

第三世代シンクロトン放射光を用いた酸素の極限状態X線結晶構造解析

(課題番号：13460046)

平成13年度～平成15年度 科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））

研究成果報告書

京 都 大 学 図 書



1040941123

附 属 図 書 館

平成16年5月

研究代表者 加藤 博章

(京都大学薬学研究科・教授)

第三世代シンクロトロン放射光を用いた酸素の極限状態X線結晶構造解析
(課題番号：13460046)

平成13年度～平成15年度 科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））
研究成果報告書

平成16年5月

研究代表者 加藤 博章
(京都大学薬学研究科・教授)

はしがき

これは、文部省科学研究費補助金 基盤研究 (B) (2) の補助を受けて2001年度～2003年度の3年間に渡って行った研究課題、「第三世代シンクロトン放射光を用いた酸素の極限状態X線結晶構造解析」(課題番号13460046)の研究成果をまとめたものである。

研究組織

研究代表者：加藤博章 (京都大学薬学研究科教授)

研究分担者：中津 亨 (京都大学薬学研究科助教授)

研究分担者：山下敦子 (理化学研究所構造生物化学研究室研究員)

研究分担者：平竹 潤 (京都大学化学研究所助教授)

研究経費

交付決定額 (配分額)	(金額単位：千円)		
	直接経費	間接経費	合 計
平成13年度	6,500	0	6,500
平成14年度	3,800	0	3,800
平成15年度	2,600	0	2,600
総 計	12,900	0	12,900

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) Ifuku, K., Nakatsu, T., Kato, H., Sato, F., Crystal structure of the PsbP protein of photosystem II from *Nicotiana tabacum*., *EMBO rep.*, **5**, 362-367 (2004).
- 2) Matsubara, M., Nakatsu, T., Kato, H., Taniguchi, H., Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca(2+)/calmodulin., *EMBO J.*, **23**, 712-718 (2004).
- 3) Nakanishi, T., Ohki, Y., Oda, J., Matsuoka, M., Sakata, K., and Kato, H., Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on pyruvate phosphate dikinase from maize., *Acta Crystallogr.*, **D60**, 193-194 (2004).
- 4) Ifuku, K., Nakatsu T., Kato H., and Sato F., Crystallization and preliminary crystallographic studies on the extrinsic 23 kDa protein in the oxygen-evolving complex of photosystem II., *Acta Crystallogr.*, **D59**, 1462-1463 (2003).
- 5) Yamashita A., Endo M., Higashi T., Nakatsu T., Yamada T., Oda J., and Kato H., Capturing enzyme structure prior to reaction initiation: tropinone reductase-II-substrate complexes., *Biochemistry*, **42**, 5566-5573 (2003).
- 6) Yamauchi E., Nakatsu T., Matsubara M., Kato H., and Taniguchi H., Crystal structure of a MARCKS peptide containing the calmodulin-binding domain in complex with Ca(2+)-calmodulin., *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 226-231 (2003).
- 7) Nakano H., Yoshida T., Uchiyama S., Kawachi M., Matsuo H., Kato T., Ohshima A., Yamaichi Y., Honda T., Kato H., Yamagata Y., Ohkubo T., and Kobayashi Y., Structure and binding mode of a ribosome recycling factor (RRF) from mesophilic bacterium., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3427-3436 (2003).
- 8) Nakano H., Uchiyama S., Yoshida T., Ohkubo T., Kato H., Yamagata Y., and Kobayashi Y., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a ribosome recycling factor from *Escherichia coli*, Arg132Gly., *Acta. Crystallogr.*, **D58**, 124-126 (2002).
- 9) Shimizu T., Nakatsu T., Miyairi K., Okuno T., & Kato H., Active-Site Architecture of Endopolygalacturonase I from the Pathogenic Fungus, *Stereum purpureum*, Revealed by Crystal Structures in Native and Ligand-Bound Forms at Atomic Resolution., *Biochemistry*, **41**, 6651 - 6659 (2002).

- 10) Irie K., Nakatsu T., Mitsuoka K., Miyazawa A., Sobue K., Hiroaki Y., Doi T., Fujiyoshi Y., & Kato H., Crystal Structure of Homer 1 Family Conserved Region Reveals the Interaction between EVH1 Domain and Own Proline-rich Motif., *J. Mol. Biol.*, **318**, 1117 - 1126 (2002).
- 11) Hibi T., Hisada H., Nakatsu T., Kato H., & Oda J., *Escherichia coli* B γ -glutamylcysteine synthetase: modification, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis., *Acta Crystallogr.*, **D58**, 316 - 318 (2002).
- 12) Shimizu T., Nakatsu T., Miyairi K., Okuno T., & Kato H., Crystallization and preliminary X-ray study of endopolygalacturonase from the pathogenic fungus *Stereum purpureum*., *Acta Crystallogr.*, **D57**, 1171 - 1173 (2001).

