

11月28日(土) フラッシュトーク 2 (9:00~11:50)

9:00~11:50 フラッシュトーク (C会場)

8:45~9:00 接続テスト

9:00~9:50 座長：馬場 清喜 (高輝度光科学研究センター)

FC-II-01 * キネシンCENP-EとATPアナログ複合体の結晶化と構造解析

○渋谷明日香・小郷尚久・澤田潤一・浅井章良・横山英志 (東京理大院薬・静岡県大院薬)

FC-II-02 * Ligand-protein interaction analysis based on deep learning

○許至真・于健・尾瀬農之・姚閔 (北海道大学 生命科学院 X線構造生物学研究室)

FC-II-03 * Structural Basis for Thioredoxin isoform-based fine tuning of Ferredoxin-Thioredoxin Reductase activity

○Linda Juniar・Hideaki Tanaka・Keisuke Yoshida・Toru Hisabori・Genji Kurisu
(IPR, Osaka University・Lab. Chem and Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

FC-II-04 * 新規デカルボキシラーゼPhcGの結晶化と構造解析

○朝比奈琴音・千田美紀・千田俊哉・上村直史・政井英司・松浦裕志・杉本敬祐
(旭川高専・KEK物構研・長岡技大生物系)

FC-II-05 * クラスIB大型テルペン合成酵素の基質複合体の結晶構造

○金本壮平・佐藤努・品田哲朗・三木邦夫・深井周也・藤橋雅宏 (京大院理・新潟大農・阪市大院理)

9:50~10:00 接続テスト

10:00~10:50 座長：和田 啓 (宮崎大学)

FC-II-06 * 高等植物型ヘムオキシゲナーゼの構造・相互作用解析

○東田怜・田中秀明・武藤梨沙・張旭紅・李映昊・小沼剛・池上貴久・右田たい子・栗栖源嗣
(大阪大学蛋白質研究所・大阪大学大学院理学研究科・山口大学 農学部・Korea Basic Science Institute・
Korea Brain Research Institute・University of Science and Technology・横浜市立大学 生命医科学研究科)

FC-II-07* バクテリアセルロース合成酵素複合体構成成分BcsCの構造解析の試み

○佐藤 亨・大内 香予子・今井 友也・田島 健次・尾瀬 農之・姚 閔（北大院生命・京大生存研・北大院工）

FC-II-08* トマチン16位水酸化酵素と20位脱水素酵素のX線結晶構造解析

○宮崎麻紗美・藤山敬介・日野智也・水谷正治・秋山遼太・加藤純平・永野真吾
（鳥取大院持続社会・鳥取大院工・神戸大院農）

FC-II-09* リッサウイルスP蛋白質C末端ドメインの構造比較

○杉山葵・野間井智・蔣欣欣・南未来・前仲勝実・伊藤直人・Paul R. Gooley・Gregory W. Moseley・姚閔・尾瀬農之
（北大生命科学学院・岐阜大院 応用生物・University of Malborne・Monash University・JSTさきがけ）

FC-II-10 中性子線結晶構造解析によるタンパク質中のアンモニアの解析

○横溝太一・李龍・安達基泰・姚閔・尾瀬農之（北大院先端生命・QST・JSTさきがけ）

10:50～11:00 接続テスト

11:00～11:50 座長：平野 優（量子科学技術研究開発機構）

FC-II-11 J-PARC,MLF単結晶中性子回折計iBIXの現状

○日下勝弘・山田太郎・矢野直峰・細谷孝明・大原高志・田中伊知朗（茨城大iFRC・JAEA J-PARCセンター）

FC-II-12 飛行時間法により収集された中性子回折データ処理ソフトSTARGazerの現状

○矢野直峰・山田太郎・細谷孝明・大原高志・田中伊知朗・日下勝弘（茨大フロンティア・茨大工・原研J-PARCセンター）

FC-II-13 iBIXを用いた細菌由来ノイラミニダーゼの中性子結晶構造解析

○山田太郎・矢野直峰・日下勝弘（茨城大iFRC）

FC-II-14 フィトクロム発色団合成酵素HY2の結晶大型化に向けて

○杉島正一・和田啓・齋藤夏希・海野昌喜・福山恵一・山本健（久留米大医・宮崎大医・茨城大工・茨城大院理工・阪大院理）

FC-II-15 ニワトリ卵白リゾチームを使った、重水内変性/再生試料の中性子線結晶構造解析

○喜田昭子・森本幸生（京大複合研）

FC-II-01

キネシン CENP-E と ATP アナログ複合体の結晶化と構造解析

○渋谷 明日香¹、小郷 尚久²、澤田 潤一²、浅井 章良²、
横山 英志¹ (¹東京理大院薬、²静岡県大院薬)

【目的】がん細胞は細胞増殖が際限なく行われているため、細胞分裂を阻害し細胞死を誘発させることは有効ながん治療戦略である。その標的として注目されるキネシン Centromere-associated protein E (CENP-E) は、細胞分裂時に染色体と微小管を安定に結合させる ATP 駆動性モータータンパク質である。CENP-E は分裂期にのみ機能するため、より副作用の少ない抗がん剤として期待されている。阻害能が向上した CENP-E 阻害剤の開発が求められているものの、既存阻害剤との結合様式は未だ不明であるため、薬剤設計が困難である。そこで今回、CENP-E の阻害機構を、CENP-E と阻害剤複合体の X 線結晶構造解析により初めて解明することを目的とした。

