

# 放射光構造生物学研究推進グループ

## SR Structural Biology Research Group

代表研究者 城 宜 嗣  
SHIRO, Yoshitsugu

構造生物学は、生体高分子、すなわちタンパク質・核酸あるいはそれらの複合体の高次構造を基盤に、生命現象の仕組みを理解・解明しようとする科学である。近年の放射光利用やコンピューター技術、結晶構造解析技術、遺伝子組換え技術などの発展により、構造解析されたタンパク質の数は飛躍的に増えてきた。分子量数万程度の可溶性タンパク質は言うに及ばず、中にはリボゾームに代表される分子量 100 万を超える巨大超分子複合体や、光合成 PSII、ロドプシン、チトクロム酸化酵素などの生理的に極めて重要な膜結合タンパク質の結晶構造も報告されるようになってきた。さらには、原子分解能のタンパク質構造の報告も数多くなってきた。これらのタンパク質構造は、生物学のみならず医学・薬学など産業利用の面からも非常に重要な情報を提供してきた。一方、近年、ヒト全ゲノム配列をはじめとして、多くのウイルス、微生物、昆虫、植物、高等動物を含む百を超える全ゲノム配列も報告され、それらゲノム情報にコードされた多様なタンパク質の立体構造を網羅的にまた体系的に解き明かし、ゲノム機能を理解しようとする“構造ゲノム科学”も世界各地の放射光施設で活発に進められている。構造生物学と構造ゲノム科学は、将来の生物科学の基礎を織りなす縦糸と横糸の関係に当たると考えられる。理研播磨研究所の生物系 5 研究室と 1 開発室が参加する「放射光研究：構造生物学研究」は、大型放射光施設 SPring-8 の理研構造生物学ビームライン (BL44B2, BL45XU) ならびに構造ゲノムビームライン (BL26B1 & B2) を有効に利用して、従来の構造生物学研究に加え、医薬開発・環境問題などへの応用も視野に入れた、次世代の構造生物学研究への展開を計ることを目的としている。さらに、理研中央研究所および各センターの研究室との数多くのタンパク質構造解析の共同研究を通して、理研の生命科学の発展に大いに寄与することも目指している。

研究担当者：宮野、吾郷、菅原、堀、島村 \*1、石嶋 \*1、中山 \*2、佐藤 \*3、坂田 \*4 (宮野構造生物物理研究室)；前田、藤沢、山下、似内、山本、成田 \*5、秋山 \*5、今井 \*1、伊藤 \*1、飯塚 \*6、芝田 \*6 (前田構造生物化学研究室)；三木、宮武、久野、岩崎、竹田 \*1、林田 \*1、田之倉 \*4 (三木生物超分子結晶学研究室)；城、青山、杉本、菊地、日野 \*5、汲田 \*1、山田 \*5、金 \*5、高 \*1、Jeyakanthan \*1、瀧尾 \*3、大嶋 \*1、中村 \*1、高橋 \*7、吉川 \*4 (城生体金属科学研究室)；横山、Vassilyev、新海、関根、嶋田、赤坂 \*4、鎌足 \*5、北原 \*5、Perederina \*1 (横山構造分子生物学研究室)；神谷、河野、内藤、古瀬 \*1、逸見 \*1 (構造解析高度化研究チーム)；引間 (研究技術開発室)；中井 \*3 (遺伝情報系蛋白質研究チーム)

### 1. ハイスループット構造解析技術の開発に関する研究

ハイスループット構造解析における残された困難タンパク質である GPCR を含む膜タンパク質の発現・精製法の検討を行い従来の大腸菌に加え、酵母・昆虫細胞を使った大量発現系の検討も行った。これまでに結晶化検討ができる品位と量で数種の膜タンパク質を生産できるようになり、いくつかについてその機能解析と結晶化をした。また、より高精度のタンパク質結晶構造解析を行うため、物質科学で実績のある MEM など新しい計算法応用のための計算環境を整えた。ヨウ素は長波長 X 線領域 ( $> 2 \text{ \AA}$ ) で  $f'' > 12e$  程度の異常分散効果を示すことから、CrK $\alpha$  線 ( $\lambda = 2.29 \text{ \AA}$ ) または長波長放射光 X 線を利用することによりヨウ素ラベ

