

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進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，引間，神谷；足立（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線超放射物理学研究室）；山崎，谷田，宇留賀）

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；BL45 XU-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。本年度も引き続き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、ビームライン建設当初から使用されてきた本ビームライン独自設計のビームライン制御系を SPring-8 標準タイプへ変更し、ソフトウェアも新規に作成した。

（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 実験に利用される。本年度は新型 CCD 検出器（ADSC 社，Q210，有効検出器面積 210 mm × 210 mm）の導入を行い、データ収集の迅速化を達成した。また検出器導入に伴いビームストッパーを更新した。

（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，古瀬^{*1}，中島，松，大須賀^{*2}，橋本^{*3}，沈^{*4}，養王田^{*4}，神谷；尾高（バイオ工学研究室）；井川，石部，美川，柴田（遺伝生化学研究室）；中井，中川，倉光（ストラクチャー研究グループ）；石嶋（ハイスループットファクトリー）；牧野，小林（FRS スフィンゴ脂質機能研究チーム）

（1）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 分解能における電子密度図の改良を進めた結果、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、より詳細な分子構造モデルを構築することができた。

（2）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、不安定な鉄型 NHase の活性型の反応中心構造を明らかにするために、嫌気条件下での結晶化の手法の確立と構造解析を行った。

（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。当室では既知のものとは異なるらせん構造を持つ RecA タンパク質の結晶を得て分子構造を決定した。本年度は構造情報を基に DNA 結合様式を考察するとともに、RecA タンパク質の機能の解明を目的として多数の部位特異的変異体を調製した。

（4）ストラクチャー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 6 種類のタンパク質の結晶化および 2 種類の構造構築を行った。

（5）イネ萎縮ウイルス（RDV）の RNA 結合タンパク質（P7）は、RDV が mRNA を合成する際の構造的な基盤となる分子である。我々は P7 の構造解析を行うことにより RDV の mRNA 合成機構を明らかにしようとしている。本年度は、大腸菌により大量発現した P7 の不溶化を軽減する方法の検討を行った。

（6）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り大量発現したライセニンとそのフラグメントの精製方法を確立した。

3. 構造生物学に関わる諸技術の開発 (引間, 神谷)

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る舞っている。当室では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, 結晶化を促進することを試みている。本年度は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との関連を検討した。

*¹ 協力研究員, *² 研修生 (姫工大大学院), *³ 研修生, *⁴ 共同研究員

Our division has 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 under way, and these will contribute to the expanding program in structural biology research of RIKEN.

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 hutch; 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, the control system of BL45XU was changed to the SPring-8 standard system 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: conventional structure analysis of protein crystals with monochromatic X-rays, X-ray absorption fine structure analysis of biological macromolecules, and time-resolved protein crystallography with white X-rays. A CCD detector was newly installed (ADSC Q210, active area: 210 mm × 210 mm), with which much faster data collection was possible in comparison with the previous detector.

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 this year an improved electron density map of PSII from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution, and reconstructed new structure models of the four major transmembrane subunits: D1, D2, CP47 and CP43.

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 the reaction mechanism, we are developing techniques of time-resolved crystallography. This year we crystallized the photo-irradiated Fe-type NHase in anaerobic condition keeping its activity, and determined the structure.

The RecA protein in *Escherichia coli* plays an important role in homologous genetic recombination. We have determined a new crystal structure of this molecule with a

different pitch of filament in a comparison to that reported previously. Several mutant proteins were designed in order to clarify the RecA protein functions, and over-expression and purification procedures were constructed for the mutant proteins.

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*. We determined this year two crystal structures of different dehydrogenases.

In order to reveal the molecular mechanism of mRNA synthesis in a Rice Dwarf Virus (RDV), we have constructed a large-scale expression system for the mRNA binding protein P7 of RDV, using *E. coli* as host cells. The solubility of over-expressed P7 was unexpectedly low, but other expression conditions were examined to gain high solubility of the protein.

3. Development of new techniques for structural biology

In an effort to develop new methods of enhancing protein crystallization, we have investigated the protein nucleation process in an electric field of alternating current. This year dielectric properties of crystallization buffers were determined and the dynamical changes of protein crystallization processes were examined in relation to the buffer characteristics.