【方法】精製したヒト CENP-E モータードメイン (1-339 残基) 溶液に ADP 加水分解酵素 apyrase を添加し、25 °C で一時間反応させた。Apyrase 添加前と同じ組成の溶液を用いたゲルろ過精製により apyrase を除

去した。mol 比 50 倍量の ATP アナログ AMPPNP を添加し結晶化した。結晶から X 線回折データを収集し、X 線結晶構造解析を行った。

【結果・考察】先行研究の阻害剤を添加して得た結晶構造では、内因性の ADP が結合しているため阻害剤が結合できなかったと考えられた。そこで今回、ADP を強制的に除去する方法の一つとして apyrase 処理を行い、その後 AMPPNP を添加し結晶化を行った。得られた柱状の結晶に、フォトンファクトリー BL17A で X 線を照射したところ、最大分解能 1.8 Å の回折像が得られた。結晶の格子定数は $a = 98.6 \text{ \AA}$, $b = 46.2 \text{ \AA}$, $c = 73.7 \text{ \AA}$ である。空間群は $P2_12_12$ である。非対称単位に 1 分子を含む。これら結晶学的データは、先行研究である ADP との複合体から得られた、最大分解能 1.9 Å, 格子定数 $a = 98.2 \text{ \AA}$, $b = 82.7 \text{ \AA}$, $c = 49.7 \text{ \AA}$, $\beta = 101^\circ$ 、空間群 $P2_1$ 、非対称単位 1 分子の結晶学的データと異なるものであった。現在構造解析を進めている。

FC-II-02

Ligand-protein interaction analysis based on deep learning

○Zhizhen Xu¹, Jian Yu¹, Toyoyuki Ose¹, Min Yao¹

¹Graduate School of Life Science, Hokkaido University

Binding specificity/affinity between protein and ligand are key-determinants for molecular performance. Understanding the binding mechanisms is not only for revealing how protein function, but also of great importance to drug discovery, enzyme design and so on.

Although experimental assay is the most reliable approach for analyzing ligand-protein interactions, experimental characterization of every possible ligand-protein complex is daunting due to the enormous costs and time involved. Thus, with the recent increase in protein structure data and protein-ligand interaction datasets, machine-learning-based methods are rapidly evolving to alleviate those pressures. Deep learning architectures such as deep neural networks, which can model complex, non-linear input-output relationships, and perform better feature extraction and pattern recognition from low-level data representations, have been shown to

match or even exceed the performance of the other machine learning methods.

In this research, we applied the deep learning technique to the analysis of ligand-protein interaction. For this purpose, we selected the existing database as training datasets and then established a deep neural network to calculate binding possibility for rapid screening of protein-ligand binding (Figure).

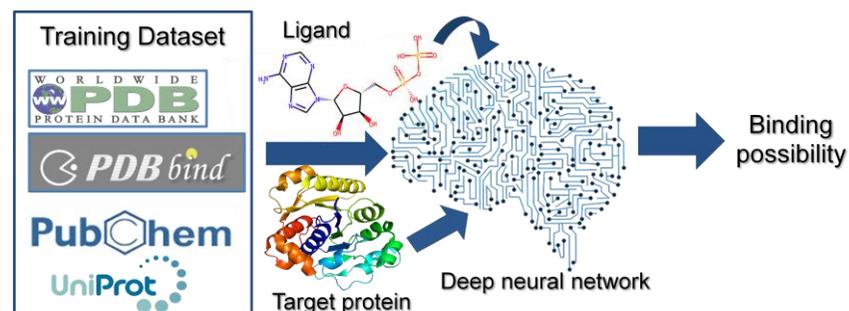


Figure. The sketch of virtual screening with deep learning

FC-II-03

Structural Basis for Thioredoxin isoform-based fine tuning of Ferredoxin–Thioredoxin Reductase activity

○ Linda Juniari¹, Hideaki Tanaka¹, Keisuke Yoshida²,
Toru Hisabori², Genji Kurisu¹

(¹IPR, Osaka University, ²Lab. Chem and Life Sci., Tokyo Inst. Tech.)

Photosynthetic electron transport occurs on the thylakoid membrane of chloroplasts. Ferredoxin (Fd) distributes electrons to several Fd-dependent enzymes including Fd-thioredoxin reductase (FTR). A cascade from Fd to FTR further reduces Thioredoxin (Trx), which tunes the activity of target metabolic enzymes eventually in a light-dependent manner. In this study, we determined the X-ray structure of three electron transfer complexes of FTR and Trx isoform, Trx-*y1*, Trx-*f2*, and Trx-*m2*, as representative examples of three classes of enzymatic activity (**Figure**). Superposition of the FTR structure with/without Trx showed no main chain structural changes upon complex formation. There was no significant

conformational change for single and complexed Trx-*m* structures. Nonetheless, the interface of FTR:Trx complexes displayed significant variation. Comparative analysis of the three structures showed two types of intermolecular interactions, and differential electrostatic potentials of Trx isoforms may be key to isoform-specific interactions.

