

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。たと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・ルシフェラーゼの発光色制御機構（中津*1, 市山*2, 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態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。

野生型ルシフェラーゼは黄緑色の発光を行うが、S286N変異体では赤色に発光することが知られている。いずれの酵素についても同一の基質を用いて反応を触媒することから、発光色の違いは酵素の立体構造に起因することが考えられる。そこで反応中間体であるルシフェリルAMP中間体のアナログである5'-O-[N-(dehydrolyciferyl)-sulfamoyl adenosine (DLSA)]との複合体のX線結晶構造解析を野生型、S286N変異体について行った。その結果、野生型ではIle288がDLSAのベンゾチアゾール環の方に近づき、側鎖を使って非常に疎水的な環境を形成していた。一方S286N変異体ではIle288は近づいてはおらず、DLSAとの間に空間ができていた。したがって野生型ではエネルギーの損失が起らないように、励起状態のオキシルシフェリンを疎水的な環境でしっかりと取り囲む構造を形成していることが予想された。そこでIle288の側鎖をより小さなアミノ酸であるVal, Alaに変異させ、発光色を測定したところ、それぞれ橙色、赤色となった。したがって、Ile288の動きにより励起状態のオキシルシフェリンがどの程度分子振動するかということが、発光色を決定している原因であることが明らかとなった。

2. 膜タンパク質装置の動作機構解析

a) 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、生命維持に必要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⁺チャン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。

(1) 結晶化に適したABCタンパク質発現系の構築（小段, 寺角*3, 崎山, 柴田*4, 加藤）

ヒトのガン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。その結果、100規模の液体培養を連続的に実施し、MDR1を安定に生産する系を確立できた。一方、結晶化能を高めるため、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についても同様に培養して結晶化条件の探索に用いることができるようになった。

(2) 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*4, 中津, 今中*5, 加藤）

ペルオキシソームは細胞内オルガネラの一つで、過酸化脂質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タンパク質の一つである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。PMP70 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、合成された PMP70 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、PMP70 と Pex19p の相互作用様式を解明するため、種々の PMP70 断片を Pex19p 存在下で無細胞合成し、Pex19p との結合力を調べた。その結果、アミノ末端側 61 残基と、6 番目の膜貫通ヘリックス部分が Pex19p との結合に必須であることが明らかとなった。また、細胞内でペルオキシソームに輸送されるのに必要な領域でもあることが判明し、この部分が PMP 輸送シグナルを含むと示唆された。一方、PMP70 をペルオキシソーム膜上で受け入れるのに機能する Pex3p についても、Pex19p との相互作用部位に関して解析をおこなった。すなわち、Pex3p の Trp104 が Pex19p の結合に直接機能することを解明した。この残基のインドール環が Pex19p に対して特異的な疎水性表面を提供することが、変異導入実験の結果から明らかとなった。

(3) 電子線単粒子解析を目的とした ATP 感受性カリウム

チャンネルの発現・精製系の構築 (木村, 加藤)

ATP 感受性カリウムチャンネル (K_{ATP}) は細胞内の代謝状態を監視し、インスリンの分泌等、代謝状態の変化に対応する生体反応において重要である。 K_{ATP} は、ABC タンパク質に属する制御サブユニット SUR1 とチャンネル孔サブユニット Kir6.2 が 4 分子ずつ会合した巨大な膜タンパク質複合体であり、その分子量は 800kDa を超える。 K_{ATP} の形成にはタンパク質の高度な品質管理機構が必要であり、有効な大量発現系は未開発の状態であった。本研究では浮遊培養が可能でヒト培養細胞に着目し、バイオリクターを併用することで K_{ATP} の大量発現系の構築を試みた。その結果、遺伝子導入試薬、培養条件等の最適化により最終的に 100 規模での培養系を構築した。続いて精製に用いる界面活性剤等の改良を試み、10 培養当たり約 25 μ g の精製 K_{ATP} を得る事に成功した。精製 K_{ATP} は 8 量体構造を保持していることがサイズ排除クロマトグラフィー、負染色による電子顕微鏡観察により明らかとなり、単粒子解析に向けての基盤が確立できた。

b) その他の膜タンパク質装置

(4) バクテリア由来ナトリウムチャンネルの構造解析 (入江)