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 macromolecules
3. Development of new techniques for structural biology research

Head

Dr. Nobuo KAMIYA

Members

Dr. Yoshiaki KAWANO

Dr. Takaaki HIKIMA

Dr. Hisashi NAITOW

Dr. Munenori FURUSE*

Mr. Taiji MATSU

Mr. Hiroki NAKAJIMA

* 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 and Molecular Biology Lab.)

Ms. Satoko ISHIBE (Cellular and Molecular Biology

Lab.)
 Dr. Jun ISHIJIMA (Highthroughput Factory)
 Dr. Tetsuya ISHIKAWA (Coherent X-Ray Optics Lab.)
 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. Tsutomu MIKAWA (Cellular and Molecular Biology Lab.)
 Dr. Noriko NAKAGAWA (Structurome Research Group)
 Dr. Tadashi NAKAI (Structurome Research Group)
 Dr. Masafumi ODAKA (Bioengineering Lab.)
 Dr. Takehiko SHIBATA (Cellular and Molecular Biology Lab.)
 Dr. Masaki YAMAMOTO (Coherent X-Ray Optics Lab.)

Visiting Members

Dr. Tame JEREMY (Grad. Sch. Sci., Yokohama City 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. Masaki NOJIRI (Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)
 Dr. Kazuhiro OGATA (Sch. Med., Yokohama City Univ.)
 Dr. Sam-yong PARK (Grad. Sch. Sci., Yokohama City Univ.)
 Dr. Jian-Ren SHEN (Fac. Sci., Okayama Univ.)
 Dr. Masaaki SHIINA (Sch. Med., Yokohama City Univ.)
 Dr. Isao TANAKA (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)
 Dr. Hajime TANIDA (Mater. Sci. Div., JASRI)
 Dr. Tomoya URUGA (Mater. Sci. Div., JASRI)
 Dr. Nobuhisa WATANABE (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)
 Dr. Hiroshi YAMAZAKI (Beamline Div., JASRI)
 Dr. Masafumi YODA (Dept. Biotech. Life Sci., Tokyo Univ., Agric. Technol.)

Trainees

Mr. Hisao OSUKA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
 Mr. Koich HASHIMOTO (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

Nakai T., Ishijima J., Masui R., Kuramitsu S., and Kamiya N.: "Structure of *Thermus thermophilus* HB8 H-protein of the glycine-cleavage system, resolved by a six-dimensional molecular-replacement method", *Acta Cryst. D* **59**, 1610–1618 (2003). *

Fujihashi M., Peapus D. H., Kamiya N., Nagata K., and Miki K.: "Crystal structure of fucose specific lectin from *Aleuria aurantia* binding ligands at three of its five sugar recognition sites", *Biochemistry* **42**, 11093–11099 (2003). *

Noguchi T., Nojiri M., Takei K., Odaka M., and Kamiya N.: "Protonation structures of cys-sulfinic and cys-sulfenic acids in the photosensitive nitrile hydratase revealed by fourier transform infrared spectroscopy", *Biochemistry* **42**, 11642–11650 (2003). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Hikima T., Hiraki T., Ikawa S., Furuse M., Shibata T., and Kamiya N.: "A possible model for filament extension of *E. coli* RecA protein in homologous recombination", 19th Congr. and General Assembly of the Int. Union of Crystallography (IUCr XIX), Geneva, Switzerland, Aug. (2002).

Kamiya N. and Shen J.: "Crystal structure analysis of photosystem II from *Synechococcus vulcanus* at BL41XU of SPring-8", SRRC 8th Users Meet. and Workshop on Application of Synchrotron Radiation in Biology, Hsinchu, Taiwan, Oct.–Nov. (2002).

Nakai T., Nakagawa N., Maoka N., Masui R., Kuramitsu S., and Kamiya N.: "Crystal structures of branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (E1) from *Thermus thermophilus* HB8: induced fit and substrate recognition of the enzyme", Int. Symp. on Diffraction Structural Biology (ISDSB2003), (JSPS), Tsukuba, May (2003).

Takeda K., Miyatake H., Park S. -Y., Kawamoto M., Kamiya N., and Miki K.: "Xe-MAD phasing at the beamline BL41XU of SPring-8", Int. Symp. on Diffraction Structural Biology (ISDSB2003), (JSPS), Tsukuba, May (2003).