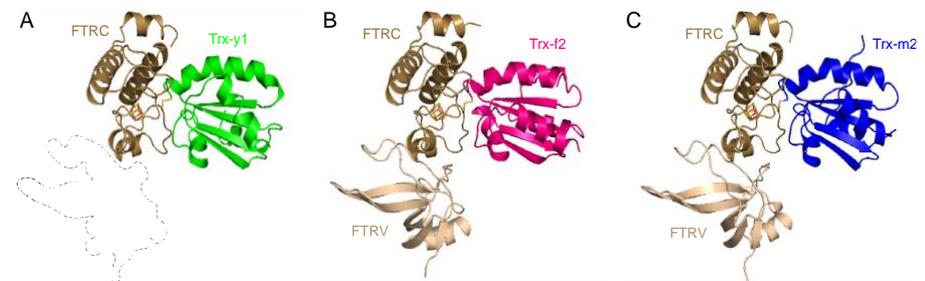


Figure Structures of the three FTR:Trx isoform complexes. **A**, FTR:Trx-*y1*, **B**, FTR:Trx-*f2*, **C**, FTR:Trx-*m2*

新規デカルボキシラーゼ PhcG の結晶化と構造解析

○朝比奈琴音¹、千田美紀²、
千田俊哉²、上村直史³、政井英司³、松浦裕志¹、杉本敬祐¹
(旭川工業高等専門学校¹、KEK 物構研²、長岡技術科学大学³)

植物の細胞壁を構成する成分であるリグニンは、自然界において白色腐朽菌などによって低分子化され、その後、主に細菌によって水と二酸化炭素にまで分解される。低分子リグニン分解細菌 *Sphingobium* sp. SYK-6 株の代謝経路において、フェニルクマラン型化合物 dehydrodiconiferyl alcohol (DCA) の代謝中間体である DCA-C は、脱炭酸されるカルボキシ基の位置により 2 つの立体異性体 (+)-DCA-CC と (-)-DCA-CC を生じるため、(+)-DCA-CC を基質とするデカルボキシラーゼ PhcF と、(-)-DCA-CC を基質とする PhcG が必要となる。キラルを認識する高い特異性の仕組みを解明するため、(-)-DCA-CC を基質として代謝を行うデカルボキシラーゼ PhcG の結晶化を行い、構造解析することを目的とした。

phcG 遺伝子を pET-16b に挿入したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換し PhcG を大量発現した後、Ni Sepharose 6 FastFlow (Ni カラム) で精製を行った。

SDS-PAGE により純度を確認し、ハンギングドロップ蒸気拡散平衡法を用いて結晶化を行ったところ、PEG4000 を沈殿剤とした条件で薄い板状晶が得られた。X 線回折強度測定を行った結果、 2.33 \AA 分解能までのスポットを確認できた。しかしながら、結晶化の再現性が低いため、改めて結晶化条件を見直し、X 線回折強度測定を目指している。

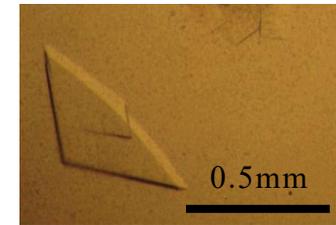


図 1. PhcG の結晶写真

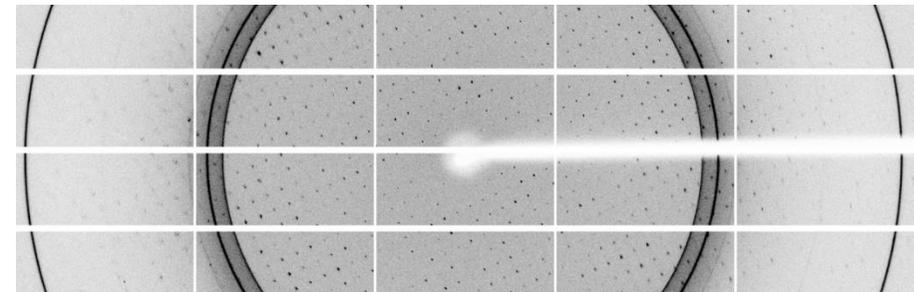


図 2. X 線回折測定で得られた PhcG 単結晶の回折パターン

FC-II-05

クラス IB 大型テルペン合成酵素の基質複合体の結晶構造

○金本壮平¹, 佐藤努², 品田哲朗³, 三木邦夫¹, 深井周也¹, 藤橋雅宏¹
(¹京大・院理, ²新潟大・農, ³阪市大・院理)

テルペンは、イソプレンを基本骨格としテルペン合成酵素により多種多様に環化や修飾された化合物群であり、75000 種以上が知られている。テルペン合成酵素のうち C₂₅ 以上のテルペンの合成を触媒する酵素を大型テルペン合成酵素と呼び、我々は近年 C₃₅ のテルペンの環化を触媒する *B. subtilis* 由来の酵素 BsuTS を同定した¹。テルペン合成酵素には反応様式の違いにより二つの Class が存在し、BsuTS は Class I 型酵素の反応を触媒するが、Class I に共通してみられるモチーフ配列を有していないため新たなサブクラス Class IB に分類される。この BsuTS のホモログである BalTS も Class IB に分類され、C₃₅テルペンの反応を触媒する。

我々は結晶化可能である BalTS の基質非結合型構造²及び基質結合型構造³を決定したが、その基質結合型構造において反応に必要な Mg²⁺を同定できていない点が問題となっている。本研究では新たな結晶化条件を探索し、Mg²⁺を含む酵素基質複合体の構造解析を目指した。

図 1 右は、新たな結晶化条件により得られた結晶の基質認識部位であるが、図 1 左には存在しない金属イオンと考えられる電子密度が見られた。構造精密化を通してこの金属イオンのイオン種の同定と位置の正確な決定を行い、Class IB 合成酵素における反応機構の決定に繋がりたいと考えている。

