

ニトリルヒドラーターゼの触媒反応機構解析—シリアルフェムト秒結晶構造解析に向けた取組

Analysis of Reaction Mechanism for Nitrile Hydratase Serial Femtosecond Crystallography

○林 英輝¹、北條 晴佳¹、松村 洋寿¹、小川 信明¹、野村 高志²、當舎 武彦²、城 宜嗣³、野口 恵一⁴、養王田 正文⁴、尾高 雅文¹

(¹秋大院・理工、²理化学研究所・SPring-8、³兵庫県大院・生命理、⁴東農工大院・工)

ニトリルヒドラーターゼ (NHase)はニトリル化合物を水和してアミドを合成する反応を触媒する酵素である。NHase はバイオ法によるアクリルアミドの工業生産に利用され、世界のアクリルアミド総生産量の約 1/2 を占めている。また、近年シアン系廃液のバイオレメディエーションでも注目されている、産業的に極めて重要な酵素である。NHase はシステインスルフェン酸(Cys-SO⁻)とシステインスルフィン酸(Cys-SO₂⁻)を配位子に含む特異な非コリンコバルトまたは非ヘム鉄を反応中心とすることから、触媒機構は未だ明らかにされていない。また、鉄型 NHase は暗条件下において一酸化窒素を結合させると不活性型となり、光を当てることによって NO が解離して活性型に戻るといった性質を持っている。そこで我々は、この光活性を利用したX線自由電子レーザーによる野生型のシリアルフェムト秒結晶構造解析に向けた準備を進めている。今回はシリアルフェムト秒結晶構造解析に必要な、バッチ法による微結晶大量生成の検討、NHase 結晶の温度変化への X 線解析に対する影響、ソーキングする基質の検討、また当研究室で精製した不活性型 NHase の X 線結晶構造解析の結果について報告する。

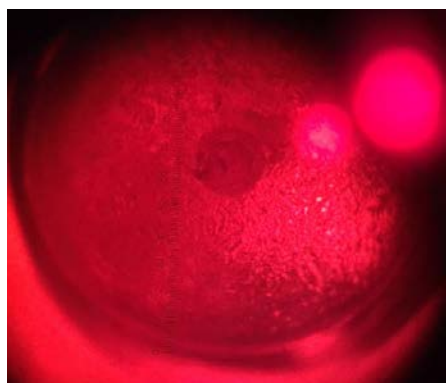


図 1.バッチ法による微結晶生成

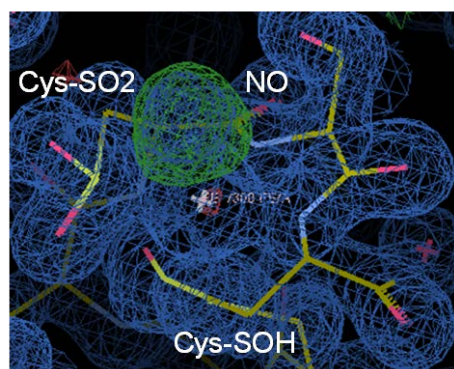


図 2.不活性型 NHase 電子密度図

リウマチ薬メトトレキサートと新規作用標的タンパク質の 複合体結晶構造解析

Structure based analysis for a novel target protein of methotrexate in rheumatoid arthritis

○杉島小雪¹、松村洋寿¹、面川 歩²、布村 渉¹、堂前 直³、尾高雅文¹、
廣川 誠²、涌井秀樹¹

1 秋大院・理工、2 秋大院・医、3 理研・環境資源科学研究センター

メトトレキサート(Methotrexate; MTX)は、急性白血病の治療薬として開発されたが、その後、炎症性関節炎患者の治療への有効性が確認されたため、現在では、関節リウマチの第一選択薬として広く利用されている。白血病治療に対する薬理作用としてジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)に対する葉酸拮抗作用が良く知られているが、それだけではMTXの免疫系に対する作用機序を説明できないと考えられている。これまでに我々は、MTXを固定化させsepharoseカラムを用いたDrug affinity chromatographyにより、MTX新規標的タンパク質候補の探索を行った。その結果、MTXに特異的な結合を示す複数の炎症関連タンパク質を同定することに成功した。今回は、同定されたMTX新規標的タンパク質候補の1つであるマクロファージ遊走阻害因子(MIF)とMTXとの複合体結晶構造解析結果について報告する。

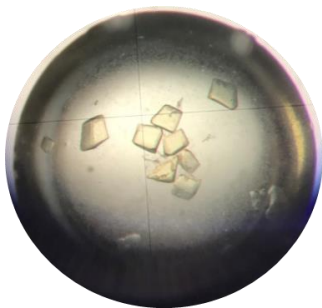


図1 MIF-MTX 複合体の結晶

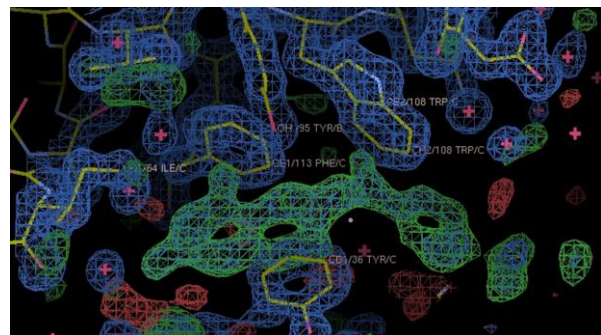


図2 MIF-MTX 複合体の電子密度マップ

ループ再設計による Outer surface protein A (OspA)の ドメインスワッピング

Domain swapping of Outer surface protein A (OspA), by minimal loop design

○志賀翔多¹, 山中優², 廣田俊², 真壁幸樹¹

1 山形大・院理工・バイオ化学, 2 奈良先端大・物質

ドメインスワッピングは蛋白質分子が分子間で構造領域を交換し多量体化する機構である。この機構により多量体化している蛋白質は多く、溶液中で単量体として存在している蛋白質に変異導入し、ドメインスワッピングした多量体をデザインした例も報告されている。しかし、成功例は数例のみに留まっている。さらに、そのデザインについて詳細に検討した研究はほとんど行われていない。本研究では、ドメインスワッピングによる多量体化が確認されていない蛋白質をモデルとして、どれだけ最小限の改変によってドメインスワッピングさせられるかを詳細に検討した。モデル蛋白質として、溶液中で単量体として存在する Outer surface protein A (OspA)を用いた。OspA は結晶化を誘導する表面残基変異が導入されている変異体 OspA-sm1 を用いた。デザインの結果、C 末端ドメイン中のループ上のアミノ酸 6 残基の欠失によるループの短縮および欠失部位に対するプロリンの挿入により OspA-sm1 の二量体化を達成した。二量体化に成功した変異体の内、プロリンを3個挿入した変異体の二量体の結晶構造を分解能 2.8 Å で解析することに成功した。その構造から、得られた二量体はデザイン通りドメインスワッピングしていることが分かった。この結果は、ミニマルなデザインにより、単量体として存在する蛋白質をドメインスワッピングさせられることを示している。

ビリン還元酵素 PcyA 変異体 I86D-BV 複合体の 中性子結晶構造解析

Neutron crystal structure analysis of the bilin reductase PcyA I86D mutant

○五十嵐啓介¹, 杉島正一², 和田啓³, 萩原義徳⁴, 日下勝弘⁵, 矢野直峰⁵,
福山恵一⁶, Andreas Ostermann⁷, 海野昌喜^{1,5}

1 茨大院理工、2 久留米大医、3 宮崎大医、4 久留米高専、
5 茨大 iFRC、6 大阪大院工、7 TUM

PcyA はヘム分解産物であるビリベルジン IX α (BV)をフェレドキシン依存的に還元し、光合成や光応答で重要な役割を担うフィコシアノビリンを合成する。PcyA は BV の D 環ビニル基と A 環ビニル基を部位特異的に順序立てて還元する特徴的な酵素である。BV へのプロトンドナーである重要なアミノ酸 Asp105 の近傍に位置する Ile86 をアスパラギン酸に置換した PcyA 変異体 I86D と BV の複合体 (I86D-BV) の吸収スペクトルは、野生型 PcyA と BV の複合体 (WT-BV) と比較して 730 nm 付近の吸光度が大きく増大する。その吸収極大は、一段階目の反応で PcyA によって BV にプロトンが付加された BVH⁺由来であると推測されているが、水素原子は高分解能の X 線結晶構造解析でも同定できていない。そこで I86D-BV 複合体結晶の中性子結晶構造解析から得る水素原子の位置情報によって、BVH⁺の構造と分子内アミノ酸の水素化状態を可視化し、PcyA の反応機構解明を目指す。

I86D-BV 複合体の中性子結晶構造解析を行うために大型結晶を作製することを目的として、ハンギングドロップ蒸気拡散法やシッティングドロップ蒸気拡散法、ボタン透析法などの様々な結晶化方法を試みた。また、緩衝液や沈殿剤の濃度や種類、pH などの結晶化条件を検討していった。さらに、室温 X 線回折実験を行い、Wilson plot で算出される温度因子から各結晶化条件で得られた結晶の評価を行った。また、結晶化相図を実験的に描き溶解度曲線から大型結晶を得られる条件を探索した。その結果、最長軸が 2.0 mm ほどの I86D-BV 複合体の結晶の作製に成功した。この結晶を重水素置換し、J-PARC 内の茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) で中性子回折実験 (テスト測定) を行ったところ、最高分解能 1.86 Å を観測した。その後、BIODIFF (MLZ, FRM II) で中性子回折強度データ収集を行ったところ、1.8 Å 分解能程度の中性子回折強度データが得られた。本シンポジウムでは、I86D-BV 複合体の結晶成長と中性子回折実験、現在までの解析結果について報告したい。

酸素センサーキナーゼのグロビンドメインの構造解析

Structural Analysis of the Globin Sensor Domain of an Oxygen Sensor Kinase

北西健一¹、海野昌喜^{1,2}

1 茨城大院、理工、量子線、2 茨城大、フロンティア

ガスセンサータンパク質は、一般的に、ガス結合センサードメインと機能ドメインから構成されている。酸素、一酸化炭素、一酸化窒素などのガス分子はヘムなどの金属中心に結合し、センサードメインのタンパク構造が変化する。その構造変化がシグナルとなって機能ドメインに伝達され、その結果、機能ドメインでの触媒活性や転写活性などのスイッチがオン/オフされる。発表者は、センサードメインにグロビンフォールドを持つグロビン結合型酸素センサーキナーゼについて研究を行ってきた[Kitanishi, K. *et al. J. Biol. Chem.* 286, 35522-35534 (2011)]。土壌粘液細菌由来の AfGcHK は N 末端グロビンドメインにあるヘムに酸素が結合すると、C 末端のヒスチジンキナーゼドメインが活性化され、自身の His を自己リン酸化する酸素センサーヒスチジンキナーゼである。本研究では、その酸素認識機構を原子レベルで解明するために、グロビンセンサードメインの結晶構造解析を目指している。大腸菌にて、AfGcHK の N 末端グロビンセンサードメインを大量発現させ、高純度に精製し、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて、結晶化を行った。PF のビームライン BL-1A、BL-17A、AR-NW12A を使用して、得られた結晶の X 線回折データを収集した。結晶は C2 の空間群に属し、格子定数は $a = 128 \text{ \AA}$, $b = 79 \text{ \AA}$, $c = 94 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 115^\circ$ であった。現在までに、ヘムに酸素が結合していない Fe(II) や酸素が結合した Fe(II)-O₂ の状態、およびヘムにイミダゾールが結合した状態の結晶の X 線回折データの収集を行った。現在、モデル構築、構造精密化を進めている。その結果、生化学や分光学的な実験結果から示唆されていたヘム遠位にある Tyr が酸素と直接水素結合していることが明らかとなった。この Tyr は、Fe(II)型、イミダゾール結合型ではヘムと離れる方向に配座しており、酸素結合に伴う構造変化により、シグナルをヒスチジンキナーゼドメインに伝播させる役割をしていることが示唆される。今後、精製法の改善や結晶化条件の最適化を行い、分解能の向上を目指し、酸素認識機構およびシグナル伝達機構を原子レベルで解明する。

構造解析に向けたヒト TRPA1 チャンネルのアンキリン リピートドメインの発現と精製

Expression and purification of human TRPA1 Ankyrin repeat domain for the structural analysis¹

○Nabilah Binti Abdul Halim¹, Yasuo Mori², Tatsuki Kurokawa³,
Masaki Unno^{1,4}

1. Grad. Sch. Sci. Eng., Ibaraki Univ., 2. Grad. Sch. Eng., Kyoto
Univ., 3. Oita Univ., Sch. Med., 4. iFRC, Ibaraki Univ.

【Introduction】In mammals, TRPA1 is the TRP cation channel protein that is belonged to TRPA gene subfamily and it is expressed in a subset of sensory neurons and is activated in response to a broad array of noxious exogenous and endogenous thiol-reactive compounds. TRPA1 was named for its extensive amino terminal Ankyrin repeat domain which is known as its special characteristics compared to other TRP channels. While selective TRPA1 antagonists have been developed, their binding sites and whole mechanism of action still remain unclear. Therefore, the objectives of this research is to use high-resolution X-ray crystallography, focusing to the Ankyrin repeat domain (ARD) of TRPA1 to obtain atomic level structural information.

【Method】 The plasmid containing cDNA for the maltose-binding protein fused with human TRPA1 Ankyrin repeat domain was used and the expression of target protein were examined by transformation and cultivation. The purification procedure was established by using Amylose affinity resin, gel filtration chromatography and Anion exchange chromatography.

【Result】 Although, in gel filtration chromatography, single sharp peak was not observed, the SDS-PAGE band corresponding to target protein were obtained. In this conference, we report the progress of purification procedure of human TRPA1-ARD.

