

研究技術開発室

Division of Bio-Crystallography Technology

室長 神谷 信夫

KAMIYA, Nobuo

当室は SPring-8 に設置された理研ビームラインの運営にあたり、ビームラインを利用した個別研究についてユーザーへの技術支援を行っている。また独自の利用研究をすすめる過程で技術的ノウハウを蓄積し、利用研究を飛躍的に発展させる研究技術の開発を行う。

1. 理研ビームラインを利用した生体巨大分子結晶構造解析研究のための技術支援 (河野, 引間, 内藤, 中島, 松, 神谷 (信); 足立 (生体物理化学研); 山本, 熊坂 (構造生物物理研); 藤沢, 西川 (構造生物化学研), 石川 (X線干渉光学研); 北村 (X線超放射物理学研))

タンパク質や核酸など生体巨大分子の立体構造を解明することは構造生物学の基礎である。当室では、構造生物学研究用理研ビームラインを用いて実施される生体巨大分子の構造解析研究についてユーザーへの技術支援を行っている。

(1) 構造生物学研究用ビームライン; BL45XU-PX

生体巨大分子の結晶構造解析のうち、多波長異常分散法による自動解析に特化したビームラインである。本年度は本ビームラインを利用した回折実験におけるユーザー対応を行った。

(2) 構造生物学研究用ビームライン; BL44B2

生体巨大分子の動的結晶構造解析, X線吸収スペクトロスコープ (XAFS) との兼用であり, (i) 単色 X 線を利用した回折実験, (ii) マイクロ秒からミリ秒程度の時間分解能における白色ラウエ回折実験, (iii) 蛍光および吸収法による XAFS 実験に利用されている。本年度は He クライオ装置と on-line 顕微分光装置を新たに導入し, 単色 X 線を利用した回折実験におけるユーザー対応を行った。

(3) 構造生物学研究用ビームライン; BL45XU-SAXS

溶液からの X 線の散乱情報に基づいて生体巨大分子のドメイン構造やドメイン間での構造変化を追跡するためのビームラインである。本年度のユーザーへの技術支援は構造生物化学研究室に依頼した。

2. 生体巨大分子結晶構造解析 (河野, 引間, 内藤, 中井^{*1}, 野尻^{*1}, 中島, 松, 開^{*2}, 神谷 (信), 緒方^{*3}, Tahirov^{*3}, 姚^{*3}, 田中^{*4}; 尾高 (バイオ工学研); 中山, 瀧尾, (生体分子解析室); 井川, 柴田 (遺伝生化学研); 沈 (光合成科学研); 野嶽, 石嶋, 中川, 倉光 (ストラクチュローム連携研究グループ))

(1) ニトリルヒドラターゼ (NHase) はニトリル化合物に水を付加して対応するアミド化合物を生成する酵素である。活性中心に 3 価の非ヘム鉄または非コリノイド・コバルトを含み, 鉄型 NHase は一酸化チツ素 (NO) の光脱離によって活性化される。本研究では NHase の酵素反応の全行程を時間分割 (動的) 構造解析によって追跡することを目的としている。本年度は, 極低温状態での光活性化過程

の追跡を行った。コバルド型 NHase については, 結晶化および回折データ収集に成功し, モデル構築を進めている。

(2) イソニトリルヒドラターゼ (IsoNHase) は基質であるイソニトリル (R-NC⁻) に水を付加して N-ホルムアミド (R-NHC(O)H) を生成する酵素である。最近発見された新規な酵素を対象にしてその立体構造を解明し, IsoNHase の水和反応機構を明らかにすることを目的として研究を開始した。本年度は IsoNHase の結晶化条件を探索して分解能 1.7 Å 程の良質な結晶を得るのに成功し, 現在その回折データから構造解析を進めている。

(3) DNA 相同組換えを行う RecA タンパク質は協同的にらせん状に DNA 鎖に結合し, 単鎖 DNA と二重鎖 DNA の間の相同性を探索し, 相同部位を対合させて相同鎖を交換するという多彩な機能を有している。RecA の DNA 認識機構を明らかにするために, 新規構造をもつ結晶の探索を進め, 既に報告されているものとは異なる構造の異なる結晶を得ることに成功した。現在, 構造の精密化を進めている。

(4) ストラクチュローム連携研究に協力して, 主にグリシン開裂系, 金属活性中心をもつエネルギー伝達系と解糖系のタンパク質群を中心にして網羅的構造解析を進めている。本年度は 5 種類のタンパク質の発現・精製と 10 種類のタンパク質の結晶化および構造解析を進め, 2 種類のタンパク質の構造を決定した。