ルされた結晶の回折強度データから位相情報を得ることができる。ヨウ素の気化を利用してタンパク質結晶をヨウ素化する効果的な方法を開発し、SAD 法での位相決定ができることを示した。Green fluorescent protein (GFP) に代表される蛍光タンパク質 30 種の結晶化を試み、13 種の X 線結晶構造解析に成功した。全体構造はいずれも  $\beta$ -can 構造であったが、各タンパク質独特な発色団周辺構造を基盤にした蛍光タンパク質の発光機構 (蛍光の有無、蛍光色、量子収率など) の解明が可能となった。生体試料を対象とした X 線吸収スペクトル (bioXAS) に最適化した測定システム構築の一貫として、容易なセンタリング、アンジュレタビームラインを利用したより希薄な系への応用の 2 点に着手した。精製タンパク質の品質評価、機能解析、昆虫細胞培養室の維持管理、タンパク質の質量分析などの支援業務を開始した。過去に石川島播磨検査計測株式会社との共同開発にとりくんだクリスタルファインダーは、従来の共同研究の成果に基づいて製品化された結晶化ロボットであるが、ハンギングドロップ蒸気拡散法を適用できる特徴を有するものの装置としての完成に至らなかったため、本年度から共同作業を再開しそれを完成させた。

### 2. 構造ゲノミクス対応タンパク質構造解析に関する研究

抗ガン剤誘導され、複数のエイコサノイドを不可逆的不活化するロイコトリエン B $_4$  12-水酸基酸化/15-ケトプロスタグランジン還元酵素をマルチターゲット医薬品インドメタシンとの薬剤複合体結晶で解析しその阻害作用機構を明

らかにした。脂質メディエーターの1つであるセラミドを生成するスフィンゴミエリン水解酵素の構造を初めて解明した。昨年度は、筋収縮のカルシウム調節でカルシウム受容体として働くトロポニンの結晶構造を解明した。本年度は、アクチンフィラメント上でのトロポニンの位置と形態について一連の新しい知見を得た。コントラスト変調法を併用した中性子溶液散乱法によって、アクチンフィラメント上でトロポニンCは(結晶構造とは異なり)伸展したダンベル形をしていることが分かった。また、中性子溶液散乱法とX線繊維回折法によって、トロポニンの中核部分が、カルシウム結合によってフィラメント軸方向に約10Å移動すると結論された。クライオ電子顕微鏡法から得た位相情報、X線繊維回折法から得た振幅情報を総合してアクチン重合体の三次元電子密度分布を得た。これとアクチン単量体の結晶構造を基にしてアクチン重合体の原子模型を構築した。この原子模型から、アクチン分子の各サブドメインの機能的役割と分子間相互作用についての多くの仮説を得ることができた。今後は現在開発中のアクチン発現系を使ってこれら仮説の検証を行っていく。大腸菌のリポタンパク質輸送体 LolA の変異体 R43L の結晶構造解析を行った。リポタンパク質の結合の際に起こる LolA の構造変化が非結合型でもすでに見られていることが明らかとなった。細胞周期において定常期の生存に必要なホスファターゼ SurE の結晶解析および機能解析を行った。高度好熱菌由来の SurE は、他種由来 SurE に比べてかなり異なった四次構造と高い基質特異性を持っていることが明らかになった。タイプ2ポリヒドロキシアルカン酸分解酵素の結晶構造解析を行い、タイプ1酵素と進化的に関係があることを見いだした。活性部位近傍は疎水的な残基が配置され、基質ポリマーとの相互作用に適していることが分かった。ヘム結合型二原子酸素添加酵素であるヒト由来インドールアミン2,3ジオキシゲナーゼの基質非結合型の結晶構造を基に各種変異体を作成し、反応機構を提唱した。ヒト由来サイトクロピンの高分解能結晶構造解析に成功した。脱窒菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の膜結合型一酸化窒素還元酵素の触媒反応サイクルにおける短寿命反応中間体を発見した。また、6Å分解能の回折データを与える単結晶を得た。新規界面活性剤3-オキサトリデシル- $\alpha$ -D-マンノシド(3OM)を用いて、モノマー型のウシ心筋チトクロム酸化酵素の結晶を得た。異なる結晶間でも同型性は保持されており、複数の結晶からの回折データを足し合わせた結果、1.65Å分解能のデータ収集に成功した。過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)による長鎖脂肪酸の水酸化反応を触媒する *Bacillus subtilis* 由来チトクロム P450 (P450<sub>BSβ</sub>) の生成物結合型ならびに一酸化炭素(CO)結合型の結晶構造を得た。X線小角散乱(SAXS)により高度好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来の二成分情報伝達系(ヒスチジンキナーゼHKとレスポンスレギュレーターRR)の溶液構造を、さらにHK/RR複合体のX線結晶構造回折から4.8Å電子密度を得た。λファージ由来Croタンパク質(λCro)の立体構造に折り畳まれるアミノ酸配列をデノボ設計し、多次元NMR解析により、その溶液構造を決定した。遺伝情報の流れ(転写、翻訳)に関するタンパク質の構造解析を行い、それらの作用機構の解明を目指した。グアノシン四リン酸(ppGpp)と共に転写を調節している因子である、大腸菌由来 DksA タンパク質の構造

