

構造生物物理研究室

Structural Biophysics Laboratory

主任研究員 宮 野 雅 司

MIYANO, Masashi

構造生物物理研究室では、生体高分子の持つさまざまな機能を、原子レベルでの立体構造から解明することを目的とした研究を行う。この立場はいわゆる構造生物学 (Structural Biology) と呼ばれるものである。具体的には、生体内でのエネルギー変換・生体制御・情報伝達に関連した酵素群を主な研究対象とする。また、大型放射光施設 SPring-8 において、理研ビームライン I (構造生物学ビームライン BL45PX) の高度化を担当するとともに、バイオクリスタロミクス研究として、構造ゲノミクスに対応したタンパク質構造解析のハイスループット化に向けた結晶化技術の開発、構造ゲノムビームライン (BL26B1&B2) の建設などを行っている。

1. 生体高分子の結晶構造の解明

(1) 脂質代謝関連酵素群の機能構造の研究 (吾郷, 菅原, 浜田 (恵) ^{*1}, 久永 ^{*2}, 宮野; 西尾, 野嶽, 浜田 (賢) (ハイスループットファクトリー))

脂質は生体にとって不可欠な構成要素の 1 つである。アルコールと脂質のエステルである単純脂質はエネルギーの蓄積物質で、ここから必要に応じて切り出される脂質の酸化分解は生体活動に必要なエネルギーを安定に供給する。一方、燐, 硫黄, 含チ素塩基あるいは糖等を含んだ脂質分子は複合脂質と呼ばれ、タンパク質と共に生体膜を構築していると共に、生体内での情報伝達物質である脂質メディエーターの材料でもある。このように脂質代謝は生体にとって必須な化学反応であり、その触媒である酵素群の三次元構造の解明は生体内での脂質代謝の理解に不可欠である。また脂質が生体の維持に深くかかわっているため、脂質代謝系酵素の三次元構造は疾病治療薬や抗菌剤開発に重要な情報をもたらす。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の脂質代謝関連タンパク質について発現精製条件の検討を進めており、このうち 3-オキソアシル還元酵素, エノイル還元酵素, アシル-CoA 脱水素酵素については三次元構造の決定を完了した。また基質複合体の構造決定, 酵素活性測定等を行い多面的な機能構造の解釈を進めている。

2. 生体高分子の結晶中の分子構造と機能の解明

(1) プラストサイジン S デアミナーゼ活性化機構の研究 (山本, 熊坂, 古市 ^{*3}, 山下 ^{*3}; 木村, 山口 (微生物制御研))

イネいもち病防除農薬プラストサイジン S (BS) のシトシン核部分を脱アミノ化して不活性化する酵素プラストサイジン S デアミナーゼ (BSD) について、そのユニークな基質認識機構を明らかにするため、様々な条件下で酵素基質複合体について結晶構造解析を行った。プラストサイジン S 基質複合体の構造では、活性中心は各サブユニット間の境界面で形成されるくぼみの中にあり、BS 分子は隣り合うサブユニットの残基と相互作用しながら、シトシン核でそのくぼみを埋めるように結合する。活性中心を構成する亜鉛イオンは、基質非存在下では亜鉛イオンを中心として 3 つのシステイン残基と 1 つの水分子で正四面体配位構造

をとっている。基質中間体との結合状態では、さらにもう 1 分子の水が亜鉛イオンに配位し三角両錐構造に転換されていた。BSD の活性発現には、この亜鉛イオンの配位構造変化が密接に関係すると考えられる。現在、BSD の活性化に伴う配位構造変化の検証のため、さらなる複合体の解析を進めている。

(2) プロスタグランジン D₂ 合成酵素の構造機能相関の研究 (熊坂, 山本, 神田, 井上 (豪) ^{*3}, 入倉 ^{*3}, 裏出 ^{*3})

プロスタグランジン (PG) D₂ は主要な脳内 PG であり、ラットやサルへの脳内投与により自然な睡眠を誘発する。この合成酵素 (PGDS) には、進化的に異なる 2 つのタイプがある。脳などに存在するリポカリン型と、造血管などに存在するグルタチオン転移型がそれである。いずれも MAD 法で解析した結晶構造に基づいて、変異体の活性測定などを行い、機能との相関を調べている。前者の酵素については、活性残基のシステインの周囲にあるセリンとスレオニン残基が活性に必須であることが明らかになったほか、基質認識に必要な残基の特定ができた。また、種々の基質アナログ分子との複合体構造の解明のために構造解析を進めている。