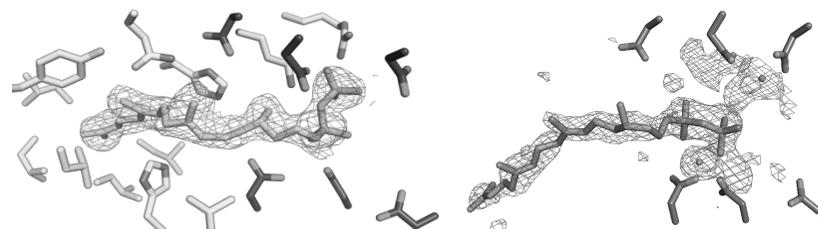


図 1. BalTS の基質認識部位の構造 (左: 金属イオンなし³, 右: 今回)

文献

1. Sato, T. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*(2011), **133**, 9734-7.
2. Fujihashi, M. *et al.*, *Chem. Sci.* (2018), **9**, 3754-8.
3. Stepanova, R. *et al.*, *ACS Chem. Biol.* (2020), **15**, 1517-25.

FC-II-06

高等植物型ヘムオキシゲナーゼの構造・相互作用解析

○東田怜^{1,2}、田中秀明^{1,2}、武藤梨沙¹、張旭紅³、李映昊^{4,5,6}、
小沼剛⁷、池上貴久⁷、右田たい子³、栗栖源嗣^{1,2}

大阪大学蛋白質研究所¹、大阪大学大学院理学研究科²、山口大学 農学部³、
Korea Basic Science Institute⁴、Korea Brain Research Institute⁵、
University of Science and Technology⁶、横浜市立大学 生命医科学研究科⁷

ヘムオキシゲナーゼ (HO)はヘム代謝に関わる酵素で、ヘムを鉄イオン、一酸化炭素、ビリベルジンに分解する。先行研究でHOは、多くの生物種に共通して保存されていることが知られている。既に哺乳類とシアノバクテリア由来HOの構造がX線結晶構造解析により明らかになっており、両者の反応機構や立体構造の基本骨格は類似していることがわかっている。一方で、HOのアミノ酸配列比較から、高等植物由来HOでは酵素活性やヘム配位に重要とされるアミノ酸残基が他種由来HOとは異なる位置に保存されており、ヘム周辺環境が大きく異なると推察されていた。しかし、高等植物由来HOの立体構造が解明されていなかったため、その詳細な議論はできていなかった。また、電

子を供給するフェレドキシン (Fd)がどのようにして高等植物型HOを認識しているのかも不明であった。

本研究ではダイズ (*Glycine max*)由来HO (GmHO)の立体構造をX線結晶構造解析によって1.06 Å分解能で決定し、他種由来HOとの構造比較を行った。その結果、ヘム近傍にある近位 α -helixのC末端側に新規ランダムコイル領域が挿入されることにより、活性部位から外部の溶媒へ繋がる新規トンネルが形成されている事が明らかになった。さらに、活性に重要とされている水素結合ネットワークも高等植物独自の形式であることが確認された。本研究では、NMRとITCによる実験結果からGmHO-Fd間の相互作用様式についても検討を行ったので合わせて報告する。

FC-II-07

バクテリアセルロース合成酵素複合体構成成分 BcsC の構造解析の試み

○佐藤亨¹、大内香予子¹、今井友也²、田島健次³、尾瀬農之¹、姚閔¹
(¹ 北大院生命、² 京大生存研、³ 北大院工)

地球上で最も多く存在する多糖であるセルロースは植物のみならず、様々な生物でも合成されている。特にバクテリアが合成するセルロース(バクテリアセルロース、BC)は、高強度・高純度・高保水性という優れた性質を持ち、新規工業材料や再生医療、診断医学にも大きな進歩をもたらす素材として現在注目されている。

BC の合成・排出は細菌の内膜と外膜を貫通する巨大な膜タンパク質複合体であるターミナルコンプレックス TC によって行われ、酢酸菌の TC は 4 つのサブユニット BcsA,B,C,D から構成される (図 1)。内膜に存在する BcsA・BcsB によって合成されたグルカン鎖が、BcsD を経て、外膜の BcsC から菌体外へと排出されることが考えられている。しかし、BcsC によるセルロース排出は、1 本のグルカン鎖、もしくは数本のグルカン鎖として菌体外に排出されるかは未知であり、BcsC の構造機能相関もまだ明らかになっていない。ここで、本研究は BcsC の構造解析を試みている。

BcsC は複数のテトラトリコペプチドリピート TPR ドメイン (BcsC-TPR) と膜貫通型ドメイン (BcsC-C) から構成されている。BcsC-C がグルカン鎖の排出孔の形成を担うことは推定された。我々は自動誘導法を用いて BcsC-C の可溶化発現に成功し、精製条件を最適化した結果、大量調製 (約 5mg/L 培養) に至った。また結晶化の検討により核形成剤を利用して結晶を得ることができた (図 2)。

