

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、多くのウィルス、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系と横系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はかる事を目的としている。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、生命科学の発展に大いに寄与する事も目指している。

研究担当者：宮野、吾郷、菅原、堀、島村^{*1}、石嶋^{*1}、中山^{*2}、佐藤^{*1}、坂田^{*3}（宮野構造生物物理研究室）；前田、藤澤、小田、奥（山下）、似内、山本、伊藤^{*1}、芝田^{*4}（前田構造生物化学研究室）；三木、宮武、久野、岩崎、金、竹田^{*5}、林田^{*6}、沼本^{*7}（三木生物超分子結晶学研究室）；城、青山、杉本、菊地、日野^{*6}、山田^{*6}、金^{*6}、高^{*1}、Jeyakanthan^{*1}、瀧尾、大嶋^{*6}、中村^{*1}、高橋^{*8}、吉川^{*3}（城生体金属科学研究室）；横山、新海、嶋田、Kumarevel^{*9}、赤坂^{*3}、丹羽^{*1}、関根^{*7}、北原^{*10}（横山構造分子生物学研究室）；山本、引間、上野（研究技術開発室）

1. ハイスループット構造解析技術の開発に関する研究

理研構造ゲノムビームラインにおいて、膨大な結晶サンプルに対し最も効率よく迅速かつ簡便に回折強度データ収集を行なうためのサンプルチェンジャー（SPACE）を中心とした自動回折データ収集システムの開発および運用を進めた。また、SPring-8 サイト外からの回折データ収集を可能にするメールインデータ収集システムの開発を行った。また、データ収集高度化を目指して X 線用 CMOS センサーを利用したフラットパネル検出器の開発研究を進めている。CMOS センサーの利点は、読み出しが速く CCD に比べて仕組みが簡単な点であり、今年度はフラットパネル検出器としての低ノイズ化を進めるためにアクティブピクセル型の検出器を試作した。

緑膿菌由来の膜結合性一酸化窒素還元酵素の三次元結晶化においては、結晶性を向上させるため、モノクローナル抗体の作成に取り組んだ。その際、天然に存在する膜蛋白質を抗原とするモノクローナル抗体の効率的なスクリーニング法を開発した。その結果 10 種類の抗体を得ること

ができた。さらに、その触媒反応における短寿命反応中間体の構造解析を目指し、クライオガスサイターの作製を行った。この装置では -130 °C まで試料を冷却した状態で、20 気圧の気体に曝露することが可能である。

精製タンパク質の品質評価及び播磨理研共通施設である昆虫細胞培養室の維持管理、タンパク質の解析に関する支援業務を行った。年度を通じて行った精製タンパク質の品質評価に関しては 2 月末現在でプロテインシークエンサーによる解析 800 件、質量分析による解析 1100 件、精製タンパク質の SDS-PAGE および Native-PAGE 650 件となっている。昆虫細胞培養室の利用研究室は現在 3 研究室・グループ（4 名）である。

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

脂質は、高密度生体エネルギー物質の細胞膜の主要成分である。化学構造的多様性から病態に深く関わる多彩なメディエーターとして働くが、その物理化学的特性から動態解明はこれからである。一つの脂質代謝酵素である病原性セリウス菌由来中性スフィンゴミエリナーゼ酵素の金属種による活性の違いの構造基盤を解明し、溶血活性の特異構造と酵素活性の分子機能が不可分であることを明らかにした。創薬支援基盤をめざして、薬剤の作用機作解明の一つとして、結晶構造を明らかにした脂質メディエーター不活性酵素 LTB₄ 12-HD/PGR と鎮痛剤インドメタシン結合の構造・物理化学的基盤を明らかにした。創薬ターゲットである GPCR の大量発現精製法の確立を目指し、ショウジョウバエで活性のある BLT1 高発現株の選抜を行ない、精製法の改良をした。また、強力な喘息・アレルギー物質として知られている LTC₄ を合成する膜貫通型酵素システムロイコトリエン C₄ 合成酵素の立体構造解析を目指して特異モノクローナル抗体作成を含む大量発現精製法と