3. 構造ゲノミクス対応タンパク質構造解析のハイスループット化技術に関する研究

構造ゲノミクスは、ゲノム解析による膨大な遺伝子情報の蓄積を受け、遺伝子産物であるタンパク質の立体構造情報を網羅的に集積することを目指している。タンパク質構造決定の 1 つの柱は X 線結晶構造解析で、構造はタンパク質の生産、結晶化、X 線回折データ収集、構造解析という流れで行われる。さらに構造情報解析によって立体構造情報が整理、集積される。様々な生物種の多様なタンパク質を扱う構造ゲノミクスでは、多数の試料を効率よく処理していくため、各段階での技術開発が必要となる。

(1) 全自動タンパク質結晶化システムの開発研究 (菅原, 宮野; 西尾, 野嶽, 国島, 濱田 (賢) (ハイスループットファクトリー))

構造ゲノミクスにおいて結晶化はボトルネックの 1 つであるが、商用結晶化ロボットや結晶化スクリーンキットなどのタンパク質結晶化技術の進歩を生かして、より多くの

サンプルをより早く結晶化スクリーニングするため、結晶化から観察のデータ管理まで含めたハイスループット全自動結晶化・観察システムの開発を進めている。本年度は、商用結晶化ロボットを使って、ストラクチュロームから提供された発現プラスミドを用いて生産した多数の高度好熱菌由来タンパク質の結晶化を行い、結晶化プロトコルの標準化、結晶化ドロップ評価基準を設定し、その有効性を確かめた。この結果を用いて、商用結晶化ロボットをモデルとして、さらに分注精度と分注速度を向上させた独自の結晶化分注ロボット、結晶化ウェル自動観察装置、2,500 枚の結晶化用プレートと 125 枚の結晶化試薬プレート保管棚を備えたプレートストックユニット、各々の装置間を連携するプレート搬送系ロボットからなる全自動結晶化ロボットを外部企業と開発し、その運用を始めつつある。

(2) 構造ゲノムビームラインの研究開発 (山本, 熊坂, 神田^{*4}, 井田^{*2}; 上野^{*5}, 石川 (X 線干渉光学研))

SPring-8 構造ゲノムビームライン BL26B1&B2 では、構造ゲノミクスのために効率のよい回折強度測定技術の研究開発を進めている。構造ゲノムビームラインでは、膨大な凍結結晶サンプルを効率よく取り扱うためサンプルチェンジャーを中心とした大量サンプル管理システムの開発を進めている。大量サンプル管理システムでは、サンプルは保存用ラックに複数個収納された状態で保存・運搬され、さらに自動マウントすることで大量サンプルの管理・測定を可能にする。また、あらかじめ測定された評価用回折イメージの検討結果に従って複数の結晶についてのルーチン化された自動データ収集を可能とする。回折計には、回折強度データ収集の効率を最大化するために、高速検出器および結晶の測定方位を最適化することが可能な κ ゴニオメータの設置を進めている。平成 13 年度中に大量サンプル管理システムや自動回折計の開発・製作を終了して、平成 14 年度からの試験運転開始をめざしている。

^{*1} 基礎科学特別研究員, ^{*2} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*3} 共同研究員, ^{*4} 技術研究生, ^{*5} 協力研究員

Research Subjects and Members of Structural Biophysics Laboratory

1. Crystallographic Analysis of Biological Macromolecules
2. Structure and Function Analysis of Biological Macromolecules
3. Development of High Throughput Protein Crystallographic Analysis Technology for Structural Genomics

Head

Dr. Masashi MIYANO

Members

Dr. Masaki YAMAMOTO
Dr. Takashi KUMASAKA
Dr. Hideo AGO
Dr. Mitsuaki SUGAHARA
Dr. Keisuke HAMADA^{*}

Dr. Tetsuya HORI^{*}

^{*} Special Postdoctoral Researcher

Visiting Members

Dr. Makio FURUICHI (Natl. Inst. Agrobiol. Sci.)
Dr. Shinya FUSHINOBU (Grad. Sch. Agr., Univ. Tokyo)
Dr. Hiroshi HASHIMOTO (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Koh IDA (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
Ms. Yuko HISANAGA (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)
Dr. Katsuaki INOUE (JASRI)
Dr. Tsuyoshi INOUE (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
Mr. Daisuke IRIKURA (Osaka Biosci. Inst.)
Dr. Satoshi ISHII (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)
Prof. So IWATA (Imperial College, UK)
Mr. Eiji KANAMORI (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.)
Mr. Hiroyuki KANDA (Grad. Sch. Sci. Eng., Shimane Univ.)
Dr. Naoki MOCHIZUKI (Natl. Cardiovascular Cen.)
Dr. Hideaki MORIYAMA (JASRI)
Prof. Toshihisa OHSHIMA (Grad. Sch. Eng., Univ. Tokushima)
Dr. Haruhiko SAKURABA (Grad. Sch. Eng., Univ. Tokushima)
Prof. Mamoru SATO (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
Prof. Takao SHIMIZU (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)
Dr. Toshiyuki SHIMIZU (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Hideyuki TAKA (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.)
Dr. Hideaki TSUGE (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)
Dr. Yoshihiro URADE (Osaka Biosci. Inst.)
Dr. Shigeo WAKABAYASHI (Natl. Cardiovascular Cen.)
Dr. Eiki YAMASHITA (Inst. Protein Res., Osaka Univ.)