(5) 光化学系 II 粒子は葉緑体のチラコイド膜上において太陽光のエネルギーを吸収し, 水を分解して酸素を発生させる。本年度は好熱性らん藻から単離された光化学系 II 粒子の結晶について, 合計 4 つの重原子誘導体を利用して得られた電子密度図にもとづいて, 3.7 Å 分解能における構造決定を進めた。

(6) イネ萎縮ウイルス (RDV) の RNA 結合タンパク質 (P7) は mRNA 合成を行う転写複合体 (TC) の構造的および機能的な基盤となる分子である。本研究は P7 の構造解析を行うことにより TC の機能発現の仕組みを明らかにしようとするものである。本年度は P7 遺伝子のクローニングとその大量発現系を確立するための準備を行った。

3. 構造生物学に関わる諸技術の開発 (引間, 河野, 内藤, 神谷 (四), 中島, 松, 神谷 (信), 三城^{*3}; 足立 (生体物理化学研))

(1) タンパク質の結晶化に関する技術

新規の生体巨大分子を結晶化するには、多数の結晶化条件を試行し結晶化の可否を観察する必要がある。この一連の作業を完全自動化するために試作したタンパク質結晶化および自動観察装置の改良を行うとともに市販化を視野に入れた新型装置の開発を始めた。

(2) 結晶化チップ利用技術

近年のタンパク質 X 線回折実験はクライオ条件下で行うことが主流となっている。結晶化の際に作成するタンパク質と沈澱剤の混合溶液のドロップをそのままクライオ回折実験に用いることができる X 線マウント兼用結晶化チップの開発を行い実用化を進めている。

(3) タンパク質結晶試料のハンドリング技術

理研ビームラインを利用して生体巨大分子の結晶構造解析を行う場合、強力な X 線の照射により発生する結晶試料のダメージを低減する必要があり、この目的には試料の液体チッ素温度までの冷却が有効である。加えて凍結された試料は長距離の運搬も容易である。液体チッ素温度に凍結された試料をビームラインに自動マウントするアームロボットを試作し、オフラインでの性能評価および改良を進めている。

(4) タンパク質分子の誘電特性を利用した結晶化制御

タンパク質は分子表面に様々な極性をもつアミノ酸残基を有しており、溶媒中では永久双極子をもつ誘電体として振舞っている。外部電場を印加することで溶媒中でのタンパク質分子の会合状態に揺動を与え、結晶化を促進する試みを開始した。

(5) 結晶解析用回折計の高度化

重原子誘導体が MAD 測定に利用可能か否かを簡便に判定するシステムの構築をめざして、結晶試料の方位を任意に変更できるミニカップーゴニオメータを製作し、その制御ソフトウェアを開発して BL44B2 における実用性をテストした。

(6) 動的結晶構造解析に必要な周辺技術

動的結晶構造解析では、タンパク質結晶中で変化する状態をモニターするために顕微分光装置が必要となる。本年度は一昨年度に製作した装置の改良と周辺整備を進めた。

(7) 非結晶学的対称を利用した位相決定法の開発

イネ萎縮ウイルスの P7 タンパク質の構造解析を通じて新たな解析方法の開発を目指している。本年度は位相改良過程で位相フィルターを導入して、類縁構造からの位相や実験的な位相測定を必要としない方法を考案した。

*¹ 基礎科学特別研究員, *² 研修生 (姫工大大学院), *³ 共同研究員, *⁴ 客員主管研究員

Research and Development Subjects and Members of Division of Bio-Crystallography Technology

1. Technical Support for Users of RIKEN Beamlines Dedicated for Structural Biology
2. X-Ray Crystal Structure Analysis of Biological Macromolecules

3. Development of New Techniques for Structural Biology Research

Head

Dr. Nobuo KAMIYA

Members

Dr. Yoshiaki KAWANO

Dr. Takaaki HIKIMA

Dr. Hisashi NAITOW

Dr. Tadashi NAKAI*

Dr. Masaki NOJIRI*

Mr. Shiro KAMIYA

Mr. Taiji MATSU

Mr. Hiroki NAKAJIMA

* Special Postdoctoral Researcher

in collaboration with

Dr. Shin-ichi ADACHI (Biophysical Chemistry Lab.)

Dr. Tetsuro FUJISAWA (Structural Biochemistry Lab.)

Dr. Shukuko IKAWA (Cellular & Molecular Biology Lab.)

Dr. Tetsuya ISHIKAWA (Coherent X-Ray Optics Lab.)

Dr. Jun ISHIJIMA (Structurome Research Group)

Dr. Hideo KITAMURA (Coherent Synchrotron Light Source Physics Lab.)

Dr. Takashi KUMASAKA (Structural Biophysics Lab.)

