

速度論的結晶学研究チーム

Kinetic Crystallography Research Team

チームリーダー 加藤 博章
KATO, Hiroaki

当研究チームでは、反応過程におけるタンパク質の動きを捉え、タンパク質の分子装置の仕組みを詳細に解明することを目標として、速度論的結晶学の研究手法の開発とその利用研究を行っている。

速度論的結晶学とは、分子構造の経時変化を捕えるという X 線結晶学の一分野である。高速度の X 線回折データ収集には超高輝度の放射光 X 線が必要であり、大型放射光施設 (SPring-8) の利用が不可欠である。ただし、構造生物学研究における速度論的 X 線結晶構造解析は、単なる高速の X 線結晶解析ではない。例えば酵素反応に伴う構造変化を結晶解析で捕捉しようとする、結晶中に含まれるすべての分子が同時刻に同じ反応状態にあるように、分子を同調的に動かすための化学的な工夫が必要となる。したがって、動的結晶構造解析の際に結晶中の動きを同調させるための有機化学的、分子酵素学的手法の開発や、結晶化に適したタンパク質を合理的に得るための戦略の確立も行っている。計画では、構造変化と生物機能が密接に関わる対象として以下の 3 つの問題にこの解析を適用している。

1. 生物発光の分子機構—速度論的 X 線結晶構造解析によるホタル・ルシフェラーゼの反応機構解明 (小橋, 中津 *1, 市山 *1, 加藤)

ホタルの発光現象は、その仕組みに科学的な興味を持たれているだけでなく、細胞生物学、分子生物学の研究や、臨床検査での利用研究が進んでいるなど、実用的な価値も認められている。その発光はルシフェラーゼによる酵素反応によって引き起こされている。すなわち、ATP に依存して基質のルシフェリンが分子状酸素によって酸化されてオキシルシフェリンに変換され、この生成物が発光するものと考えられている。本研究課題では、ゲンジボタルの遺伝子から調製したルシフェラーゼの速度論的 X 線結晶構造解析を行うことにより、同酵素の反応機構の構造的な基盤を明らかにし、発光の仕組みを解明することを目的としている。

昨年度までの研究によりルシフェラーゼ結晶中で酵素反応を行わせることが速度論的 X 線結晶構造解析を行う上で重要であると示された。そこで、反応開始前の状態である ATP 複合体結晶を作製することとした。ATP とルシフェラーゼを事前に混合して調製した結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL45PX において X 線回折強度データの収集を行った。構造解析の結果、ATP のアデノシンと α -リン酸に相当する電子密度ははっきり観察できた。さらに結晶保存液を工夫したところ、 β 、 γ -リン酸に相当する電子密度も観察された。この結果、基質であるルシフェリンのカルボキシ基に対して β -リン酸が共有結合の架け替えに必要な in-line の配置を取ることが明らかとなった。この反応機構の構造基盤の解明は、ホタル・ルシフェラーゼが属する adenylate-forming enzymes 群における最初の例である。同酵素群は、リボゾーム非依存型ペプチド結合の形成を行っており、種々の抗生物質の生合成に関わる重要なものが多い。

2. ヌクレオチド依存性タンパク質装置の動作機構解析

(1) ABC タンパク質の機能発現の仕組みと動作機構

ABC (ATP Binding Cassette) タンパク質とは、分子内によく保存された ATP 結合部位を 2 つ有する膜タンパク質の総称であり、トランスポーター、レセプター、チャンネルといった多様な生理機能を示し、生命維持に必須な役割を果たしている。例えば、SUR1 は、細胞内 ATP/ADP のレセプターであり、 K^+ チャネルの開閉を制御する。MDR1 や MRP は、ガンの化学療法の障害となっている生体異物排出ポンプである。さらに CFTR や MDR1 には、レギュレーターなどとしての多機能性も報告されている。本研究課題では、膜タンパク質である分子全体の結晶化を試み、膜貫通領域についても結晶構造をもとに生理機能の解明を目指す。さらに、静的な X 線解析ができた系については、結晶状態での反応速度解析と反応制御法を確立し、ATP 駆動による動作機構について四次元構造解析を行う予定である。