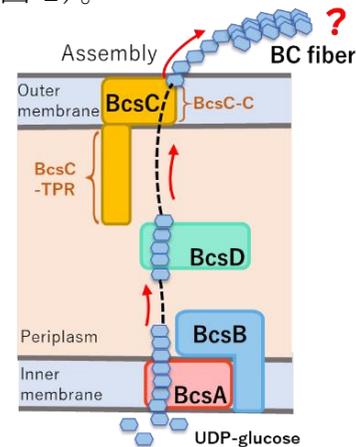


図 1 TC 模式図

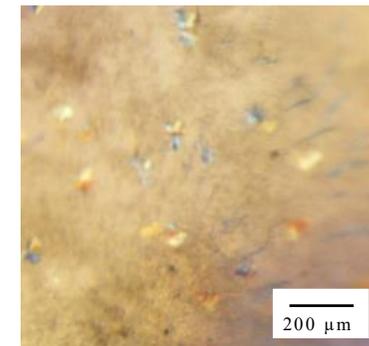


図 2 BcsC-C の結晶

FC-II-08

トマチン 16 位水酸化酵素と 20 位脱水素酵素の X 線結晶構造解析

○宮崎麻紗美¹、藤山敬介²、日野智也²、水谷正治³、秋山遼太³、
加藤純平³、永野真吾²

(¹鳥取大院持続社会・²鳥取大院工・³神戸大院農)

2-オキシグルタル酸 (2OG) と非ヘム鉄を補因子とする 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) は酸化活性種 Fe(IV)=O による水素原子の引き抜きを起点に、水酸化、不飽和化やハロゲン化反応など多様な反応を触媒する。我々はトマトの未熟果実に含まれる苦味成分であるトマチンを代謝する 4 種類の初発酵素トマチン 2OGD に注目している。これらの酵素は 50%以上の相同性を示すにもかかわらず、トマチンの 16 位、20 位、23 位の水酸化や 20 位の脱水素反応をそれぞれ特異的に行う。当研究ではこれらの酵素による位置選択的な酸化メカニズムと脱水素反応のメカニズムを解明することを目的とし、基質結合型トマチン 2OGD の X 線結晶構造解析を進めている。本発表では基質結合型の 16 位水酸化酵素と 20 位脱水素酵素の結晶構造について報告する。

16 位水酸化酵素と 20 位脱水素酵素は、本来の補因子である鉄の代わりに亜鉛と 2OG, トマチンを加えて結晶化し、それぞれ 1.83Å と 1.40 Å の分解能で立体構造を決定した。16 位水

酸化酵素と 20 位脱水素酵素における基質結合様式を比較したところ、トマチンの骨格が反転して結合することで、16 位、20 位それぞれが活性中心に近づき、位置特異的な反応を可能にしていた。また、16 位水酸化酵素ではトマチンと亜鉛との距離は 4.4 Å と 2OGD による水素原子の引き抜きが可能な距離にあり、この酵素では一般的な 2OGD の水酸化反応が進むことが理解できる。一方で 20 位脱水素酵素ではトマチンと亜鉛との距離が 5.0 Å と一般的な水酸化酵素と比較して、わずかに遠く位置している。これにより、酸化活性種による水素引き抜きは可能であるが水酸化反応は起こらないことが示唆された。発表では 20 位脱水素酵素による水素引き抜きと、それに続いて起こる環拡大反応のメカニズムについても結晶構造に基づいて議論したい。

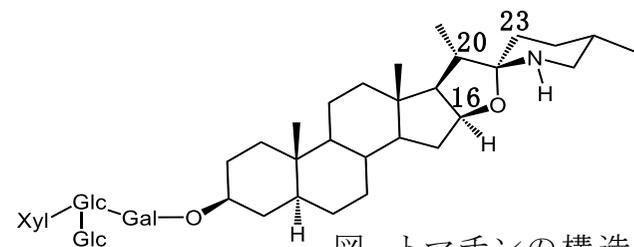


図. トマチンの構造

リッサウイルス P 蛋白質 C 末端ドメインの構造比較

○杉山葵¹, 野間井智¹, 蔣欣欣¹, 南未来¹, 前仲勝実¹,
 伊藤直人², Paul R. Gooley³, Gregory W. Moseley⁴, 姚閔¹, 尾瀬農之^{1,5}
 (¹ 北大・生命科学院, ² 岐阜大院・応用生物, ³ University of Malborne,
⁴ Monash University, ⁵ JST さきがけ)

狂犬病を引き起こすことで知られるリッサウイルス属のウイルスは、自身の遺伝子にコードされている P 蛋白質 (RVP) を用いて宿主の免疫系を阻害する。特に、RVP の C 末端ドメイン (RVP CTD) は、宿主の JAK-STAT シグナル伝達経路を阻害し、ウイルスが自身の増殖に有利な環境を作り出す。しかしながら、RVP CTD による JAK-STAT 阻害機構の詳細は、未だ明らかになっていない。リッサウイルス属のウイルスのうち、本研究では弱毒性の Duvenhage ウイルス P CTD, 強毒性の狂犬病ウイルス西ヶ原株 P CTD の結晶構造解析を行い、他の強毒性ウイルス 3 種の P CTD と構造比較を行った。5 種の RVP CTD の疎水性パッチを比較すると、強毒性の 4 種は 265 番目の残基が W や F の影響で高高く、結晶中において隣接する単量体との相互作用に寄与していた。一方で、相当する残基が 266G である Duvenhage virus P CTD の疎水性

パッチは窪んだ構造をしており、結晶中における分子パッキングには関与していなかった。このことから、疎水性パッチの高さが、他の分子との相互作用に影響し、ウイルスの毒性の違いを生み出す可能性を考えている。
 文献：Aoi Sugiyama *et al.*, *BBRC* **529**, 507 - 512 (2020)