Dr. Seiki KURAMITU (Structurome Research Group)

Dr. Noriko NAKAGAWA (Structurome Research Group)

Dr. Hiroshi NAKAYAMA (Biomolecular Characterization Div.)

Dr. Yukihiko NISHIKAWA (Structural Biochemistry Lab.)

Dr. Yuuichi NODAKE (Structurome Research Group)

Dr. Masafumi ODAKA (Bioengineering Lab.)

Dr. Jian-Ren SHEN (Photosynthesis Research Lab.)

Dr. Takehiko SHIBATA (Cellular & Molecular Biology Lab.)

Dr. Koji TAKIO (Biomolecular Characterization Div.)

Dr. Masaki YAMAMOTO (Structural Biophysics Lab.)

Visiting Members

Dr. Osamu MATSUMOTO (Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

Dr. Yao MIN (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

Dr. Atsushi NAKAGAWA (Inst. Prot. Res., Osaka Univ.)

Dr. Masayosi NAKASAKO (Inst. Mol. Cel. Biosci., Univ. Tokyo)

Dr. Kazuhiro OGATA (Sch. Med., Yokohama City Univ.)

Dr. Akira SANJO (Protein Wave Co.)

Dr. Tahir TAHIROV (Sch. Med., Yokohama City Univ.)

Dr. Isao TANAKA (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)
Dr. Nobuhisa WATANABE (Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

Trainees

Mr. Toshiaki HIRAKI (Fac. Sci., Himeji Inst. Technol.)
Mr. Koji KUMAGAI (Grad. Sch. Med., 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

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). *

Tahir T., Inoue-Bungo T., Sasaki M., Fujikawa A., Kimura K., Sato K., Adachi S., Kamiya N., and Ogata K.: "Crystallization and preliminary X-ray analysis of the C/EBP β C-terminal region in complex with DNA", *Acta Cryst. D* **57**, 854–856 (2001). *

Toriumi Y., Park S., Hashimoto H., Shimizu H., Hirano M., and Kamiya N.: "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of light-harvesting protein phycoerythrin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*", *Acta Cryst. D* **57**, 1326–1328 (2001). *

Adachi S., Oguchi T., Tanida H., Park S., Shimizu H., Miyatake H., Kamiya N., Shiro Y., Inoue Y., Ueki T., and Iizuka T.: "The RIKEN structural biology beamline II (BL44B2) at the SPring-8", *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **467/468**, 711–714 (2001). *

Kawamoto M., Kawano Y., and Kamiya N.: "The bio-crystallography beamline (BL41XU) at SPring-8", *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **467/468**, 1375–1379 (2001). *

Nakashima T., Yao M., Kawamura S., Iwasaki K., Kimura M., and Tanaka I.: "Ribosomal protein L5 has a highly twisted concave surface and flexible arms responsible for rRNA binding", *RNA* **7**, 692–701 (2001). *

(総 説)

神谷信夫: "理化学研究所におけるタンパク質構造・機構解析の現状と今後の動向", *バイオサイエンスとインダストリー* **59**, 786–787 (2001).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国 際 会 議 等)

Shen J. R. and Kamiya N.: "Crystal structure analysis of photosystem II from *Synechococcus vulcanus* at BL41XU of SPring-8", 7th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR 2001), São Pedro, Brazil, July–Aug. (2001).

Takeda K., Miyatake H., Park S., Kawamoto M., Miki K., and Kamiya N.: "MAD method using ultra-high energy X-rays at SPring-8 BL41XU", 7th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR 2001), São Pedro, Brazil, July–Aug. (2001).

Kawano Y., Nojiri M., Odaka M., Endo I., and Kamiya N.: "Role of post-translational modifications around the reaction center of photoreactive nitrile hydratase", 7th Int. Conf. on Biology and Synchrotron Radiation (BSR 2001), São Pedro, Brazil, July–Aug. (2001).

Watanabe N., Nakayama H., Odaka M., Kawano Y., Takio K., Kamiya N., Nagamune T., and Endo I.: "Cysteine-sulfenic acid modification is essential for the activity of nitrile hydratase", 10th Int. Conf. on Bioinorganic Chemistry (ICBIC 10), Florence, Italy, Aug. (2001).

Odaka M., Kawano Y., Nakayama H., Tsujimura M., Takio K., Kamiya N., and Endo I.: "Post-translational modification of photoreactive nitrile hydratase in the photoactivated state", 10th Int. Conf. on Bioinorganic Chemistry (ICBIC 10), Florence, Italy, Aug. (2001).

Nakai T., Ishijima J., Kuramitsu S., and Kamiya N.: "Crystal structure of *Thermus thermophilus* lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system", IV Meet. of Asian Crystallographic Assoc. (AsCA'01), (Indian National Science Academy and others), Bangalore, India, Nov. (2001).