キネトコアと微小管の接着を制御する
MAD2L2-CAMP 複合体の構造解析
Crystallographic structure of MAD2L2-CAMP
complex, a regulator of kinetochore-microtubule
attachment

原幸大¹, 田原迫奨大¹, 菱木麻美¹, 石川吉伸¹, 菅野新一郎², 田中耕三²,
橋本博¹

1 静岡県大薬・2 東北大加齢研

【目的】 CAMP は分裂期染色体のキネトコアと微小管の適切な接着を担っており、CAMP のノックダウンは染色体の紡錘体中央への整列に異常を生じさせる。また CAMP を介した様々なタンパク質間相互作用の欠損は、発達障害を引き起こすことが明らかとなった。CAMP が相互作用するタンパク質の一つとして、DNA 修復タンパク質 MAD2L2 が知られており、DNA 修復との関連性も示唆されるが、その複合体の構造基盤と相互作用は明らかとなっていない。本研究では、MAD2L2-CAMP 複合体の構造解析を行い、CAMP を介した相互作用と DNA 修復における CAMP の新たな機能を解明することを目的とした。

【方法】 大腸菌発現系により調製した MAD2L2-CAMP 複合体の組換えタンパク質の結晶化条件の探索と結晶の最適化を行ったところ、空間群の異なる 2 種類の結晶(空間群 $I222$ と $C2$) が得られた。得られた結晶を用いて大型放射光施設 Photon Factory BL-17A で X 線回折実験と回折データ収集を行った。その後、MAD2L2 をサーチモデルとしてプログラム PHASER による分子置換法により構造解析を行った。また、立体構造に基づく部位特異的変異体を作成し、複合体形成に重要なアミノ酸残基を同定した。

【結果および考察】 MAD2L2 はシートベルトと呼ばれる C 末端領域により、プロリンに富んだ配列を認識することが知られる。また、シートベルトとは異なる結合部位でヘリックスバンドルと相互作用する。CAMP はプロリンに富んだ配列やヘリックスバンドルを持たないことから、MAD2L2 との相互作用様式は未知であった。構造解析の結果、CAMP は MAD2L2 のシートベルトと相互作用しており、 $C2$ 複合体は $I222$ 複合体とは異なるシートベルト構造を形成していた。本発表では、MAD2L2 のシートベルトの新たな配列認識機構と、CAMP の結合によるシートベルトの構造誘起について議論する。

Ca²⁺/Zn²⁺結合型ヒト S100A3 蛋白質 四量体構造の解明に向けた研究

The studies for elucidation of the tetrameric structure of Ca²⁺/Zn²⁺-bound human S100A3 protein

井手賢司¹、木澤謙司²、北西健一¹、海野昌喜^{1,3}

1 茨城大院理工、2 (株)花王、3 茨城大 iFRC

【緒言】 毛髪キューティクル細胞内で多量発現する S100A3 蛋白質 (S100A3) は、Ca²⁺依存的に活性化する蛋白質脱イミノ化酵素により 51 番目のアルギニン (R51) が特異的に脱イミノ化 (シトルリン化) されると、二量体から四量体へ構造変化を引き起こし、同時に Ca²⁺と Zn²⁺の結合親和性が協同的に上昇する。この特異な構造変換機構と Ca²⁺/Zn²⁺親和性上昇機構の解明には、R51がシトルリン化した S100A3 を必要としたが、調製が難しく、大量の試料を得ることが困難であった。そこで本研究では、R51 をシトルリンと同様に、電荷的に中性で構造が類似しているグルタミンに変異させた R51Q 変異体を R51 シトルリン化モデルとして考えた。この変異導入による物性の変化を調べ、シトルリン化モデルとして適しているかを検証した。さらに X線結晶構造解析で、Ca²⁺/Zn²⁺結合型 S100A3 構造の原子レベルでの解明を目指した。

【結果と考察】 Ca²⁺結合による構造変化と、Zn²⁺の存在が Ca²⁺結合による構造変化へ与える影響をトリプトファン蛍光分析で調べた。その結果、R51Q の Ca²⁺結合親和性は WT に比べて高いことがわかった。さらに、同濃度の Zn²⁺の存在による Ca²⁺結合親和性の上昇度は、WT よりも R51Q の方が大きいことがわかった。また、Ca²⁺結合による分子量の変化をサイズ排除クロマトグラフィーで調べた。その結果、WT は二量体から変化しなかったのに対し、R51Q は約 75%が四量体へ構造変化していることを確認した。これらの結果から、R51Q は WT と比べて効率良く Ca²⁺が結合し、四量体へ構造変化することがわかった。

タンパク質濃度 6.9 mg/ mL, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.3), 2.4 M (NH₄)₂SO₄, 0.1 M CaCl₂の条件下で R51Q の結晶を得た (図 1)。X 線結晶構造解析の結果、Ca²⁺の電子密度は観測できなかった。原因として、結晶化条件のイオン強度が高いために Ca²⁺が結合しないことが考えられたため、現在、イオン強度の低いポリエチレングリコールを沈殿材として用いた条件で、結晶化を行っている。

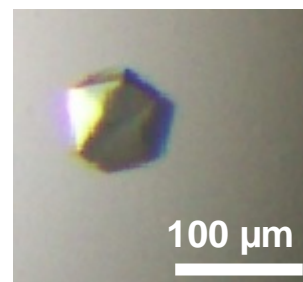


図 1. R51Q の結晶

**X線結晶学とX線小角散乱による
タンパク質脱イミノ化酵素 PAD1 の構造解析
Structural Studies of Peptidylarginine Deiminase
Type I using X-ray Crystallography and Small-Angle
X-ray Scattering**

永井杏奈^{1,4}, 西條慎也², 金城さや³, 眞下降太郎^{1,4}, 秋元恵^{1,4}, 清水伸隆²,
高原英成^{3,4}, 木澤謙司⁵, 和田(矢部)俊樹⁶, 海野昌喜^{1,4}
(¹茨大院理工・²高エネ研・³茨大農・⁴茨大 iFRC・⁵花王・⁶金沢医科大)

蛋白質脱イミノ化酵素 peptidylarginine deiminase (PAD)は、Ca²⁺存在下で、蛋白質中のアルギニン残基をシトルリンに変換する酵素である。哺乳類には PAD1-PAD4, PAD6 の 5 種類のアイソザイムが存在する。我々は、毛髪内に多量発現する S100A3 タンパク質 (S100A3) がシトルリン化を受けていることを見出したことから、毛髪内で起こるシトルリン化反応に興味を持った。毛髪には PAD1, PAD2, PAD3 の 3 種類が存在している。毛髪キューティクル細胞内に多量に存在する PAD3 は S100A3 の Arg51 を特異的にシトルリン化する。この翻訳後修飾により、ホモ二量体で存在する S100A3 はホモ四量体に構造変化を起こし、Ca²⁺, Zn²⁺ の親和性が上昇する。このことから PAD3 による S100A3Arg51 の特異的シトルリン化は、Ca²⁺, Zn²⁺ の恒常性維持に関わる重要な反応であることが明らかになってきた。一方、*in vitro* で PAD1, PAD2 は S100A3 の 4 つすべてのアルギニン (Arg3, Arg22, Arg51, Arg77) をシトルリン化し、PAD3 とは異なる基質特異性を持つ。本研究の最終目的は、PAD1, PAD2 と PAD3 の基質認識の相違を構造生物学的に解明することである。

当研究室では、PAD1 の結晶化を Ca²⁺存在下で行い、X線結晶構造解析により 3.2 Å の分解能の構造を得た。非対称単位中に PAD1 が 2 分子存在していること、活性部位に隣接する PAD1 の細長い N 末端が入り込む構造であることが明らかになった。しかし、その 2 分子の配置が構造既知である PAD2 や PAD4 二量体構造とは明らかに異なる構造であった。これらの構造が結晶内分子パッキングによる人工的なものである可能性を考慮して、溶液中での構造を決定するために、X線小角散乱 (SAXS) 実験を行い、PAD1 の溶液中の構造を解析した。比較対象として PAD3 の溶液構造の解析も行った。X線小角散乱による溶液構造解析において、PAD1 は、細長い棒状の形状を示し、単量体であったのに対し、PAD3 は PAD2 や PAD4 と同様の二量体であることが明らかになった。

本シンポジウムでは、PAD1 の構造の詳細について議論する。

セリンプロテアーゼの反応速度制御と 阻害剤複合体の X 線結晶解析

Control of reaction rate of serine protease and X-ray crystal analysis of inhibitor complex

杉山玲¹, 田中伊知朗^{2,3}

1 茨城大院理工, 2 茨城大工, 3 茨城大フロンティアセンター

【緒言】 酵素としてのタンパク質は、水素原子等のやり取りや様々な構造の変化で、生体内の化学反応を触媒している。しかしながら、その詳細なメカニズムについては、はっきりしていないものが多い。その大きな理由の一つは、反応速度が速いため、実際の系による高分解能結晶構造解析ができず、反応が止まるような阻害剤等を用いた複合体による疑似的な「反応中間体」を結晶構造解析しているものが多いからである。また、その構造解析は通常、抗凍結剤を用いた低温 X 線測定を行っているので、水素原子の位置情報も入手困難であり、抗凍結剤自体の影響も無視できない。そこで、抗凍結剤フリーかつ実際の系で、高圧凍結により酵素反応を様々な段階でトラップした大型良質結晶を作製し、中性子結晶構造解析を行うことが出来れば、抗凍結剤の影響なく、水素原子の位置情報まで含めた詳細な反応機構解明が期待できる。そのためにはまず、酵素反応を遅くする必要があり、その条件探索を、まずは溶液状態で行った。また Trypsin と阻害剤との複合体の結晶構造も、中性子解析の準備として行った。

【反応速度実験】 酵素タンパク質は Chymotrypsin を、基質は p-nitrophenyl acetate を使用し、黄色い反応生成物 p-nitrophenol を波長 400nm で定量した。測定時間を 600 秒に設定し、最初の 2 分間は基質の非酵素的分解反応を測定した。加える酵素溶液量を 16、24、32 μ L、緩衝液の pH を 6.5、7.0 として同様に測定し、それぞれの条件での初期バースト量 (μ M) と定常状態速度 (μ M/min) を計算した。

【結晶解析実験】 タンパク質は Trypsin 単独と、阻害剤 Benzamidine との複合体の結晶を過去の文献を参考に作成し、PF での回折実験、解析を行った。

【結果】 pH7.0 では定常状態速度 0.798 μ M/min、初期バースト量 3.638 μ M、pH6.5 では 1.571 μ M/min、13.640 μ M、pH8.0 では 9.877 μ M/min、16.709 μ M (加える酵素溶液量が 32 μ L の時) となった。この結果から、pH を酸性にすることで反応速度を遅らせることができたと言える。また、Trypsin-Benzamidine 複合体の結晶化に成功し、X 線回折実験まで行うことができた。抗凍結剤を用いた場合と用いなかった場合で、それぞれ 1.03 Å 及び 1.00 Å の高分解能を得ることができた。今後は解析結果の比較を行う予定である。

染色体凝縮を担うコンデンシン制御サブユニットの 精製と結晶化

Preparation and crystallization of condensin regulatory subunit in chromosome condensation

右田智子¹, 原幸大¹, 清水研一郎¹, 平野達也², 橋本博¹

1 静岡県大薬・2 理化研

【目的】 ヒトの遺伝情報を担う DNA はつなぎ合せると長さが約 2 m であり、細胞周期の分裂期に凝縮されることで、染色体と呼ばれるコンパクトな高次構造を形成する。染色体凝縮の機構に異常が生じると正しく染色体が形成されないために染色体の不均等な分配が起こり、細胞の癌化や遺伝性疾患を引き起こす。コンデンシンは、分裂期染色体を構成する主要なタンパク質複合体であり、染色体凝縮と分配で中心的な役割を担う。コンデンシンは SMC サブユニットと制御サブユニットから構成される分子量約 700kDa のリング状の巨大なタンパク質複合体であり、制御サブユニットが DNA との結合・解離を制御する。しかし、制御サブユニットの構造的知見は得られておらず、コンデンシンの制御機構についてはあまり分かっていない。よって、本研究ではコンデンシン制御サブユニットである NCAPG-NCAPH 複合体の構造解析を行い、染色体凝縮の詳細な分子機構を解明することを目的としている。

【方法】 大腸菌発現系を用いて、組み換えタンパク質を調製し、結晶化条件の探索を行った。結晶化スクリーニングの結果に基づき、X 線回折実験に適した結晶を得るために結晶化条件の最適化を行った。また、金、水銀などの重原子化合物を用いて重原子誘導体結晶の調製を行った。得られた結晶は放射光施設 Photon Factory にて X 線回折実験、および回折強度データ収集を行った。

【結果】 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて、組み換えタンパク質の溶液中での会合状態を調べたところ、低塩濃度で安定な多量体を形成することを明らかとした。この精製タンパク質を用いて結晶化を行ったところ、X 線回折実験に適した厚みのある柱状の結晶を得ることができた。回折実験の結果、3.3 Å 分解能の X 線回折強度データを収集し、構造解析に必要な結晶学的パラメータである空間群を決定することに成功した。構造解析に向けて、金化合物、水銀化合物の重原子誘導体結晶を用いて、X 線回折実験を行ったところ、それぞれ 4.1 Å、4.2 Å 分解能の回折強度データを得たが、現在までに構造解析に至っていない。今後、より高分解能の回折強度データを得るために、結晶の調製条件の検討などを行っていく予定である。

タンパク質脱イミノ化酵素 PAD3 の阻害剤 Cl-amidine による阻害機構解明に向けた取り組み

Approach to elucidate the inhibition mechanism of PAD3 by the inhibitor Cl-amidine

○舟橋一真¹、永井杏奈¹、大和田哲也¹、高原英成^{2,3}、海野昌喜^{1,3}

1 茨城大院理工、2 茨城大農、3 茨城大フロンティア

【緒言】タンパク質脱イミノ化酵素(PAD)は、Ca²⁺依存的にタンパク質中のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する反応(脱イミノ化)を触媒する酵素である。PAD3はPADのIII型アイソザイムであり、毛髪キューティクル細胞内に多量に存在するS100A3タンパク質のArg51のみを特異的にシトルリン化する。Cl-amidineはPADアイソザイム共通の不可逆的阻害剤であり、PAD3の基質認識機構・反応機構のみならず、全てのPADアイソザイムの阻害機構を明らかにすることで、アイソザイム選択的阻害剤の開発に有用な情報を与えられる。本研究では、PAD3と阻害剤Cl-amidineの複合体構造のX線結晶構造解析を試み、PAD3の阻害機構ならびに活性部位構造の原子レベル分解能での解明を目指した。

【実験】形質転換した大腸菌を培養した後、His-tagアフィニティークロマトグラフィー・イオン交換クロマトグラフィー・ゲル濾過クロマトグラフィー精製を行い、PAD3の精製標品を得た。結晶化は蒸気拡散法で行った。結晶作製の際、CaCl₂含有溶液へのソーキングでは結晶がダメージを受けることが問題視されていたため、結晶化スクリーニングによりCaCl₂を含む結晶化条件を検討した。また、阻害剤含有溶液へのソーキングを行い、PAD3-阻害剤複合体結晶の作製を試みた。作製した結晶に対し、X線回折実験と構造解析を行った。

【結果と考察】200 mMのCaCl₂を含む結晶化条件の確立に成功し、阻害剤含有溶液へのソーキング無・ソーキング有の結晶でそれぞれ分解能2.65 Å・3.10 ÅのX線回折強度データを得ることが出来た。構造解析ならびに精密化によりCl-amidineの結合は確認出来なかった。これは、ソーキング条件が不適當、またはHis-tagによる影響等によるものだと考えられる。分解能2.65 ÅのデータからはCa²⁺と見られる電子密度を4ヶ所確認することが出来た。結晶構造が既知であり、PAD3と構造類似性があるPAD4のCa²⁺結合型構造との比較により、Ca²⁺結合部位は同様の位置にあることが確認できた。活性部位の電子密度を確認出来ない箇所があったため、現在はその後得られた分解能2.75 Åのデータも参考にして精密化を続けている。

