-ray diffraction experiments. The PBMD can immobilize protein crystallization drops in a vapor- diffusion well, and we can directly mount the crystal in one chip of PBMD under cryogenic condition at 100 K. Furthermore, an automated cryo-crystal mounting system was developed at our institute using a six-axis robot arm.

A microspectrophotometer is a powerful tool for time-resolved protein crystallography. It can be used to monitor reactions in crystals when the proteins or reactants undergo spectral changes along the reaction pathways. A notable advance this year was the improvement of our microspectrophotometer, which was installed in the experimental hut of BL45XU-PX. The large-angle oscillation technique (LOT) is another data collection method used in for time- resolved crystallography. The LOT requires alignment of one axis of the sample crystal with the rotation axis of the goniometer prior to X-ray diffraction data collection. For this purpose, a mini-kappa goniometer was designed and installed in BL45XU-PX, and the goniometer itself was improved to make it capable of supporting LOT data collection.

We have investigated the protein nucleation process in an electric field of alternating current, in an effort to develop new methods of enhancing protein crystallization. We are also developing a new technique to determine phases of diffraction data from protein crystals using non-crystallographic symmetries. A phase filtering technique was tested as a method to verify this approach.

### Research and Development Subjects and Members of Division of Bio-Crystallography Technology

1. Technical support for users of RIKEN beamlines dedicated to structural biology
2. X-ray crystal structure analyses of biological macro-

molecules

3. Development of new techniques for structural biology research

### Head

Dr. Nobuo KAMIYA

### Members

Dr. Yoshiaki KAWANO

Dr. Takaaki HIKIMA

Dr. Hisashi NAITOW

Dr. Tadashi NAKAI<sup>\*1</sup>

Dr. Masaki NOJIRI<sup>\*1</sup>

Dr. Munenori FURUSE<sup>\*2</sup>

Mr. Shiro KAMIYA

Mr. Taiji MATSU

Mr. Hiroki NAKAJIMA

---

<sup>\*1</sup> Special Postdoctoral Researcher

<sup>\*2</sup> Contract Researcher

### in collaboration with

Dr. Shin-ichi ADACHI (Biophysical Chemistry Lab.)

Dr. Tetsuro FUJISAWA (Structural Biochemistry Lab.)

Mr. Takashi IIZUKA (Structural Biochemistry Lab.)

Dr. Shukuko IKAWA (Cellular & Molecular Biology Lab.)

Dr. Tetsuya ISHIKAWA (Coherent X-Ray Optics Lab.)

Dr. Jun ISHIJIMA (Structurome Research Group)

Dr. Hideo KITAMURA (Coherent Synchrotron Light Source Physics Lab.)

Dr. Toshihide KOBAYASHI (Sphingolipid Functions Lab., FRS)

Dr. Seiki KURAMITU (Structurome Research Group)

Dr. Yuichiro MAÉDA (Structural Biochemistry Lab.)

Dr. Asami MAKINO (Sphingolipid Functions Lab., FRS)

Dr. Noriko NAKAGAWA (Structurome Research Group)

Dr. Hiroshi NAKAYAMA (Biomolecular Characterization Div.)

Dr. Yuuichi NODAKE (Structurome Research Group)

Dr. Masafumi ODAKA (Bioengineering Lab.)

Dr. Jian-Ren SHEN (Structural Biophysics Lab.)

Dr. Yoshitsugu SHIRO (Biophysical Chemistry Lab.)

Dr. Takehiko SHIBATA (Cellular & Molecular Biology Lab.)

Dr. Koji TAKIO (Biomolecular Characterization Div.)

Dr. Masaki YAMAMOTO (Structural Biophysics Lab.)

### Visiting Members

Dr. Osamu MATSUMOTO (Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Dr. Yao MIN (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

Dr. Atsushi NAKAGAWA (Inst. Protein. Res., Osaka

Univ.)  
 Dr. Masayoshi NAKASAKO (Inst. Mol. Cel. Biosci., Univ. Tokyo)  
 Dr. Kazuhiro OGATA (Sch. Med., Yokohama City Univ.)  
 Dr. Akira SANJO (Protein Wave Co.)  
 Dr. Isao TANAKA (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)  
 Dr. Nobuhisa WATANABE (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

### Trainees

Mr. Koji KUMAGAI (Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)  
 Mr. Hiroki NAKAJIMA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)  
 Mr. Hisao OSUKA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)

## 誌 上 発 表 Publications

### [ 雑誌 ]

#### ( 原著論文 ) \* 印は査読制度がある論文

Fujihashi M., Peapus D. H., Nakajima E., Yamada T., Saito J., Kita A., Higuchi Y., Sugawara Y., Ando A., Kamiya N., Nagata Y., and Miki K.: "X-ray crystallographic characterization and phasing of a fucose-specific lectin from *Aleuria aurantia*", *Acta Cryst. D* **59**, 378–380 (2003). \*

Nakai T., Nakagawa N., Maoka N., Masui R., Kuramitsu S., and Kamiya N.: "Coexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of glycine decarboxylase (P-protein) of the glycine-cleavage system from *Thermus thermophilus* HB8", *Acta Cryst. D* **59**, 554–557 (2003). \*

Kamiya N. and Shen J.: "Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 98–103 (2003). \*

#### ( その他 )

河野能顕: "第 7 回 Biology and Synchrotron Radiation (BSR2001) 報告", *放射光* **14**, 395–396 (2001).