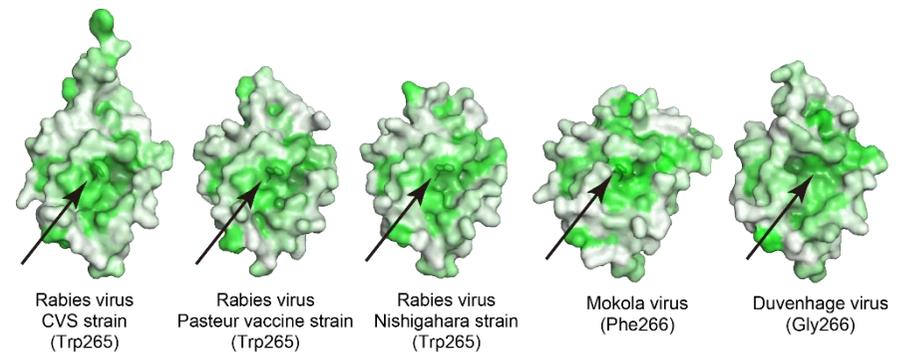


図 1 . 5 種の RVP CTD 疎水性パッチの構造比較

FC-II-10

中性子線結晶構造解析によるタンパク質中のアンモニアの解析

○横溝太一¹, 李龍¹, 安達基泰², 姚閔¹, 尾瀬農之^{1,3}
(¹北大院先端生命, ²QST, ³JST さきがけ)

タンパク質の立体構造において、水素原子の位置は非常に重要であり、酵素の反応機構などを説明する上で欠かせない情報である。しかし、構造生物学において主流である X 線結晶構造解析と CryoEM では、タンパク質中の水素原子の位置を決定することは難しい。

一方、中性子線結晶構造解析では原子の核密度を計算でき、水素原子の精密な位置情報を得ることができる。本研究では、特にアンモニアに注目して、輸送や酵素反応などタンパク質中のアンモニアの挙動を解析することを目的とした。アンモニアは生体内で主な窒素源として使われるが、求核性・塩基性に富み毒性が高いため厳密に制御される必要がある。X 線解析では通常、水と見分けがつかないアンモニアは、中性子線を使用することで区別できると考えた。

タンパク質の中性子線結晶構造解析では 1 mm^3 以上の結晶が必要になるが、一般的にタンパク質の結晶が 1 mm^3 以上に成長することは非常に稀である。我々は試行錯誤の後に、グルタミンアミドトランスフェラーゼ複合体(Gat CAB)の 1 mm^3 以上の

結晶を高確率で得る方法を開発することができた(図1)。ミュンヘン工科大学 BIODIFF を使用した中性子線回折データおよび PF BL5A を使用した X 線回折データを使用して joint-refinement によりアンモニウムイオンと考えられる核密度が得られた(図2)。

また、GatCAB 以外の脱アミノ化酵素に対しても、生成物としてのアンモニアを捉えるため、結晶成長を試みている。

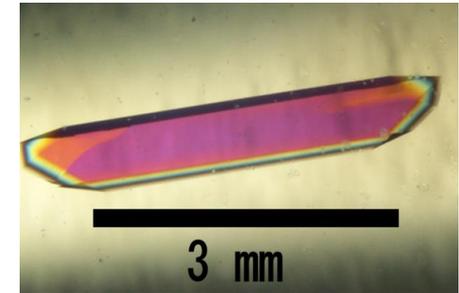


図1 GatCAB の結晶

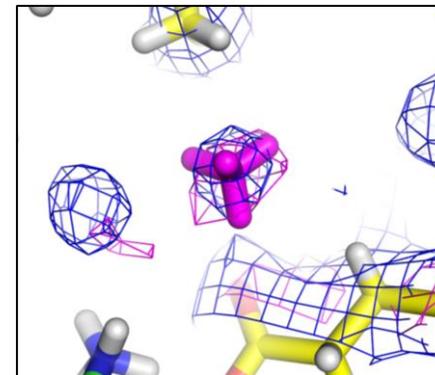


図2 GatCAB 中のアンモニアの電子密度マップ(濃、 2.25 \AA , 1.3σ)及び核密度マップ(薄、 3.0 \AA , 1.9σ) アンモニウムイオンを stick model で記載した。

FC-II-11

J-PARC, MLF 単結晶中性子回折計 iBIX の現状

○日下勝弘¹、山田太郎¹、矢野直峰¹、細谷孝明¹、
大原高志²、田中伊知朗¹
(¹茨城大, iFRC・²JAEA, J-PARC センター)

中性子回折法は X 線回折法との相補的な利用により水素（重水素）原子を含む全原子の位置情報を得ることができる生体高分子にとって強力な手法である。茨城県生命物質構造解析装置 iBIX は生体高分子の高効率な中性子構造解析を実現するため J-PARC の物質・生命科学実験施設（MLF）に開発・建設された飛行時間型単結晶中性子回折計である（図 1）。現状では、J-PARC の加速器出力が安定的に 600kW（最大：1MW）で運転されており、生体高分子の単結晶試料サイズが 1~2mm³ であれば、標準的な結晶系の場合、約 7 日程度で中性子構造解析が可能なフルデータの測定が可能となっている。本年度までに検出器が 4 台増強され（30 台→34 台）、その調整も終了し、ユーザーへの供用が開始されている。また、加速器出力が増強され単位時間当たりを検出される中性子のデータ量が増えることに対応するべく、昨年度から本年度にかけてデータ集積システムの更新を進めてお

り、J-PARC の 1MW フルパワー運転への準備も整っている。本発表では、iBIX の基本性能と現状、および中性子の特徴を生かして得られた最近の成果（タンパク質および合成高分子）等について報告する。