PCNA と APIM の複合体の構造と機能

Structure and interaction of PCNA-APIM complex

内田雅之¹, 原幸大¹, 田形梨紗¹, 横山英志², 石川吉伸¹, 菱木麻美¹,
橋本博¹

1 静岡県大薬・2 東京理大薬

PCNA はリング状の 3 量体タンパク質であり、リング中央の孔に二本鎖 DNA を結合し、リング外側の疎水性ポケットに DNA 複製や修復などに関わる様々なタンパク質を結合する。現在までに 200 以上のタンパク質が PCNA に結合すると考えられており、PCNA は DNA 上で起こる様々なタンパク質-タンパク質間相互作用のハブタンパク質として機能する。PCNA に結合するタンパク質は PIP-box (PCNA-Interacting Protein box) と呼ばれる結合モチーフを持つ。PIP-box の共通配列は Q-XX-[L/I/M]-XX-[F/Y]-[F/Y] であり、疎水性および 2 つの芳香族アミノ酸残基が螺旋構造を形成し、PCNA の疎水性ポケットに結合することが知られている。近年、PIP-box とは異なる PCNA 結合モチーフ APIM (AlkB homolog 2 PCNA-Interacting Motif) が同定された。APIM は 5 つのアミノ酸残基から構成され、その共通配列は [K/R]-[F/Y/W]-[L/I/V/A]-[L/I/V/A]-[K/R] である。APIM は PIP-box よりもアミノ酸配列の保存性は低いが、様々な核内タンパク質で見いだされている。本研究では、PCNA と APIM を含む ZRANB3 ペプチドとの複合体の X 線結晶構造解析および構造に基づく相互作用解析を行い、PCNA と APIM との相互作用メカニズムを明らかにした。構造解析の結果、APIM は PIP-box と同じ結合部位に結合しており、APIM の芳香族および疎水性アミノ酸残基に加えて、APIM 以外の疎水性アミノ酸が PIP-box と類似した螺旋構造を形成し、PCNA の疎水性ポケットに結合していた。部位特異的変異体を用いた相互作用解析の結果、この相互作用が APIM と PCNA との相互作用に重要であることが明らかとなった。

リゾチーム-糖複合体の中性子構造解析に向けた 大型良質結晶育成

Large scale high quality crystal growth for neutron structure analysis of lysozyme-sugar complex

後藤亮祐¹, 田中伊知朗^{2,3}

1 茨城大院理工, 2 茨城大フロンティアセンター, 3 茨城大工

【緒言】

リゾチームは細菌の細胞壁ペプチドグリカンの N-アセチルムラミン酸と N-アセチルグルコサミンの間のグリコシド結合を切断する酵素である。工業的には卵白から抽出したリゾチームが食品や医薬品に応用されている。リゾチームの触媒機構に関しては非常に多くの研究がなされてきたが、いまだに議論がされている。代表的な反応として Phillips 機構と Koshland 機構の 2 つの反応機構がある。リゾチームの中間体は共有結合を作って反応が進む (Koshland 機構) と断定している教科書もあるが、これはリゾチームの中間体を直接観察したものではなく、リゾチームと共有結合を作りやすいリガンドで行った不自然な条件下での結果によるものである[1]。そこで本研究では、リゾチームの反応が生体内で進む際、より自然な系で観察するため、N-アセチルグルコサミンの 4 量体((NAG)₄)を基質に用いた条件で、酵素反応に係る水和水の位置情報や触媒基のプロトネーションの有無を確認するために中性子回折実験を計画した。まずはその準備のために、中性子回折を用いたテスト測定にて結晶性の確認、中性子構造解析に向けた大型結晶の作成、軽水を用いて作成した大型結晶の重水ソーキング条件の検討を行った。

【実験】

実験に用いたリゾチームは SIGMA-ALDRICH 社のニワトリ卵白リゾチームを使用し、糖は(NAG)₄、(NAG)₃であり、Dextra Laboratories 社より購入した。X線回折実験は、PF-AR NW12Aにて行い、温度は 100K で測定した。また、150 kW 出力時の BL-03 (iBIX)にて中性子回折を用いたテスト測定を行った。

【結果と考察】

中性子回折実験のテスト測定では目視による分解能 2.42 Å の反射を確認できた。今回、実験に用いた結晶は 0.123mm³と小さい結晶であったが結晶性は良いものと判断できた。テスト測定後、中性子構造解析に向けた大型結晶の作成にとりかかり、滅菌フィルターを用いた結晶化により、1 辺 1mm を超える結晶を得ることが出来た。重水ソーキング条件の検討実験の結果、安定して比較的高分解能回折像が得られることに成功している。さらに結晶性を良好にするソーキングの条件を検討中であり、2 月に予定されている改良した大型良質結晶での中性子測定の結果を報告する予定である。

参考文献[1] D. J. Vocadlo *et al.*, Nature 412 (2001) 835 など

新規グアニンヌクレオチド交換因子 SmgGDS による RhoA 認識機構の構造基盤

Structural basis of RhoA recognition by novel guanine nucleotide exchange factor SmgGDS

清水光、藤間祥子、紺谷圏二、堅田利明、清水敏之

東京大学大学院薬学系研究科

SmgGDS は RhoA や RhoC に対する guanine nucleotide exchange factor (GEF)として知られており、既存の GEF にみられる活性ドメインを持たず、新規の GEF 機構を持つと考えられている。SmgGDS は armadillo repeat motifs (ARMs)からなり、異なる生理学的役割を持つ二つのアイソフォーム (SmgGDS-607, SmgGDS-558)で構成される。興味深いことに SmgGDS は C 末端に poly basic region (PBR)を持つ RhoA, Rac1, Rap1A, K-Ras4B, Di-Ras といった様々な Small GTPase と結合できる。SmgGDS は GEF としての役割の他に分子シャペロン、輸送、局在制御因子として報告されている。本研究では X 線結晶構造解析を用いて SmgGDS による低分子量 G 蛋白質の認識機構の解明を目的とし研究を行った。

今回我々はヒト SmgGDS-558 単体および RhoA との複合体の結晶構造を世界で初めて決定した。SmgGDS-558 は RhoA の脂質修飾と Switch II 領域を認識して結合していた。本構造解析により SmgGDS は RhoA の Switch II 領域を捕捉することで G-domain を不安定化するという新規の GEF 活性機序を持つことが明らかになった。また生化学実験の結果から SmgGDS-558 は脂質修飾された RhoA を、SmgGDS-607 は未修飾の RhoA と強く結合し GEF 活性を発揮することを明らかにした。構造情報と生化学実験の結果を通じて我々は SmgGDS による Small GTPase の認識には 2 つの結合領域が関わり、SmgGDS はアイソフォームに応じて Small GTPase の脂質修飾状態を認識した異なる結合フォームをとることを提唱した。

新規構造を持つ環化酵素 CghA の X 線結晶構造解析と その立体選択的反応機構

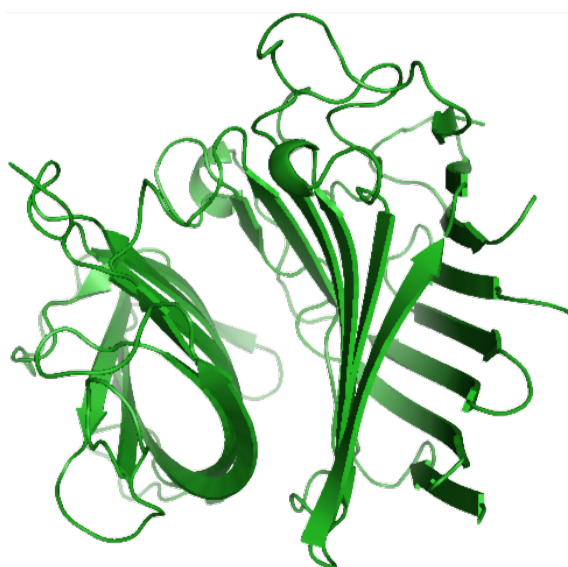
Crystal structure and mechanism of stereoselective cyclization enzyme CghA

横山 葵, 前田 直哉, 岸本 真治, 佐藤 道大,
原 幸大, 恒松 雄太, 橋本 博, 渡辺 賢二
静岡県大薬

【目的】微生物が産生する生理活性物質の一部は、Diels-Alder 反応によって生合成されることが報告されており、3HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるロバスタチンがその代表例である。これらの天然物はデカリン部分に関して立体特異的に生合成されるという特徴を持つ一方で、その立体制御については未だ不明な点が多い。今回我々は、糸状菌 *Chaetomium globosum* が生産する Sch210972 と Diels-Alder 反応を触媒する酵素 CghA に着目し、立体構造と詳細な反応機構の解明を目的とし研究に着手した。

【方法】 *cghA* 遺伝子の全塩基配列をシーケンスを用いて決定した後、塩基配列をもとにコドンが大腸菌宿主系に最適化した。大腸菌 BL21(DE3)株を用いて、CghA の組換えタンパク質を得た。得られたタンパク質を X 線回折実験に供し、2.0 Å の分解能の回折データを収集し、Se-Met を用いた SAD 法により、位相を決定した。また、Sch210972 との共結晶を作成し、X 線回折実験に供して、回折データの収集を行い、CghA の構造をサーチモデルとした MR 法により位相決定を行った。

【結果】構造解析によって得られた立体構造は β バレルモチーフと β サンドイッチモチーフを合わせもつ、これまでになく新規の構造であることが明らかとなった。また、共結晶の解析により CghA の活性部位が予想されたため、その推定活性アミノ酸残基に変異を導入し、酵素活性を測定した。その結果から、Asp69 および Arg78 が基質との結合に、Ser71 と Gly389 が立体選択性に関与していることが明らかとなった。



β -バレル ドメイン β -サンドイッチ ドメイン
CghAの結晶構造

新規 HIV-1 逆転写酵素阻害剤の結晶構造

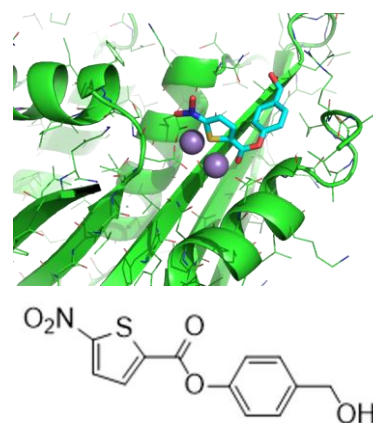
Crystal structure of novel HIV-1 reverse transcriptase inhibitors

宇佐美琴、瞿良、小向勇士、米田友貴、根矢三郎、星野忠次
千葉大院薬

【目的】近年 HIV に対する化学療法は様々な薬剤の開発により大きな進歩を遂げている。しかし、多剤耐性ウイルスの出現が危惧されており、既存の薬剤と異なる作用点を持つ新たな HIV-1 に対する抗ウイルス剤の開発が強く求められている。本研究では、HIV-1 逆転写酵素に内在する RNase H 活性を標的とする新規抗 HIV 薬の開発を進めている。

【方法】これまでの研究において、RNase H に対する阻害活性を有する数種の化合物を合成した。HIV-1 逆転写酵素の RNase H ドメインは、その分子量より p15 と称される。p15 を部分タンパク質として発現した場合、RNase H 酵素活性は示さない。大腸菌も RNase を持っており、HIV-1 の p15 と類似のアミノ酸配列を持っている。大腸菌 RNase H の1つのヘリックスを HIV-1 p15 に組み込んだ p15Ec 組換えタンパク質は、RNase H 酵素活性を示すことが知られている。今回 p15Ec を改変した p15Ec Δ ADKK というベクターを作成し、組換えタンパク質の発現、精製、結晶化を行った。結晶と合成した化合物を用いてソーキングを行い、X 線回折データを得て、回折データの解析を行った。

【結果と考察】フラン環やチオフェン環をもつ阻害活性を有する化合物を数種合成し構造解析を行った結果、p15Ec の酵素活性中心における2つの Mn^{2+} と各化合物におけるフラン環(O)、チオフェン環(S)、加えてニトロ基やカルボニル基等が引き付け合うことで結合構造が形成されていた(右図)。回折データを得たいくつかの化合物において解析を進めた結果、チオフェン環を持つ化合物がより強く HIV-1 RNase H 活性を阻害する傾向が見られた。上記の結果をもとに更なる構造改変、構造解析を進めている。



PsoF のメチルトランスフェラーゼ ドメインの構造解析

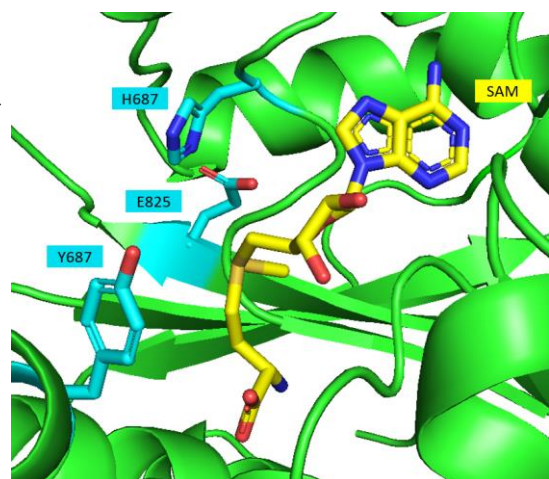
Crystal structure of methyltransferase domain of PsoF

松下 拓磨、岸本 真治、山本 剛、原 幸大、
恒松 雄太、橋本 博、渡辺 賢二
静岡県大薬

【目的】 シューロチンは糸状菌 *Aspergillus fumigatus* によって産生される二次代謝物の一つであり、ガンによる血管新生を阻害する効果があるため、新規の抗ガン薬として注目されている。PsoF はシューロチンの生合成を担う酵素の一つであり、N 末端領域にフラビン依存型酸化酵素 (FMO) ドメイン、C 末端領域にメチル基転移酵素 (MT) ドメインを有しており、シューロチン生合成において、それぞれ異なる段階で機能することを明らかになっている。また、ポリケチド合成酵素 (PKS) にコードされているメチルトランスフェラーゼではなく、PsoF のメチルトランスフェラーゼによってメチル化が起こる点も非常に新規性が高い。今回は C 末端領域にコードされた MT ドメインの結晶化を行い、メチル化反応の反応機構を解明することを目指して PsoF の X 線結晶構造解析に着手した。

【方法】 大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いて PsoF の MT ドメインの組み換えタンパク質の発現を行った。フレンチプレスを用いて破碎した後、Ni アフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いて高純度に精製した。PsoF 単体と *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の複合体の結晶化に成功した。X 線回折実験より、各々 2.0 Å で回折データ収集した。そして、PDB エントリー 5MPT をサーチモデルとして、分子置換 (MR) 法によりタンパク質の立体構造を決定した。

【結果】 PsoF は結晶内ではリング状の 3 量体を形成していることが確認された。さらに、MT ドメインの C 末端ドメインには典型的な Rossmann fold を有しているが、N 末端ドメインは他の MT と比較するとアミノ酸配列の相同性が低いことから、基質認識において非常要であることが推測できた。今後は基質アナログを用いた共結晶化により複合体の構造解析を行い、シューロチン生成経路におけるメチル化反応の反応機構を解明する。



SAM 結合部位

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来 CcGH131B とセロビオース
の複合体の立体構造解析
Structural analysis of CcGH131B from *Coprinopsis
cinerea* in complex with cellobiose

石川涼一¹, 奥山舜朔¹, 砂川直輝², 五十嵐圭日子², 西河淳¹,
吉田誠¹, 殿塚隆史¹

1 東京農工大院、2 東京大院²

【緒言】

植物腐生性担子菌 *Coprinopsis cinerea* はセルロースやヘミセルロースなどの植物バイオマス構成多糖類を単一の炭素源として旺盛に生育し、また、それらの分解に関わる多数の酵素遺伝子をゲノム上に有していることが知られている。研究対象である CcGH131B は子囊菌 *Neurospora crassa* が微結晶セルロースであるアビセルを含む培地において強く発現するタンパク質 NCU09764 と相同性をもつタンパク質であり、糖質加水分解酵素ファミリー GH131 に分類されている。GH131 に分類されるタンパク質は近年、子囊菌 *Podospora anserina* 由来の PaGluc131A について β -1,3-、 β -1,4-、 β -1,6-グルカンに作用するという報告がなされたが、これ以外の酵素については全く機能が分かっていない。

