

宮野構造生物物理研究室

Structural Biophysics Laboratory

主任研究員 宮野 雅司

MIYANO, Masashi

脂質は、生体の高密度エネルギー源で主要な細胞膜構成成分で、様々な化学修飾を受け多彩な生理活性信号伝達物質としても働く。多様な構造を持つ脂質は多くの疾患・病態と連関しているため、脂質関連タンパク質研究は医学薬学分野の応用への基盤情報となる。例えば、ロイコトリエンC₄(LTC₄)はアラキドン酸を出発物質として生合成されるエイコサノイドの一つで、強力な平滑筋収縮物質として知られ、喘息増悪時にLTC₄産出が増大するので、LTC₄合成酵素の特異的阻害剤は抗喘息抗アレルギー薬候補となる。そこで、未解明の本酵素の立体構造は、特異的薬剤設計の貴重な情報となる。我々は、基礎生物学としての脂質生物学の発展と医学薬学の基盤、創薬展開を視野に入れ、脂質関連タンパク質の構造・機能研究を中心に行っている。また、応用展開支援として化学生物学研究と、タンパク質結晶構造解析基盤技術向上のために、結晶イメージの自動判別法開発と、新規分子置換アルゴリズムと高精密化アルゴリズムの検証を共同で進めている。

1. 脂質関連タンパク質の構造・機能解析

(1) 病原性セリウス菌由来スフィンゴミエリン水解酵素の構造機能解析 (吾郷、津下^{*2}、宮野)

病原性セリウス菌 (*Bacillus cereus*) 由来スフィンゴミエリン水解酵素 (BcSMase) (EC:3.1.4.12) は、中性スフィンゴミエリナーゼに属し、スフィンゴミエリンをセラミドとコリンリン酸に加水分解するスフィンゴミエリナーゼ C 活性と溶血活性を示す。これらの活性はいずれも金属イオン依存的に発現する。BcSMase が分解するスフィンゴミエリンは、生体膜を構成する複合脂質の主要構成リン脂質の一つであり、その分解産物であるセラミドは、二次情報伝達物質として細胞外からの情報伝達にかかわる。またセラミドは外傷性の神経細胞アポトーシスにも関わり、この観点から、脳に分布しスフィンゴミエリナーゼ活性 C を示す中性 SMase (nSMase) が注目されている。BcSMase は、アミノ酸配列が nSMase と有為な相同性を示すだけでなく、特定の種類の金属イオン依存的に活性を発揮する点でも nSMase と類似しているため、スフィンゴミエリンの認識機構や金属イオンの役割なども共通であると考えられる。本研究では、BcSMase のスフィンゴミエリナーゼ C 活性の分子機構を明らかにするため、BcSMase のスフィンゴミエリナーゼ C 活性を著しく活性化する金属イオン二種類と、弱く活性化する金属イオン一種類に付いてそれぞれ BcSMase との複合体の結晶構造を解析した。その結果、高い活性を示す為には、水分子 1 個を共通の配位子として間に挟む 2 個の金属イオンがそれぞれスフィンゴミエリン結合部位にあるヒスチジンとグルタミン酸に結合する事が必要である事が明らかになった。また、溶血活性に関わる特異構造を明らかにし、この構造機能が酵素活性と構造・機能的に連関していることを明らかにした。

(2) ロイコトリエンB₄ 12-水酸化酵素/15-ケトプロスタグランジン還元酵素の結晶学的研究 (堀、石嶋^{*3}、吾郷、清水 (孝) ^{*1}、宮野)

脂質メディエーターは、生体恒常性維持や炎症細胞の活性を制御するホルモン脂質である。本酵素は、脂質メディエーターのうち安定なロイコトリエンB₄ (LTB₄) の 12 位の水酸基を酸化してLTB₄を不活性化し、また 15-ケトプロ

スタグランジンE₂ (15-keto-PGE₂)や 15-ケトリポキシンA₄ (15-keto-LXA₄)の 13 位の二重結合を還元してPGE₂やLXA₄を完全に不活性化させる。本酵素は生体内脂質メディエーター濃度を調節する必須酵素であるが、いくつかの非ステロイド抗炎症薬で活性阻害を受ける。非ステロイド抗炎症薬の一つであるインドメタシンの作用機構を複合体結晶構造解析により明らかにし、結合の熱力学を明らかにした。

(3) 長鎖脂肪酸アシル化 CoA 合成酵素の結晶構造解析 (吾郷、宮野)

