13:00〜14:50 フラッシュトーク（C会場）

12:45〜13:00 接続テスト

13:00〜13:50 座長：杉島 正一（久留米大学）

FC-II-16　X線結晶構造解析による赤痢菌エフェクターIpaH1.4及び2.5の 基質認識機構の解析
○平木慶人・西出旭・高木賢治・Kim Minsoo・水島恒裕（兵県大院生命理・京大白眉・津山高専）

FC-II-17　Characterization and ligand-binding manner of EHEP and BGL for producing biofuel from brown algae
○Xiaomei Sun・Yuxin Ye1・Naofumi Sakurai・Koji Kato・Jian Yu1・Keizo Yuasa・Akihiko Tsuji・Min Yao
（Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido university・Graduate School of Bioscience and Bioindustry, Tokushima University）

FC-II-18　AmpC β-ラクタマーゼの変異と酵素触媒効率に関する構造生物学的研究
○河合聡人・土井洋平 （藤田医大医）

FC-II-19　昆虫ステロイドホルモン生合成に必要なグルタチオンS-転移酵素Noppera-boの阻害剤探索
○海老原佳奈・稲葉和恵・小祝孝太郎・吉野龍ノ介・広川貴次・今村理世・小島宏建・岡部隆義・井上英史・藤川雄太・佐久間 知佐子・嘉糠洋陸・湯本史明・千田俊哉・丹羽隆介
（筑波大 生命環境・高エネ研 物構研 構造生物・筑波大 医学医療・産総研 創薬分子プロファイリング研究セ・東大 創薬機構・東京薬大 生命科学・慈恵医大 熱帯医学・筑波大 TARAセ）

FC-II-20　自然免疫に関わるシグナル分子TIFA の構造学的研究
○中村照也・橋川智恵・岡部航太郎・横手祐哉・池鯉鮒麻美・藤間祥子・中村成志・松尾美保子・上仮屋美歩・岡本良成・合田仁・秋山泰身・仙波憲太郎・池水信二・大塚雅巳・井上純一郎・山縣ゆり子
（熊本大院先導機構・熊本大院薬・熊本大薬・奈良先端大先端科学技術・東大医科研・理研生命医科学研究センター・早稲田大理工学術院・尚絅大）

13:50〜14:00 接続テスト

14:00〜14:50 座長：長谷川 和也（高輝度光科学研究センター）

FC-II-21　「モジュラー折り紙プラスキラリティ」の技法と知的玩具（i-gami）で制作するウイルスカプシド模型
八十嶋裕・◯八十嶋章雄（SSDS　Symmetric）

FC-II-22　プレートスキャン法を用いた[NiFe]ヒドロゲナーゼの常温構造解析
◯今西隆浩・奥村英夫・仲村勇樹・熊坂崇・松浦滉明・樋口芳樹
（兵庫県立大学大学院生命理学研究科・高輝度光科学研究センター・理化学研究所放射光科学研究センター）

FC-II-23　迅速に結晶構造を決定するための戦略
◯千田美紀・千田俊哉（高エネ機構）

FC-II-24　深層学習を用いた結晶化プレート内のタンパク質結晶の認識
◯篠田晃・山田 悠介・加藤 龍一・千田 俊哉（高エネルギー加速器研究機構）

FC-II-25　放射光ビームラインにおける顕微分光の利用
◯引田理英・山田悠介・平木雅彦・松垣直宏・千田俊哉（高エネ機構）

FC-II-16

X線結晶構造解析による赤痢菌エフェクターIpaH1.4及び2.5の基質認識機構の解析

○平木慶人[1], 西出旭[2], 高木賢治[3], Kim Minsoo[2], 水島恒裕[1]
（兵県大院生命理[1], 京大白眉[2], 津山高専[3]）

赤痢菌などの病原性細菌はエフェクターと呼ばれる毒性のタンパク質を細胞内に分泌することで、宿主の免疫系を抑制し、感染を確立している。赤痢菌のエフェクターであるIpaH1.4及び2.5は宿主のNF-κBシグナル伝達経路で働くLUBAC(HOIP,HOIL-1L,SHARPIN)複合体を標的としている。IpaH1.4及び2.5はユビキチンリガーゼ活性を持ち、LUBACのサブユニットであるHOIPにユビキチンを付加し、プロテアソーム依存的な分解に導くことで、NF-κBシグナルを抑制することが報告されている（図1）。しかし、IpaH1.4及び2.5によるLUBACの詳細な認識機構は不明であった。そこで、本研究ではX線結晶構造解析と生化学的な解析により IpaH1.4 及び 2.5 によるLUBAC複合体の認識機構の解明を目的とした。

IpaH1.4 及び 2.5 の欠失変異体を用いた相互作用解析により、それぞれの基質認識領域を同定した。さらに、IpaH1.4 及び 2.5 基質認識領域の X 線結晶構造解析を行い、それぞれ分解能 1.4Å,3.4Åで立体構造を決定した。IpaH1.4 及び 2.5 基質認識領域の構造を基に立体構造既知の IpaH3 及び IpaH9.8 の基質認識領域との比較により、結合に必要なアミノ酸残基を予測し、部位特異的変異体を用いた相互作用解析を行った。その結果、IpaH1.4 及び 2.5 の基質認識に関わるアミノ酸残基を明らかにした。