解析を行い、転写制御メカニズムの解明を試みた。その結果、DksAのコイルドコイルドメインがRNAポリメラーゼ(RNAP)の基質侵入孔に侵入し、本ドメインの先端に位置するAsp残基が、ppGppに結合しているMg<sup>2+</sup>と結合して、ppGpp-RNAP複合体を安定化させていることが強く示唆された。古細菌 *Sulfolobus tokodaii* 株由来の転写調節因子様タンパク質 ST1889 の構造解析を行った。その結果、ST1889は細胞内タンパク質であるにも関わらず、ジスルフィド結合で結合した二量体であり、さらに、分子内にも1つのジスルフィド結合が存在する大変珍しい構造をしていた。好熱性らん藻の光化学系II膜タンパク質超分子複合体(PSII)の結晶構造解析をさらに高分解能化するために、独自にらん藻の培養、PSIIの精製と結晶化を行える体制を整えた。その結果、従来3.5Åを限界としていた回折分解能を3.2Åまで拡大することに成功した。光により活性化され、ニトリル化合物に水を付加して対応するアミドを合成する酵素:ニトリルヒドラーターゼについて、その基質アナログまたは基質との複合体を調製し、光活性化後の反応過程を時間分割結晶解析法により追跡した。イネ萎縮病ウイルスの研究では、感染に関与するP2タンパク質を含む完全粒子(従来の構造解析にはP2タンパク質は含まれていない)について分解能8Åの結晶解析を行い、P2タンパク質に対応する電子密度を初めて同定することに成功した。グリシン開裂系については、グリシンの脱炭酸過程を触媒するPタンパクの結晶構造解析に世界で初めて成功した。

\*1 協力研究員, \*2 ジュニア・リサーチ・アソシエイト, \*3 連携研究員, \*4 客員主管研究員, \*5 基礎科学特別研究員, \*6 業務協力員, \*7 協力技術員

In structural biology, many physiological actions can be understood on the basis of molecular structures of bio-macromolecules such as proteins and nucleic acids that are related to the actions. A large number of crystallographic structures of proteins including super-biomolecules with MW > 1,000 kDa (i.e., ribosome) and many membrane-bound proteins (i.e., PSII, cytochrome c oxidase, rhodopsin) have been reported. Many structures with an atomic resolution have been also available. The structural biology has provided useful and valuable information to the medical and pharmaceutical application as well as biological studies. On the other hand, "structural genomics" is now promoted in many synchrotrone facilities world-wide. In the structural genomics, protein structures based on genome sequences from diverse species will be systematically determined. Both structural biology and structural genomics provide molecular bases of biological studies. Five institute laboratories and one division participate the "RIKEN Structural Biology Research" project. The aim of this project is to examine structures of many proteins using the dedicated RIKEN Structural Biology Beam Lines (BL44B2, BL45XU, BL26B1 & B2) of SPring-8, and to develop a new field of the structural biology that could be applied to medical and environmental problems. Through a lot of collaborations, the Structural Biology Group of RIKEN Harima Institute largely contributes to the life science of all RIKEN.