長鎖脂肪酸アシル化 CoA 合成酵素(LC-FACS あるいは ACSL)は、長鎖脂肪酸に補酵素 A を結合し長鎖脂肪酸アシル化 CoA を合成することで、脂肪酸の細胞への取り込みなどの脂肪酸代謝過程で重要な役割を果たす。その重要性にもかかわらず LC-FACS の立体構造研究は未開拓の領域で、我々は先に高度好熱菌由来 LC-FACS の立体構造を明らかにし、30 年以上前に酵素速度論解析から予想されながら実験的に確認できなかった 3 基質 3 生成物の 2 段階反応の反応中間体を初めて実態としてとらえるとともに Bi-Uni-Uni-Bi 反応進行に従い、ホモ 2 量体にある脂質結合の穴に結合した長鎖脂肪酸が空間的に一方向にアシル化 CoA 生成物として運ばれることを原子レベルで明らかにした。高等動物では脂質選択性が異なる LC-FACS のアイソザイムを組織依存的に発現させる事で、組織に必要な脂肪酸の選択的取り込みを可能にしている。この組織依存的な脂肪酸取り込みの分子機構を明らかにする事は、脂質代謝に関わる肥満や高脂血症などの生活習慣病の分子レベルでの理解に寄与する。本研究では高等動物 LC-FACS の基質選択性を決定する構造を明らかにする事を目指し、哺乳動物由来の LC-FACS の立体構造を決定する。現在、LC-FACS の発現精製系の検討を行っている。

(4) ヒト由来ロイコトリエンC₄合成酵素の構造研究 (吾郷、入倉^{*3}、金岡^{*2}、島村^{*3}、宮野)

膜貫通型タンパク質であるロイコトリエンC₄合成酵素 (LTC₄S)は、ロイコトリエンA₄ (LTA₄)に還元型グルタチオンを付加しロイコトリエンC₄ (LTC₄)を生合成する酵素である。LTC₄とその代謝物であるLTD₄、LTE₄は、総称して

システイニルロイコトリエン(Cys-LT)と呼ばれ、特異的受容体に結合する事で気道平滑筋の収縮や毛細血管からの血漿漏出など喘息特有の症状を誘発する。また最近の遺伝子欠損動物による実験から様々な免疫反応の制御に関わることが明らかになってきている。これらの点からLTC₄SはCys-LTによる生体反応において鍵となる酵素である。本研究では、LTC₄Sの構造をX線結晶構造解析によって明らかにし、さらに基質認識や触媒反応の構造的基礎を明らかにする。現在までに、LTC₄Sを転換体*Schizosaccharomyces pombe* で発現させdodecylmaltoideを用いて精製し結晶化した。また、転換体*S. pombe*をセレノメチオニン存在下で培養し、構造決定に必要なセレノメチオニン置換LTC₄Sを発現・精製した。

(5) ロイコトリエンB₄レセプターと血小板活性化因子受容体の構造研究(佐藤(高等動物タンパク質構造解析研究チーム)、堀、石井²、清水(孝)^{*1}、宮野)

ヒトゲノム中には800を超えるGタンパク質共役型受容体(GPCR)がコードされているが、これらの多くが創薬ターゲットとなる可能性を持つ。脂質メディエーター受容体のほとんどはGPCRに分類され、最も構造解析が困難な膜蛋白として知られている。構造解析を困難にしている理由としては、まず安定した大量発現が困難であることが挙げられる。本研究では、昆虫細胞にヒト脂質メディエーター受容体を発現させ生理活性の解析を行うと同時に、構造解析を目的とした受容体の大量発現・精製系の確立にむけて基礎的な検討を行っている。

ショウジョウバエ卵母細胞由来細胞株は小型で細胞の体積に比べ膜面積比が他の細胞よりも大きく、高密度培養が可能ことから、膜タンパクの高発現には適している。Drosophila melanogaster 2 (D.mel-2)を用いた脂質メディエーター受容体の安定発現株の構築を試みた。そして、D.mel-2によりロイコトリエンB₄レセプター(BLT1)、血小板活性化因子受容体(PAFR)について、遺伝子の動物種によらず比較的安定した発現し、その安定発現株を樹立をし、さらに高安定発現株を選抜・増殖した。BLT1高発現安定発現株を使つての大量培養では10⁷ cells/mlの密度となり、3リットル培養で10¹¹個の細胞生産となった。

BLT1、PAFRそれぞれの産生株の膜粗抽出画分を調製し、さらに可溶化してHis-タグ精製を行った。質量分析計で目的受容体であることを確認した。BLT1産生株の膜画分を用いてリガンド結合活性を確認し、各種アンタゴニストを用いた薬理学的活性も確認した。

一方、発現精製が容易な大腸菌および分裂酵母を用いた両受容体の発現系構築を行った。大腸菌においては、結晶化を行えるだけの発現量を達成することはでき、さらに発現誘導条件の最適化により、温和な界面活性剤で可溶化できた。しかしながら、発現受容体のリガンド結合活性はなかった。

(6) プロスタグランジンE₂ (PGE₂)認識マウスモノクローナルIgG1の構造解析(菅原、石嶋³、倉橋²、勝川⁵、山本²、宮野)
PGE₂は、炎症作用と抗炎症作用を併せ持ち、血管拡張、血圧降下、胃液分泌抑制など様々な生理作用を引き起こす。

