

# 構造解析高度化研究チーム

## Protein Crystallographic Methodology Team

チームリーダー 神谷 信夫

KAMIYA, Nobuo

当研究チームでは、SPring-8の理研ビームラインを含めて、先端タンパク質結晶学研究グループに整備された研究基盤を利用するとともに、タンパク質結晶学に関わる新たな方法論を開発して、構造プロテオミクスにおける新領域の開拓を目指している。当研究チームは平成16年11月に、上記チームリーダーの下で、構造解析第1研究チームからチーム名を変更して発足した。

1. 4次元結晶構造解析法による酵素反応の構造生物化学 (河野, 大須賀<sup>\*1</sup>, 橋本<sup>\*1</sup>, 野尻<sup>\*2</sup>, 尾高<sup>\*2</sup>, 養王田<sup>\*2</sup>, 神谷)

当研究チームではX線結晶学の手法を駆使して酵素反応を網羅的に動的に追跡することを目指している。現在はその先行研究として、ニトリルヒドラーゼ(NHase)の酵素反応過程の追跡を行っている。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。本年度は反応速度が野生型に比べて1/50に低下した変異体酵素の結晶構造を決定するとともに、大きな角度の回転結晶法を用いてNOの光脱離過程と基質類似化合物の鉄への配位過程の追跡を行った。

2. 膜タンパク質・超分子複合体の構造生物学 (内藤, 古瀬<sup>\*3</sup>, 逸見<sup>\*3</sup>, 大熊<sup>\*1</sup>, 沈<sup>\*2</sup>, 神谷; 中井, 中川, 倉光(ストラクチュローム連携研究グループ); 引間, 松(研究技術開発室); 井川, 美川, 柴田(柴田遺伝生化学研究室); 小林(小林脂質生物学研究室))

(1) 光化学系II粒子(PSII)は20種以上のサブユニットからなる巨大な膜タンパク質複合体であり、葉緑体のチラコイド膜に含まれ、太陽光を吸収して、2分子の水から分子状酸素を生成する。本年度は材料となる好熱性ラン藻の培養系を新たに立ち上げ、精製結晶化条件の精密化を行った結果、分解能3.2Åの回折強度データを収集することに成功した。昨年度までに得られていた3.7Å分解能の位相情報をもとに3.2Å分解能における電子密度図を計算し、それに基づいて構造モデルの修正と結晶学的精密化を行った。

(2) ほとんど全ての生物種におけるグリシン代謝では、グリシン開裂系が必要不可欠である。本年度は、高度好熱菌由来グリシン開裂系Pタンパク質の結晶構造を2.1Å分解能で決定した。Pタンパク質は $\alpha_2\beta_2$ テトラマーのピリドキサルリン酸依存性酵素(PLP酵素)であり、fold type IのPLP酵素に分類されている。構造既知のfold type IのPLP酵素はすべて $\alpha_2$ ダイマーを基本単位とするのに対し、Pタンパク質は $\alpha\beta$ ダイマーを基本単位として活性部位を構成するという特異な構造を持つことが分かった。またPLPを含むホロ酵素以外に、PLPを含まないアポ酵素およびホロ酵素・基質アナログ複合体の構造解析を行い、補酵素お

よび基質の認識など反応に重要と考えられるアミノ酸残基を同定した。これらの結果に基づいて、非ケト-シス型高グリシン血症の発症メカニズムをPタンパク質の立体構造に基づいて説明することに成功した。

(3) イネ萎縮ウイルス(RDV)粒子内に含まれるRNA結合タンパク質(P7)は、RDVがmRNAを合成する際に機能する分子であると考えられている。本年度は大腸菌で大量発現させたP7分子の可溶性条件の検討を行った。これまでP7分子は十分に可溶性化させることができなかったが、大腸菌破碎時の緩衝液条件を改良することによりP7分子の可溶性率の増加に成功した。recAタンパク質は多数のモノマーが重合してフィラメントを形成し、さらにDNAと相互作用して遺伝的相同組換え反応を司る。本年度は複数の機能分離変異体を作成し、これらに適用可能な新規の精製条件を確立した。現在は変異体recAタンパク質とDNAとの共結晶化条件の検索を進めている。生体膜上でオリゴマーを形成し膜に孔をあけて溶血活性を示すシマミミズ由来の毒素ライセニンが大腸菌で大量発現させることに成功した。その精製系を確立し、結晶化条件の検索を行った。