結晶化の改良をすすめた。

トロポミオシンは coiled-coil 蛋白質であるが柔らかい。C 端側断片 (全分子長の約 40%) から得られた 2 つの異なる結晶構造を比較して、曲がりやすい箇所と曲がりのメカニズムを解明した。これによってトロポミオシンの柔らかさの原因が見えてきた。非対称細胞分裂などに不可欠なダイナクチン複合体 (12 種類、分子量 1.5 MDa の蛋白質複合体) の負染色電顕写真よりダイナクチン複合体の 2 次元投影像を得た。これにより複合体内の分子配置が明らかとなった。アクチン重合体による細胞運動は重合体の端に結合する蛋白質によって調節されている。2003 年に我々は CapZ の結晶構造を解明したが、今年度はクライオ電子顕微鏡を使って、CapZ-アクチン重合体複合体構造を解明し、結合に寄与する残基を決定し結合様式を解明した。この研究のためにアクチン重合体の端の構造を解析するアルゴリズムを開発した。

グラム陰性細菌のペリプラズムにおいて脂質タンパク質の輸送を行うタンパク質 LolA の変異体 R43L の構造解析を行い、脂質タンパク質の結合部位を覆う α ヘリックスのフタの開閉機構を明らかにした。ストレス環境下での生存に必要なホスファターゼ SurE の結晶解析を行い、ヘアピン領域の運動性のために 4 量体分子において対称性の異なる複数の会合様式をとりうることを見いだした。微生物によって作られる生分解性ポリエステルの分解酵素の変異体と 3-ヒドロキシブタン酸の 3 量体基質との複合体の構造解析を行い、疎水性基質に対する認識機構および分解機構を明らかにした。分子量 40 万のヒゲムシ由来巨大ヘモグロビンの結晶構造解析を行い、その超分子構造と硫化水素結合様式を明らかにした。

二原子酸素添加酵素インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ (IDO) において、活性中心である鉄の配位子の違いにより、基質結合ポケットを形成する長いループの位置が 6 Å 以上移動する事を見出した。好熱菌の二成分情報伝達系 HK(ThkA) と RR(TtrA) の複合体構造を X 線小角散乱、結晶回折により解析し、4.2 Å 分解能で決定した。ThkA 二量体の中心に二つの TtrA 分子が結合していた。GFP 様タンパク質の蛍光特性をそれらの立体構造を基盤に理解し、従来にはない機能を持つ GFP 様タンパク質を合理的に設計する事を目的に、様々な色の GFP 様色素・蛍光タンパク質の結晶構造解析を進めている。本年度は新たに 3 種の色素タンパク質の構造解析に成功し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) イメージングでの利用に大きな期待が持てるドナーとアクセプターの 2 つのドメインから成る蛍光タンパク質の結晶化にも成功した。さらに、通常回転法を用いてニトリルヒドラーゼ (NHase) の分割結晶構造解析を行い、試料温度 140K 下で基質の鉄への配位過程を捕らえることに成功した。

アクチン細胞骨格の制御に関与している Rho ファミリーの GTP 結合タンパク質 Cdc42 の下流のエフェクター分子である、FBP17 と CIP4 の EFC ドメインの構造解析を行った。EFC ドメインは、生体膜変形モジュールとして知られている。構造解析の結果、EFC ドメインは湾曲した弓形の構造を取っており、結晶中でフィラメントを形成していた。このことから、EFC ドメインはカーブの内側で生体膜と結合し、生体膜に巻き付く様にフィラメント化することで、生体膜をチューブ化するというメカニズムが示唆された。

アクチンを含むクロマチン再編成因子複合体の一つである、高等真核生物の BAF 複合体中のサブユニットに含まれる ARID ドメインの構造解析を行い、DNA との結合様式に関して考察した。

*¹協力研究員、*²ジュニア・リサーチ・アソシエイト、*³

客員主管研究員、*⁴業務協力員、*⁵連携研究員、*⁶基礎科学特別研究員、*⁷客員研究員、*⁸協力技術員、*⁹特任研究員、*¹⁰学術振興会特別研究員

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 synchrotron 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:

We have been developing and operating an automatic diffraction data collection system at RIKEN Structural Genomics Beamlines. The system is mainly composed of a sample changer named SPACE, and integrated beamline operating software named BSS. We also developed a Mail-in data collection system in which remote users are able to collect diffraction data without visiting SPring-8. For research and development of high-speed data collection system, we have been developing a two dimensional x-ray detector applying a flat panel CMOS sensor. CMOS sensor has advantages of fast readout and simple architecture compared with CCD. In this year, we have made a prototype of a new active pixel sensor to improve the readout noise level.