用いたマウスIgG1は非常に高い抗原認識能力をもち、結合して不活性化するため、その動態研究のツールとして、実際に検査試薬として使われている。そこでPGE₂やその基質アナログとの高PGE₂特異抗体およびそのFabの複合体を解析することで、その脂質メディエーター分子の認識機構を解明する。今年度は、抗体およびFab化抗体の高純度精製に成功し、結晶化を検討中である。

2. 化学生物学を目指した構造・機能解析

(1) β-ラクタマーゼ、Toho-1の超高分解能X線結晶構造解析(内山^{*4}、島村^{*3}、宮野)

β-ラクタマーゼToho-1は、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼであり、近年の薬剤耐性菌に対して開発された第三世代セフェム系抗生物質に対しても高い加水分解活性を持つ。既にToho-1の立体構造は、酵素-基質複合体のものが高分解能で解明されている。さらに、基質拡張型β-ラクタマーゼの触媒機構の詳細を明らかにして、酵素-基質複合体における基質とβ-ラクタマーゼとの詳細な非共有結合分子間相互作用を水の構造を含めて実験的に明らかにすることで、新規抗生物質開発の構造情報基盤を提供する。このため、Toho-1の超高分解能X線結晶構造解析を進めた。分子間接触に関与する残基を置換した人工型酵素を使った結晶化により、結晶内での分子配向性が良くなり、この変異体Toho-1アポ結晶で、大きさ0.5x0.5x0.4 mmの結晶で0.98 Åまで回折斑点が認められた。空間群、格子定数とも野生型と同じであった。既報の天然型構造を用いた分子置換法で位相決定をし、結晶学的精密化とモデル再構築をすすめた。1.00 Åまでの分解能でR=13.4%、R_{free}=16.2%の立体構造モデルを得た。酵素-基質複合体結晶でも1.00 Åに近い(1.10~1.20 Å)高分解能での回折データが得られ、現在構造精密化中である。更なる高分解能データを得るため、結晶化条件の最適化を進めている。

(2) ホーミングエンドヌクレアーゼI-Tsp061Iの結晶構造に基づくDNA認識機構の解析(中山^{*4}、島村^{*3}、津下^{*2}、宮野)

ホーミングエンドヌクレアーゼ(HEase)はイントロン中にコードされたイントロンやインテインの水平伝播の鍵酵素である。HEaseは長いDNA配列(14-40bp)を認識して切断する特異性が極めて高い部位特異的DNAエンドヌクレアーゼとして機能する。この長いDNA配列認識はまた、極めてまれな位置で切断するrare-cutting enzymeとして機能するので、ゲノム研究においてHEaseは部位特異的な遺伝子組み換えや長いDNA断片のクローニング(メガベース・クローニング)等に応用の可能性がある。現在のところ、切断出来る対象部位が限定されており、広く応用出来るまでには至っていない。そこでこの汎用性の低さを克服するため、既存の認識配列を改変したHEaseのデザインを目標としている。HEaseの効率的な認識配列改変を行う第一歩として、超好熱古細菌 *Thermoproteus* sp. IC-061株の16S rDNAイントロン内部のORFにコードされていたI-Tsp061IのX線結晶構造に基づきDNA複合体モデルを作成し、相互作用を検討した。DNAと塩基特異的な相互作用をするアミノ酸残基候補を複数選択し、位置特異変異導入したI-Tsp061Iの変異体について、基質特異性変化を検定した結果、活性が野生型より高い変異型酵素が複数

得られた。

(3) ヒトM1 ファミリー亜鉛アミノペプチダーゼの結晶構造解析 (菅原、石嶋^{*3}、服部 (辻本細胞生化学研究室)、辻本 (辻本細胞生化学研究室)、宮野)

哺乳動物において重要な生理機能を担っている糖タンパク質である M1 亜鉛アミノペプチダーゼのうちヒト由来の脂肪細胞由来ロイシンアミノペプチダーゼ (A-LAP) およびアミノペプチダーゼ A (APA) について、天然糖鎖修飾型および糖鎖のない変異体を昆虫細胞により大量発現・精製し、結晶化の検討を行っている。

(4) カンピロバクター由来シアル酸転移酵素の大量調製とX線結晶解析 (菅原、石嶋^{*3}、梶原^{*2}、宮野)

シアル酸は細胞膜表面のオリゴ糖の末端に存在して、リガンド-受容体および細胞-細胞間相互作用に重要な生物学的機能を担っている。シアル酸転移酵素は糖タンパク質のムチン型糖鎖やアスパラギン結合型糖鎖およびスフィンゴ糖脂質の非還元末端糖残基 (ガラクトース, N-アセチルガラクトサミン, N-アセチルグルコサミン, シアル酸) に CMP-シアル酸を糖供与体として転移する酵素群である。基質とする糖鎖や形成される結合様式の違いにより異なる酵素が関与する。これらの酵素とその変異体を作成し、結晶化および酵素学的な反応メカニズムの検討をおこなっている。