(i) 結晶化に適した ABC タンパク質発現系の構築 (小段, 寺角 *2, 柴田, 加藤)

ヒトのがん細胞の多剤耐性の主要因と考えられる ABC タンパク質 (MDR1) に着目し、バキュウロウィルス・昆虫細胞系を用いることによって、X 線結晶解析に適したタンパク質標品を調製する系の確立を試みてきた。大規模液体培養を連続的に実施し、MDR1 の安定な発現と生産が確認できた。また、タンパク質の安定性が向上する因子を検索した結果、とりわけ、コレステロールの添加が MDR1 の安定性の維持に効果的であることが判明した。一方、結晶化能を高めるため、タンパク質自体の改変、すなわち、立体構造の不安定化に寄与するアミノ酸残基を置換した変異体 MDR1 の作製を試みた。変異体ウィルスを作製し、昆虫細胞に感染させ、発現を確認した。現在、精製サンプルの分子物性の解析、発現系のスケールアップを進めている。

(ii) ペルオキシソーム ABC タンパク質 PMP70 の機能解析と大量発現の試み (柴田, 中津, 今中 *1, 加藤)

ペルオキシソームは細胞内オルガネラの 1 つで、過酸化

物や脂質の代謝に関わる酵素を多く含んでいる。ペルオキシソームの ABC タンパク質の 1 つである PMP70 は、ペルオキシソーム内の β 酸化を誘導することにより発現の上昇が認められ、極長鎖脂肪酸の代謝に関与するものと推測されるが、その機能の詳細は不明である。本研究の目的は、PMP70 をはじめとするペルオキシソーム膜タンパク質 (PMP) がペルオキシソームに輸送される機構を明らかにし、立体構造解析に向けた PMP70 の過剰発現を達成することである。

PMP の細胞内輸送には、ペルオキシソーム形成異常の原因となる遺伝子産物であるタンパク質 (Pex) のいくつかが関与する。すなわち、生合成された PMP に Pex19p が結合し、細胞質を移動した後、ペルオキシソーム膜上で Pex3p がその複合体を認識すると推測されている。そこで、PMP の局在化の鍵となる Pex3p と Pex19p との特徴的な相互作用を調べるために、Pex3p の発現精製系を確立した。得られた精製 Pex3p と既に調製法を確立した Pex19p サンプルを用いて、トリプトファンの蛍光変化を測定することにより Pex3p-Pex19p の解離定数を決定した。今回の結果は、他のタンパク質因子が Pex3p-Pex19p 間の相互作用に与える影響を評価する基礎となるデータである。加えて、酵母を用いた PMP22 の発現系および Pex19p-PMP22 融合タンパク質の大腸菌による発現系を確立したので、今後、PMP-Pex19p 複合体と Pex3p の親和性を比較することにより、PMP 輸送機構の解明に重要な知見が得られるものと期待される。また、強い結合により安定化した複合体を結晶化に供し、三次元構造を明らかにする予定である。

(2) その他のヌクレオチド依存性タンパク質の構造生物学—生物時計タンパク質 KaiA のリズム発振ドメインの構造と機能 (中津^{*1}, 柴田, 加藤)

生物時計はほとんどの生物に存在し、生命活動を 24 時間周期で制御している。地球上に最初に現れた光合成生物である藍色細菌においては時計遺伝子クラスター *kaiABC* が生物時計本体の遺伝子であり、時計タンパク質 KaiA は *kaiBC* オペロンの発現を促進し、時計タンパク質 KaiC はその発現を抑制することが知られている。しかしながら時計タンパク質がどのような分子機構で時計を発振させ、周期を 24 時間に調節しているのか、未だ明らかにはなっていない。我々は、KaiA タンパク質の C 末端ドメインが時計の発振を司る“時計発振ドメイン”であることを解明するとともに、X 線結晶解析を用いてその三次元構造を 1.8 Å 分解能で決定した。Native 結晶と MAD 法のためのセレノメチオニン誘導体結晶についての X 線回折強度の測定は、大型放射光施設 SPring-8 の BL26B2 と BL26B1 それぞれのビームラインを用いて測定した。さらに時計発振ドメインは KaiA の二量体化、KaiC との結合および KaiC リン酸化の促進に必須であること、二量体構造中央の凹面最深部に存在する His270 が KaiC との結合および KaiC のリン酸化促進に重要であり、時計発振を行うために必須の残基であることを初めて突き止めた。