3. 構造生物学に関わる方法論の開発 (内藤, 神谷; 引間(研究技術開発室))

ハンギングドロップ蒸気拡散法はタンパク質の結晶化において従来から最も多用されてきたものであり、その方法に従った自動化ロボットの開発は、タンパク質結晶構造解析のハイスループット化になくはないものである。我々には、タンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合してハンギングドロップを作成する部分と、生成した結晶の成長過程を自動観察する部分について、平成11年度から3年間にわたり、石川島検査計測株式会社(IIC)と共同研究を進めた経緯があった。平成14年度から製品化が進められたクリスタルファインダー(CF)は、我々の開発した技術に応用したものであったが装置としての完成に至らなかったため、本年度からIICとの共同研究を再開する形でCFの完成を目指すこととなった。ほぼ半年間で装置全体の見直しを行い、ドロップ作成の信頼度を向上させて製品化を達成した。

<sup>\*1</sup> 研修生, <sup>\*2</sup> 共同研究員, <sup>\*3</sup> 協力研究員

Our team has launched several new initiatives in struc-

tural proteomics using RIKEN beamlines constructed at SPring-8 and basic equipments prepared in the Advanced Protein Crystallography Research group. Several research and development programs are under way, and these will contribute to the expanding program in structural proteomics of RIKEN.

### 1. Structural biochemistry on enzymatic reactions by four-dimensional protein crystallography

To gain deeper understandings of enzymatic reactions, we are developing new techniques for time-resolved crystallography. Nitrile Hydratase (NHase) from *Rhodococcus* species is an enzyme capable of catalyzing hydration of nitriles, and it contains a mononuclear non-heme iron as the reaction center. The center is activated by photo-driven NO release. We have determined a crystal structure of a mutant enzyme, activity of which is less than 1/50 than the wild type NHase. Using the large-angle oscillation technique at the RIKEN beamline BL45XU of SPring-8, we observed the NO releasing from the iron atom and the substrate-analogue binding to the reaction center.

### 2. Structural biology on membrane proteins and supura-complexes

Photosystem II (PSII) is a large membrane protein complex evolving molecular oxygen from waters with solar energies on the thylakoid membrane of chloroplast. A culture system of thermophilic cyanobacteria was newly constructed and purification/crystallization conditions of PSII were further refined, aiming at X-ray crystal structure analyses of atomic resolution. We succeeded to calculate new electron density maps at 3.2 Å resolution. The molecular model was revised and the crystallographic refinement procedure was started.

The glycine cleavage system (GCS) plays a crucial role in glycine degradation in most organisms. The crystal structure of P-protein of the GCS from *Thermus thermophilus* HB8 has been determined at 2.1 Å resolution. It reveals that P-protein does not involve the  $\alpha_2$ -type active dimer universally observed in the evolutionarily related pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzymes. Instead, novel  $\alpha\beta$ -type dimers associate to form an  $\alpha_2\beta_2$  tetramer. The binding of PLP to the apoenzyme induces large open-closed conformational changes. The complex structure of the holoenzyme with an inhibitor suggests residues that may be responsible for substrate recognition. These results provide insights into the molecular basis of nonketotic hyperglycinemia.

P7 is an RNA binding protein included in Rice Dwarf Virus (RDV), which functions inside RDV at the virus-mRNA synthesis. We succeeded to express the P7 protein in *E. coli* in the soluble form at a high quantity, improving a buffer constitution for cell disruption. The recA protein is a multi-functional recombinase. The monomers co-aggregate to form very long helical filaments and the filaments interact with relating DNAs in homologous genetic recombination. We have established many types of recA mutants in which one of the recA functions is affected by the mutation. Over-expression and purification procedures were constructed for the mutant proteins. Lysin is a hemolytic toxin from earth worm, which forms oligomers on the cell surface to form membrane pores. Expression and purification procedures were established in *E. coli*, and crystallization trials were started.

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

We completed Crystal Finder (CF), a high-throughput crystallization robot by the hanging- and sitting-drop vapor diffusion method, in collaboration with the Ishikawajima Inspection & Instrumentation Company (IIC).