電圧感受性 Na^+ チャンネル (Na_vch) は膜電位の変化を感知して活性化されるイオンチャンネルであり、膜電位の脱分極の伝播はこのチャンネルの働きによるものである。そのため、 Na_vch の異常は様々な疾患の直接原因となる。したがって、 Na_vch のチャンネル開閉やイオン透過のメカニズムを分子レベルで明らかにすることは関連する疾患の病因解明に大きな役割を果たす。しかしながら、高等生物の Na_vch は巨大で複雑なタンパク質であることから、X 線結晶構造解析を行うのは非常に困難である。我々は原核生物においても電圧感受性 Na^+ チャンネル (NachBac) が存在することに着目した。これまでに、NachBac の全長を His-tag 融合タンパク質として発現することに成功した。

3. 超原子分解能 X 線結晶構造解析による酵素反応機構研究 (清水*6, 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。たとえば、*invertig* 型のグリコシダーゼの反応は、一対のカルボン酸による一般酸塩基反応によって触媒されることから、このプロトン (水素) の動きを捉えることが出来れば、より詳細な反応加速機構の理解が可能になる。そこで、本研究では、*invertig* 型のグリコシダーゼである *Stereum purpureum* 由来エンドポリガラクトツロナーゼ I (endoPG I) の反応機構の理解を目指し、0.8 Å 以上の超原子分解能 (subatomic resolution) X 線結晶構造解析による水素を含めた構造決定を試みた。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。

(1) 超原子分解能 X 線結晶構造解析

前年度、endoPG I の結晶化条件、クライオプロテクタントの改良の結果、0.68 Å 分解能のデータ収集に成功した。そこで、データ測定条件、データ処理方法を改良し更なる高分解能を目指した。測定は、SPring-8 の BL41XU にて、短波長 (0.45 Å) の X 線と大面積 CCD 検出器 (ADSC Q315) を使用し行った。0.2 度の微小振動角測定や、放射線損傷低減のため 40 K のヘリウムクライオの利用や測定中の照射位置変更を導入した。さらに、*redundancy* 向上のため 2 結晶の分のデータを測定した。その結果、0.62 Å 分解能で $R_{\text{pim}} = 2.4\%$ (最外殻 21.6%) の回折データを得た。

プログラム SHELXL を用いた構造解析の結果、 $R/R_{\text{free}} = 8.82\%/9.81\%$ の構造を得た。解析中、予想される水素原子 57% にあたる約 1600 の水素原子を Fo-Fc マップ上で、3.0 σ 以上の強度で測定に成功した。さらに、幾つかの Asp 残基の解離性水素原子や水分子の水素原子も観測された。

(2) 変異体酵素を用いた酵素基質複合体の解析

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等の酵素反応を停止させる仕組みが必要である。前年度、一般酸触媒残基の Asp173 を Asn に置換した D173N と基質の複合体の構造解析に成功している。そこで、新たに一般塩基触媒残基の候補である Asp153 に変異を加えた D153N と基質の複合体の解析を試みた。その結果、0.85 Å の高分解能で -4 ~ +1 のサブサイトに基質が結合した構造が得られた。得られた構造を、D173N と基質の複合体の構造と比較した結果、Ile89 - Thr94 のループの構造が異なっていた。D153N 基質複合体のループ構造は、天然型酵素と反応生成物ガラクトツロン酸 (GalA) との複合体のそれと同じことから、D153N 複合体の方がより実際の酵素基質複合体に近い構造と考えられた。D153N と D173N の比較の結果、D173N では切断されるグリコシド酸素への水素結合のドナーが、酸素原子から窒素原子に代わっていることから、このグリコシド酸素と水素結合が基質の正しい結合に不可欠であることが明らかになった。