## 1. Technical development for high throughput structural determination

Membrane proteins including GPCRs as one of the major difficult targets in High-throughput protein crystallography were tried their over-production by yeast and insect cells as well as *E. coli*. Several were successfully produced and purified, and were characterized and crystallized. Computer environments for novel possible accurate protein crystallographic analysis including MEM methods were prepared. Iodine offers sufficient anomalous scattering effect against X-rays of longer wavelengths. We have developed a novel method to label protein crystals with iodine atoms by means of vapor-diffusion, which is effective for phase determination by the SAD method. New chromo/fluoro-proteins (GFP-like proteins) cloned from anthozoa species were purified and the 13 crystal structures were subsequently determined in order to discuss interactions between the chromophore and amino acid residues, which are effective in determination of fluorescent colors. Systems for X-ray absorption spectroscopy of bio-related samples (bioXAS) has been developed at SPring-8 undulator beamline to obtain data with higher S/N ratio for ultra-diluted samples such as membrane proteins. The Functional Analysis Group of the Large Scale Protein Production Team in the Highthroughput Factory was reorganized to assist researchers of the Harima Institute in protein characterization. This year, more than 700 protein samples have been characterized by protein sequencer, mass spectrometer, PAGE, HPLC, fluorescence spectrometer and others. We completed Crystal Finder (CF), a high-throughput crystallization robot by the hanging-drop vapor diffusion method, in collaboration with the Ishikawajima Inspection & Instrumentation Company (IIC).

## 2. Structural determination of proteins in structural genomics

LTB<sub>4</sub> 12-HD/PGR, an essential multi-eicosanoids inactivating enzyme was determined as the complex structure with a common drug, indomethacin. The first crystal structure of sphingomyelinase was determined and elucidated the mechanism of the action. Troponin is the calcium receptor protein that plays key roles in the calcium regulation of muscle contraction. After our elucidation of crystal structure of troponin (2003), we have now studied where and in which conformations troponin resides on the actin filament. The neutron scattering in combination with the contrast variation methods have indicated that troponin C is in an extended dampbell shape. The neutron scattering as well as the X-ray fiber diffraction have elucidated that the core domain of troponin shift by 10 Å towards the filamentous axis upon Ca<sup>2+</sup> binding. We have also obtained the atomic model of polymerized actin, by

employing X-ray fiber diffraction, cryo-EM in combination with advanced refinement algorithm for fitting the atomic coordinates of a monomeric actin molecule to the 3D density map. Based on the atomic model, some testable hypotheses have been proposed about the nature of the intras as well as inter-monomer side chain interactions within the polymerized actin. The beam-line BL45XU-SAXS, a small angle scattering beam-line of high brilliance and high accuracy, has been continuously employed for studying protein folding processes and protein complex formations. The crystal structure of a free form of the mutant of the lipoprotein carrier LolA showed structural changes which are expected to occur upon binding of the lipoprotein. The crystal structure of a stationary-phase survival protein SurE was determined and its phosphatase activity was assayed. The crystal structure of the polyhydroxyalkanoate depolymerase type II revealed the evolutionary relationship with the type I enzyme. On the basis of the crystal structure of the heme-containing dioxygenases, that catalyze the first and rate-limiting step in the main pathway of human tryptophan catabolism, we proposed a possible mechanism of the catalytic reaction. The high resolution crystallographic analysis of ferric cytoglobin in orthorhombic crystal lattice revealed the additional helix, composed of twenty residues in the N-terminal extra region. We have obtained single crystals of bacterial nitric oxide reductase from denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, which diffracted X-ray at 6 Å resolution. Cytochrome c oxidase crystals diffracting X-rays at 1.65 Å resolution was obtained using 3-oxatridecyl- $\alpha$ -D-mannoside as a detergent. We determined structure of the ferrous-CO-bound form of peroxygenase cytochrome P450 from *Bacillus subtilis* (P450BS $\beta$ ) as an analog of oxygenated intermediate. Using small angle X-ray scattering technique, we obtained the solution structures of histidine kinase and its response regulator in two-component regulatory system from hyperthermophile, *Thermotoga maritima*. We also obtained the crystal structure of their complex at 4.8 Å resolution. Solution structure of an artificial protein computationally designed to fold into the bacteriophage  $\lambda$ Cro structure was determined by NMR spectroscopy, that is comparable to the X-ray structure of natural  $\lambda$ Cro with r.m.s. deviation 2.1 Å. In order to elucidate the mechanism of transcription and translation, crystal structures of *E. coli* transcription factor DksA, and transcription factor-like protein ST1889 have been analyzed. Structural biology researches were continued on the Photosystem II membrane protein supra-complex, a photoreactive hydration enzyme: Nitrile Hydratase, the whole particle of Rice Dwarf Virus, and the glycine cleavage system of *Thermus thermophilus* HB8.