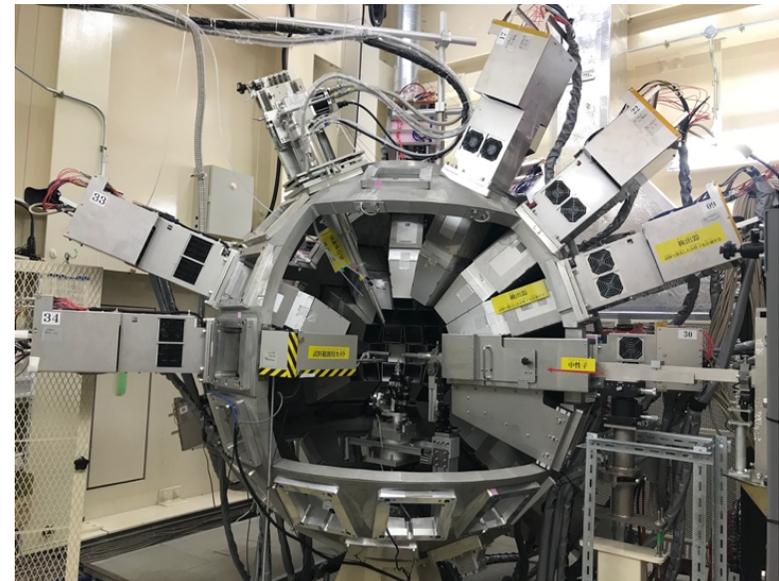


図 1. 茨城県生命物質構造解析装置 iBIX の回折計

FC-II-12

飛行時間法により収集された中性子回折データ処理ソフト STARGazer の現状

○ 矢野直峰¹, 山田太郎¹, 細谷孝明^{1,2}, 大原高志³, 田中伊知朗^{1,2}, 日下勝弘¹
(¹茨大フロンティア・²茨大工・³原研 J-PARC センター)

茨城県生命物質構造解析装置 iBIX は飛行時間法により波長に幅のある中性子を用いて、単結晶の中性子回折データを測定する装置である(図 1)。主にタンパク質中の水素原子やプロトンの位置を決定し、反応機構を解明するために利用される。我々は中性子回折データ処理ソフト STARGazer をより使いやすくするとともに積分強度の精度を向上させるために開発を進めてきた。STARGazer は仮想化ソフト VirtualBox を用いることで、Window, Linux, Mac で使用することが出来る。インストールに必要なファイルとマニュアルはユーザーに配布している。STARGazer はデータ処理パートとデータ可視化パートに分かれている。データ処理パートでは GUI を用いて入出力ファイル名やフォルダ名を指定し、計算を実行出来る。データ可視化パートでは回折データ、ピークサーチの結果、UB 行列から予想したピーク位置を表示出来ると共に積分範囲の決定に用いる。

今後、J-PARC の加速器出力が現在の 600kw から最大の 1000kw に増加することで、ビーム強度は 1.67 倍になる。より格子定数の長い結晶での中性子回折データ測定が可能になる

ことが予想される。iBIX は単純格子とみなした時の格子長の 1 辺が 135 Å 以下であれば、回折斑点が重ならず測定出来るように設計されている。135 Å を超える結晶の場合、測定波長や散乱角 2θ によっては回折斑点が重なる問題が生じる。そこで、重なった回折斑点でも強度決定出来る様に積分方法の開発を現在進めている。

ユーザーに対しては、ヒストグラム化から強度データ出力までの手順をまとめたマニュアルを作成し、ソフトと共に配布している。講演では STARGazer の現状について報告する。

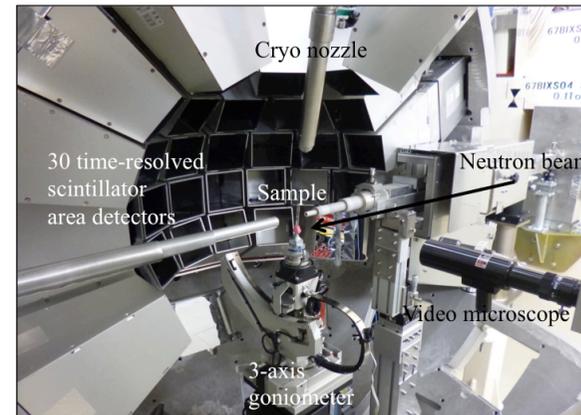


図 1 iBIX の外観

FC-II-13

iBIX を用いた細菌由来ノイラミニダーゼの中性子結晶構造解析

○山田 太郎、矢野 直峰、日下勝弘
(茨城大学 iFRC)

ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* LT2 株由来ノイラミニダーゼはムチンに存在する糖鎖末端のシアル酸の α -2,3 グリコシド結合を加水分解する糖鎖分解酵素である。この酵素は Garman らにより最高 1.0 Å 分解能の構造解析がなされている。その活性部位は B 型インフルエンザウイルス由来ノイラミニダーゼと共通点が多く、特に活性に必要と考えられているアミノ酸残基は保存されている。活性部位にある Asp はグリコシド結合の酸素にプロトンを供給することでカルボカチオン中間体の生成を促すと考えられている。そして Glu と水素結合を形成する Tyr の水酸基がカルボカチオン中間体を安定化するという反応機構が提唱されている。これらの重要な残基のプロトン化状態を中性子結晶構造解析で決定することで反応機構について新たな知見が得られるのではないかと考えた。今回、試料入手が容易なネズミチフス菌由来のノイラミニダーゼを用いて中性子・X 線結晶構造解析を行った。