(5) ヒト由来カルシニューリンホモログスプロテイン (CHP) の精製および結晶化 (菅原、石嶋^{*3}、若林^{*2}、宮野)

CHPは、細胞に普遍的に含まれ細胞内部のpHを調節する膜タンパク質であるNa⁺-H⁺ exchanger (NHE1) に結合し、何らかの制御因子として働くことが示唆されている。NHE1 のCHP結合配列部分のペプチド断片とCHPを大腸菌で共発現させて得られた複合体試料の高純度精製に成功し、添加剤としてイットリウムなどを含む条件から3 Å分解能を越えるX線回折能のある結晶が得られ、構造解析を行っている。

(6) 膜タンパク質の構造解析 (島村^{*3}、岩田^{*2}、宮野)

タンパク質全体の約30%を占めている膜タンパク質は、細胞の中と外の間の情報、エネルギー、物質の輸送や伝達等で重要な働きを担っている。さらに、創薬ターゲットの約50%が膜タンパク質である。このようなことから、膜タンパク質の立体構造を明らかにすることは、意義がある。しかし膜タンパク質は大量に精製することが難しいため、構造はほとんど分かっていない。

そこで我々は、好熱菌由来の数種の膜タンパク質について立体構造の解析を目指し、まず、発現及び精製系の構築を行った。対象とした膜タンパク質は、細菌だけでなく、真核生物由来のものも含んでいる。発現は、主に大腸菌を用いた。また、精製を容易にするために、His-tagを導入した。新たに、1種の膜タンパク質について、結晶化の検討を行うに十分な純度と量で精製する系を確立することに成功した。

3. タンパク質構造解析技術の高度化を目指した研究

(1) タンパク質結晶化の効率化 (菅原、国島 (多量体タ

ンパク質構造解析研究チーム)、川端 (分散適応ロボティクス研究ユニット)、宮野)

タンパク質の X 線結晶構造解析で、最大のボトルネックである。そこで結晶化のための全自動結晶化観察ロボット (TERA) の開発により、多数の試料の標準条件での結晶化に成功した。ロボットによる実際の稼働によるこれまでの経験と蓄積された膨大な数の結晶化イメージを使って、結晶化写真の自動判別ソフトウェア開発をロボティクス研究グループと共同でおこなっている。結晶化ドロップの形状と画像の撮影条件の均一化により、90%を越える判別が可能となった。

(2) 構造解析の高度化 (石嶋^{*3}、吾郷、西堀^{*2}、坂田^{*1}、戎崎 (情報基盤研究部)、宮野)

超精密構造解析 - タンパク質の超高分解能精密解析は、タンパク質の構造や機能の源泉となって生体機能発現の中心的役割を果たしている水の構造を含む水素結合など非共有結合相互作用を検討する上で必須である。しかし、有機小分子、材料結晶などとは違い、実在のタンパク質結晶の不完全性、タンパク質結晶の損傷、さらに回折データ収集システムの限界など多くの実験的制約の中で、水を含む非共有結合相互作用を再検討する基礎データとなりうる超高分解能解析が出来るタンパク質結晶の数は少ない。またさらに、現在の結晶解析計算がフーリエ解析に基づいていることによる原理的限界が存在する。これまでに C60、シリコン結晶などの超高分解能解析に実績があり、フーリエ解析の原理的限界を超える電子密度改良法であるマキシマムエントロピー法 (MEM) を準原子分解能のタンパク質結晶の回折強度データに対して適応し、タンパク質結晶解析の精密解析における MEM 法の有用性と限界を検討した。

分子置換法 - 分子置換法はタンパク質の X 線結晶構造解析の主要な構造決定法であるが、構造の相同性が十分高いタンパク質の立体構造モデルがあらかじめ必要であるという制約がある。このためアミノ酸配列の相同性と立体構造の相同性の間の相関が低いタンパク質の構造を決定する場合には、解析出来ない。この限界の緩和・解決を目指して、遺伝的アルゴリズムを取り入れた分子置換法 GA-MR 法の開発に参画した。

^{*1}客員主幹研究員、^{*2}客員研究員、^{*3}協力研究員、^{*4}ジュニア・リサーチ・アソシエイト、^{*5}研修生

We have been focusing on the structural-based functional analyses for enzymes and receptors related to lipids. These proteins are biologically important and the major targets for the therapeutics for inflammation and immuno-modulation. We also develop new technologies for SR protein crystallography in collaboration.