(2) 口頭発表

- 1) 中西亜実、中津 亨、松岡 信、坂田完三、加藤博章「トウモロコシ由来ピルビン酸リン酸ジキナーゼの X 線結晶構造解析」日本結晶学会 2003 年度年会 (熊本)、12 月 2 日(2003)
- 2) 清水哲哉・中津亨・佐藤衛・栗原和男・宮入一夫・奥野智旦・新村信雄・加藤博章「リング銀葉病菌由来エンドポリガラクトナーゼの中性子線結晶構造解析 (第一報)」日本結晶学会 2003 年度年会 (熊本)、12 月 2 日 (2003)
- 3) 柴田洋之、柏山恭範、守田 雅志、今中常雄、加藤 博章、“Domain structure and function of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins” 日本生化学会 2003 年度大会 横浜 2003 年 10 月 17 日
- 4) 小段篤史、柴田洋之、松本崇、松尾道憲、植田和光、加藤博章“Large scale purification of p-glycoprotein from Sf-9 insect cells” 日本生化学会 2003 年度大会 2003 年 10 月 17 日
- 5) 柴田洋之、柏山恭範、守田 雅志、今中常雄、加藤 博章、“ペルオキシソーム膜タンパク質局在化機構の解析—Pex19p のドメイン構造と機能” 日本蛋白質科学会 2003 年度大会 札幌 2003 年 6 月 23 日
- 6) T. Shimizu, T. Nakatsu, K. Miyairi, T. Okuno, and H. Kato 「Reaction mechanism of endopolygalacturonase based on the crystal structures at atomic resolution」 International Symposium on Diffraction Structure Biology 2003. つくば、2003 年 5 月 30 日

- 7) 小橋信行、中津 亨、加藤博章「ゲンジボタル由来ルシフェラーゼの発光色決定機構」日本農芸科学会 2003 年度大会 (東京)、4 月 1 日 (2003)
- 8) 柴田洋之、柏山恭範、守田 雅志、今中常雄、加藤 博章、「ペルオキシソーム膜タンパク質局在化機構の解析-Pex19p の機能性部位の探索」 日本農芸化学会 2003 年度大会 (横浜) 2003 年 4 月 2 日
- 9) 中西亜実、中津 亨、松岡 信、坂田完三、加藤博章「トウモロコシピルビン酸リン酸ジキナーゼの X 線結晶構造解析 2」日本農芸化学会、横浜、2003 年 4 月 (2003)
- 10) 清水哲哉、中津亨、宮入一夫、奥野智旦、加藤博章、「エンドポリガラクトナーゼ/ガラクトロン酸複合体の超高分解能 X 線結晶構造解析」第 75 回日本生化学会大会 (京都)、10 月 17 日 (2002)
- 11) 中津亨、市山進、Saldanha Adrian、平竹潤、坂田完三、加藤博章、「X 線結晶構造解析によるホタルルシフェラーゼの発光反応機構および発光色決定の解明」第 75 回日本生化学会大会 (京都)、10 月 15 日 (2002)
- 12) 清水哲哉、中津亨、宮入一夫、奥野智旦、加藤博章、「Active-Site Architecture of endopolygalacturonase from a pathogenic fungus, *Stereum purpureum*」日本応用糖質科学会創立 50 周年記念国際シンポジウム (東京)、9 月 16 日 (2002)
- 13) 清水哲哉、中津亨、宮入一夫、奥野智旦、加藤博章、「超高分解能 X 線結晶構造解析に基づくエンドポリガラクトナーゼの作用機構」第 23 回日本糖質学会年会 (横浜)、8 月 22 日 (2002)
- 14) 仁位寛、日比隆雄、平竹潤、中津亨、加藤博章、小田順一「 γ -グルタミルシステイン合成酵素遷移状態アナログ複合体の結晶化」 第 2 回日本蛋白質科学会 大阪大学 (吹田市) 6 月 14 日 (2002)
- 15) 伊福健太郎、中津亨、山本由弥子、加藤博章、佐藤文彦「光化学系 2 酸素発生系 23-kDa タンパク質に関する生化学的解析と結晶化」日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台市)、3 月 26 日 (2002)
- 16) 中西亜実、中津亨、松岡信、坂田完三、加藤博章「トウモロコシ由来ピルビン酸リン酸ジキナーゼの X 線結晶構造解析」日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台市)、3 月 26 日 (2002)
- 17) 中津 亨「超高分解能 X 線結晶構造解析によるエンドポリガラクトナーゼの触媒機構」、理研シンポジウム「構造生物学 VII」 理研播磨研 2002 年 3 月 12~13 日

