

多量体タンパク質構造解析研究チーム

Oligomeric Protein Crystallography Team

チームリーダー 国島直樹
KUNISHIMA, Naoki

当研究チームでは、多量体で機能するタンパク質に焦点を当て、タンパク 3000 プロジェクトの一環として結晶構造解析を用いた構造ゲノムの研究および関連技術開発を行っている。多量体形成の生物学的役割の体系的理解を目指すため、我々は大規模な構造解析の結果得られる数多くの結晶構造を比較する手法をとっている。また、大規模構造解析を効率良く行うために、自動解析システム・構造評価システム・回折チェックロボット等の新技術を開発している。我々はこれらの技術開発を通じてタンパク質の立体構造と機能との相関を系統的かつ網羅的に解析し、これらの研究および技術開発を通じて構造ゲノム科学とその産業応用に貢献したいと考えている。

1. 構造ゲノム科学のための網羅的結晶構造解析および技術開発 (国島, 浅田, Bagautdinov, Lokanath, 水谷, 清水, 菅原, 山本)

構造解析のハイスループット化のためには、解析そのものの効率化に加え、得られた立体構造を評価するための機能解析環境も効率化する必要がある。本年度当研究チームでは、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 および超好熱古細菌 *Pyrococcus Horikoshii* OT3 由来タンパク質 37 種類の結晶構造解析を通じて、これら効率化のための技術開発を進めた。まず構造解析効率化のためのソフトウェア開発として、自動解析システムの開発および構造評価システムの開発を行った。次に、昨年度開発した解析実験データベースの研究者による試験的運用を行い、今後の解析未経験者による運用に備えた。また、SPRING-8 構造ゲノムビームライン BL26B1/B2 と連携してインハウス回折ロボットの導入・運用およびそれらを通じた機能改善を行った。さらに、汎用性に優れたクライオプロテクタントを開発し、その結果、異なる結晶化条件から得られた多数のタンパク質結晶の回折チェック作業が効率化された。加えて、重原子誘導体結晶作製の効率化のため、アミノ酸配列に基づいた結合重原子試薬の予測法を開発した。さらに、構造生物学的研究として、オリゴマー状態で機能するタンパク質の結晶構造解析を行い、タンパク質機能とオリゴマー状態との相関関係を体系的に研究した。本年度は数種類のオリゴマータンパク質の構造解析を通じて構造評価方法を確立した。この方法を適用することにより、これまで見逃されていた微妙でかつ生物学的に意味のある構造変化を捉えることが可能になった。また、大阪市大・宮田グループとの共同研究でマイコプラズマ滑走運動の分子機構について研究した。さらに、岐阜薬科大・原グループとの共同研究で、ウロン酸回路において機能する L-gulonate 3-dehydrogenase, 五炭糖の代謝に関わる D-xylose dehydrogenase などの酵素群の分子機構について、オリゴマー酵素を中心に結晶構造解析の手法を用いて研究した。

1. Cyclopedic analysis of protein crystal struc-

ture and related technological development for the structural genomics

As a part of the protein 3000 project, we perform the structural genomics oriented study on the structure-function relationship of oligomeric proteins and undertake relevant technological development. In order to obtain the systematic understanding for the biological role of protein oligomerization, we compare a huge number of crystal structures from the large-scale structural analysis. At the same time, we develop new technologies for high-throughput crystallography, including an automated analysis system, the structure evaluation system, and the diffraction checking robot. Through this research and development, we would like to contribute to structural genomics and the relevant industrial applications. In this fiscal year, we focused on the technological developments through the structure determination of 37 proteins from thermophilic organisms. The normalized experiment procedure is now implemented on software system: the automatic analysis system and the structure evaluation system. We also developed several other technological developments for high-throughput structure determination. Furthermore, we established an effective method to analyze the subtle but biologically relevant conformational changes of oligomeric proteins, through researches in structural biology for several oligomeric proteins.

Staff

Head

Dr. Naoki KUNISHIMA

Members

Mr. Yukuhiko ASADA
Dr. Bagautdin, BAGAUTDINOV
Dr. Neratur K. LOKANATH
Dr. Hisashi MIZUTANI
Dr. Katsumi SHIMIZU
Dr. Michihiro SUGAHARA
Mr. Hitoshi YAMAMOTO