1. Structural based functional study of lipid-related proteins

(1) Crystallographic analysis of neutral-sphingomyelinase from *Bacillus cereus* (BcSMase)

BcSMase exerts phosphodiesterase C activity on sphingomyelin (SM) as well as hemolysis activity. BcSMase requires divalent cations for these activities. The crystal structures of BcSMase with various divalent cations reveal that the essential

architecture for the efficient hydrolysis of SM is the water-bridged two divalent cations of which one cation binds to glutamic acid and the other one binds to histidine in the substrate binding site. Because of the similarities on the amino acid sequence and the divalent cation dependency, the architecture would be common to human neutral sphingomyelinase involved in the traumatic neural apoptosis.

(2) Crystallographic study of leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase (LTB₄ 12-HD/PGR)

The bi-functional LTB₄ 12-HD/PGR is an essential enzyme for eicosanoid inactivation. Anti-configuration indomethacin was found to bind to one of the two active sites of LTB₄ 12-HD/PGR homo-dimer.

(3) Crystal structure analysis of mammalian long chain fatty acyl-CoA synthetase (LC-FACS)

LC-FACS catalyses the formation of long chain fatty acyl-CoA from long chain fatty acid and CoA in the ATP dependent manner. Mammal cell/tissue-specific LC-FACS isozymes with different substrate specificities selectively absorb specific fatty acids to cells. We started to establish the over-expression and purification system for mammalian LC-FACSs.

(4) Crystal structure analysis of leukotriene C₄ synthase (LTC₄S)

LTC₄S is the membrane integrated enzyme responsible for biosynthesis of cysteinyl leukotrienes and a potent target for the development of therapeutic agents for allergic diseases including asthma. LTC₄S was over-expressed in *Schizosaccharomyces pombe*, purified and crystallized. Selenomethionyl LTC₄S was also over-expressed in the presence of selenomethionine.

(5) Establishment of high yielding *Drosophila*-derived Schneider 2 cell line (S2 cell) for large-scale G-protein coupled receptor production.

We established the S2 cells for large-scale expression of human BLT1 in active form and characterized the pharmacological profile of the membrane fraction as the first step toward the structural analysis. The advantages of the systems for expression of active GPCRs are the applications of high-density suspension culture with serum-free medium and the availability of inducible *Drosophila* metallothionein promoter to avoid the potent toxicity of recombinant GPCR on stable cell lines. The expression systems of BLT1 and PAFR in *E. coli* and *Schizosaccharomyces pombe* have been also developed. The expressed receptors by *E. coli* and *S. pombe* were not active forms.

(6) Crystallographic analysis of anti-prostaglandin E₂ (PGE₂) mouse monoclonal IgG1

PGE₂ has both inflammation and anti-inflammation actions, and exerts various physiological functions. We have purified the Fab fraction of a highly specific anti-PGE₂ mouse monoclonal IgG from hybridoma cell and tried to crystallize.

2. Structural and functional analysis of other proteins.

(1) Ultra-high resolution crystal structure of β -Lactamase, Toho-1

β -Lactamases hydrolytically inactivate β -lactam antibiotics and

thus the expression of β -lactamases is a prevalent resistance mechanism of pathogenic bacteria to β -lactam antibiotics. Toho-1 is an extended-spectrum β -lactamase. Refinements of atomic models of Toho-1 at 1.00 Å are currently in progress.

(2) Characterization of DNA recognition mechanisms by structural and mutational studies using homing endonuclease (HEase) I-Tsp0611

HEase is a site-specific DNA endonuclease, which recognizes and cleaves a relatively long sequence (14-40bp). To create a novel I-Tsp0611 with optional recognition sequences, we predicted the residues that could interact with the substrate DNA and introduced mutations based on the modeled I-Tsp0611/DNA complex. Some of these mutants showed the higher cleavage activities against the substrate than the wild type enzyme.

(3) Structural analysis of the two types of human M1 zinc amino peptidases

We try to purify and crystallize adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP) and aminopeptidase A (APA) including their natives and mutants without modified-sugar chains expressed by insect cells, Sf9.

(4) Crystallographic analysis of sialyltransferase from campylobacter.

Sialic acid on the end of oligosaccharide of the cell membrane surface takes an important biological function on a ligand-acceptor and cell-cell interactions. Sialyltransferases transaminate CMP-sialic acid as a sugar donor to a mucin-type sugar chain of glyco-protein, an asparagine bound carbohydrate chain and a non-reduction end sugar residue of sphingoglycolipid (galactose, N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine and sialic acid). We have been trying to purify the recombinant native and inactive mutant proteins expressed in *E. coli*.

(5) Purification and crystallization of human calcineurin homologous protein (CHP)

CHP binds to Na⁺-H⁺-exchanger (NHE1) and regulates intracellular pH. We have obtained crystals of CHP complex with NHE1 fragment, which diffracted beyond 3 Å resolution.

(6) Crystallographic studies of membrane proteins

In order to determine the structures of membrane proteins, we first tried to construct expression and purification systems for several membrane proteins including mammalian proteins using mainly bacterial cells. We succeeded in establishing the expression and purification systems for a membrane protein with amount and purity enough for the crystallization trials.