3. 超高分解能 X 線結晶構造解析による酵素反応における水素の構造機能解析 (清水^{*1}, 中津^{*1}, 加藤)

酵素反応の仕組みを理解するためには、反応に伴う構造変化を明らかにするだけでなく、反応の鍵となる状態の構

造をできるだけ精密に解析することも必要である。例えば、酵素の基本的な触媒機構の 1 つである一般塩基触媒機構では、プロトンの移動が鍵になっていることから、反応機構の解明には水素を含めた構造情報が必要である。しかしながら、酵素の構造研究の主力である X 線結晶構造解析では電子を観察するため、水素原子の位置決定には 1.0 Å 以上の非常に高い分解能の結晶を必要とする。それに対し、中性子線は原子核によって散乱されるため、中性子線結晶構造解析は、水素の位置決定により適していると考えられている。

本研究では、ペクチンのポリガラクトuron酸主鎖の α -1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素、エンドポリガラクトuronナーゼ (endoPG) の反応機構を、水素原子を含む構造情報を基に解明することを目指し、その超高分解能 X 線結晶構造解析と中性子線結晶構造解析を行った。さらに、endoPG I の基質認識機構を解明するため、変異体酵素を用いて酵素基質複合体結晶の構造決定を行った。EndoPG は、*invertin* 型のグリコシダーゼに分類され、その反応は、2 つの酸性残基によって触媒される。そのうち、一方の残基はグリコシド結合の酸素にプロトンを提供する一般酸触媒として、もう一方の残基は加水分解を行う水分子からプロトンを引き抜く一般塩基触媒として働くと考えられている。

X 線に比べ中性子線の散乱は弱いいため、解析はデータ測定が可能な数ミリ立方の巨大な結晶を得ることが鍵になるが、中性子解析用の巨大 endoPG I 結晶の調製法は、マクロシーディング法を用いてすでに確立した。本年度は、この結晶を用いて、生成物ガラクトuron酸との複合体結晶として解析することを目的として研究を行った。

中性子回折強度データの測定ではバックグラウンドを上げる原因となる水素 (H) を可能な限り重水素 (D) に置換するため、重水中で複合体を形成する条件が必要である。しかし、中性子結晶構造解析は、データ測定に長期間を要することから、目的の複合体結晶が得られる条件を X 線結晶構造解析によりあらかじめ確認した。

中性子回折強度データの測定には、ガラクトuron酸を含む重水母液に対し 1ヶ月以上透析した結晶 (約 4.4 ミリ立方) を用いて行った。測定は、研究用原子炉 JRR-3 の生体高分子用中性子回折装置、BIX-4 にて行った。その結果、最大 1.5 Å の高分解能で $R_{\text{sym}} = 11.7\%$ (最外殻, 24.8%), $\text{Completeness} = 89.1\%$ (同, 68.5%) の回折強度データを得た。

構造決定は、X 線で得られた endoPG の結晶構造を初期構造として、プログラム SHELXL を用いて行った。すでに、 R 値 19.6%, R_{free} 値 21.9% まで構造精密化を進め、その結果、ガラクトuron酸の結合が確認されている。現在、引き続き構造精密化を行っている。