体積 2 mm³ 程度の結晶を作成し、窒素気流下で凍結した。600 kW で稼働する J-PARC MLF BL03 iBIX を用いて飛行時間型中性子回折実験を行った。41 結晶方位についてそれぞれ 5 時間程度波長帯 1.5 – 5.5 Å のパルス中性子の露光を行い、最終的に 1.5 Å 分解能回折データを得た。同様の結晶化条件で得られた結晶を使用して KEK PF BL-17A にて 1 Å 分解能の X 線回折データを取得した。現在、これらのデータを使用して XN 結合結晶構造解析を行っている。中性子回折の分解能が比較的高いため、初期段階で相当数の水素原子が中性子散乱長密度図上で確認されている。現在、構造精密化を行っているところであるが、現時点での結果をもとに、興味のもたれるアミノ酸残基のプロトン化状態や考えられる反応機構について発表する。

FC-II-14

フィトクロム発色団合成酵素 HY2 の結晶大型化に向けて

○杉島 正一¹、和田 啓²、齋藤 夏希³、海野 昌喜⁴、福山 恵一⁵、山本 健¹
(¹久留米大・医、²宮崎大・医、³茨城大・工、⁴茨城大院・理工、⁵阪大院理)

フェレドキシン依存性ビリル還元酵素(FDBR)はヘム代謝物であるビリベルジン(BV)を還元し、光合成や光受容に用いられる様々なビリル色素を合成する一群のファミリーである[1]。FDBRの一つであるフィトクロモビリル(PΦB)合成酵素 HY2 は、植物における主要な赤色光受容体であるフィトクロム中に見られる色素である PΦB を BV から合成する (図 1)。この反応で、BV の A 環が還元されることにより、アポ型フィトクロムは PΦB と共有結合し、ホロ型となることができる。

我々は以前に FDBR の一種である PcyA の BV 結合型について中性子解析に取り組み、BV や触媒残基のプロトン化状態、タンパク質に結合したヒドロニウムイオンの観察などに成功した[2]。また、昨年の本学会にて HY2 の BV 結合型結晶の X 線結晶構造解析結果について報告している。HY2 と PcyA では BV の結合様式やコンフォメーションが全く異なっていた[3]。還元反応は水素と電子が関わる反応で、PcyA と HY2 の水

素原子を含んだ立体構造の比較は FDBR 全体の反応機構を理解するうえで有用と考えられる。そこで HY2 の中性子解析に向けて結晶の大型化に取り組んでいる。

本発表では大型結晶作製ストラテジーの一環として、クリスタルコンタクトの改善や分子間ジスルフィド結合の解消を目指して導入した HY2 の部位特異的変異体の結晶構造や分子挙動について報告する。

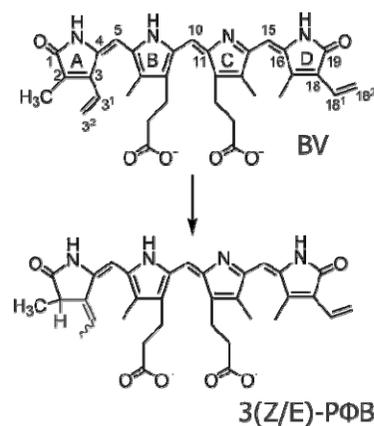


図 1 PΦB 合成酵素による
BV の還元反応

<参考文献>

- [1] Sugishima M *et al.* *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2019) 59, 73-80
- [2] Unno M *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* (2015) 137, 5452-5460
- [3] Sugishima M *et al.* *J. Biol. Chem.* (2020) 295, 771-782

FC-II-15

ニワトリ卵白リゾチームを使った，重水内変性/再生試料の 中性子線結晶構造解析

○喜田 昭子、森本 幸生
(京大複合研)

タンパク質の中性子線結晶回折実験を行う上で，タンパク質の水素/重水素交換（重水素化）は，回折パターンの S/N 比向上のためには必須の手段である．重水内で発現・精製して調製される場合もあるが，重水は高価であるため，一般的には重水素化タンパク質結晶は，主として緩衝溶液や結晶化試薬に重水素化試薬を用いたり，または結晶を重水素化母液に浸漬する方法で調製されている．われわれは，重水素化効率を上げるために，重水内でタンパク質を変性させ，タンパク質内部に重水素を取り込ませてから構造を巻き戻す方法でタンパク質内部の重水素化を行い，効率の良いタンパク質重水素化法を模索してきた．モデルタンパク質として高品質で均一な標品が容易に得られるニワトリ卵白リゾチームを用い，重水内で酸，塩基，および熱による変性と構造巻き戻しを行った時に，それぞれコントロール試料と比べて重水素化率が上がることで，また変性方法によって重水素

化数が違うことを示した[1]．これは，構造変化を起こす場所がそれぞれの変性操作によって違うことを示している．各変性要因毎の構造変化部位を調べるため，これまでに酸性変性/再生結晶，塩基性変性/再生結晶の中性子線回折実験を進めてきたが，コントロール結晶の中性子線回折実験の結果[2]と比較することにより，重水内変性/再生によって増加した重水素位置を決定することが可能になった．ここではこれまでに行った，酸性変性/再生結晶，塩基性変性/再生結晶の中性子線回折実験について報告する．

[1] Kita A. and Morimoto Y., *Mol. Biotechnol.*, **58**, 130-136 (2016).

[2] Kita A. and Morimoto Y., *J. Appl. Cryst.*, **53**, 837-840 (2020).