Trainees

Mr. Kyouhei ARITA (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Hiromi IMAMURA (Grad. Sch. Agr., Univ. Tokyo)
Mr. Tsuyoshi IMASAKI (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Souhei ITO (Grad. Sch. Agr., Univ. Tokyo)
Mr. Matsuri KATO (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Masamichi NAGAE (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Shigefumi OMATSU (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)

hama City Univ.)
 Mr. Noriyasu OSHIMA (Grad. Sch. Agr., Univ. Tokyo)
 Mr. Ikuya SHIROMIZU (Mochida Pharm. Co., Ltd.)
 Ms. Noriyo YAMADA (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)
 Mr. Chouji YONEYAMA (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
 Mr. Kazunari YONEDA (Fac. Domestic Sci., Tokushima Bunri Univ.)
 Mr. Wadud Bhuiya MOHANMAD (Grad. Sch. Eng., Univ. Tokushima)
 Ms. Ayaka WATANABE (Grad. Sch. Integr. Sci., Yokohama City Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

- Nakagawa N., Sugahara M., Masui R., Kato R., Fukuyama K., and Kuramitsu S.: “Crystal structure of *Thermus thermophilus* HB8 UvrB protein, a key enzyme of nucleotide excision repair”, *J. Biochem.* **126**, 986–990 (1999). *
- Tahir T., Inoue-Bungo T., Sasaki M., Siina M., Kimura K., Sato K., Kumasaka T., Yamamoto M., Kamiya N., and Ogata K.: “Crystallization and preliminary X-ray analysis of quaternary, ternary and binary protein-DNA complexes with involvement of AML1/Runx-1/CBF α Runt domain, CBF β and the C/EBP β bZip region”, *Acta Cryst. D* **57**, 850–853 (2001). *
- Hara T., Tanaka T., Seike T., Bizen T., Maréchal X., Kouda T., Inoue K., Oka T., Suzuki T., Nagi N., and Kitamura H.: “In-vacuum X-ray helical undulator for high flux beamline at SPring-8”, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **467/468**, 165–168 (2001). *
- Inoue K., Oka T., Suzuki T., Yagi N., Takeshita K., Goto S., and Ishikawa T.: “Present status of high flux beamline (BL40XU) at SPring-8”, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **467/468**, 674–677 (2001). *
- Yamamoto M., Kumasaka T., Yamazaki H., Sasaki K., Yokozawa Y., and Ishikawa T.: “Development of high-speed Imaging Plate detector”, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **467/468**, 1160–1162 (2001). *
- Miyano M.: “How the G protein-coupled receptor activates GTP-binding protein”, *Pharmacogenet. J.* **1**, 225–228 (2001). *
- Kimura M., Furuichi M., Yamamoto M., Kumasaka T., Mizuno H., Miyano M., and Yamaguchi I.: “The flexible C-terminal region of *Aspergillus terreus* blastidin S deaminase: Identification of its functional roles with deletion enzymes”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 421–426 (2002). *
- Tahir T. H., Sato K., Ichikawa E., Sasaki M., Bungo T., Shiina M., Kimura K., Takata S., Fujikawa A., Morii H., Kumasaka T., Yamamoto M., Ishii S., and Ogata

K.: “Mechanism of c-Myb-C/EBP β cooperation from separated sites on a promoter”, *Cell* **108**, 57–70 (2002).

*

宮野雅司, 田中勲: “タンパク質 X 線結晶構造解析”, *実験医学* **19**, 950–953 (2001).

浜田恵輔, 箱嶋敏雄: “細胞骨格を膜に連結する ERM タンパク質と細胞膜・接着分子との相互作用: ラディキシンの FERM ドメインの結晶構造研究”, *生物物理* **41**, 230–234 (2001). *

浜田恵輔, 箱嶋敏雄: “接着分子・受容体へ集積する蛋白質の構造研究”, *蛋白質 核酸 酵素* **46**, 1929–1935 (2001).