*1 客員研究員 (京大大学院)、*2 客員研究員 (学習院大学)、*3 JRA (京大大学院)、*4 客員研究員 (国立循環器病センター研)、*5 客員研究員 (富山医科薬科大学)、*6 客員研究員 (京大大学院)

1. Mechanism of Biological luminescence – Elucidation of the control mechanism of the luminescent color based on the 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 luminescent color change by single amino acid mutation of luciferase and the high quantum yield in luciferin/luciferase reaction are interesting research. The aim of the study is to capture the structures of the enzyme during the reaction by kinetic crystallography. We determined the crystal structures of wild-type and red emitting S286N mutant luciferases complexed with 5'-O-[N-(dehydrolyciferinyl)-sulfamoyl adenosine (DLSA) which is luciferin-AMP intermediate analogue. The wild-type luciferase changes the conformation that Ile288 is close to the benzothiazole ring of DLSA and forms hydrophobic microenvironment in the active site. On the other hand, the red-emitting S286N mutant does not induce the conformational change and is less hydrophobic microenvironment. The wild-type luciferase will cause the conformational change forming tightly rigid and nonpolar environment of the excited oxyluciferin in order to minimize energy loss before emitting yellow-green light. In order to confirm our idea, we prepared the I288V and I288A mutants and examined the luminescent color. I288V and I288A mutants emitted orange and red colored light, respectively. Consequently, the degree of the molecular rigidity of the excited oxyluciferin involved in the movement of Ile288 determines the color of bioluminescence during the emission reaction.

2. Mechanism of molecular motion of membrane protein machinery.

a) 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 from human.

Large-scale production of P-glycoprotein (MDR1) was conducted by baculovirus/insect cell expression system and soluble MDR1 expression was thus confirmed. To maintain protein stability, various factors were screened and the purification conditions were thus improved. The stability and monodispersity of the purified preparation were better than

those of previous one. Furthermore, several site-directed mutations were introduced into MDR1 to reduce its conformational flexibility and consequently to increase its crystallizability. Crystallization of the purified mutant MDR1 is 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 identify the regions that interact with Pex19p, various truncated PMP70 were synthesized by a cell-free system in the presence of Pex19p. The amino-terminal 61 residues and the sixth transmembrane helix of PMP70 were required for both the interaction with Pex19p and the intracellular translocation toward peroxisomes. We meanwhile examined the Pex3p residues necessary for binding to Pex19p. Several site-directed mutagenesis experiments revealed that Trp104 of Pex3p directly interact with Pex19p with hydrophobic contacts. Our investigation of the protein-protein interactions (Pex3p—Pex19p—PMP70) will be expected to explore protein samples suitable for the crystallization.

b) Structural biology studies on the other membrane proteins—Voltage-gated sodium channel.

To elucidate the structural basis of the voltage-gated sodium channel mechanism, a small size sodium channel from a bacterium, *Bacillus halodurans* (NachBac) has been studied. NachBac with His-tag was expressed in *E. coli* and purified by an affinity and size-exclusion column chromatographies. Exploring of good detergents and lipids for crystallographic works are in progress.

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 subatomic resolution ($d < 0.8 \text{ \AA}$). In such a resolution, we can recognize hydrogen atoms and identify the protonation state of functional residues in enzymes.

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 subatomic resolution X-ray crystallography of endoPG from *Stereum purpureum*.

The crystals for subatomic resolution were prepared using sitting drop vapor diffusion method coupled with macro seeding. Data collection was performed at beamline BL41XU using an ADSC Q315 CCD detector. The data was integrated and scaled to 0.62 \AA resolution. R_{pim} of overall and outer shell (0.64 - 0.62 \AA) were 2.4% and 21.6%, respectively. Even in the most outer shell, the completeness and the mean $I/\sigma(I)$ were 55.0% and 3.0, respectively. The model was refined with an R factor of 8.82% and a corresponding R_{free} factor of 9.81% using a program SHELXL97. About 1600 hydrogen atoms were observed in the $F_o - F_c$ maps contoured at 3.0 σ during the refinement. These observed hydrogen atoms contain the labile hydrogen atoms of two asparagine residues and hydrogen

atoms of 13 water molecules.