Bacterial nitric oxide reductase (NOR) is a membrane-bound cytochrome cbb₃ type respiratory enzyme. To elucidate the NO reduction mechanism of NOR, we tried to solve the crystal structure of NOR in the complex form with monoclonal antibodies, which specifically bound to NOR by developing new hybridoma screening technique. In addition, to determine crystal structures of the short-lived reaction intermediate of the enzymes, we have developed cryo-gas-citer, which forces gas molecules to penetrate into NOR at cryo-condition.

We supported researchers of the Harima Institute in protein

characterization. This year, more than 1500 protein samples have been characterized by protein sequencer, mass spectrometer, PAGE, HPLC, fluorescence spectrometer and others.

2. Structural Determination of Proteins in Structural Genomics:

It has been focused on the lipids related structural-based functional analysis, because of their biological importance as targets for the therapeutics as well as the major constituents of biological membranes and mediators. We revealed the structural-functional basis of neutral sphingomyelinase from pathogenic *Bacillus cereus* in the metal-type dependent activity differences, which is linked with hemolytic specific architecture. Further structural and functional studies on leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase (LTB₄ 12-HD/PGR) catalyzed irreversible steps of multiple-eicosanoid inactivation, a common NSAID, indomethacin as an inhibitor bound in the mode of anti-configuration at only one active site of dimer. For the crystallographic studies, membrane integrated LTC₄S was tried to improved in the procedures of over-expressed by *S. pombe*, purification and crystallization including LTC₄S specific monoclonal antibody production as well as other lipid related proteins. In lipid mediator GPCRs, BLT1 was successfully expressed by *D. melanogaster* cells in active form and further cloning and purification were established to better production.

Tropomyosin is a flexible coiled-coil. We have obtained two crystal structures of a tropomyosin fragment which spans about 40% of the molecule. By comparing the two structures, we now know structural basis of the flexibility, which plays crucial roles in its biological functions. The dynactin complex (of 12 species of proteins, with 1.5 MDa in entire mass) plays crucial roles in asymmetric cell division and many other cellular functions. We have obtained a 2D projection of the negatively stained complexes, elucidating molecular arrangement within the complex. The actin-based cell motility is regulated through end-capping proteins. In 2003, we have published the crystal structure of CapZ. Now we have obtained an EM structure of the CapZ-actin filament end complex, enabling us to identify residues contributing to the binding, and to know the nature of the actin filament end-capping. For this work, we have first developed an algorithm for analysis of actin-end-complexes.

Structural studies of the R43L mutant that can bind a lipoprotein but that cannot transfer it to its receptor in the periplasmic space of Gram-negative bacteria revealed a motion of the α -helical lid covering the lipoprotein binding site. The crystal structure of a stationary-phase survival protein SurE revealed several states of the quaternary structures of the enzyme. Structure of depolymerase that degrades bacterial polyester, in complex with a trimer of 3-hydroxybutyric acid, revealed the binding mode for hydrophobic polyester, as well as its mechanism of biodegradation of the polymer. The crystal structure of a giant hemoglobin from a beard worm (400kDa) elucidated its supramolecular 24mer assembly and H₂S binding mechanism.

IDO is a heme-containing dioxygenase and catalyzes the incorporation of dioxygen (O₂) into indole rings, that is the first and rate-limiting step in the main pathway of human tryptophan catabolism. In this year, we found a role of the flexible loop in the active site for the wide substrate specificity. The two-component regulatory system is widely distributed in bacteria, fungi and plants. It is well known that sensory histidine kinases (HK) sense individual environmental stimuli,

and the cognate response regulators (RR) transduce their signals downstream upon receiving the phosphoryl group. We determined the low resolution structure of the two-component system (ThkA/TrtA complex) of the thermophilic bacterium with small angle X-ray scattering and crystallographic techniques. Two TrtA molecules bind to center of ThkA dimer in the complex structure. We have succeeded in crystallization and determination of three new GFP-like proteins. The structures help us to construct new fluorescent proteins as *in vivo* markers. This year, we obtained diffraction data in the process of the substrate molecule binding to NHase at 140K. We solved the crystal structures of the EFC domains of FBP17 and CIP4, which are downstream effectors of a Rho family member, Cdc42, and involved in regulation of actin cytoskeleton. The EFC domain is a module for deformation of membrane, and the structure reveals a gently-curved helical bundle dimer, which is joined end to end into a filament in the crystals. According to the structure, we proposed a mechanistic model, in which the EFC filament winds around the tubular membrane with the concave surfaces facing the tubular membrane to drive membrane tubulation.