Hikima T. and Kamiya N.: "Development of a protein crystallization support system for structural genomics in laboratory scale", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).

Takeda K., Miyatake H., Park S., Kawamoto M., Kamiya N., and Miki K.: "Protein crystallography by MAD method using ultra-high energy X-rays", Canada-UK-Japan Joint Symp. on Toward Post DNA-Sequencing Era, Yokohama, Feb. (2002).

Hikima T., Murakami K., Kimura Y., Tachikawa S., Suzuki T., and Kamiya N.: "Development of a protein crystallization support system for structural genomics in laboratory scale: Preparation of hanging drops and automatic detection of crystal growth", 9th Int. Conf. on the Crystallization of Biological Macromolecules (IC-CBNM9), Jena, Germany, Mar. (2002).

Sanjoh A., Cachau R. E., Hikima T., and Kamiya N.: "High-throughput crystallization screening and diffraction data collection of protein crystals using polymer-based microarray devices", 9th Int. Conf. on the Crystallization of Biological Macromolecules (IC-CBNM9), Jena, Germany, Mar. (2002).

(国 内 会 議)

尾高雅文, 中山洋, 渡辺直樹, 河野能頭, 瀧尾擴士, 神谷信夫, 長棟輝行, 遠藤勲: "鉄型ニトリルヒドラーゼにおけるシステインスルフェン酸修飾は酵素活性に必須である", 第1回日本蛋白質科学会年会, 吹田, 6月(2001).

引間孝明, 朴三用, 神谷信夫: "X線結晶クライオマウント

ロボットの開発”, 文科省科研費特定領域研究 (A) 「生物マシーナリー」第 4 回ワークショップ, 福岡, 8 月 (2001).
引間孝明, 木村祐二, 村上公英, 立川茂, 鈴木利昭, 神谷信夫: “ハンギングドロップ結晶化ロボットと結晶化自動観察ロボットの開発”, 文科省科研費特定領域研究 (A) 「生物マシーナリー」第 4 回ワークショップ, 福岡, 8 月 (2001).
尾高雅文, 中山洋, 渡辺直樹, 橋本花那子, 片山葉子, 河野能顕, 野尻正樹, 瀧尾擴士, 養王田正文, 丹生谷博, 神谷信夫, 長棟輝行, 遠藤勲: “システイン酸化体を配位子とする新規金属酵素の反応機構解析”, 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2001).
渡辺直樹, 尾高雅文, 中山洋, 河野能顕, 瀧尾擴士, 神谷信夫, 長棟輝行, 遠藤勲: “鉄型ニトリルヒドラターゼにおける安定化剤 n-酪酸の機能の解析”, 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2001).
中井忠志, 石嶋潤, 中川紀子, 増井良治, 倉光成紀, 神谷信夫: “高度好熱菌グリシン開裂系のクローニングおよび大量発現系の確立”, 第 74 回日本生化学会大会, 京都, 10 月 (2001).
神谷信夫, 沈建仁: “SPring-8 の BL41XU を利用した *Synechococcus vulcanus* 由来光化学系 II 膜蛋白質複合体の結晶構造解析”, 日本結晶学会平成 13 年度年会, 名古屋, 10 月 (2001).

神谷信夫: “放射光構造生物学と生命科学”, むつ小川原地域における放射光施設整備研究会, (日本原子力産業会議), 札幌, 11 月 (2001).
神谷信夫, 沈建仁: “SPring-8 の BL41XU を利用した *Synechococcus vulcanus* 由来光化学系 II 膜蛋白質複合体の結晶構造解析”, 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).
竹田一旗, 宮武秀行, 朴三用, 河本正秀, 神谷信夫, 三木邦夫: “高エネルギー領域に吸収端を持つ原子 (I, Xe, Cs) を用いた多波長異常分散法による蛋白質 X 線結晶構造解析”, 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).
藤橋雅宏, Peapus D. H., 神谷信夫, 長田嘉穂, 三木邦夫: “MAD 法によるヒロチャワンタケ由来レクチンの結晶構造解析”, 日本放射光学会第 15 回年会・放射光科学合同シンポジウム, 柏, 1 月 (2002).
藤橋雅宏, Peapus D. H., 神谷信夫, 長田嘉穂, 三木邦夫: “ヒロチャワンタケ由来フコース特異的レクチンの結晶構造”, 日本農芸化学会 2002 年度大会, 仙台, 3 月 (2002).
河野能顕, 尾高雅文, 遠藤勲, 神谷信夫: “ニトリルヒドラターゼの反応機構の構造生物学的研究”, 理研シンポジウム「構造生物学 (VII)」, 播磨, 3 月 (2002).