(2002)

- 18) Hiroaki Kato: Canada-UK-Japan Joint Symposium: Toward Post DNA-Sequencing Era, "Enzyme Mechanisms by Kinetic and Ultra-high Resolution Crystallography", 理化学研究所・横浜研究所交流棟ホール (横浜市)、2月26日 (2002)
- 19) 加藤博章: けいはんな文化学術協会「けいはんなセミナー速度論が引き寄せる未来ー酵素反応キネティックスの基礎と応用」"構造論と速度論の融合ー速度論的結晶学で結晶構造の時間変化を求める", 大阪医科大学臨床第一講堂 (高槻市)、11月23日 (2001)
- 20) 加藤博章: 第74回日本生化学会大会シンポジウム「酵素触媒機構研究の新展開」"酵素反応をX線結晶構造解析で捉えるには", 国立京都国際会館 (京都市)、10月25日 (2001)
- 21) 清水哲哉、中津亨、宮入一夫、奥野智旦、加藤博章、「リング銀葉病菌の生産するエンドポリガラクトナーゼのX線構造解析ー原子分解能結晶構造と作用機構ー」日本農芸化学会東北支部2001年度大会 鶴岡 2001年10月20日
- 22) 清水哲哉、中津亨、宮入一夫、奥野智旦、加藤博章「原子分解能結晶構造に基づいたエンドポリガラクトナーゼの作用機構」日本結晶学会 2001年度年会 名古屋 2001年10月2日
- 23) Ifuku, K., Nakatsu, T., Kato, H., Sato, F. 「The extrinsic 18-kDa protein in photosystem II restores the ion-retention activity of a mutant extrinsic 23-kDa protein lacking 19 amino-acid residues in the amino terminus」 12th International Congress on Photosynthesis. Brisbane, Australia 8月18 - 23日 (2001)
- 24) 中津亨、市山進、平竹潤、坂田完三、加藤博章、「X線結晶構造解析によるホタルの発光反応機構の解明」 第1回日本蛋白質科学会 大阪大学 (吹田市) 6月2-3日 (2001)
- 25) 加藤博章: 日本電子顕微鏡学会題57回学術講演会「生体高分子 (構造生物学) 研究の新しい流れ」"動的X線結晶構造解析", アクロス福岡 (福岡市)、5月10日 (2001)

研究成果の概要

本研究課題では、世界最高エネルギー出力の第三世代シンクロtron放射光リング、SPring-8 の性能をフルに発揮させて、極限状態におけるX線結晶構造解析を行うことにより、数種の酵素の構造と機能を詳細に解明した。極限状態解析としては、1. 短寿命分子種の高時間分解能（時分割）X線解析、2. 1 Åを越える超高分解能での精密X線解析、3. 解析困難な構造のX線解析の3つのカテゴリーを設定した。そして、以下の成果を得ることに成功した。

1. 時分割X線結晶解析（高時間分解能解析）

トロピノン還元酵素について、結晶内で酵素：基質複合体ができる状態に保ちつつ、ラウエ法を用いてX線回折データを収集するとともに、そのデータを解析して、基質（NADPH と tropinone）に相当する電子密度を得ることに初めて成功した。酵素：生成物複合体との構造比較から、本酵素は、基質と生成物の結合位置を微妙に制御することにより、最も反応に適した立体配置を達成していることが判明した。（発表論文5）

2. 超高分解能解析（高空間分解能解析）

ポリガラクトナーゼの立体構造を、X線と中性子線を用いて結晶構造解析を行った。その結果、0.7 Å分解能のX線解析構造と1.5 Å分解能の中性子線解析構造を決定することができた。超高精度の電子密度図と核密度図が得られており、水素を含めたタンパク質の立体構造を精密に調べることが実現した。（発表論文12）

3. 解析困難な状況のX線結晶解析

トウモロコシ由来のピルビン酸リン酸ジキナーゼのX線結晶構造解析を行い、反応に伴い中央ドメインが回転することを構造的に実証した。次いで、神経特異的なミリスチル化タンパク質であるCAP-23/NAP-22のミリスチル化ドメインとその結合タンパク質であるカルモジュリンとの複合体のX線結晶構造解析から、タンパク質の脂質修飾の一つであるミリスチル化がタンパク質間相互作用に直接関わることを分子レベルで初めて解明した。さらに、高等植物の光合成における酸素発生に関わるタンパク質PsbPのX線結晶解析に初めて成功し、PsbPがRun-GTPase結合タンパク質Mog1Pとよく似た立体構造であることを明らかにした。（発表論文1～4、6～11）