### Staff

#### Head

Dr. Nobuo KAMIYA

#### Members

Dr. Yoshiaki KAWANO

Dr. Hisashi NAITOW

Dr. Munenori FURUSE\*

Dr. Takahiro HENMI\*

---

\* Contract Researcher

#### in collaboration with

Dr. Takaaki HIKIMA (Div. Synchrotron Radiat. Instrum.)

Dr. Shukuko IKAWA (Cell. Mol. Biol. Lab.)

Dr. Toshihide KOBAYASHI (Lipid Biol. Lab.)

Dr. Seiki KURAMITSU (Structurome Res. Group)

Mr. Taiji MATSU (Div. Synchrotron Radiat. Instrum.)

Dr. Tsutomu MIKAWA (Cell. Mol. Biol. Lab.)

Dr. Noriko NAKAGAWA (Structurome Res. Group)

Dr. Tadashi NAKAI (Structurome Res. Group)

Dr. Takehiko SHIBATA (Cell. Mol. Biol. Lab.)

#### Visiting Members

Dr. Masaki NOJIRI (Grad. Sch. Sci, Osaka Univ.)

Dr. Masafumi ODAKA (Dept. Biotechnol. Life Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Dr. Jian-Ren SHEN (Fac. Sci., Okayama Univ.)

Dr. Masafumi YOYODA (Dept. Biotechnol. Life Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

#### Trainees

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

Mr. Akio OKUMA (Fac. Sci., Okayama Univ.)

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

Inagaki E., Ukita Y., Kumei M., Kajihara Y., and Tahirov T.: "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of 2-keto-3-deoxygluconate kinase from *Thermus thermophilus*", Acta Cryst. D **60**, 761–763 (2004).

\*

- Lokanath N. K., Kuroishi C., Okazaki N., and Kunishima N.: "Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the glycine-cleavage system component T-protein from *Pyrococcus horikoshii* OT3", *Acta Cryst. D* **60**, 1450–1452 (2004). \*
- Lokanath N. K., Shiromizu I., Ohshima N., Nodake Y., Sugahara M., Yokoyama S., Kuramitsu S., Miyano M., and Kunishima N.: "Structure of aldolase from *Thermus thermophilus* HB8 showing the contribution of oligomeric state to thermostability", *Acta Cryst. D* **60**, 1816–1823 (2004). \*
- Hori T., Yokomizo T., Ago H., Sugahara M., Ueno G., Yamamoto M., Kumasaka T., Shimizu T., and Miyano M.: "Structural basis of leukotriene B<sub>4</sub> 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase catalytic mechanism and a possible Src homology 3 domain binding loop", *J. Biol. Chem.* **279**, 22615–22623 (2004). \*
- Hisanaga Y., Ago H., Nakagawa N., Hamada K., Ida K., Yamamoto M., Hori T., Arai Y., Sugahara M., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Miyano M.: "Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-coa synthetase dimer", *J. Biol. Chem.* **279**, 31717–31726 (2004). \*
- Sugawara H., Kawano Y., Hatakeyama T., Yamaya T., Kamiya N., and Sakakibara H.: "Crystal structure of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP2 from maize", *Protein Sci.* **14**, 202–208 (2005). \*
- (総説)
- 宮野雅司, 菅原光明: "ハイスループット自動結晶化観察システム", *Med. Sci. Dig.* **30**, 161–162 (2004).
- 神谷信夫: "時間分割結晶構造解析による4次元構造ゲノム化学のすすめ", *構造生物* **10**, No. 2, pp. 3–9 (2004).