Visiting Members

Mr. Haruhiko AYAMA
Mr. Masahiko BANDO (Otsuka Pharm. Co., Ltd)
Dr. Khoon-Tee CHONG (Taiho Pharm. Co., Ltd)
Dr. Shoko FUJIMOTO (Eisai Co., Ltd)
Dr. Akira HARA (Gifu Pharm. Univ.)
Mr. Tatsuya HORIO (Nippon Shinyaku Co., Ltd)
Mr. Takayoshi KINOSHITA (Fujisawa Pharm. Co., Ltd)
Dr. Masanori KOBAYASHI (SPring-8 Service Co., Ltd)
Mr. Masahiro KOIZUMI (Teijin Co., Ltd)
Dr. Shintaro MISAKI (Shionogi Co., Ltd)
Mr. Hiroshi MIWA
Dr. Makoto MIYATA (Osaka City Univ.)
Ms. Kumiko MORIMOTO
Dr. M.R.N. MURTHY (Indian Inst. Sci., Bangalore, India)
Dr. Chikahiro NAGATA (Daiichi Pharm. Co., Ltd)
Mr. Yuichiro NAKAISHI (Otsuka Pharm. Co., Ltd)
Mr. Takanobu NAKAMOTO
Dr. Masahiro SAKURAI (Eisai Co., Ltd)
Mr. Yoshifumi SATO
Mr. Hiroki SHIMADA
Mr. Ikuya SHIROMIZU (Mochida Pharm. Co., Ltd)
Dr. Shigetoshi SUGIO (Mitsubishi Pharma Corp.)
Dr. Kenji SUZUKI (Dainippon Pharm. Co., Ltd)
Mr. Hideyuki TAKA (Hitachi Software Eng. Co., Ltd)
Ms. Yasuko TERASHIMA

誌上発表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

- 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). *
- Lokanath N. K., Ukita Y., Sugahara M., and Kunishima N.: "Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the vacuole-type ATPase subunit E from *Pyrococcus horikoshii* OT3", *Acta Cryst. F* **61**, 56–58 (2005). *
- Bagautdinov B., Kuroishi C., Sugahara M., and Kunishima N.: "Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the biotin-protein ligase from *Pyrococcus horikoshii* OT3", *Acta Cryst. F* **61**, 193–195 (2005). *
- Sugahara M., Nodake Y., Sugahara M., and Kunishima N.: "Crystal structure of dehydroquinase synthase from

Thermus thermophilus HB8 showing functional importance of the dimeric state", *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **58**, 249–252 (2005). *

- Lokanath N. K., Kuroishi C., Okazaki N., and Kunishima N.: "Crystal structure of a component of glycine cleavage system: T-protein from *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 1.5 Å resolution", *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **58**, 769–773 (2005). *

(総説)

- 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).

口頭発表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Lokanath N. K., Shiromizu I., Matsunaga E., Tanaka T., and Kunishima N.: "Structure of β -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).
- Kunishima N.: "Efforts toward the high-throughput determination of protein structures in RIKEN", 2nd Int. E.Coli Alliance Conf. on Systems Biology: Project Gemini, Banff, Alberta, Canada, 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).
- Kunishima N.: "Toward the next phase of post-genomic protein research", The Consortium for Post-Genome Science 2nd Conf.: Genomes to Systems, Manchester, UK, Sept. (2004).
- Kuramitsu S., Ebihara A., Kanagawa M., Kuroishi C., Sato S., Agari Y., Iino H., Kashihara A., Kira S., Yanai H., Imagawa T., Nakagawa N., Masui R., Bessho Y., Hori-Takemoto C., Handa N., Kishishita S., Niino-kukimoto M., Kaminishi T., Wang H., Mizohata E., Shibata R., Kato-Murayama M., Kawazoe M., Arai R., Toyama M., Kunishima N., Tahirov T., Sekine S.,

- Shinkai A., Vassylyev D. G., Murayama K., Terada T., Shirouzu M., Miki K., and Yokoyama S.: "A structural and functional whole-cell project for the model organism, *Thermus thermophilus* HB8", 3rd Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2004), (International Structural Genomics Organization and others), Washington DC, USA, Nov. (2004).
- Lokanath N. K., Kuroishi C., Okazaki N., and Kunishima N.: "Crystal structure of a glycine cleavage system: T-protein from *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 1.5Å resolution", 3rd Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2004), (International Structural Genomics Organization and others), Washington DC, USA, Nov. (2004).
- Bagautdinov B., Takio K., Sugahara M., and Kunishima N.: "Crystallographic analysis of the biotin (acetyl-CoA-carboxylase)ligase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its complexes", 3rd Int. Conf. on Structural Genomics (ICSG 2004), (International Structural Genomics Organization and others), Washinton DC, USA, Nov. (2004). (国内会議)
- 浅田征彦, 高秀幸, 菅原道泰, 阿山晴彦, 卯川尚史, 国島直樹: "蛋白質構造解析支援ソフトウェアの開発", 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).
- 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).
- 国島直樹, 村山和隆, 横山茂之: "X線結晶構造解析", 第3回タンパク3000プロジェクト公開シンポジウム, (文科学省タンパク3000プロジェクト推進委員会), 豊中, 11月(2004).
- 浅田征彦, 高秀幸, 菅原道泰, 阿山晴彦, 国島直樹: "蛋白質構造解析支援ソフトウェアの開発", 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」, (RIKEN, SPring-8), 播磨, 1月(2005).