## 口 頭 発 表 Oral Presentations

### ( 国際会議等 )

Kawano Y., Nojiri M., Odaka M., Endo I., and Kamiya N.: "Role of post-translational modifications around the reaction center of photoreactive nitrile hydratase", 7th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR 2001), Sao Pedro, Brazil, July–Aug. (2001).

Nojiri M., Kawano Y., Odaka M., Endo I., and Kamiya N.: "Crystal structure of the complex of photoreactive nitrile hydratase with substrate analogue, cyclohexyl isocyanide", 10th Int. Conf. on Bioinorganic Chemistry (ICBIC 10), (Magnetic Resonance Center (CERM), University of Florence), Florence, Italy, Aug. (2001).

Nakai T., Ishijima J., Nakagawa N., Masui R., Kuramitsu S., and Kamiya N.: "Comparison of strategies for coex-

pressing two subunits of recombinant protein to fold into its native structure", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).

Kamiya N. and Shen J.: "Crystal structure analysis of photosystem II from *Synechococcus vulcanus* at BL41XU of SPring-8", 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Nakai T., Ishijima J., Nakagawa N., Masui R., Kuramitsu S., and Kamiya N.: "X-ray structure studies of H- and L-proteins of glycine cleavage system from *Thermus thermophilus*", 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Sanjoh A., Cachau R. E., Hikima T., and Kamiya N.: "Automated crystallization screening and diffraction data collection of protein crystals using heterogeneous nucleation-induced solid material devices", Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2002), Berlin, Germany, Oct. (2002).

### ( 国内会議 )

河本正秀, 三浦圭子, 引間孝明, 沈建仁, 神谷信夫: "SPring-8 におけるビームライン操作環境の整備, He クライオ装置, 結晶化ロボット, 光化学系 II 研究", 文科省科研費補助金特定領域研究「生物マシーナリー」第 5 回ワークショップ, 熱海, 7 月 (2002).

神谷信夫: "蒸気拡散法による蛋白質結晶化支援システムの開発", 文科省科研費補助金特定領域研究「生物マシーナリー」第 5 回ワークショップ, 熱海, 7 月 (2002).

中井忠志, 中川紀子, 増井良治, 倉光成紀, 神谷信夫: "高度好熱菌グリシン開裂系 P タンパク (グリシンデカルボキシラーゼ) の結晶化および予備的回折実験", 第 75 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2002).

河野能顕, 野尻正樹, 尾高雅文, 中島寛樹, 大須賀久織, 遠藤 勲, 神谷信夫: "クライオ凍結法と LOT 法を用いた Fe-NHase の反応機構の解明", 第 40 回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11 月 (2002).

引間孝明, 開俊樹, 井川しゅく子, 古瀬宗則, 柴田武彦, 神谷信夫: "大腸菌 RecA 蛋白質の低温結晶構造解析", 日本結晶学会平成 14 年度年会, 東京, 12 月 (2002).

神谷信夫, 沈建仁: "SPring-8 の BL41XU を利用した *Synechococcus Vulcanus* 由来光化学系 II 膜蛋白質複合体の結晶構造解析", 日本結晶学会平成 14 年度年会, 東京, 12 月 (2002).

神谷信夫, 引間孝明, 開俊樹, 井川しゅく子, 古瀬宗則, 美川 務, 堂前直, 柴田武彦: "遺伝的相同組換えの構造生物学: RecA タンパク質に見られる弱い相互作用", 理研シンポジウム「モレキュラー・アンサンブル 2002」, 和光, 12 月 (2002).

竹田一旗, 宮武秀行, 朴三用, 河本正秀, 神谷信夫, 三木邦夫: "I, Xe, Cs を用いた MAD 法による蛋白質 X 線結晶構造解析", 第 16 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 姫路, 1 月 (2003).

神谷信夫, 沈建仁: "SPring-8 の BL41XU を利用した Syne-

chococcus vulcanus 由来光化学系 II 膜蛋白質複合体の結晶構造解析”, 第 16 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 姫路, 1 月 (2003).

神谷信夫: “好熱性らん藻の酸素発生光化学系 II 膜蛋白質複合体の 3.7Å 分解能における結晶構造”, 生物マシナリー・

蛋白研セミナー合同シンポジウム「膜蛋白質・生体超分子構造研究最前線」, 大阪, 1 月 (2003).

沈建仁, 神谷信夫: “結晶構造に基づく光化学系 II 複合体の分子機構”, 日本植物生理学会 2003 年度年会および第 43 回シンポジウム, 東大阪, 3 月 (2003).