- 坂部知平, 坂部貴和子, 佐々木教祐, 神谷信夫, 山根善久, 浅川徹: "高速時間分割電子レベル酵素結晶学の扉を開く装置開発: Super Galaxyの威力", *構造生物* **10**, No. 2, pp. 10–40 (2004).
- 国島直樹, 菅原光明: "SPRING-8・理化学研究所播磨研究所ハイスループットファクトリーにおける蛋白質大規模X線結晶構造解析にむけた取り組み", *放射光* **17**, 135–143 (2004).
- (その他)
- 菅原光明, 岡崎伸生, 宮野雅司: "全自動タンパク質結晶化観察ロボット (TERA)", *化学* **59**, No. 10, pp. 52–53 (2004).
- synthetase from *Pyrococcus horikoshii* OT3", 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).
- Sugahara M., Okazaki N., Nakamura Y., Kumei M., Tanaka T., Miyano M., and Yokoyama S.: "High throughput protein crystallization in Highthroughput Factory, SPring-8/RIKEN", 10th Int. Conf. on the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM10), Beijing, China, June (2004).
- Hori T., Yokomizo T., Ago H., Sugahara M., Ueno G., Yamamoto M., Kumasaka T., Shimizu T., and Miyano M.: "Structural basis of leukotriene B<sub>4</sub> 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase catalytic mechanism and a possible SH3-binding loop", *ASBMB Ann. Meet. and 8th IUBMB Conf.*, (American Society for Biochemistry and Molecular Biology and International Union of Biochemistry and Molecular Biology), Boston, USA, June (2004).
- Misaki S., Suzuki K., Kunishima N., Sugahara M., Kuroishi C., Kobayashi M., Fujimoto S., Sakurai M., and Nishijima K.: "Crystal structure of putative phosphomannomutase from *Thermus thermophilus* HB8", 2004 Ann. Meet. American Crystallographic Assoc., Chicago, USA, July (2004).
- Sugahara M., Ohshima N., Ukita Y., Tanaka T., and Kunishima N.: "Crystal Structure of ATP-dependent phosphoenolpyruvate Carboxykinase from *Thermus thermophilus* HB8 at 2.0 Å Resolution", 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Lokanath N. K., Fujimoto Y., Kumei M., and Kunishima N.: "Crystal structure of malate dehydrogenase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 revealed a new type of NADP folding", 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Okazaki N., Tanaka T., Nakamura Y., Kumei M., Miyano M., and Sugahara M.: "Development of data processing for High-throughput crystallization with TERA", 8th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR2004), (Himeji City, RIKEN, and others), Himeji, Sept. (2004).
- Sakabe K., Sakabe N., Kamiya N., Yamane T., and Asakawa T.: "Design concept of high-throughput data collection system for time-resolved protein crystallography using SPring-8 undulator X-rays", 3rd Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2004), Washington DC, USA, Nov. (2004).
- Kawano Y., Hashimoto K., and Kamiya N.: "Time-resolved crystallography with the large-angle oscillation technique on a photoreactive nitrile hydration enzyme, NHase", 3rd Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2004), Washington DC, USA, Nov. (2004).
- (国内会議)