宮野雅司: “構造ゲノム科学”, *放射光* **14**, No. 4, pp. 34–39 (2001).

宮野雅司, 吾郷日出夫: “SPring-8 の光を使ってタンパク質の構造を見る”, *可視化情報学会誌* **22**, No. 84, pp. 10–17 (2002).

(総 説)

宮野雅司, 熊坂崇: “エアリー会議: 第 2 回構造ゲノム国際会議そして播磨ワークショップ”, *SPring-8 利用者情報* **6**, 287–292 (2001).

堀哲哉, 熊坂崇, 山本雅貴, 宮野雅司: “ロドプシンの構造決定がひらくゲノム創薬の新しい道”, *Bio ベンチャー* **2**, 73–79 (2002).

(その他)

Miyano M.: “Atomic structure of bovine rhodopsin: A seven transmembrane receptor”, *SPring-8 Res. Frontiers* **1999**, 7–9 (2001).

Sugahara M. and Kuramitsu S.: “Crystal structure of a repair enzyme of oxidatively-damaged-DNA, MutM (Fpg), from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8”, *SPring-8 Res. Frontiers* **1999/2000**, 12–14 (2001).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Nakagawa N., Sugahara M., Masui R., Kato R., Fukuyama K., and Kuramitsu S.: “Crystal structure of a nucleotide excision repair enzyme UvrB from *Thermus thermophilus* HB8”, 18th Int. Congr. of Biochemistry and Molecular Biology, (The Biochemical Society), Birmingham, UK, July (2000).

Nakagawa N., Sugahara M., Masui R., Kato R., Fukuyama K., and Kuramitsu S.: “Crystal structure of nucleotide excision repair enzyme, UvrB from *Thermus thermophilus* HB8”, Int. Conf. on Structural Genomics 2000 (ICSG2000), Yokohama, Nov. (2000).

Miyano M.: “Application of synchrotron radiation to protein crystallography: The molecular structure of rhodopsin”, 1st Southeast Asian Protein Crystallography Workshop: How to prepare your protein for crystallography, (National Synchrotron Research Center), Nakhon Ratchasima, Thailand, May (2001).

Stenkamp R. E., Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Yamamoto M., and Miyano