今回 CcGH131B についてセロビオースとの複合体の構造が得られたため、これについて報告する。

【方法と結果】

大腸菌 BL21 (DE3) を用いて、C 末端に His タグを結合した融合タンパク質として CcGH131B を発現させた。アフィニティークロマトグラフィーで精製を行い、SDS-PAGE にて単一バンドであることを確認した。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法にて行い、MES 緩衝液、PEG8000、リン酸水素ニアンモニウムをリザーバーとして用いた。抗凍結剤にセロビオースを混ぜることで、リガンドとの複合体の作製を試み、X 線回折強度測定を行った。分子置換法により位相決定を行い、分解能 2.1 Å で構造を決定した。

構造解析の結果、CcGH131B は 2 枚の逆平行 β シートからなる β -ゼリーロール構造を持ち、分子内のサブサイト側と考えられる領域にセロビオースが一分子取り込まれていた。取り込まれたセロビオースの立体配置は α -アノマー型をとっていることから、CcGH131B がセルロースに関連した基質に対して、アノマー反転型で作用することが示唆された。

***Sohingobium* sp. SYK-6 由来メチレンテトラヒドロ還元酵素 (MTHFR) の機能解析**

Analysis of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) function from *Sphingobium* sp. SYK-6

于 宏洋^{1,2}、桑原直之¹、千田俊哉^{1,2}
1 KEK, IMSS, SBRC、2 SOKENDAI

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) は、アミノ酸代謝やDNA合成へと繋がる C1 代謝において、 N^5 , N^{10} -methylenetetrahydrofolate (5,10-CH₂-THF) を N^5 -methylenetetrahydrofolate (5-CH₃-THF) に可逆的に変換する FAD 含有酵素である。*E. coli* 由来 MTHFR (EcMTHFR) などバクテリア由来 MTHFR は、5,10-CH₂-THF を可逆的に 5-CH₃-THF へ触媒することが明らかにされている。これに対して、近年、*Sphingobium* sp. SYK-6 株由来 MTHFR (S6MTHFR) は 5-CH₃-THF から 5,10-CH₂-THF への非可逆的な反応しか起こせないことが示唆されている。EcMTHFR と S6MTHFR は 21% の相同性を持つにもかかわらず、反応の可逆性/非可逆性が異なることから、各生物の細胞機能の多様性の影響により MTHFR が異なる進化を遂げたと考えられた。本研究では、X 線構造解析を用いて S6MTHFR の立体構造を決定し、立体構造の比較に基づく生化学的実験で MTHFR の触媒メカニズムの多様性に関する知見を得ることを目的としている。

立体構造の決定及び酵素活性の測定には大量かつ高純度な S6MTHFR が必要となるため、*E. coli* BL21(DE3) で His タグを用いた大量培養した後、ニッケルカラム、陰イオン交換カラムとゲル濾過カラムで精製を行い、最終的に 25 mg/4L 培養スケールの収量で高純度の S6MTHFR を入手できた。これまでの MTHFR の研究から、EcMTHFR が四量体を形成することなど多量体構造は活性の維持や調節に必須であることが報告されていた。しかし、我々のゲル濾過カラム解析の結果から、S6MTHFR は機構が異なり、単量体として活性を保持していることが示唆された。

さらに詳しい触媒機構を知るために S6MTHFR の結晶化実験を行い、立体構造解析を現在行っている。これまでに、硫酸アンモニウムや高分子量 PEG を沈殿剤として含む条件で、S6MTHFR の結晶化に成功している。それら結晶を用いて、Photon Factory BL17A における回折データ収集を行った結果、1.5 Å の高分解能データが得られた。今後は S-SAD 法による構造解析を行い、構造情報に基づく生化学的解析によって、MTHFR の触媒メカニズムの多様性に関する知見を得る。

インフルエンザウイルスエンドヌクラーゼ活性阻害 化合物の合成と結合構造解析

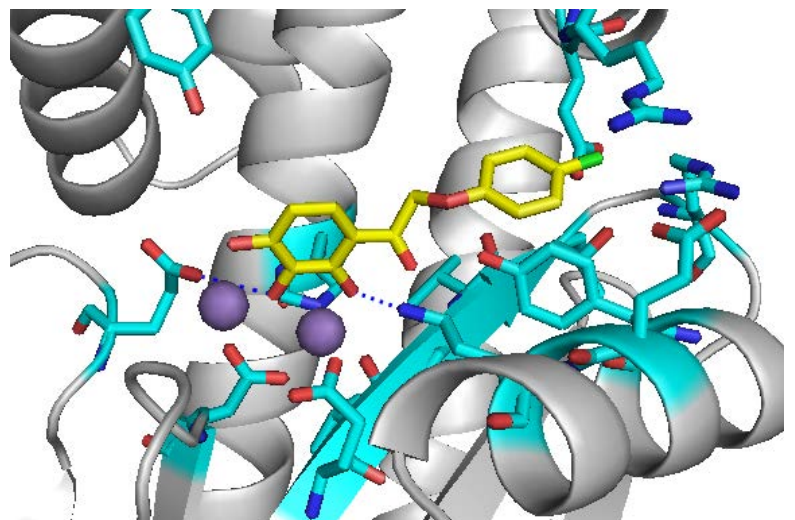
Organic synthesis and structural analysis of influenza virus endonuclease inhibitors

北原真理子¹、額賀路嘉²、米田友貴¹、根矢三郎¹、星野忠次¹

1 千葉大院薬、2 城西国際大薬

[目的]インフルエンザウイルスの持つ RNA Polymerase 中の Acidic サブユニットの N 末端側約 200 残基(PA_N)には、エンドヌクラーゼ活性がある。この活性はインフルエンザウイルス複製に必須のものであり、新たな抗インフルエンザ薬の標的部として期待されている。本研究では PA_Nを標的としたエンドヌクラーゼ活性阻害剤の開発を進めている。

[方法・結果]我々のこれまでの研究において当研究室で所有する化合物ライブラリを用いて、PA_Nに対する *in vitro* スクリーニングを行った。その結果、エンドヌクラーゼ阻害活性を持つ3種の化合物を同定した。さらに同定した3種の化合物と PA_Nとの共結晶を作出し、X線結晶構造解析を行った。今回これらの結果を踏まえて、構造改変を加えた 14 種類の化合物を合成し、阻害活性を測定した。このうち3種の化合物が高い阻害活性を示した。一方で、硫化アンモニウムを含む結晶化剤で PA_Nの結晶を析出させ、この結晶と活性化合物をソーキングすることによって共結晶を作出した。この共結晶に関して X 線結晶構造解析を実施した。さらに活性化合物と PA_Nの結合構造から、さらなる構造改変を加えた化合物を合成した。この化合物の構造解析を行い、構造改変を進めることによって、より高い阻害活性を示す PA_N阻害薬を創出し得る可能性を見出した。



PAN と合成化合物の共結晶構造

FTIR 法を用いたフェレドキシン依存性ビリル還元酵素 PcyA-BV 複合体 Glu76 の水素化状態の解明

Insights into Protonation State of Glu76 of a Bilin Reductase PcyA-BV Complex Following Fourier Transform Infrared Spectroscopy

(茨城大・院理工¹, 理研・播磨², 久留米大・医³, 久留米高専・生命⁴, 宮崎大・医⁵, 大阪大・工⁶, 茨城大・フロンティア⁷) ○堀江和輝¹, 久保稔², 野村 高志², 杉島正一³, 萩原義徳⁴, 和田啓⁵, 五十嵐啓介¹, 福山恵一⁶, 海野昌喜^{1,7}

【緒言】フェレドキシン依存性ビリル還元酵素 PcyA はビリベルジン(BV)の二か所を部位特異的に一定の順序で二電子還元しフィコシアノビル(PCB)を生合成する。これまでにPcyA-BV複合体のX線構造でプロトドナーと考えられるGlu76, Asp105が二重コンホメーションを持つことが示されていた。X線構造解析では水素原子を同定できなかったため中性子構造の解析が進められたが、Glu76周辺のプロトン化が確認できなかった。そこで、中性子構造解析の曖昧さを補完するため、本研究では①PcyAの野生型(WT), Glu76Gln (E76Q), Asp105Asn (D105N)変異体それぞれのBV複合体を用いた赤外分光法によるGlu76水素化状態の解析を行った。また、続いて②D105N変異体のX線結晶構造解析と③中性子構造解析に向けた結晶の大型化を行った。

【実験】①PcyA(WT, E76Q, D105N)-BVを用いて10 μmの光路長で赤外分光法を行った。緩衝液でバックグラウンドをとり、各複合体を6000 scanで測定した。②D105N-BVの結晶を用いて茨城県のPhoton Factory, BL-1AにてX線回折実験を行った。③1.35 mM D105N-BV, 1.4 M (NH₄)₂SO₄, 50 mM MES (pH 5.9), 200 mM NaClを用いてシッピングドロップ蒸気拡散法を採用し結晶化を行った。

【結果と考察】①1750 cm⁻¹付近に二重コンホメーションを持ちどちらもプロトン化を示すピークが見られた。したがって、中性子解析では不鮮明だったGlu76のプロトン化状態が決定された(図)。

②最大分解能 1.2 Åのデータが得られ、現在の精製手順で得られるPcyAは結晶化を行い回折実験においても純度が高いことを確認することができた。③結晶を仕込み二か月後、一辺最大 2 mmを超える大型結晶が観察され、現在中性子構造解析を実行中である。

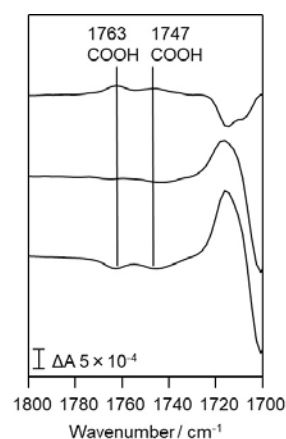


図.FTIR

タンパク質単結晶の高圧凍結法最適化

Optimization of high-pressure freezing method of protein single crystals

青木晃次¹、新井隆介¹、加藤康平¹、杉山玲²、矢本早紀²、田中伊知朗^{1,3}
1 茨城大学工学部、2 茨城大学大学院理工学研究科、3 茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター

【緒言】

タンパク質結晶を X 線回折測定する際、結晶損傷を防ぐ目的で試料を凍結する必要がある。凍結する際に重要となるのが、水をアモルファス状に凍らせ、氷晶からの散乱を防ぐことである。そこで、水の粘度が最大になる 200MPa での高圧凍結に注目した。先行研究では、さまざまなタンパク質結晶の高圧凍結実験には成功しているが、回折実験での試料マウント時にトンクを用いて手動でマウントする際、うまくセットできず結晶が溶けてしまう問題、ループがステージから落ちてしまう、ビームからずれてしまう問題があり、常圧凍結と比較対象となる精度の良い構造解析には至っていない。そこで、高圧凍結実験の成功率を上げること、回折実験での問題を解決することで、さまざまなタンパク質結晶の構造解析を行い、常圧凍結との構造比較をすることを目的とした。今回、高圧凍結法の実最適化として行ったのが、(1)凍結ピンの改良、(2)ループ固定法の改良、(3)回折実験での試料マウント自動化である。

【実験】

高圧凍結には、東海の IQBRC に設置されている米国 ADC 社製高圧凍結装置 HPC-201 を用いた。ヘリウムガスによって 200MPa まで加圧し、液体窒素で 77K まで温度を下げた後常圧に戻し、液体窒素中に保存する手順を取った。

(1)では、内径 2mm の圧力管壁面にぶつかり、結晶が落ちてしまうことを防ぐために、外径 1.25mm から 1.4mm の凍結ピンに変更し凍結実験を行った。(2)では、ループの固定に用いていた Cryoglue (2-プロパノールとエタノール 3:2 の混合液)の温度を変更し、粘度を調節した。また塗り方も変更し、確実に固定するように工夫した。(3)では、ロボットの規格に合うようにループの長さを調整最適化した。

【結果】

凍結ピンの改良、ループ固定法の改良、回折実験での試料マウント自動化のための改良を行った結果、高圧凍結実験の成功率が上がり、いくつかの結晶では、X 線回折実験まで成功することができた。今後、X 線回折測定したタンパク質の構造解析をし、常圧凍結との構造比較をしていく予定である。

ブルー銅タンパク質シュウドアズリン Met16His 変異体の X線結晶構造解析

X-ray Crystallography of Met16His Variant of a blue copper protein, pseudoazurin

竹林 直希・斎藤 喜之・山口 峻英・高妻 孝光
茨城大院理工 量子線科学専攻

タンパク質において非共有結合性の弱い相互作用は、タンパク質の構造形成、機能発現において、重要な役割を演じている。脱窒菌における電子伝達体として機能するシュウドアズリンでは、第二配位圏に位置する Met16 と、銅イオンに配位する His81 との相互作用により、活性中心の構造と性質が調節されている。本研究では、Met16 を His に置換した Met16His 変異体の分光学的、電気化学的性質、結晶構造および電子移動反応を調べ、活性中心近傍に導入した His 残基のプロトン化/脱プロトン化の効果についての検討を行った。

pH 7.0 における電子吸収スペクトルを測定したところ、Met16His 変異体は 450 nm と 591 nm に吸収極大を有し、それぞれの吸光度比は $A_{450}/A_{591} = 0.50$ であった。pH 4.0 では吸収極大がそれぞれ 456 nm と 594 nm に長波長側にシフトし、その吸光度比は $A_{456}/A_{594} = 0.31$ へと変化したことから、新しく導入した His のプロトン化により、活性中心の構造がより Axial になることが明らかとなった。また、電子吸収スペクトルの pH 依存性から、新しく導入した His16 は pK_a を 4.1 に有することが判明し、通常のアヒスチジンイミダゾール性窒素よりも低い pK_a を有することが明らかとなった。

pH 7.0 と pH 4.1 での結晶構造を比較したところ、pH 7.0 において His16 は、His81 と π - π 相互作用を形成していたのに対し、pH 4.1 になると、 π - π 相互作用は消失した(Figure 1)。このことは、導入した His16 がプロトン化し、正に帯電したことによって、静電的反発が生じ、活性中心から離れたものと考えられる。活性中心近傍に導入した His のプロトン化によって π - π 相互作用が消失し、活性中心の構造は、Axial 型へと転移するものと考えられる。