3. Development of novel methodology in protein crystallography.

(1) Protein crystal evaluation

Development of an automatic crystallization observation robot (TERA) contributed to structure determination of a lot of proteins. We have been developing of automatic crystal evaluation system for an enormous number of crystallization images in cooperation with a robotics research group of RIKEN. By uniformity of crystallization plate and photographic condition, the correct rate in the evaluation of crystals reached more than 90%.

(2) Novel procedures for structure determination and refinement

High accurate refinement of protein crystals – It is rare to get a crystal diffracting beyond 1 Å resolution, although it is very important the crystallographic refinement without chemical restraint to elucidate non-bonding interactions of protein structure including ligands as well as water molecules in detail. The electron density modification based on the maximum entropy method (MEM), which was proved in material science, is a potential method to overcome the resolution problem and limitation by Fourier method in protein crystallography. We are developing the protocol to apply the method on the protein crystallographic structural refinement.

Molecular replacement method – The structural similarity between the target and the reference proteins is crucial to the molecular replacement method, because of the fewer searching parameters of the current MR programs in reciprocal space. We start the development of a new molecular replacement system based on the genetic algorithm to extend the searching parameters in real space.

Staff

Head

Dr. Masashi MIYANO

Members

Dr. Hideo AGO

Dr. Mitsuaki SUGAHARA

Dr. Tetsuya HORI

Dr. Tatsuro SHIMAMURA^{*1}

Dr. Jun ISHIJIMA^{*1}

Mr. Daisuke IRIKURA^{*1}

^{*1} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Masafumi TSUJIMOTO (Cellular Biochemistry Lab.)

Dr. Akira HATTORI (Cellular Biochemistry Lab.)

Dr. Yo SATOW (Advanced Protein Crystallography Research Group Mammalian Protein Crystallography Team)

Dr. Naoki KUNISHIMA (Oligomeric protein crystallography team)

Dr. Kuniaki KAWABATA (Distributed adaptive robotics research unit)

Visiting Members

Dr. Kosuke ARITAKE (Osaka Biosci. Inst.)

Dr. Shuichiro GODA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Dr. Hiroshi HASHIMOTO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Dr. Koh IDA (Sch. Sci., Kitazato Univ.)

Dr. Katsuaki INOUE (JASRI)

Prof. Tsuyoshi INOUE (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Dr. Satoshi ISHII (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Prof. So IWATA (Imperial Col., UK)

Prof. Yasuhiro KAJIWARA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Dr. Yoshihide KANAOKA (Harvard med. Sch., USA)

Dr. Yuko KURAHASHI (Fac. Human Life Sci., Doshisha

Women's College of Liberal Arts)

Prof. Masayoshi MAEJIMA (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

Dr. Michitaka MASUDA (Nat. Cardiovascular Center)

Dr. Naoki MOCHIZUKI (Nat. Cardiovascular Center)

Dr. Nanae NAGATA (Osaka Biosci. Inst.)

Mr. Hitoshi NAKAYAMA (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Dr. Eiji NISHIBORI (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Prof. Toshihisa Ohshima (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Prof. Makoto SAKATA (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Dr. Haruhiko Sakuraba (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Prof. Mamoru SATO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Prof. Takao SHIMIZU (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Dr. Toshiyuki SHIMIZU (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Prof. Hideaki TSUGE (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)

Mr. Takuro UCHIYAMA (Grad. Sch. Biosci. Biotech., Tokyo Inst. Tech.)

Dr. Yoshihiro URADE (Osaka Biosci. Inst.)

Ms. Hiroko UTSUNOMIYA (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)

Dr. Shigeo WAKABAYASHI (Nat. Cardiovascular Center)

Prof. Shozo YAMAMOTO (Grad. Sch. Home Econ., Kyoto Women's Univ.)

Trainees

Ms. Mayuko AKABOSHI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kyouhei ARITA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kodai HARA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Asami HISHIKI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Kumiko IGARI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Tsuyoshi IMAZAKI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Saki IRIE (Grad. Sch. Home Econ., Kyoto Women's Univ.)

Mr. Makoto IWAMOTO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Michiko KATSUKAWA (Grad. Sch. Home Econ., Kyoto Women's Univ.)

Mr. Shigeta KAWAGUCHI (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Shigeyuki MOMOZAWA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Ms. Nahoko NAGASAKI (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

Mr. Yoichi NAOE (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Takashi ODA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Yasuhiro SHIMIZU (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Mr. Yasushi SUGIMOTO (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)

Mr. Mayuki YAMABE (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Kazunari YONEDA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Imagawa T., Nakayama H., Katunuma N., Sakuraba H.,