- M.: "Structure determination of visual rhodopsin", 2001 ACA Ann. Meet., (American Crystallographic Association), Los Angeles, USA, July (2001).
- Yamamoto M., Kumasaka T., Yamashita E., Moriyama H., and Ueki T.: "Trichromatic protein crystallography at SPring-8 RIKEN Beamline I (BL45XU)", 2001 ACA Ann. Meet., (American Crystallographic Association), Los Angeles, USA, July (2001).
- Sugahara M., Nodake Y., Ishijima J., Kuramitsu S., Yokoyama S., and Miyano M.: "Standardization of protein crystallizing procedure: the first result", 4th Int. Conf. on Biological Physics, (The International Union of Pure and Applied Physics and others), Kyoto, July–Aug. (2001).
- Miyano M.: "Atomic structure of bovine rhodopsin: A seven transmembrane receptor", 7th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR 2001), São Pedro, Brazil, July–Aug. (2001).
- Ida K., Norioka S., Yamamoto M., Kumasaka T., Yamashita E., Newbiggin E., Clarke A. E., Sakiyama F., and Sato M.: "Crystal structure of *Nicotiana alata* S_{F11}-RNase associated with gametophytic self-incompatibility", IV Meet. of Asian Crystallographic Assoc. (AsCA'01), (Indian National Science Academy and others), Bangalore, India, Nov. (2001).
- Kanda H., Kumasaka T., Hamada K., Yamamoto M., and Miyano M.: "Molecular replacement in hemihedral twinning", IV Meet. of Asian Crystallographic Assoc. (AsCA'01), (Indian National Science Academy and others), Bangalore, India, Nov. (2001).
- Yamamoto M.: "The influence of radiation damage on MAD data collection and the effectiveness of the trichromator concept", 2nd Int. Workshop on X-ray Damage to Crystalline Biological Samples, (Argonne National Laboratory), Argonne, USA, Dec. (2001).
- Kumasaka T., Yamamoto M., Irikura D., Urade Y., and Miyano M.: "Crystal structure of lipocalin-type prostaglandin D synthase", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Tajima K., Shirouzu M., Ishihara G., Hori T., Saeki M., Goto M., Miyano M., Kigawa T., Haga T., and Yokoyama S.: "Effects of detergents on the membrane protein synthesis by cell-free system", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Yamamoto M. and Ishikawa T.: "Highthroughput beamlines", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Miyano M.: "Highthroughput Factory, a part of RIKEN structural Genomics/Proteomics initiative (RSGI) at SPring-8", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Ago H., Hisanaga Y., Hamada K., Sugahara M., Nodake Y., Nishio K., and Miyano M.: "Structure analysis of proteins involved in lipid metabolism of *Thermus thermophilus* HB8", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).
- Miyano M. and Kumasaka T.: "Full automation approach of crystallization screening and its observation", Interdisciplinary Workshop Promoting Collaboration in High-Throughput X-ray Structure Determination, (The Institute for Complex Adaptive Matter and others), Santa Fe, USA, Mar. (2002).
- (国内会議)
- 木村真, 古市真木雄, 山本雅貴, 熊坂崇, 水野洋, 宮野雅司, 山口勇: "Aspergillus terreus 由来 blasticidin S deaminase (BSD) の C 末端の flexible な領域の 5 残基は, 基質の呼び込みおよび反応効率の向上に大きく貢献している", 日本農薬学会第 26 回大会, 堺, 3 月 (2001).
- 宮野雅司: "7 回膜貫通レセプター・ウシロドプシンの結晶構造", 日本ビタミン学会第 53 回大会, 淡路, 5 月 (2001).
- 青山浩, 山下栄樹, 平田邦夫, 月原富武, 村本和優, 伊藤恭子, 吉川信也: "ウシ心筋チトクロム酸化酵素の 1.8 Å 分解能の X 線構造解析", 第 1 回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6 月 (2001).
- 宮野雅司: "創薬の基盤としてのタンパク質構造解析", CBI 学会 2001 年大会, (情報計算化学生物学会), 東京, 7 月 (2001).
- 古市真木雄, 木村真, 山本雅貴, 熊坂崇, 山下昭二, 水野洋: "Blasticidin S deaminase の基質認識機構", 第 39 回日本生物物理学会年会, 大阪, 10 月 (2001).
- 山本雅貴, 熊坂崇, 上野剛, 井田孝, 神田浩幸, 宮野雅司, 石川哲也: "SPring-8 構造ゲノムビームライン", 日本結晶学会平成 13 年度年会, 名古屋, 10 月 (2001).
- 井上豪, 岡野洋介, 衣笠茂浩, 松村浩由, 甲斐泰, 入倉大祐, 早石修, 山本雅貴, 熊坂崇, 宮野雅司, 裏出良博: "ヒト由来造血管型プロスタグランジン D 合成酵素の X 線構造に基づく抗アレルギー剤の開発", 日本結晶学会平成 13 年度年会, 名古屋, 10 月 (2001).
- 神田浩幸, 熊坂崇, 濱田賢作, 山本雅貴, 宮野雅司: "双晶における分子置換法", 日本結晶学会平成 13 年度年会, 名古屋, 10 月 (2001).
- 宮野雅司: "ロドプシンの不活性型結晶構造と活性型機能解析に基づく GPCR 活性化のメカニズムについて", ゲノム創薬フォーラム第 4 回シンポジウム「ゲノムからプロテオーム創薬へ」, 東京, 11 月 (2001).
- 宮野雅司: "ポストゲノム時代の創薬へのタンパク質構造利用にむけて", 鹿島医薬品カンファレンス「ゲノム/グローバル時代の医薬品施設と経営」, (鹿島建設), 東京, 11 月 (2001).
- 宮野雅司: "GPCR/ロドプシンの原始構造と活性化の分子機構", 大阪バイオサイエンス研究所 Monthly Lecture, 吹田, 12 月 (2001).
- 山本雅貴, 熊坂崇, 上野剛, 井田孝, 神田浩幸, 宮野雅司, 石川哲也: "SPring-8 構造ゲノムビームライン", 第 15 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 柏, 1 月 (2002).
- 宮野雅司: "構造ゲノムのアプローチ: SPring-8 ハイスルー

ブットファクトリーの現状と将来”, 第 15 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 千葉, 1 月 (2002).
宮野雅司: “ポストゲノム時代における構造生物の創薬への展開: GPCR ロドプシンの活性化メカニズムを中心に”, 第 7 回放射光医学研究会学術集会, 東京, 2 月 (2002).
宮野雅司: “ポストゲノム時代における構造生物学の創薬へ

の展開: GPCR ロドプシンの活性化メカニズムを中心に”, バイオ化学産業分科会, (化学技術戦略推進機構), 東京, 3 月 (2002).
熊坂崇: “プロスタグランジン D 合成酵素の結晶構造: リポカリン型と造血器型の活性部位構造比較”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VII)」, 播磨, 3 月 (2002).