Shen J. and Kamiya N.: "Crystal structure of photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*", 11th Int. Symp. on Phototrophic Prokaryotes (ISPP2003 Tokyo), (The Japanese Association for Photosynthesis Research), Tokyo, Aug. (2003).

Shen J. and Kamiya N.: "Functions of carotenoids and other pigments in photosystem II from a structural point of view", 10th Congr. of the European Soc. for Photobiology (ESP 2003), Vienna, Austria, Sept. (2003).

Kamiya N. and Shen J.: "Crystal structure analysis of photosystem II complex from *Thermosynechococcus vulcanus*", RIKEN/BBSRC Joint Symp. on Japan-UK Membrane Protein Structure Biology, (RIKEN and BBSRC), Harima, Sept. (2003).

Shen J. and Kamiya N.: "Crystal structure of photosystem

- II from *Thermosynechococcus vulcanus*”, Joint Japanese-Swiss Scientific Seminar, Kurashiki, Sept.–Oct. (2003). (国内会議)
- 中井忠志, 石嶋潤, 中川紀子, 増井良治, 倉光成紀, 神谷信夫: “グリシン開裂系の構造生物学: 代謝系の原子レベルでの理解を目指して”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト: 第1回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 7月 (2002).
- 藤橋雅宏, Peapus D. H., 神谷信夫, 長田嘉穂, 三木邦夫: “ヒイロチャワソウ由来レクチンの結晶構造とフコース認識機構”, 第3回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6月 (2003).
- 神谷信夫: “SPRING-8 共同利用ビームラインと生物マシーナリー研究: アンジュレータから光化学系複合体へ”, 文科省科研費特定領域研究「生物マシーナリー」第6回ワークショップ, 東京, 7月 (2003).
- 中井忠志, 中川紀子, 真岡伸子, 増井良治, 倉光成紀, 神谷信夫: “Ligand-induced conformational changes and a reaction intermediate in branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (E1) from *Thermus thermophilus* HB8”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第2回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8月 (2003).
- 竹田一旗, 宮武秀行, 朴三用, 河本正秀, 神谷信夫, 三木邦夫: “高エネルギー領域での多波長異常分散法による位相決定”, 第46回日本神経化学会年会・第41回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9月 (2003).
- 神谷信夫: “ロッキングカーブ測定は結晶成長論のツールになり得るか?”, 日本学術振興会回折構造生物第169委員会 第11回研究会「タンパク質結晶成長とX線結晶学的品質」, 京都, 9月 (2003).
- 中井忠志, 中川紀子, 真岡伸子, 増井良治, 倉光成紀, 神谷信夫: “Crystal structures of *Thermus thermophilus* HB8 branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (E1) in complex with cofactors, substrate and substrate analogue”, 第76回日本生化学会大会, 横浜, 10月 (2003).
- 神谷信夫, 沈建仁: “*Thermosynechococcus 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15年度年会, 熊本, 12月 (2003).
- 藤橋雅宏, Peapus D. H., 神谷信夫, 長田嘉穂, 三木邦夫: “フコース特異的レクチンの立体構造と基質認識機構”, 日本結晶学会平成15年度年会, 熊本, 12月 (2003).
- 中井忠志, 中川紀子, 真岡伸子, 増井良治, 倉光成紀, 神谷信夫: “Crystal structures of *Thermus thermophilus* HB8 branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase (E1) and its complexes with cofactors, substrate and substrate analogue”, 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月 (2003).
- 神谷信夫: “4次元構造生物学に向けた準備と今後の展望”, 日本学術振興会回折構造生物第169委員会 第12回研究会, 東京, 12月 (2003).
- 神谷信夫, 吾郷日出夫, 青山浩, 宮野雅司, 城宜嗣, 沈建仁: “*Thermosynechococcus vulcanus* 由来光化学系 II 膜蛋白質複合体の結晶構造解析”, 第17回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, つくば, 1月 (2004).
- 沈建仁, 神谷信夫: “X線結晶構造解析が明らかにする構造”, 日本植物生理学会2004年度年会, 八王子, 3月 (2004).