一方、EndoPG I 結晶のより高分解能でのデータ収集を目指して、試料結晶作成条件の変更を行い、さらに良質の結晶を得ることができた。そこで、SPring-8 の BL-41XU で超高分解能のデータを収集した。その際、短波長 (0.6 Å) の X 線と、大面積 IP 検出器 (RAXIS-V) を使用した。その結果、最高 0.63 Å 分解能に達する、タンパク質結晶として驚異的な高分解能の回折点が確認された。得られた回折像を処理した結果、0.68 Å の超高分解能で $R_{\text{sym}} = 3.2\%$ (最外殻, 30.0%) の、 $\text{Completeness} = 92.6\%$ (同, 80.7%) の

回折強度データを得た。現在、水素原子を含めた構造精密化を継続している。

酵素基質複合体の構造を捉えるためには、変異体酵素や基質アナログを用い酵素反応を停止させる仕組みが必要である。EndoPG Iには、有効な基質アナログが報告されていないことから、活性残基の1つを他のアミノ酸に置換した変異体酵素の結晶を作成し、酵素基質複合体の構造決定を試みた。結晶は、基質であるガラクトン酸6量体を含む溶液に浸漬した後にSPring-8のビームラインBL-38B1でX線回折強度データを測定した。得られたデータを解析した結果、基質結合部位に6つのガラクトン酸残基すべての電子密度が確認された。この構造から、初めてendoPGの基質認識機構の全容と基質のコンフォメーションについての知見を得ることに成功した。

*1 連携研究員, *2 研修生

1. Mechanism of Biological luminescence — Reaction mechanism of firefly luciferase analyzed by kinetic X-ray crystallography

To elucidate the bioluminescence mechanism of firefly, reaction mechanism of the firefly luciferase has been studied. The firefly luciferase catalyzes an oxidative reaction involving ATP, firefly luciferin and molecular oxygen, yielding an electronically excited oxyluciferin species. This excited species emits visible light. The quantum yield is the highest known for any bioluminescent reaction, with nearly one photon of light emitted for every luciferin molecule oxidized. The aim of the study is to capture the structures of the enzyme during the reaction by kinetic crystallography. Previous studies indicated that it is important to achieve the enzymatic reaction in the crystalline state to perform the kinetic X-ray crystallography of firefly luciferase. Thus, we prepared the crystals of the enzyme complexed with ATP, corresponding to the state prior to the reaction initiation. The X-ray diffraction data sets of crystals prepared by co-crystallization of ATP and the enzyme were collected by a RIGAKU imaging-plate area-detector, R-AXIS-V at SPring-8 beamline BL45PX. Structural analysis provided that the electron density showed all three phosphate groups of ATP, especially the β - and γ -phosphate moieties were in the in-line conformation that favorable for the phosphoryl transfer between the carboxy group of luciferin and β -phosphate of ATP. This is the first time to capture the structure of the bound ATP molecule at the active site of an enzyme that belongs to the adenylate-forming enzyme family.

2. Mechanism of molecular motion of nucleotide dependent protein machinery

(1) Mechanistic aspects for the function and molecular motion in ABC proteins

ATP-binding cassette (ABC) proteins comprise a family of structurally related membrane proteins sharing well-conserved nucleotide binding domains. Although their predicted secondary structures are very much alike, they have divergent functions and can be classified as transporters, channels, and regulators. They commonly use ATP hydrolysis as an energy source for various functions. Therefore, determination of three-dimensional structure at high resolution is important to elucidate their functional differences.

In this project, we have two aims in mind. First, we study P-glycoprotein, also termed as MDR1, that contributes to the multi-drug resistance developed in the course of the AIDS and cancer chemotherapy, in order to understand the mechanism of the multi-drug resistance. Second, we also try to find out ways to overcome the difficulties for overproduction of properly folded membrane proteins. Our idea is to utilize the peroxisome as a folding and storage device for overproduced membrane proteins. Since PMP70 and ALDP are the peroxisomal ABC transporters, successful over-expression of these proteins would prove our strategy.