#### □ 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Lokanath N. K., Shiromizu I., Matsunaga E., Tanaka T., and Kunishima N.: "Structure of  $\beta$ -glucosidase at atomic resolution and complex with glucose", 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (The Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).
- Ishijima J., Uchida Y., Kuroishi C., Tsuzuki C., Okazaki N., and Yutani K.: "Structure of putative alanyl-tRNA

- 内藤久志, 高潤一郎, 宮崎直幸, 小川輝, 中川敦史, 月原富武, 藤本瑞, 水野洋, 萩原恭二, 東貴彦, 渡邊康雄, 大村敏博: “イネ萎縮ウイルスの主要キャプシド蛋白質の構造”, 平成 16 年度日本植物病理学会大会, 福岡, 3 月 (2004).
- 宮崎直幸, 内藤久志, 高潤一郎, 中川敦史, 月原富武, 藤本瑞, 水野洋, 萩原恭二, 東貴彦, 渡邊康雄, 大村敏博: “イネ萎縮ウイルスの主要構成蛋白質の自己組織化機構”, 平成 16 年度日本植物病理学会大会, 福岡, 3 月 (2004).
- 萩原恭二, 東貴彦, 宮崎直幸, 内藤久志, 一木 (植原) 珠樹, 難波一徳, Cheng H. R., 水野洋, 中川敦史, 月原富武, 大村敏博: “イネ萎縮ウイルス内殻及び外殻粒子の構造構築機構”, 平成 16 年度日本植物病理学会大会, 福岡, 3 月 (2004).
- 菅原道泰, 野嶽勇一, 菅原光明, 国島直樹: “*Thermus thermophilus* HB8 からの dehydroquinase の結晶構造”, 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第 3 回連携研究会, (理研), 播磨, 7-8 月 (2004).
- 田中智之: “ハイスループット結晶化における動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering) の有効性”, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2004).
- 神谷信夫: “蛋白質結晶構造解析におけるピクセル検出器の可能性”, 第 8 回 SPring-8 シンポジウム「利用技術に関するワークショップ: 最新の検出器とその応用」, 播磨, 10 月 (2004).
- 河野能顕, 中島寛樹, 藤澤哲郎, 伊藤和輝, 秋山修志, 飯塚崇: “理研構造生物学ビームライン I(BL45XU) の現状”, 第 8 回 SPring-8 シンポジウム「利用技術に関するワークショップ: 最新の検出器とその応用」, (高輝度光科学研究センター), 播磨, 10 月 (2004).
- 仲村勇樹, 田中智之, 岡崎伸生, 糸井麻希, 菅原光明: “Evaluation and optimization of full automated crystallization and observation robot system “TERA””, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 内藤久志, 沈建仁, 大熊章郎, 川上恵典, 古瀬宗則, 逸見隆博, 神谷信夫: “Crystal structure refinement of photosystem II complex from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.5Å resolution”, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 河野能顕, 橋本浩一, 野尻正樹, 東常行, 神谷信夫: “LOT 法を用いた Fe-NHase の光活性化過程と基質類似化合物結合過程の追跡”, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 橋本浩一, 河野能顕, 神谷信夫: “嫌気条件下で結晶化した活性型鉄含有ニトリルヒドラターゼの反応中心構造”, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 中井忠志, 中川紀子, 真岡伸子, 増井良治, 倉光成紀, 神谷信夫: “高度好熱菌由来グリシン開裂系 P タンパクの X 線解析”, 日本結晶学会平成 16 年度年会, 吹田, 11 月 (2004).
- 菅原光明, 岡崎伸生, 仲村勇樹, 糸井麻希, 田中智之, 永島正嗣, 川村清和, 山井滋雄, 野々村健司, 佐藤貴久, 宮野雅司: “ポストゲノム時代の大規模処理システムの必要性と現状”, 第 5 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI2004), つくば, 12 月 (2004).
- 齊藤佳奈子, 川端邦明, 浅間一, 三島健稔, 菅原光明: “テクスチャ特徴量を用いたタンパク質結晶化状態判定手法: Support vector machine による識別実験”, 第 5 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI2004), つくば, 12 月 (2004).
- 糸井麻希, 岡崎伸生, 仲村勇樹, 田中智之, 菅原光明: “ハイスループット X 線結晶評価システムの開発”, 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).
- 豊川秀訓, 引間孝明, 中島寛樹, 神谷信夫, 鈴木昌世, 水牧仁一郎, 木村滋, 池田直, Christian B., Eikenberry E. F., Hulsen G.: “光子計数型ピクセル検出器を用いた構造解析実験の現状”, 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).
- 河野能顕, 橋本浩一, 野尻正樹, 東常行, 神谷信夫: “LOT 法を用いた Fe-NHase の光活性化過程と基質類似化合物結合過程の追跡”, 理研シンポジウム「構造生物学 (X): これからの構造生物学における新ツール」, 播磨, 1 月 (2005).
- 引間孝明, 豊川秀訓, 中島寛樹, 鈴木雅世, 神谷信夫: “タンパク質結晶構造解析に向けた光子計数型ピクセル検出器の現状”, 理研シンポジウム「構造生物学 (X): これからの構造生物学における新ツール」, 播磨, 1 月 (2005).
- 橋本浩一, 河野能顕, 神谷信夫: “嫌気条件下で結晶化した活性型鉄含有ニトリルヒドラターゼの反応中心構造”, 理研シンポジウム「構造生物学 (X): これからの構造生物学における新ツール」, 播磨, 1 月 (2005).
- 逸見隆博: “好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* からの光化学系 II 複合体の単離精製と結晶化”, 理研シンポジウム「構造生物学 (X): これからの構造生物学における新ツール」, 播磨, 1 月 (2005).
- 中井忠志, 中川紀子, 真岡伸子, 増井良治, 倉光成紀, 神谷信夫: “高度好熱菌由来グリシン開裂系 P タンパクの結晶構造”, 理研シンポジウム「構造生物学 (X): これからの構造生物学における新ツール」, 播磨, 1 月 (2005).