- Ohshima T., Itoh T., Sako Y., Nomura N., and Tsuge H. : "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of homing endonuclease I-*Tsp061I*", Acta Cryst. D 60, 2006--2008 (2004). *
- Saito K., Kawabata K., Asama H., Mishima T., Sugahara M., and Miyano M. : "Evaluation of protein crystallization states based on texture information derived from greyscale images", Acta Cryst. D 61, 873--880 (2005). *
- Sugahara M., Ohshima N., Ukita Y., Sugahara M., and Kunishima N. : "Structure of ATP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Thermus thermophilus* HB8 showing the structural basis of induced fit and thermostability", Acta Cryst. D 61, 1500--1507 (2005). *
- Ammar Y. B., Takeda S., Sugahara M., Miyano M., Mori H., and Wakabayashi S. : "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the human calcineurin homologous protein CHP2 bound to the cytoplasmic region of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1", Acta Cryst. F 61, No. 10, pp.956--958 (2005). *
- Lokanath N. K., Yamamoto H., Matsunaga E., Sugahara M., and Kunishima N. : "Purification, crystallization and initial X-ray crystallographic analysis of the putative GTPase PH0525 from *Pyrococcus horikoshii* OT3", Acta Cryst. F 61, 892--894 (2005). *
- Taka J., Ogasahara K., Jeyaraman J., Kunishima N., Kuroishi C., Sugahara M., Yokoyama S., and Yutani K. : "Stabilization due to dimer formation of phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermus thermophilus* HB8: X-ray analysis and DSC experiments", J. Biochem. 137, No. 5, pp.569--578 (2005). *
- Asada Y., Sawano M., Ogasahara K., Nakamura J., Ota M., Kuroishi C., Sugahara M., Yutani K., and Kunishima N. : "Stabilization mechanism of the tryptophan synthase α -subunit from *Thermus thermophilus* HB8: X-ray crystallographic analysis and calorimetry", J. Biochem. 138, No. 4, pp.343--353 (2005). *
- Kunishima N., Asada Y., Sugahara M., Ishijima J., Nodake Y., Sugahara M., Miyano M., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Sugahara M. : "A novel induced-fit reaction mechanism of asymmetric hot dog thioesterase paal", J. Mol. Biol. 352, 212--228 (2005). *
- Lokanath N. K., Ohshima N., Takio K., Shiromizu I., Kuroishi C., Okazaki N., Kuramitsu S., Yokoyama S., Miyano M., and Kunishima N. : "Crystal structure of novel NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8", J. Mol. Biol. 352, 905--917 (2005). *
- Bagautdinov B., Kuroishi C., Sugahara M., and Kunishima N. : "Crystal structures of biotin protein ligase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and its complexes: structural basis of biotin activation", J. Mol. Biol. 353, 322--333 (2005). *
- Ueno G., Kanda H., Kumasaka T., and Yamamoto M. : "Beamline Scheduling Software: administration software for automatic operation of the RIKEN structural genomics beamlines at SPring-8", J. Synchrotron Rad. 12, 380--384 (2005). *
- Ishihara G., Goto M., Saeki M., Ito K., Hori T., Kigawa T., Shirouzu M., and Yokoyama S. : "Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors", Protein Expr. Purif. 41, 27--37 (2005). *
- Kawabata K., Takahashi M., Saito K., Asama H., Mishima T., Sugahara M., and Miyano M. : "Evaluation of crystalline objects in crystallizing protein droplets based on line-segment information in greyscale images", Acta Cryst. D 62, 239--245 (2006). *
- Koike-Takeshita A., Shimamura T., Yokoyama K., Yoshida M., and Taguchi H. : "Leu³⁰⁹ plays a critical role in the encapsulation of substrate protein into the internal cavity of groEL", J. Biol. Chem. 281, 962--967 (2006). *
- Ishijima J., Uchida Y., Kuroishi C., Tsuzuki C., Takahashi N., Okazaki N., Yutani K., and Miyano M. : "Crystal structure of alanyl-tRNA synthetase editing-domain homolog (PH0574) from a hyperthermophile, *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 1.45 Å resolution", Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 62, No. 4, pp.1133--1137 (2006). *
- (総説)
- Okuno T., Yokomizo T., Hori T., Miyano M., and Shimizu T. : "Leukotriene B₄ receptor and the function of its helix 8", J. Biol. Chem. 280, No. 37, pp.32049--32052 (2005).
- Miyano M. : "Amphiphilic Helices Drive Signaling", Structure 13, 946--947 (2005).
- 宮野 雅司 : "エイコサノイド合成系酵素の構造生物：医薬品の分子作用機能理解とさらなる創薬を目指して", 実験医学 23, No. 6, pp.886--893 (2005).
- [単行本]
- (原著論文) *印は査読制度がある論文誌
- Takahashi M., Kawabata K., Saito K., Sugahara M., Asama H., and Mishima T. : "Protein crystal state discrimination method by extracting line features on the image", Proceedings of 31st Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society (IECON 2005), Raleigh, USA, 2005-- 11, IEEE, Raleigh, pp.112--117 (2005). *
- 口 頭 発 表 Oral Presentations
(国際会議等)
- Sugahara M. : "Development of full automatic protein crystallization robot "TERA" and its data evaluation (in Japanese)", 4th International Bio Expo Japan, (Reed Exhibitions Japan Ltd.), Tokyo, May (2005).
- Suzuki K., Misaki S., Shiromizu I., Takimoto-Kamimura M., Bando M., Kunishima N., Nodake Y., Sugahara M., and Nishijima K. : "Crystal structure of MCoA-ACPT from *Thermus thermophilus* HB8", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Bagautdinov B., Kuroishi C., Sugahara M., and Kunishima N. : "Crystal structure of the biotin protein ligase from *Pyrococcus horikoshii* OT3: insights into the mechanism of biotin activation", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Lokanath N. K., Ohshima N., Takio K., Shiromizu I., Kuroishi C., Okazaki N., Kuramitsu S., Yokoyama S., Miyano M., and Kunishima N. : "Crystal structure of the NADP-dependent 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Hori T. : "LTB4 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-PG 13-reductase and Indomethacin Complex", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Miyano M. : "Structural Basis of Multifunctional Lipocalin-type Prostaglandin D₂ Synthase", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Takahashi M., Kawabata K., Saito K., Sugahara M., Asama H., and Mishima T. : "Protein crystal state discrimination method by extracting line features on the image", 31st Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society (IECON 2005), Raleigh, USA, Nov. (2005).