(i) Structural basis of multi-drug resistance ABC transporter P-glycoprotein form human

Large-scale production of P-glycoprotein (MDR1) was conducted by baculovirus/insect cell expression system and stable MDR1 expression was thus confirmed. On the other hand, the conditions that keep the protein stable were explored. Cholesterol addition was particularly effective for maintaining the protein stability. Furthermore, MDR1 was genetically engineered to reduce conformational flexibility and consequently to increase crystallizability. The baculoviruses containing the mutant MDR1 genes were constructed. Characterization of the purified mutant MDR1 and scale up of the expression system are in progress.

(ii) Construction of crystallography-oriented overexpression system for membrane proteins derived from peroxisomal translocation

PMP70 is a peroxisomal ABC transporter that is assumed to be responsible for the metabolism of very long chain fatty acids. During the cellular localization of PMP70, a peroxin protein Pex19p seems to function like a chaperone to carry PMP70 toward another peroxin Pex3p on the peroxisomal membrane. To evaluate the specific interaction between Pex3p and Pex19p, we established the expression and purification procedures of Pex3p. The purified preparation allowed us to measure the dissociation constant between Pex3p and Pex19p by the intrinsic fluorescence intensity change. We also established the preparation of PMP22 or the Pex19p-PMP22 fusion protein. Our investigation of the protein-protein interactions (Pex3p-Pex19p-PMP) will be expected to explore protein samples suitable for the crystallization.

(2) Structural biology studies on the other nucleotide dependent proteins—Crystal structure of the C-terminal clock-oscillator domain of the cyanobacterial KaiA protein

Circadian rhythms, the daily activity cycles exhibited by most organisms, are sustained even in the absence of outside cues. Cyanobacteria are the most primitive organisms known to exhibit circadian rhythms. KaiA, KaiB and KaiC constitute the circadian clock machinery in cyanobacteria, and KaiA activates *kaiBC* expression whereas KaiC represses it. We observed that KaiA was composed of three functional domains, the N-terminal amplitude-amplifier domain, the central period-adjuster domain and the C-terminal clock-oscillator domain. The C-terminal domain was responsible for dimer formation, binding to KaiC, enhancing KaiC phosphorylation and generating the circadian oscillations. We determined the X-ray crystal structure of the C-terminal clock-oscillator domain of KaiA from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 at 1.8 Å resolution. Native and selenomethionine MAD data were collected at SPring-8 beamlines, BL26B2 and BL26B1, respectively, using a RIGAKU Jupiter210 detector. The structure showed that residue His270, located at the center of a KaiA dimer concavity, is essential to KaiA function. KaiA bind-

ing to KaiC probably occurs via the concave surface. On the basis of the structure, we predict the structural roles of the residues that affect circadian oscillations.

3. Capture of hydrogen behavior in enzymatic reaction by ultra-high resolution crystallography

The availability of high-intense synchrotron X-ray beam and efficient X-ray image detectors has also led to open the determination of three-dimensional structure at ultra-high resolution. In such a resolution, more than 1.0 Å resolution, we can recognize hydrogen atoms and identify the protonation state of functional residues in enzymes. On the other hand, neutron beam is suitable to analyze the structure of hydrogen atoms since neutron is diffracted by the nucleus instead of electron.

Endopolygalacturonase (endoPG) is an inverting glycosidase, which is involved in the degradation of pectin by hydrolyzing the α -1,4 glycosidic bonds. It is considered that the reaction is accelerated by acid-base catalyst. To visualize hydrogen atoms and/or protons involved in the reaction, we started neutron crystallography and sub-atomic resolution X-ray crystallography of endoPG from *Stereum purpureum*.

For the neutron crystallography, the crystals with 4.4 mm³ volume were prepared. Prior to the data collection, the crystals were soaked into the D₂O mother liquor containing galacturonate to prepare the galacturonate complex. The neutron diffraction data was collected at BIX-4, JRR-3 (JAERI). The data had a R-merge of 11.7% at 1.5 Å resolution. Further structural analysis of the data is in progress.