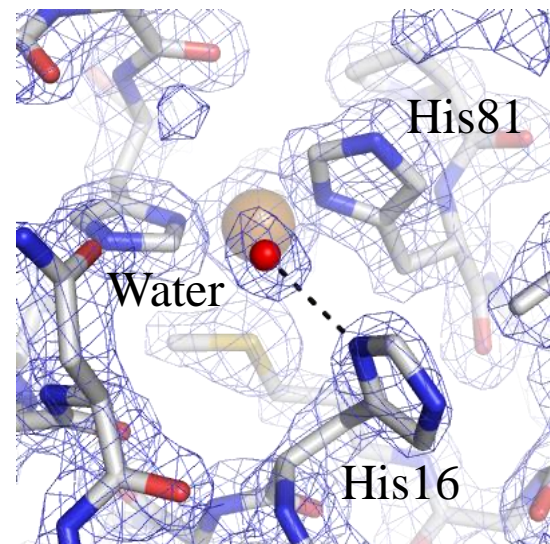


Figure 1. pH 4.1 における Met16His 変異体の His16 残基周辺の構造

DAPK タンパク質・ATP アナログ複合体の X 線結晶解析と キナーゼ活性測定

X-ray analysis and kinase assay of DAPK protein · ATP analog complexes

加藤康平¹・松尾悠平²・田中伊知朗^{1,3}

1 茨城大工, 2 秋田大学, 3 茨城大フロンティアセンター

【緒言】

DAPK は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼサブファミリーに属する Ser/Thr キナーゼであり、生体内で脱リン酸化されることで活性化し、細胞死を促進する。DAPK1 は急性虚血性心疾患、および子宮内膜線癌の治療標的である。これまでの研究において、DAPK キナーゼドメインに含まれる ATP 結合部位の立体構造が X 線結晶解析によって明らかにされている。また、ATP 結合部位が ATP アナログとの結合時に、結合部位に多数の水分子が保存されること、金属イオンが 1 つのみ配位することがわかっている。そして、リン酸転移反応が起こり得る結合様式も判明したが、実際に基質に対してリン酸転移反応が行われるかどうかはわかっていない。これより、結晶化条件下で基質を用いて DAPK 活性測定を行い、DAPK・ATP アナログ複合体結晶構造と DAPK 活性との関係を考察していく。

【実験方法】

キナーゼドメイン(残基数 277)を大腸菌で大量発現させて精製した DAPK を使用した。結晶化剤には $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、ATP 類似体には、Sigma Aldrich 社製の AMP-PnP (ANP)、ATP- γS (AGS)、AMP-PCP (ACP)、ATP、ADP を用いた。金属には MgCl_2 を用いて、pH は 6.5 と 8.0、温度は 293K の条件でハンギングドロップ法により結晶化した。また、モル比が DAPK:ATP 類似体:金属=1:5:50 になるように DAPK 溶液にアナログと金属を加えて、それをタンパク質溶液とした。X 線回折実験は、KEK-PF BL5A にて 100K で低温測定し、Phenix と coot を使用してデータ解析を行った。キナーゼ活性測定には Invitrogen 社製の Z'-LYTE™ Kinase Assay Kit - Ser/Thr 13 Peptide、コロナ電気社製のマルチグレーティングマイクロプレートリーダー SH-9000Lab を用いた。

【結果】

分解能 1.57~2.26 Å の新規構造 3 つを含む全 8 構造を得ることが出来た。それぞれの構造における DAPK と ATP 類似体との結合様式の比較により、ATP 類似体の 2 つの結合様式と重要な水の保存が確認され、 α β γ リン酸が直線状の時に転移が起こると考察できた。また、DAPK-ATP-Mg 構造により、リン酸転移直前の構造の相互作用様式を考察することが出来た。

PF-BL1A、PF-BL17A、PF-AR NE3A、SPring-8 BL41XU、BL44XU

微生物 Dipeptidyl aminopeptidase IV の結晶構造解析 Crystal structure analysis of bacterial dipeptidyl aminopeptidase

六本木沙織¹、鈴木義之³、館岡千佳¹、藤本真友¹、森澤さおり¹、飯塚一平¹、中村章宏³、
本間宣行³、伊藤康広³、志田洋介³、小笠原渉³、田中信忠²、阪本泰光¹、野中孝昌¹
(1 岩手医大薬、2 昭和大薬、3 長岡技大生物)

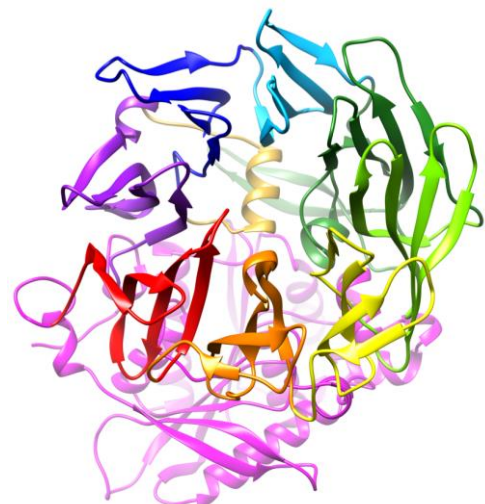
DAP IV (Dipeptidyl aminopeptidase IV; DPP IV) は、タンパク質やペプチドを栄養源とする糖非発酵グラム陰性細菌 (NFGNR; Non-Fermenting Gram-Negative Rods) に存在し、基質 P1 の Pro、Hyp あるいは Ala を認識しジペプチドを産生する酵素である。DAP IV により産生されたジペプチドは、ペプチドトランスポーターを介してアミノ酸単体よりも優先的に細菌内に取り込まれるため、DAP IV は NFGNR の生育に深く関与していると考えられる。

本研究では、*Pseudoxanthomonas mexicana* WO24 由来 DAP IV (PmDAP IV) とペプチド・化合物との共結晶化、構造解析を行った。位相決定は、既に明らかになっている *Stenotrophomonas maltophilia* 由来 DAP IV のアポ体立体構造をモデル分子として、分子置換法により行った。

その結果、PmDAP IV のアポ体、阻害剤複合体、ジペプチド複合体の結晶構造を決定した。PmDAP IV とジペプチドとの複合体においては、 β プロペラドメインに存在する Arg106 が、基質の N 末端を認識するダブル Glu モチーフの Glu208 と塩橋を形成し間接的に基質の N 末端認識に関与していることが明らかになった。さらに、PmDAP IV の触媒残基 Ser613 とジペプチドが結合しアシル中間体を形成している立体構造も得られた。

これらの構造情報から、微生物 DAP IV と既知の哺乳類 DPP IV の立体構造の比較が可能となり、微生物 DAP IV は基質結合時に構造変化もしくは Conformational selection を起こすこと、基質 N 末端認識に関与する Arg を含む二次構造が両者で異なること、サブサイトを構成するアミノ酸残基の一部が両者で異なり、これが微生物 DAP IV と哺乳類 DPP IV の基質認識の違いに関与していることなどが明らかとなった。さらに、本研究により得られた PmDAP IV の立体構造情報に基づいて、微生物 DAP IV と哺乳類 DPP 群との比較を行った。

これらの研究結果は、糖非発酵病原菌由来 DAP IV に特異的な阻害剤の開発につながる可能性がある。



結晶化に向けた平板動物リゾチームの大量発現と精製 Expression, Purification, and crystallization of *Trichoplax adhaerens* lysozyme

此下亜椰¹、長瀬里沙²、千田俊哉^{1,2}

1 総研大、2 KEK-放射光 II

センモウヒラムシは平板動物門に属する唯一の種である。1883年に海水の水槽から初めて発見され、熱帯や亜熱帯に生息している。形態はミリメートルサイズの巨大なアメーバ様であるが、多細胞生物であり、背腹軸を持つ。6種類に分化した2000-3000個の細胞から構成された3層構造をとり、器官と大部分の組織を欠いた非常にシンプルな構造をしている。平板動物はミトコンドリアや核ゲノムの比較から後生生物初期に分岐したとされている。これは単細胞から多細胞への移行の直後であるため、平板動物は多細胞真核生物の進化に関する研究のモデル生物となることが期待されている。

平板動物は藻類の表面に付着し、それらを消化して摂取する。腹面の繊毛運動によって藻類の表面を這うように進行して食餌を見つけ、繊毛の動きを止めて摂食する。また、平板動物は藻類の一種であるシアノバクテリアを餌として飼育することが可能である。消化液にはリゾチームが含まれていると考えられており、すでに平板動物リゾチームがシアノバクテリアのようなグラム陰性菌にも有効であることが報告されている。後生生物からは chicken-type, goose-type, invertebrate-type, phage-type のリゾチームが報告されており、平板動物がもつリゾチームは goose-type に属する。しかし、平板動物が持つリゾチームには他の動物のリゾチームにはない、システインに富む領域をもつことが示唆されている。

本研究では特有のアミノ酸配列をもっている平板動物リゾチームの生化学的、構造学的な解析を進め、他の生物との比較から分子進化的な知見を得ることを目指す。まず、X線結晶構造解析に向けた結晶化のため、平板動物リゾチームの発現系の構築と精製法の確立を試みた。

平板動物リゾチームは、大腸菌 (SHuffle T7) を宿主とし pCold-ProS2 プラスミドベクターを用いることにより、可溶画分に発現した。続いて、His-tag を用いたアフィニティー精製ならびにゲル濾過クロマトグラフィーを行い最終精製物とした。精製した平板動物リゾチームの純度および収量は結晶化に適していなかった。さらに、リゾチーム活性は卵白リゾチームと比較して著しく低いことが明らかとなった。以上の結果から、本発現・精製法では、活性を持った平板動物リゾチームを高純度かつ高効率で取得することが困難であると考えられる。今後は以上の問題点を解決できる発現・精製方法を検討する。

X線による大型タンパク質単結晶の結晶品質評価

Crystal quality evaluation of large protein single crystals by X-ray

新井隆介¹・青木晃次¹・矢本早紀²・田中伊知朗^{1,3}

1 茨城大学工学部、2 茨城大学大学院理工学研究科

3 茨城大学フロンティア応用原子科学研究センター

【緒言】

一般的にX線回折と中性子回折を比較すると中性子回折から得られる分解能等のデータは悪くなる。その原因として中性子ビームの方が強度は弱く、角度分散が大きいためである。そのため中性子回折実験ではビームを結晶全体にあてる必要があり、使用する結晶の大きさも1mm³程度の大きさが必要となる。ビームを結晶全体にあてることにより得られるデータは結晶全体の品質に影響を受ける。実際、一般的にはビームの強度等の影響で中性子回折から得られるデータは分解能等が悪くなるのであるが、結晶の局所的な品質がどの程度影響を与えるのかに注目した。中性子回折ではX線回折と違い結晶全体の品質に影響を受けるので、X線解析を用いて1mm³大型結晶の場所依存による品質の差を主に、分解能、相対的な温度因子[1]などを比較することを目的とした。

【実験】

プレート上で1mm²程度の大きさであるLysozymeとGlucose Isomeraseの結晶を使用した。結晶はそれぞれ結晶化剤に塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、緩衝剤には50mM酢酸ナトリウム(pH4.5)、100mM HEPES(pH7.7)を用いた。結晶化方法はハンギングドロップ法、シッティングドロップ法、温度は293K、279Kでそれぞれ行った。石英キャピラリーに封入した1つの結晶に対して、室温条件で6~9ヶ所X線をあて1ヶ所15Frameで測定し、全ての箇所をR-margеを40%で切り分解能と温度因子を比較した。X線回折実験はKEK-PF NW12A、0.20mm×0.05mmのビーム断面積条件を用いた。BL5Aでは2月に0.05mm四方の条件で行う予定である。

【結果】

Lysozyme、Glucose Isomerase両結晶とも15Frameと少ないデータから解析を行うことが出来た。Lysozymeの方は結晶の端に分解能と温度因子の差がみられた。Glucose Isomeraseの方は大きな差はみられなかった。このことから結晶内で場所依存による品質のさがあることがみられた。また結晶の種類による場所依存の品質の差も考察することが出来た。

【参考文献】

[1] Shigeki Arai et al. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 60 (2004) 1032-1039

TasiRNA 生成経路で働く SDE5 の構造解析 Cloning, expression, and functional analysis of the SDE5 from *Arabidopsis thaliana*

藤井 裕史¹、吉川 学²、西野 達哉¹

1 東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻 西野研究室

2 農業生物資源研究所 植物化学研究領域 主任研究員

RNAサイレンシングは、小分子RNAによる配列特異的なRNA分解機構で、外来因子に対する防御や遺伝子発現制御において大きな役割を担っている。植物には二次的な小分子RNAを産生し、サイレンシングシグナルを増幅する経路が存在する。Trans-acting small interfering RNA(tasiRNA)は、サイレンシング増幅機構の一つであり、mRNAの開裂による負の制御によって植物の器官形成や成長時期の決定など幅広い生命現象に関与している。tasiRNA生成過程に関与する因子としてSGS3、RDR6、SDE5、DCL4が知られている。中でもSDE5は立体構造や作用機序が未知である。そこで本研究では、SDE5の構造生物学的、生化学的解析を通じて、tasiRNA生成におけるSDE5の役割を解明することを目的とする。

まず、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来SDE5遺伝子をPCRにて増幅し、大腸菌大量発現用プラスミドベクターに組み込み、ヒスタグ融合組換えタンパク質として大量発現した。組換えSDE5はヒスタグによるアフィニティ精製およびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。しかし、全長SDE5は37°Cで大腸菌を培養できないことやタンパク質の収量、純度が低かったことから構造解析には不相当と判断した。アミノ酸配列解析を参考に、SDE5のC末端に存在する機能/構造未知の保存されたドメインを含むSDE5C(322-490)を作成した。SDE5C(322-490)は大量に調整できることから結晶化スクリーニングを試みた。また、ドメイン構造解析のため、トリプシンによる限定分解を行い、SDS-PAGEによる分子量測定並びにZetasizerを用いた動的光散乱測定を行い、粒子形及び分子量を測定した。動的光散乱測定より、C末端には安定な16kDaのドメインが存在することが分かった。今後はこの領域の特定を行い、結晶化、構造解析を目指す。さらにはSGS3やRDR6、DCL4も含めたtasiRNA生成過程の全貌解明を目指す。

グルコースイソメラーゼ-グルコース複合体の 中性子構造解析

Neutron structure analysis of glucose isomerase - glucose complex

矢本早紀¹, 奥田夏樹², 佐々木昭雄²,
日下勝弘³, 矢野直峰³, 田中伊知朗^{3,4}

1 茨城大院理工, 2 (株)V.I.C., 3 茨城大フロンティアセンター, 4 茨城大工

グルコースイソメラーゼ(GI)は、D-グルコースと D-フルクトースの互変異性を触媒する金属酵素タンパク質である。GTIM バレル構造を持つホモ4量体で、バレルの中心に活性部位がある。この触媒反応は開環、異性化、閉環からなる多段階反応である。この反応のうち、異性化反応においてグルコースの C2 から C1 への水素移動が伴うと考えられている。反応機構解明に関する多くの報告がなされているが、詳細は不明である。そこで本研究では、重水緩衝液中で GI、D-グルコース、Mg の3成分複合体結晶を作製し、X 線・中性子結晶構造解析により、反応機構を解明することを目的とした。

GI タンパク質は Hampton Research の HR7-102(*Streptomyces rubiginosus* 由来)を購入した。結晶化は5~45%(w/v)の硫酸アンモニウムを用いて行った(pD7.7)。金属 Mg とリガンドとなる D-グルコースはソーキングによって結晶へ導入し、3成分複合体結晶を準備した。なお、結晶化からソーキングはすべて重水中で行った。室温中性子回折データは J-PARC MLF BL03 iBIX で収集した。その後、同一結晶を用いて PF-BL5A にて室温 X 線回折データを収集した。中性子および X 線回折データは STARGazer および HKL2000 でそれぞれデータ処理した。