(国内会議)

長崎 菜穂子, 石嶋 潤, 宮野 雅司, 井出 悠葵, 中西 洋一, 前島 正義: "植物新規Ca²⁺結合タンパク質RVCaBの構造的、物理化学的特徴", 第46回日本植物生理学会年会, 新潟, 3月 (2005).

高橋 六徳, 齊藤 佳奈子, 川端 邦明, 菅原 光明, 浅間 一, 三島 健稔: "線分抽出に基づいたタンパク質の結晶化状態判定", ロボティクス・メカトロニクス講演会'05 (ROBOMECH'05), (日本機械学会), 神戸, 6月 (2005).

小池 あゆみ, 島村 達郎, 横山 謙, 岩田 想, 吉田 賢右, 田口 英樹: "GroELの気質タンパク質閉じ込めにはGroELとGroESの多価結合が重要である", 第5回日本タンパク質科学学会年会, 福岡, 6月 (2005).

高橋 六徳, 川端 邦明, 齊藤 佳奈子, 菅原 光明, 浅間 一, 三島 健稔: "輪郭線特徴抽出によるタンパク質の結晶化状態判定", 2005画像電子学会: 第33回年次大会, (画像電子学会), 長野, 6月 (2005).

中山 仁志, 島村 達郎, 野村 紀通, 佐子 芳彦, 津下 英明, 宮野 雅司: "ホーミングエンドヌクレアーゼI-Tsp061Iの基質DNA認識特異性の改変", 第5回日本タンパク質科学学会年会, 福岡, 6--7月 (2005).

今川 貴仁, 杉本 康志, 宇都宮 敬子, 津下 英明: "高度好熱菌由来TT1382の結晶構造解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005).

岬 真太郎, 鈴木 健司, 白水 郁也, 上村 みどり, 板東 政

彦, 桑井 麻希, 和田 いづみ, 国島 直樹, 野嶽 勇一, 菅原 光明, 西嶋 和三: "Crystal structure of MCoA-ACPT from *Thermus Thermophilus* HB8", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005).

今川 貴仁, 宇都宮 敬子, 杉本 康志, 海老原 章郎, 津下 英明: "高度好熱菌由来 *O*-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase の結晶構造解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005).

Bagautdinov B., Sato Y., 菅原 光明, 国島 直樹: "Crystal structures of shikimate 5-dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8 and its cofactor and substrate complexes: insights into the enzymatic mechanism", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第4回連携研究会, 播磨, 8月 (2005).

長崎 菜穂子, 石嶋 潤, 宮野 雅司, 井出 悠葵, 中西 洋一, 前島 正義: "植物の新規Ca²⁺結合タンパク質RVCaBはαヘリックスもβ構造も有さずCa²⁺に対して低親和性を示す", 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月 (2005).

清水 勝美, 藤本 弥生, 菅原 光明, 国島 直樹: "*Pyrococcus horikoshii* OT3 由来の推定ベプチジル-tRNA 加水分解酵素の結晶構造", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).

浅田 征彦, 澤野 雅英, 小笠原 京子, 中村 順司, 太田 元規, 黒石 千寿, 菅原 光明, 油谷 克英, 国島 直樹: "X線構造解析と示差走査熱量測定(DSC)を用いた高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来トリプトファン合成酵素αサブユニットの安定化機構の検討", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).

内山 琢郎, 島村 達郎, 石嶋 潤, 西堀 英治, 坂田 誠, 熊坂 崇, 宮野 雅司: "Toho-1 beta-lactamaseの超高分解能X線結晶構造解析", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).