For sub-atomic resolution crystallography, we obtained 0.68 Å resolution X-ray diffraction intensity data of endoPG I crystal. The data collection was performed at beamline BL41XU using a RIGAKU R-AXIS V imaging plate detector. The model building and refinement are in progress.

Staff

Head

Dr. Hiroaki KATO

Members

Dr. Hiroyuki SHIBATA

Dr. Nobuyuki KOBASHI

Dr. Atsushi KODAN

Visiting Members

Dr. Susumu ICHIYAMA (Fac. Sci., Gakushuin Univ.)

Dr. Tsuneo IMANAKA (Fac. Pharm. Sci., Toyama Med. Pharm. Univ.)

Dr. Toru NAKATSU (Grad. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

Dr. Tetsuya SHIMIZU (Grad. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

Trainees

Ms. Kanako TERAKADO (Grad. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Matsubara M., Nakatsu T., Kato H., and Taniguchi H.:

“Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca²⁺/calmodulin”, *EMBO J.* **23**, 712–718 (2004). *

Ifuku K., Nakatsu T., Kato H., and Sato F.: “Crystal structure of the PsbP protein of photosystem II from *Nicotiana tabacum*”, *EMBO Rep.* **5**, 362–367 (2004). *

Shibata H., Kashiwayama Y., Imanaka T., and Kato H.: “Domain architecture and activity of human pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins”, *J. Biol. Chem.* **279**, 38486–38494 (2004). *

Uzumaki T., Fujita M., Nakatsu T., Hayashi F., Shibata H., Itoh N., Kato H., and Ishiura M.: “Crystal structure of the C-terminal clock-oscillator domain of the cyanobacterial KaiA protein”, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 623–631 (2004). *

Nakanishi T., Nakatsu T., Matsuoka M., Sakata K., and Kato H.: “Crystal structures of pyruvate phosphate dikinase from maize revealed an alternative conformation in the swiveling-domain motion”, *Biochemistry* **44**, 1136–1144 (2005). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kato H.: “Structural basis of firefly luciferase reaction”, 13th Int. Symp. on Bioluminescence and Chemiluminescence, (ISBC and JABC), Yokohama, Aug. (2004).

Shibata H., Kawashima Y., Imanaka T., and Kato H.: “Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins”, Int. Meet. on the Topogenesis of Organellar Proteins, Bochum, Germany, Oct. (2004).

(国内会議)

柴田洋之, 柏山恭範, 守田雅志, 今中常雄, 加藤博章: “ペルオキシソーム膜タンパク質局在化機構の解析: Pex19pのドメイン構造と機能”, 第3回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 6月(2003).

加藤博章: “ホタル・ルシフェラーゼ: 反応機構と発光制御の立体構造基盤”, 科学研究費補助金特定領域研究 (A) 「未解明生物現象を司る鍵化学物質」成果取りまとめシンポジウム, 名古屋, 6月(2003).

柴田洋之, 今中常雄, 加藤博章: “Domain structure and function of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins”, 第76回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2003).

小段篤史, 柴田洋之, 松本崇, 松尾道憲, 植田和光, 加藤博章: “Large scale purification of p-glycoprotein from Sf-9 insect cells”, 第76回日本生化学会大会, 横浜, 10月(2003).
清水伸隆, 清水哲哉, 酒井久伸, 中津亨, 加藤博章, 山本雅貴: “蛋白質の超高分解能構造解析”, 日本結晶学会平成16年

度年会, 吹田, 11 月 (2004).

加藤博章: “構造生物学の次世代技術とその応用”, 第 27 回
日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).

清水伸隆, 清水哲哉, 酒井久伸, 中津亨, 加藤博章, 山本雅貴:
“蛋白質の超高分解能構造解析”, 第 18 回日本放射光学会

年会・放射光科学合同シンポジウム, 鳥栖, 1 月 (2005).

加藤博章: “超高分解能 X 線・中性子線結晶構造解析による
酵素反応機構と水素原子の挙動”, 第 18 回日本放射光学
会年会・放射光科学合同シンポジウム, 鳥栖, 2 月 (2005).