Staff

Head

Dr. Hiroaki KATO

Members

Dr. Atsushi KODAN

Dr. Yasuhisa KIMURA

Dr. Katsumasa IRIE

Mr. Keita SAKIYAMA

Visiting Members

Assoc. Prof. Toru NAKATSU (Grad. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

Prof. Tsuneo IMANAKA (Fac Pharm. Sci., Toyama Univ.)

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

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

Dr. Hiroyuki SHIBATA (Natl. Cardiovasc. Ctr. Res. Inst.)

JRA

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誌

Sakaue R., Nakatsu T., Yamaguchi Y., Kato H., and Kajiyama N.: "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of bacterial fructosyl amino acid oxidase", *Acta Cryst. F* 61, 196--198 (2005). *

Kawashima Y., Asahina K., Shibata H., Morita M., Muntau A. C., Roscher A. A., Wanders R. J., Shimozawa N., Sakaguchi M., Kato H., and Imanaka T.: "Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisome", *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 116--128 (2005). *

Shimizu T., Shibata H., Araya T., Nakatsu T., Miyairi K., Okuno T., and Kato H.: "Expression, purification, and crystallization of endopolygalacturonase from a pathogenic fungus, *Stereum purpureum*, in *Escherichia coli*", *Protein Expr. Purif.* 44, 130--135 (2005). *

Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K. and Kato, H. Structural Basis for Spectral Difference in Luciferase Bioluminescence. *Nature*, 440, 372-376 (2006)

[単行本]

(総説)

加藤 博章, 小段 篤史, 柴田 洋之: "ABC蛋白質の立体構造研究: 現状と課題", *ABC蛋白質*, 学会出版センター, 東京, pp.245--274 (2005).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Shimizu N., Kawamoto M., Hasegawa K., Sakai H., Nisawa A., Shimizu T., Nakatsu T., Kato H., and Yamamoto M.: "Ultra-high Resolution Measurement at BL41XU of SPring-8", 20th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr2005), Florence, Italy, Aug. (2005).

Mimura Y., Matsuo M., and Ueda K.: "Cholesterol modulates drug-stimulated ATPase activity of human MDRI/P-glycoprotein", International Symposium on Biological Membrane Transport 2005, (Research Group for Transport Nano-machine-Project), Awaji, Aug. (2005).

(国内会議)

入江 克雅, 中津 亨, 光岡 薫, 宮澤 淳夫, 祖父江 賢治, 廣明 洋子, 土井 知子, 藤吉 好則, 加藤 博章: "シナプス後膜における Horner1 ファミリーによるタンパク質集積制御機構の構造生物学", 第10回放射光医学研究会講演会, (放射光医学研究会), 吹田, 1月 (2005).

加藤 博章: "生物時計タンパク質の立体構造と機能", 日本薬学会第125年会, 東京, 3月 (2005).

加藤 博章: "糖鎖修飾によるタンパク質構造安定化機構の構造生物学的研究", 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調整」第3回夏期シンポジウム, 岐阜, 8月 (2005).

清水 哲哉, 中津 亨, 清水 伸隆, 佐藤 衛, 栗原 和男, 宮入 一夫, 奥野 智旦, 新村 信雄, 山本 雅貴, 加藤 博章: "リング銀葉病菌由来エンドポリガラクトナーゼの超高分解能X線結晶構造解析と超高分解能中性子結晶構造解析", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).

中津 亨, 清水 哲哉, 中野 博明, 小橋 信行, 柴田 洋之, 山本 雅貴, 佐藤 貴久, 佐々木 勝成, 加藤 博章: "微小タンパク質結晶X線回折装置の開発(2)", 日本結晶学会2005年度年会および総会, 姫路, 12月 (2005).