中性子、X 線、それぞれ 2.00 Å、1.39 Å の分解能でデータセットを得た。この2つのデータを用いて X 線・中性子同時精密化を行った。精密化は Phenix、モデル構築は Coot を用いた。構造解析の結果、活性部位には2つのマグネシウムと糖が結合していることがわかったほか、糖は環状および直鎖両方の形態をとっていることが、X 線も含め構造学的には初めて観察された。また、中性子散乱長密度から、活性部位の2つの重要なヒスチジンは、それぞれの局所環境条件に従って異なるプロトネーション状態をとることがわかった。構造の詳細な議論はポスター発表で行う。

GTP センサーPI5P4K の進化的解析へ向けた培養条件の検討

Investigation of culture conditions for evolutionary analysis of GTP sensor, PI5P4K

降旗 大岳^{1,2}、原田 彩佳²、中川 草³、竹内 恒⁴、

佐々木 敦朗⁵、千田俊哉^{1,2}

1. 総研大 物構専攻、2. KEK-PF, SBRC、3. 東海大 医学部、
4. 産総研、5. シンシナティ大

生体のエネルギー通貨である ATP (Adenosine triphosphate)は、状況に応じて、分子内の3つのリン酸基を1つずつ放出してエネルギーを供給する。ATP とは分子内の塩基が異なる GTP(Guanosine triphosphate)はタンパク質合成に用いられるエネルギー分子で、細胞増殖に必須の分子である。我々は、脂質キナーゼ PI5P4K β が細胞内 GTP 濃度に応じて反応する GTP センサーであることを見出した(1)。PI5P4K はキナーゼでありながら GTP を優先的に用いる特異な性質を有し、細胞内 GTP 濃度に応じて、脂質2次メッセンジャーPI(5)P の量を変化させた。また、PI5P4K β の GTP センサー活性はがん細胞の増殖にも関与していることが明らかになった。我々は、GTP センサーの進化に興味をもち、その由来を解析してきた。興味深いことに、PI5P4K は菌類には存在せず動物の祖先種と菌類が分岐した後に新たに獲得されていることがわかった。

そこで我々は、現存する進化的に古い生物由来の PI5P4K の GTP 感知能を生化学的、構造生物学的に解析することを目的とし、進化上ポイントとなる古生物として後生動物の中から、センモウヒラムシ(平板動物)、ナメクジウオ、ホヤの3種を選択した。

結晶構造解析に必要な大量の PI5P4K を精製するために T7 プロモーターを用いて大腸菌 BL21(DE3)による *PI5P4K* の発現を試みた。本発表では、培養条件の検討(培養温度:20°C、30°C、37°C、IPTG 濃度:0.1, 0.6 mM、培養時:5時間、1晩の12条件)で実施したのでその結果を中心に報告する。

Reference

Sumita, K. (2016), The lipid kinase PI5P4K β is an intracellular GTP sensor for metabolism and tumorigenesis, *Mol Cell*, 61(2): 187-198.

ヒトカゼインキナーゼ II の触媒活性に係わる 新たな水素結合ネットワークの発見

Discovery of new hydrogen bonding network responsible for catalytic activity of human casein kinase II

柴崎千枝¹、清水瑠美¹、新井栄揮¹、安達基泰¹、黒木良太²

¹ QST (量研機構)、² JAEA (原子力機構)

カゼインキナーゼ II (CK2)は、細胞に広く存在するセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞周期の進行や細胞の生存・増殖に関与することが知られている。また CK2 の過剰な発現と、発癌や癌転移との関係が指摘されていることから、CK2 は創薬標的タンパク質の一つとなっている。我々は、CK2 の触媒反応に係わる水素結合ネットワークの解明、そして阻害剤開発に有効な水素・水和構造に関する立体構造的知見を得ることを目的として、野生型 CK2 の大型結晶作製および中性子線回折実験、CK2 変異体の X 線回折実験および活性測定を実施した。

試料調製は、野生型 CK2 (触媒サブユニットのみ)を大腸菌発現系を用いて生産し、カラムクロマトグラフィーによって精製した。中性子回折実験用の大型結晶作製においては、約 40 mg/mL に濃縮したタンパク質試料に種結晶を加えるマクロシーディング法によって、約 2 mm³の大型結晶を得ることができた。取得した結晶を、重水溶媒に対して透析処理した後、中性子回折実験(FRMII BioDiff、100 K)を行い、1.90 Å の分解能でフルデータを取得することに成功した。また、同じ結晶を用いて X 線回折実験(BL-5A、分解能 1.10 Å)を実施し、X 線・中性子線同時精密化を行った。その結果、タンパク質内部(触媒残基)からタンパク質外部(溶媒側)へ通じる新たな水素結合ネットワークが存在することが明らかになった。その中で水素結合リレーの一部を形成している His148 は、セリン/スレオニンキナーゼ間で高く保存されている。His148 を Ala、Ser、Asn に置換した変異体を作製し、結晶化および X 線回折実験(NW-12A)を実施し、それぞれ、1.20 Å、1.50 Å、1.65 Å 分解能でデータを得た。さらに、CK2 のキナーゼ活性を測定したところ、変異体は野生型に比べ約 50%活性が低下した。以上の結果は、明らかにした水素結合ネットワークが、CK2 の酵素反応に重要な役割を担うことを示している。今回の発見は、新たな阻害機構をもつ抗がん剤の開発に貢献するものと期待できる。

Slx1-Slx4 複合体と Mus81-Eme1 複合体の構造機能解析 Structural and Mechanistic Analysis of Slx1-Slx4 and Mus81-Eme1

白濱辰也、西野達哉

東京理科大学基礎工学部生物工学科 西野研究室

細胞は、DNA ポリメラーゼによる複製エラーや放射線などの環境要因によって DNA 損傷にさらされている。このような損傷 DNA は様々な DNA 修復機構によって修復され、ゲノムの統合性が維持されている。DNA 修復機構の一つである相同組み換え修復では、修復過程の DNA はホリデイジャンクションやフォーク構造、フラップ構造などの中間体を形成する。Slx1-Slx4 複合体と Mus81-Eme1 複合体は、このような中間体の切断に必要なタンパク質である。さらに Slx4 は他の DNA 修復タンパク質の足場として機能することも知られている。特に G2/M 期においては Slx1、Mus81、Eme1 と安定複合体を形成する事が知られている。Slx1-Slx4 と Mus81-Eme1 は、エンドヌクレアーゼ活性を持っており、相互作用によって活性化される。Slx1-Slx4 複合体と Mus81-Eme1 複合体の構造と機能は一部報告されているものの、それぞれがどのように相互作用し、機能するかは未解明な部分も多い。我々はこの機構解明を目指して好熱性真菌由来 Slx1-Slx4 と Mus81-Eme1 複合体の生化学解析、立体構造解析を行っている。

まず cDNA ライブラリーから Mus81、Eme1、Slx1、Slx4 の全長配列のクローニングを行った。これまでに Mus81、Eme1 の全長配列のクローニングに成功し、各単量体でのタンパク発現を試みている。今後は、単独の発現条件検討を行うとともに、Mus81/Eme1 共発現コンストラクトを作製して、Mus81-Eme1 の生化学、構造解析を目指す。Slx1 と Slx4 は、現在クローニング中である。こちらにも Mus81/Eme1 複合体と同様に、単独での発現を試すとともに、共発現コンストラクトを作製し、生化学的解析、立体構造解析を行う。最終的には、Slx1-Slx4 と Mus81-Eme1 の複合体がどのように相互作用し、基質 DNA の認識や切断を制御しているのかを原子レベルで解明する予定である。

新規リン酸化酵素におけるピロリン酸特異的な 供与体認識機構

Mechanism of the pyrophosphate-specific recognition in a novel kinase

永田隆平¹、藤橋雅宏¹、佐藤喬章²、跡見晴幸²、三木邦夫¹

1 京大院理、2 京大院工

リン酸化酵素は、リン酸基供与体から受容体へのリン酸基の受け渡しを触媒する酵素である。ほとんどのリン酸化酵素は、リン酸基供与体として ATP を用いるが、まれにピロリン酸 (PPi) を供与体とする酵素も存在する。既に同定されている PPi 依存性リン酸化酵素は 3 種類のみで、さらに PPi の認識機構も未解明である。本研究では、最近我々が同定した新規の PPi 依存性リン酸化酵素 (PPi-InsK) の結晶構造から、その PPi 認識機構を明らかにした。また、判明した PPi 特異的な認識に重要な残基を目印にして、新たな PPi 依存性酵素の探索を行った。

PPi-InsK は、ATP 依存性のイノシトールリン酸化酵素 (ATP-InsK)¹ とよく似た立体構造をもつ酵素として見つかった。本酵素は、ATP-InsK がイノシトールを認識する 5 残基を有していたが、ATP 結合部位の一部は嵩高い残基によって塞がれていた。そこで、いくつかの供与体を用いて PPi-InsK の活性を調べ、本酵素が ATP や ADP でなく PPi を用いてイノシトールをリン酸化することを見出した。

次に、PPi-InsK と PPi 類似体とイノシトールとの三者複合体の結晶構造を分解能 1.70 Å で決定し、PPi 類似体の代わりに硫酸イオンが結合した構造を分解能 1.47 Å で決定した。2 つの構造から本酵素の PPi 結合様式が明らかになった。PPi 認識に関わる残基のうち塩基性 3 残基は、ATP-InsK では異なるアミノ酸になっていた。さらに、PPi-InsK や ATP-InsK が属するリボキナーゼファミリーにおける ATP や ADP 依存性の酵素でも保存されておらず、この 3 残基は PPi-InsK に特徴的な残基であることが判明した。

PPi-InsK において ATP 結合部位を埋めていた残基と PPi 認識に特徴的な残基を目印にして、新たな PPi 依存性酵素を BLAST サーチによって探した。その結果、目印の残基を有する酵素が 50 個見つかった。このうちいくつかの酵素についてリン酸化活性を測定し、ATP や ADP ではなく PPi を特異的に供与体として利用することを確認した。

[1] R. Nagata, *et al. Biochemistry* **54**, 3494–503 (2015)

Photon Factory BL-17A における MR-Native SAD データ 収集条件とパイプラインの検討

○小祝 孝太郎¹・山田 悠介¹・湯本 史明¹・千田 俊哉¹
(¹ 高エネ機構物構研 PF)

近年、変異体の結晶構造解析や網羅的な低分子化合物との複合体構造解析が構造生物学研究に浸透しつつあり、結晶構造をより迅速に決定することが求められるようになってきている。そのために多くの放射光施設では、高度に自動化された測定・解析システムを構築し、ハイスループットで結晶構造を決定する技術開発が進められている。

こうした X 線結晶構造解析のハイスループット化に対して、MR-Native SAD 法による位相決定が有効な手段と考えられる。Native SAD 法は、標的タンパク質結晶中の硫黄原子に由来する異常分散シグナルを利用しているため、重原子誘導体を作成する必要がなく、新規のタンパク質構造の決定が可能である。MR-Native SAD 法は、分子置換法と Native SAD 法を組み合わせることで位相を決定する手法であり、分子置換法を用いても鑄型によるモデルバイアスがない電子密度を計算し、モデルを自動構築することが可能であるため、効率の良い自動結晶構造決定に有効である。しかしながら、硫黄原子に由来する異常分散のシグナル強度は、重金属原子等に由来する異常分散シグナル強度より非常に弱く、精度よくデータを収集することが求められる。

高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の BL-1A では、約 3 Å までの長波長のビームとヘリウムチャンバーを用いることで、高度に Native SAD データを収集する環境が整えられている。一方で、BL-17A においては、約 2 Å まで長波長ビームと大型の検出器を用いることで Native SAD データ収集は可能であるが、MR-Native SAD に適したデータの収集条件等は検討されていなかった。

今回我々は BL-17A における MR-Native SAD データの収集法の検討を行った。露光時間、振動角、冗長度を検討項目とし、それぞれの条件によって得られた回折データを XDS によって処理し、異常分散シグナルを SigAno で、放射線損傷によるデータの精度の低下を ISa で判断した。また、MR-Native SAD 法によって構造解析を行い、figure of merit, Rwork/Rfree, 自動構築されたアミノ酸残基数によって評価を行った。

また、本発表では、得られたデータをもとに既報の MR-Native SAD 法のパイプラインを比較検討し、有用な解析方法について議論を行う。

良質なタンパク質結晶と回折データを得るための工夫

A comprehensive strategy to obtain high quality crystals & diffraction data

千田美紀、千田俊哉

高エネ機構・物構研・構造生物学研究センター

最近では Uni-puck などのカセットを用いて予め結晶を凍結し、ロボットで結晶をマウントして回折データ収集を行うケースが多くなってきた。10 年ほど前までは結晶化プレートをビームラインに持ち込んで手動で結晶をマウントしデータ収集を行いながらソーキング条件を最適化することも多かったが、ロボットを用いた測定が主流となった現在では各々の結晶の持つ回折能を最大限に引き出し、効率的に良いデータを収集するために昔とは異なる工夫が必要になってきた。凍結した結晶は元には戻せず条件をその場で変えられないため、クライオプロテクタントや化合物などへのソーキング条件のスクリーニングを行う場合にはソーキング条件にバリエーションを持たせて結晶を用意すべきである。グリセロールなどの最も一般的なクライオプロテクタントを用いて目標とする分解能までの回折が得られない場合には 10-20 種類程度のクライオプロテクタントから各々のタンパク質結晶に最適なものを探索し、時には良いものを組み合わせて用いることが有効である。また、良いデータを収集するには結晶を凍結する段階での結晶のハンドリング（ループの選択、すくい方、ループに触れないように中央にのせる等）に細心の注意を払う必要がある。本発表では、結晶をハンドリングする際に注意している点とあわせてクライオプロテクタントへのソーキング条件を最適化することで結晶の質を大きく改善し結晶構造解析に成功したいくつかの実例についても紹介したい。

References

1. M. Senda & T. Senda (2016) Screening of cryoprotectants and the multistep soaking method. *Advanced methods in Structural Biology*. Springer, pp.139–152.
2. M. Senda *et al.*, Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality for protein crystals. (2016) *Crystal growth & Design* 16, 1565–1571.
3. K. Sumita *et al.* The Lipid Kinase PI5P4K β is an Intracellular GTP Sensor for Metabolism and Tumorigenesis. (2016) *Molecular Cell* 61, 1–12.
4. Hayashi, T. *et al.* (2012). Tertiary structure and functional analysis of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cell Host and Microbe*. 12, 20-33.

好熱性 DNA ポリメラーゼ β サブユニットの構造解析

Structural analysis of thermophilic DNA polymerase β subunit

中林開人、西野達哉

東京理科大学基礎工学部生物工学科 西野研究室

DNA ポリメラーゼ β サブユニットはすべての生物で保存されているリング状のタンパク質で DNA ポリメラーゼの伸長反応を促進するとともに、DNA リガーゼ、DNA ヌクレアーゼ、DNA 修復酵素など様々な DNA 結合タンパク質の足場として機能する。DNA クランプと相互作用するタンパク質には PIP(PCNA interaction peptide)モチーフが存在し、特異的に結合する。我々は DNA 複製修復機構解明や DNA 複製装置を利用した新規蛋白質デザインを目指して、好熱性細菌由来の DNA ポリメラーゼ β サブユニットの構造解析を行っている。

好熱性細菌の DNA ポリメラーゼ β サブユニット遺伝子をクローニングし、大腸菌にて組換え蛋白質を大量発現した。精製した DNA ポリメラーゼ β サブユニット蛋白質を結晶化し、結晶を得ることに成功した。BL-1Aにて結晶に X 線を照射したところ、良好な回折データを取得できた。分子置換法により位相を決定し、リング状の DNA ポリメラーゼ β サブユニットの電子密度が確認できた。現在は精度の高いデータを取得するため、結晶化条件およびクライオ条件の最適化を行っている。

使用ステーション/ビームライン(12ポイント・右寄せ)

好熱性真菌由来 GST を用いた クローニング/発現精製ベクターの作成 Construction of thermophilic fungal GST expression vector

上野未恵、西野達哉

東京理科大学基礎工学部生物工学科 西野研究室

組換えタンパク質の発現や精製には、融合タンパク質タグがよく利用されている。日本住血吸虫由来 (Schistosoma japonicum) の Glutathione-S-Transferase (GST) は一般的に利用されているタグの 1 つである。GST は組換えタンパク質発現量の増大とともに親和性をもつ基質のグルタチオンを用いて分離することが可能である。一方、タンパク質の安定性においては日本住血由来の GST は MBP などのタンパク質と比べて熱安定性が低い。我々は熱安定性の高い好熱性真菌由来の GST を用いて、クローニングベクターの作成を目指している。

まず好熱性真菌 (Chaetomium thermophilus) の GST 遺伝子 (CthGST) を cDNA ライブラリーよりクローニングし、発現用プラスミドを作成した。現在は、CthGST の発現条件を検討している。今後は CthGST のグルタチオン結合および熱耐性について評価予定である。

オロチジナーリン酸脱炭酸酵素の反応中心における 電荷反発の解析

Analysis of charge repulsion at the reaction center of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase

岩原卓哉¹, 藤橋雅宏¹, Emil F. Pai^{2,3}, Lakshmi P. Kotra^{2,4}, 三木邦夫¹
(¹京大院理・²トロント大・³オンタリオ癌研究所・⁴トロント総合研究所)

オロチジナーリン酸脱炭酸酵素 (ODCase) は、オロチジナーリン酸 (OMP、図 1 で R=COOH) の脱炭酸反応を 10^{17} 倍にも加速する酵素であり、世界で最も効率的な酵素の一つとして知られている。これまでの研究で、この 10^{17} 倍という非常に高い反応加速倍率は、ODCase が他の酵素でもよく見られる遷移状態安定化に加え基質の歪みを利用することで実現できていることが示されている[†]。そこで今回、基質の歪みに影響を及ぼすような負電荷反発が、酵素活性中心 (Asp70) と基質 OMP の C6 位に位置するカルボキシ基との間に存在するかどうかを確かめるために、基質アナログ BMP (図 1 で R=OH) と ODCase の複合体について超高分解能の結晶構造解析を試みた。OMP の C6 位に結合するカルボキシ基 (図 1 の R=COOH) は、BMP の C6 位に結合するヒドロキシ基 (図 1 の R=OH) と比べて pKa が低く、脱プロトン化しやすい。また、この OMP のカルボキシ基と BMP のヒドロキシ基は同等の位置に存在し、Asp70 と相互作用することが知られている。よって、図 2 に示す複合体構造中で Asp70 と BMP の両方が脱プロトン化していることを確認できれば、Asp70 と OMP 間にも同様の負電荷反発が存在することが明らかになる。これまでに 0.99 Å 分解能のデータを取得している。このデータを精密化して得られた ODCase-BMP 複合体構造、特に反応中心周辺に重点を置いて報告する。

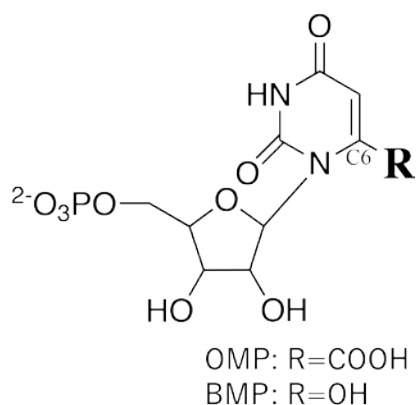


図 1. 基質の化学構造

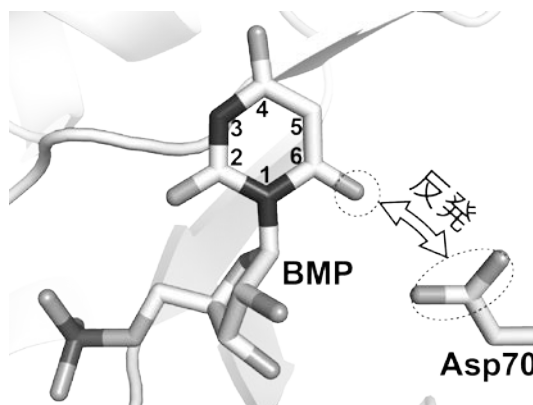


図 2. 複合体の活性中心部位

[†]Fujihashi, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* (2013) 135, 17432–43

Native SAD データ収集における試料結晶加工システムの導入

Native SAD data collection with laser fabricated sample crystals

松垣直宏¹、山田悠介¹、原田彩佳¹、平木雅彦²、千田美紀¹、千田俊哉¹

¹KEK-PF 構造生物学研究センター、²KEK 機械工学センター

Native SAD (Single Anomalous Dispersion) 法は、試料中のタンパク質に自然に含まれている軽原子の異常分散シグナルを利用して位相決定を行う結晶構造解析の手法である。試料への重原子導入を省けることによる解析の高速化、重原子導入自体が困難なタンパク質の構造解析等が期待される。しかし、イオウやリンなど軽原子からの微弱な異常散乱シグナルを精度よく測定するための低エネルギー X 線回折実験には多くの困難がある。

KEK-PF BL-1A ビームラインでは、高輝度の低エネルギー X 線 (3.7 - 4.6 keV) を利用した回折実験を目的として設計された。試料から検出器までのビーム経路の空気を完全にヘリウムに置換することで、測定上の問題の一つであるバックグラウンドノイズの低減を実現した。一方で、試料自体の X 線吸収に起因する回折データの系統誤差は、正確に補正することが困難で依然として Native SAD 法の成功を妨げている。我々はレーザー加工システム (理研・播磨研究所) により試料結晶を球状に加工することで、この問題を解決できる可能性を見出した。加工システムは今年度中に理研・播磨研究所から KEK-PF に移設され、より積極的な利用が可能となる。本発表では、レーザーシステムのユーザー解放等、今後の予定について述べる。その他、サンプルチェンジャーデュワーの高度化、極低温 (20K 近傍) 下での回折実験環境の実現等、ビームラインのアップデート予定についても合わせて報告する。

タンパク質 X 線結晶構造解析ビームラインにおける全自動測定を用いた新しい利用制度

New beamline application scheme with fully automated data collection on macromolecular crystallography beamlines

山田悠介^{1,2}、篠田晃^{1,4}、平木雅彦^{2,3}、引田理英^{1,2}、
松垣直宏^{1,2}、千田俊哉^{1,2}

¹高エネ機構 物構研 フォトンファクトリー

²総研大 高エネルギー加速器研究科

³高エネ機構 共通 機械工学センター

⁴ポールシェラー研究所

タンパク質 X 線結晶構造解析ビームラインでは回折データ測定の全自動化を進めている。これまで、試料の素性が実験前から良く分かっている創薬研究をターゲットとした全自動測定システムを開発し、主に多量のサンプルからの回折データ収集を必要とする製薬企業を中心に利用されてきた。しかしながら、一般的なデータ測定には不十分な部分が多く、ビームラインでの回折データ測定の全自動化を目指すには多くの改良が必要である。とくに結晶試料を X 線照射位置に位置合わせを行うセンタリングの過程において既存の全自動システムではループ形状のみを認識するループセンタリングと、200 μm 角程度の比較的大きなサイズのビームとを組み合わせることで実現させてきたが、本来は結晶そのものを認識しセンタリングする必要がある。特に結晶に比べて小さなサイズのビームを利用する場合には、このような結晶のセンタリングが必須である。そこで筆者らはループの 3 次元形状認識と X 線センタリングを導入した新たな全自動測定システム (SIROCC) を開発した。

SIROCC ではループの 3 次元形状認識をすることで、市販されている多種多様な形状をしたループのほとんどでループを認識することが可能である。そして、その認識されたループ領域全体を X 線でスキャンして、回折点を多く生じる部分を特定することで結晶位置を特定することが可能である。

SIROCC は現在も開発が続けられている一方で 2016 年秋より一部ユーザーの協力を得てコミショニングを開始し、2018 年春を目標に一般ユーザーの実験にも適応する。また、この SIROCC を用いた新しいビームライン利用制度を開始する。

ブルー銅タンパク質シュウドアズリン Met16Tyr 変異体 の X 線結晶構造解析

X-ray Crystallographic Analysis of Met16Tyr Variant of a Blue Copper Protein, Pseudoazurin.

齋藤喜之、山口峻英、高妻孝光
茨城大学大学院 量子線科学専攻

Achromobacter cycloclastes 由来のシュウドアズリンは脱窒過程において、亜硝酸還元酵素と亜酸化窒素還元酵素への電子供与体として機能している。活性中心は、銅(II)イオンに His40、His81、Cys78、Met86 が配位した歪んだ四面体構造をとっている。これまでに、活性中心近傍に存在し、配位に関与していない Met16 が His81 との弱い相互作用を通して、シュウドアズリンの構造と電子状態を調節していることを報告してきた[1,2]。本研究では、His81 とフェノール環との相互作用の詳細を知るために Met16 をチロシンに置換した Met16Tyr 変異体の X 線結晶構造解析を行った。

pH 8.5 で作成した Met16Tyr 変異体の結晶の空間群は $P2_1$ 、分解能 1.46 Å であった。非対称単位中に 2 分子が存在していた。両者の全体構造は野生型と大きな変化はなく、Chain A の活性中心の Cu(II)と配位原子間の結合距離は Cu-N(His40) = 2.09 Å、Cu-S(Cys78) = 2.21 Å、Cu-N(His81) = 2.13 Å、Cu-S(Met86) = 2.55 Å であり、Chain B では、Cu-N(His40) = 2.01 Å、Cu-S(Cys78) = 2.21 Å、Cu-N(His81) = 2.09 Å、Cu-S(Met86) = 2.84 Å であった。このことから、Chain A は Rhombic 型、Chain B は Axial 型に近い構造をとっていることが明らかになった。また、変異を導入した Tyr16 残基のフェノール環と His81 残基のイミダゾール環の 2 面角は、Chain A では -10.75° 、Chain B では 3.92° であり、ほぼ平行な位置関係になっていることが明らかとなった。また、His81 のイミダゾール環と Tyr16 のフェノール環との距離は、Chain A では 3.43 Å、Chain B では 3.65 Å であり、いずれも π - π 相互作用が可能な距離と角度に位置していることが判明した(図 1)。

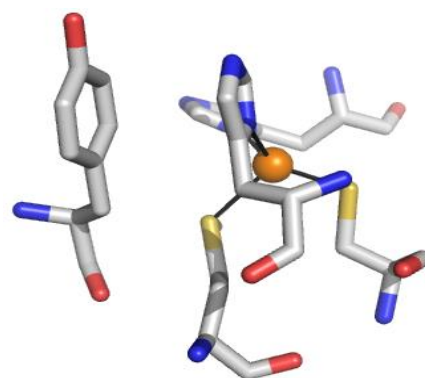


図 1. Met16Tyr 変異体の活性中心とその近傍の構造

- 1) T. Kohzuma, *et al. J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**, 104, 250–260.
- 2) T. Kohzuma, *et al. RSC Adv.*, **2016**, 6, 88358–88365.

ブルー銅タンパク質シュウドアズリンの Met16Ali 変異体の X 線結晶構造解析

X-ray crystal structure analysis of Met16Ali variant of Pseudoazurin of Blue copper protein

酒井千尋¹、平岡万里菜²、山口峻英¹、高妻孝光¹

1-茨城大院量子線科学専攻、2-茨城大理学部

シュウドアズリンは、脱窒菌において亜硝酸還元酵素と亜酸化窒素還元酵素への電子伝達体として機能している。活性中心に存在する Cu(II)イオンには Cys78、Met86、His40、His81 が配位し、歪んだ四面体型構造をとっており、近年、Axial/Rhombic の二重構造性を有することが明らかとなった。His81 残基近傍には、配位に関与しない Met16 残基が存在し、弱い相互作用を通して活性中心の電子状態を制御している。Met16 を他のアミノ酸に置換することにより Axial/Rhombic 成分の割合が変化する[1]。Met16 を脂肪族アミノ酸である Ile、Val に置換すると、Axial/Rhombic 成分は、ほぼ 100% Rhombic 型へと転移する[2]。

本研究では、活性中心近傍の Met16 残基を脂肪族アミノ酸である Ile、Leu、Val に置換した Met16Ali 変異体を作成し、主として構造上の変化に関する研究を行った。

Met16Leu PAz の電気化学的挙動をサイクリックボルタンメトリー法によって調べたところ、準可逆的な挙動を示した。pH 7.0 での Met16Leu PAz の酸化還元電位は、296 mV vs.NHE であり WT PAz(260 mV vs.NHE)よりも 36 mV 高くなっていることが明らかとなった。Met16Ali 変異体と亜硝酸還元酵素との電子移動反応速度は、WT PAz が $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であるのに対して Met16Val PAz は $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、Met16Ile PAz は $7.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、Met16Leu PAz は $7.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、Met16Ali 変異体と亜硝酸還元酵素との電子移動反応速度は酸化還元電位の高い変異体の方が遅くなること示唆された。Met16Leu 変異体では酸化型 pH 7.5 の結晶で 1.18 Å 分解能の回折データが得られ、Met16Ile 変異体では酸化型 pH 7.5 の結晶で 1.00 Å 分解能の回折データが得られ、Met16Val 変異体では酸化型 pH 8.5 の結晶で 1.32 Å 分解能の回折データが得られ現在精密化を進めている。

【参考文献】

1. Fitzpatrick, M. B. *et al. J. Inorg. Biochem.*(2010),104,250-260.
2. Abdelhamid, R. F. *et al. J. Biol. Inorg. Chem.*,12,165-173 (2007).

ブルー銅タンパク質シュウドアズリン Thr36His 変異体の X 線結晶構造解析 X-ray Crystal Structure Analysis of a Blue Copper Protein, Pseudoazurin, Thr36His Variant

赤倉萌、大下宏美、山口峻英、庄村康人、高妻孝光
茨城大学大学院理工学研究科量子線化学専攻

ブルー銅タンパク質シュウドアズリン (PAz) の活性中心は、Cu(II) イオンに Front-Loop 上に存在する Cys78、His81、Met86、Back-Loop 上に存在する His40 が配位した、歪んだ四面体構造を形成している。Back-Loop に関する研究では、酸化型 PAz において、Thr36 の OH 基と水素結合を形成する His6 の電子伝達経路としての役割が示唆されてきた。この水素結合を切断し、正電荷をもたせた Thr36Lys 変異体では、酸化還元電位が大きく正にシフトすることがこれまでに報告されている。本研究では、Thr36 を His に置換し、His のプロトン化／脱プロトン化が構造と性質に及ぼす影響について、主として X 線結晶構造解析法を用いて検討を行った。

X 線結晶構造解析の結果、中性条件下酸化型及び還元型の結晶の晶系、空間群はともに単斜晶、 $P2_1$ であり、分解能は酸化型では 1.70 Å、還元型では 1.66 Å であった。また、どちらも単位格子中に 2 分子が存在した。36 位周辺構造の検討を行ったところ、酸化型 Chain A では、N(His36)-N(His6)間で水分子を介した相互作用が存在し、Chain B では 3.31 Å の距離で直接相互作用が働いていると考えられ、Wild Type に存在する N(His36)-N(His6)間の水素結合が再現されていると考えられた。また、N(His6)-O(Glu4)の距離は Chain A では 3.22 Å、Chain B では 3.09 Å となり、両分子において Wild Type 還元型のみが存在する His6 と Glu4 の間の水素結合が形成されていると考えられた。還元型 Thr36His においては、両分子ともに His36 と His6 間に大きな余剰電子密度が存在した (図1)。これは、活性中心とは異なる Cu(I)イオンが入り込み、His36 と His6 のイミダゾール N 原子が直線二配位をしているのではないかと考えられる。また、N(His6)-O(Glu4)の距離は Chain A では 2.68 Å、Chain B では 2.70 Å となり、Wild Type 還元型構造に存在する水素結合が存在していると考えられる。

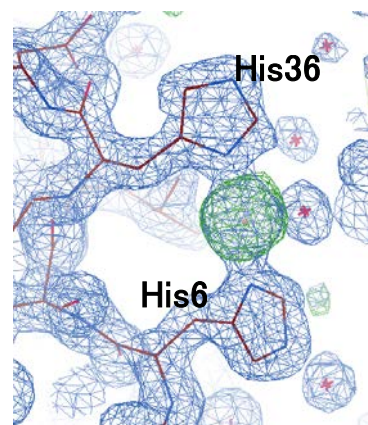


図1 還元型 Thr36His の His36 と His6 間に存在する電子余剰密度

哺乳類細胞発現系による Fukutin-related protein (FKRP)の 大量精製と結晶構造決定

Purification and crystal structure determination of Fukutin-related protein (FKRP)

桑原直之¹、萬谷博²、今江理恵子¹、遠藤玉夫²、千田俊哉¹、加藤龍一¹
1 KEK, IMSS, SBRC、2 都健康長寿医療センター研

α ジストログリカン(α DG)は細胞表面に局在する糖タンパク質であり、ラミニンなどの細胞外マトリックス局在タンパク質との相互作用に直接関与している。この相互作用には *O*-Man 型糖鎖のうち、GalNAc- β 1,3-GlcNAc- β 1,4-Man(-6-phospho)-Thr (core M3 糖鎖)を出発点とした Xly-GlcA の繰り返し構造がラミニンと直接相互作用することが知られており、その糖鎖修飾不全は先天性筋ジストロフィーを引き起こす。近年の研究により、糖転移酵素 Fukutin 及び Fukutin-related protein(FKRP)が Core M3 糖鎖にリン酸化リビトールを付加することが分かった。このことは哺乳類がリン酸リビトールを利用する初めての報告であり、リビトール含有糖鎖の意義を調べる上で注目されている。本研究では Fukutin-related protein (FKRP)に注目し、この新規な糖転移機構の解析および疾患との相関解析を進めている。本発表では、HEK293S GnT-株を用いた FKRP 安定発現株の取得による FKRP 大量精製系の確立を行い、さらに Ba を用いた SAD 法により位相決定を行うことで、結晶構造を明らかにしたことを報告する。

これまで FKRP を大腸菌発現系による発現・精製を試みられてきたが、正しくフォールドした FKRP を精製することができていなかった。そこで、我々は哺乳類細胞発現系を用いることで、FKRP の大量精製を行った。発現ベクターとして、分泌型 FKRP を発現させ、薬剤耐性マーカーをバイシストロニックに発現させることで、FKRP 安定発現株を作成することができた。

この安定発現株から精製した分泌型 FKRP を結晶化し、波長 1.9 Å で測定することで、Ba のアノーマラスシグナルを利用した SAD 法による位相決定を行った。糖転移酵素に限らず、転移酵素は補因子として、二価の金属イオンを必要とする場合がある。そのため、活性中心に Ba²⁺を配位させることが可能であり、実験的位相決定に有用であることを示した。

狂犬病ウイルス P 蛋白質変異体の結晶および機能解析 Crystal structure and functional analyses of Rabies virus P protein mutants

野間井智¹, 蔣欣欣¹, 永野悠馬¹, 杉山葵², 姚閔², Paul Gooley³,
Gregory Moseley⁴, 前仲勝実¹, 尾瀬農之^{1,2}

1 北大院薬, 2 北大院生命, 3 Monash University, 4 University of Melbourne

宿主免疫応答に対して、ウイルスが積極的に対抗し免疫機構を阻害する現象は、多くのウイルスと免疫系シグナル経路の間で見出されている。中でもインターフェロン(IFN)シグナル経路は宿主免疫系における抗ウイルス反応の中心となる経路であり、しばしば Counteraction の標的となる。狂犬病ウイルス(Rabies Virus, RV)は、ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される(-)一本鎖 RNA ウイルスである。すべての食肉目に感染する非常に広い宿主域を持つうえ、致死性が高く、発症後の治療法はない。そのため、すべての大陸に渡って年間 55,000 人の死者を出している。

これまでの研究から、狂犬病ウイルスゲノム上の 5 つの遺伝子のうち、P 遺伝子が致死性に大きく関与することが知られる。その遺伝子産物である P タンパク質(RVP)は、共免疫沈降法、細胞内共局在観察などにより、C 末端ドメイン(CTD)を介してリン酸化 STAT1 と相互作用し、核への局在を阻害することが明らかにされている。

本研究では、RVP による STAT1 阻害機構を明らかにすることを目的とし、幾つかの RVP 変異体を作製して結晶構造解析および相互作用解析をおこなった。表面プラズモン共鳴法による RVP-CTD - STAT1 相互作用の解析を行った。Kd は 35 μ M と計算された。すなわち RVP-CTD は非リン酸化 STAT1 と弱い相互作用を持つが共免疫沈降法ではリン酸化 STAT1 との相互作用のみが検出されていることから、リン酸化 STAT1 とはより強い相互作用を持つと考えられる。また W265G 変異体ではレスポンスが有意に下がるものの、相互作用があることが解った。この結果から、W265G でも他の残基を利用して相互作用できると考えられ、RVP 野生型と W265G の STAT1 核移行阻害能の差異はこのわずかな相互作用の強さの差も影響していると考えられた。

K214A 変異体結晶構造解析をおこなったところ、野生型構造から大きなコンフォメーション変化は認められなかったが、C261 及び W265 側鎖が大きく動いていることが明らかになった。また、K214A 変異体の結晶中のパッキングは野生型では対称分子と接触してしまうため、不可能であることがわかった。また、S217 - G221 のループ構造が変化しており、C261 及び W265 の変化と相まって溶液中での物性の変化(溶解度の低下)をもたらしたと考えている。

ハブ毒筋壊死因子 Lys49-ホスホリパーゼ A₂ の構造解析 Structure analysis of Lys49-phospholipase A₂ in snake venom.

鎌田しずか¹, 松井崇¹, 小川智久¹, 鈴木淳巨², 上田直子³, 田中良和^{1,4}
¹東北大院・生命科学, ²名古屋大・工, ³崇城大学・薬, ⁴JST さきがけ

ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は、沖縄県や鹿児島県の南西諸島に生息するクサリヘビ科の毒ヘビの一種である。Lys49-ホスホリパーゼ A₂ (Lys49-PLA₂) はハブ毒中の筋壊死因子で、ホスホリパーゼ活性には依存せず、細胞膜に作用することで筋壊死を引き起こす。本研究では細胞膜への相互作用機構を解明することを目的に、始めに Lys49-PLA₂ のアイソザイムである BPII について、X 線結晶構造を解析した。

BPII はハブ毒液より単離精製し、0.1 M 酢酸ナトリウム pH 4.5–5.0, 0.5 M 硫酸アンモニウム, 27.5%–37.5%(w/v) PEG4000 条件で結晶化した。BPII の結晶構造は Photon Factory BL-17A にて、分解能 2.57 Å でデータセットを取得し、*Antropoides nummifer* の筋毒素 II をサーチモデルとした分子置換法により決定した。BPII は非対称単位中に 4 分子存在していた (図 1)。また、隣接分子間はカチオンに富んだ領域同士で接しており、分子間に金属イオンや分子間を繋ぐような分子の電子密度は存在せず、単量体として存在していた。

一方、精製した BPII を非還元 SDS-PAGE に供すると二量体を形成するという興味深い特性が見られた。この二量体は、加熱やトリクロロ酢酸処理、6 M Urea (非加熱) や、結晶を 1%(w/v) サンプルバッファーで溶解した変性試料においても、非還元 SDS-PAGE で二量体を形成した。これらの結果から、BPII は SDS に晒されることにより強固な二量体を形成することが示唆された。BPII の生理的機能は細胞表面のリン脂質に結合することで筋壊死を引き起こすことである。リン脂質に似た極性のヘッドと長鎖アルキル基を構成要素として持つ両親媒性分子である SDS により会合する BPII の特徴的な分子特性がどのように筋壊死活性に関与するのかを、今後、構造学的側面から考察していく。

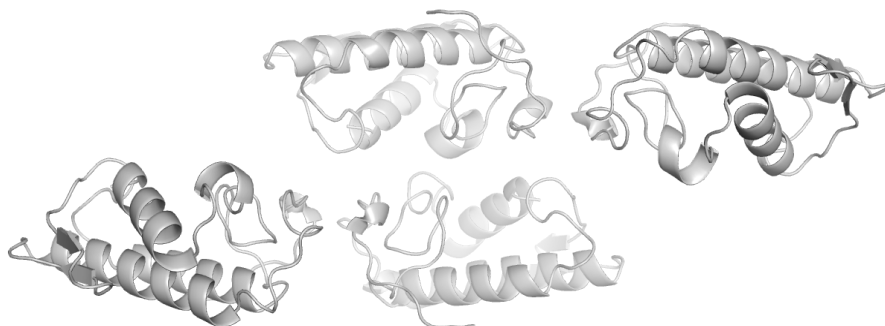


図 1. BPII の非対称単位中の 4 分子の単量体構造。

ピロリ菌 CagA タンパク質-細胞内標的分子複合体の結晶化 Crystallization of *Helicobacter pylori* CagA protein-intracellular target complex

長瀬里沙、千田美紀、千田俊哉
高エネ機構・物構研・構造生物学研究センター

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)は世界人口の約半数が感染していると推定されるグラム陰性螺旋状桿菌で、胃がんを含む種々の胃粘膜病変を引き起こす。特に、ピロリ菌が産生する CagA タンパク質は胃がんの発症に重要な役割を果たすと考えられている。CagA は胃上皮細胞内に侵入後、Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化される。CagA はリン酸化依存的にがんタンパク質として知られる SHP2 チロシンホスファターゼと特異的に結合し、SHP2 を異常に活性化する。一方で、CagA はリン酸化非依存的に細胞極性の主要制御因子である PAR1 キナーゼと特異的に結合して酵素活性を抑制する。その結果、タイトジャンクションが破壊され、上皮細胞極性が失われる。このようにして CagA は細胞内シグナルを攪乱することにより、胃上皮細胞をがん化すると考えられている。そこで、本研究では CagA-SHP2-PAR1 からなるシグナル攪乱複合体の立体構造を解析することで、CagA による発がんメカニズムを解明することを目的とした。立体構造解析に向けたシグナル攪乱複合体の結晶化に先立ち、CagA の SHP2 結合部位および PAR1 結合部位を模したペプチド(CagA ペプチド)と SHP2 の CagA 結合部位であるタンデム SH2 ドメイン(N-SH2 および C-SH2)ならびに PAR1 の CagA 結合部位である触媒ドメインを用いて、シグナル攪乱複合体の試験管内再構成を行なった。CagA ペプチド、タンデム SH2 ドメイン、PAR1 触媒ドメインを混和してゲル濾過クロマトグラフィーを行なった結果、三者複合体の形成が認められた。続いて、この三者複合体を用いて結晶化条件の探索を行なったが、結晶は得られなかった。そこで、CagA ペプチドと N-SH2 ドメインの複合体結晶および PAR1 の触媒ドメインの結晶を用いたヘテロマイクロシーディングにより、シグナル攪乱複合体の結晶生成が誘導されるのではないかと考えた。PAR1 触媒ドメインの結晶はすでに取得していたため、まず、CagA ペプチドと N-SH2 ドメインの共結晶を作製した。次に、得られた結晶を用いて回折データを収集し、SHP2 の SH2 ドメインをサーチモデルとした分子置換法で構造決定した結果、CagA ペプチドと N-SH2 ドメインの複合体結晶であることが確認された。現在は、この CagA ペプチド-N-SH2 複合体結晶および PAR1 触媒ドメイン結晶をシードとして結晶化ドロップに添加して、シグナル攪乱複合体の結晶化条件を探索している。

AhRR-ARNT ヘテロダイマーによる AhR の転写抑制機構の構造基盤

Structural basis of the repression of AhR-mediated transcription by AhRR-ARNT heterodimer

櫻井駿也¹、清水敏之¹、大戸梅治¹

1 東京大学大学院薬学系研究科

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)はダイオキシンなどの生体異物に応答し、解毒や代謝のための遺伝子発現を制御するリガンド依存的な転写因子である。通常細胞質に存在する AhR はリガンド結合に伴い核に移行する。そこで AhR nuclear translocator (ARNT)とヘテロダイマーを形成し、xenobiotic-responsive element (XRE)に結合して CYP1A1 などの異物代謝酵素の転写を活性化する。AhR によって発現が誘導される遺伝子の 1 つに AhR repressor (AhRR)がある。AhRR は ARNT とのヘテロダイマー化や XRE への結合、またヒストン脱アセチル化酵素などのコリプレッサーをリクルートすることで AhR の転写活性を抑制するとされている。

本研究では AhRR による AhR の転写抑制機構を構造生物学的に解明することを目的とし、転写抑制複合体である AhRR-ARNT ヘテロダイマーについて 2.4 Å の分解能で結晶構造を決定した¹⁾。AhRR-ARNT の構造は以前報告された AhR-ARNT の部分領域の構造²⁾とよく似ており、AhRR が AhR と競合的に ARNT や XRE と結合し、AhR を抑制するという最も広く受け入れられている競合モデルを支持した。さらに、同じ転写因子ファミリーのヘテロダイマー構造と比較して AhRR-ARNT ヘテロダイマーには特徴的なドメイン配置があり、これがコリプレッサーのリクルートなど競合モデル以外の転写抑制機構に関与する可能性を示唆した。これらの結果は、AhRRによるAhRの転写抑制機構を理解するための構造基盤となる。

1) Sakurai *et al.*, *J Biol Chem.*, **292**, 17609–17616 (2017)

2) Schulte *et al.*, *Structure*, **25**, 1025–1033 (2017)