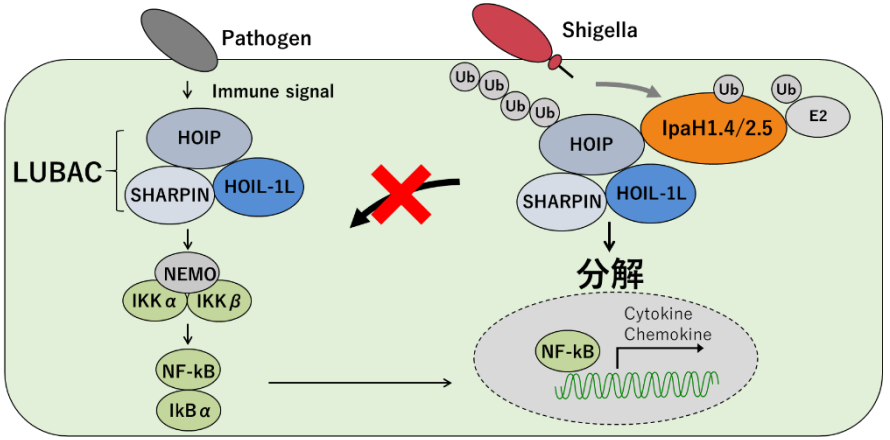


図1: 赤痢菌はIpaH1.4 及び 2.5 を分泌しLUBAC複合体を分解することでNF-κBシグナルを抑制している。

FC-II-17

Characterization and ligand-binding manner of EHEP and BGL for producing biofuel from brown algae

○Xiaomei Sun[1], Yuxin Ye[1], Naofumi Sakurai[1], Koji Kato[1], Jian Yu[1], Keizo Yuasa[2], Akihiko Tsuji[2], Min Yao[1]

(1.Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido university; 2. Graduate School of Bioscience and Bioindustry, Tokushima University)

The world is meeting the serious challenge of the energy crisis, which prompted searching for renewable energy resource. Brown algae are ideal feedstocks for producing biofuels, the promising renewable resource. The sea hare *Aplysia kurodai* consumes brown algae as a staple food, utilizing β-glucosidase (BGL) to catalyze the hydrolysis of laminarin, the major polysaccharide in brown algae, to produce glucose, making it an excellent model for investigating the biofuel production process. However, phlorotannins, abundant in brown algae, inhibit BGL activity, which cause the a serious problem in biofuel production from brown algae. Interestingly, Eisenia hydrolysis enhancing protein (EHEP) was identified in the digestive fluid of *Aplysia kurodai* and was found to protect BGL from phlorotannin inhibition by binding with phlorotannin and precipitating (A. Tsuji, *et al*., *Plos one*, 12, e0170669 (2017). Hence, EHEP and BGL have a high potential for the application in the biofuel industry. Understanding the binding manner of phlorotannin with EHEP and BGL will give us valuable information to utilize them in the industry.

In this study, the apo and tannic acid-binding structures were determined. The structures reveal that EHEP consisted of three chitin-binding domains linked by two long loops and Tannic acid binds at the center of EHEP by hydrophobic interactions and hydrogen bonds. Furthermore, the structure of BGL was determined and the docking analysis of tannic acid with BGL was performed. Collectively, we proposed the mechanism of EHEP protect BGL from inhibition.

FC-II-18

AmpC β-ラクタマーゼの変異と酵素触媒効率に関する構造生物学的研究

○河合 聡人、土井 洋平
（藤田医科大学 医学部 微生物学講座）

AmpC β-ラクタマーゼを産生する細菌は、ペニシリン系、セフェム系およびモノバクタム系などβ-ラクタム系抗菌薬に対する薬剤耐性を獲得している。近年β-ラクタマーゼ阻害剤の開発が進み、既存のβ-ラクタム薬とβ-ラクタマーゼ阻害剤の組み合わせで AmpC β-ラクタマーゼ産生細菌の治療が行われるようになったが、これにも耐性を示す細菌も増えてきた。最近、我々は第３世代セファロスポリンであるセフタジジムとβ-ラクタマーゼ阻害剤であるアビバクタムの合剤に対して耐性を示す *Enterobacter cloacae* Ent385 臨床分離株を単離した。そして、この細菌の染色体にコードされる AmpC β-ラクタマーゼ（$AmpC^{Ent385}$）には A294、P295 の欠失が生じていて、これが主な要因で抗菌薬-β-ラクタマーゼ阻害剤 合剤への耐性を獲得していることを突き止めた [1]。この $AmpC^{Ent385}$ の酵素学的な解析を行うと、アミノ酸欠失のない酵素と比べ、アビバクタムの阻害効果は同等であった。一方、セフタジジムに対しては、K_m 値は変わらないものの、k_{cat} 値が 1,000 倍高くなっていた [1]。本発表ではこのセフタジジムの分解活性が向上した要因を X 線結晶構造解析と分子動力学計算を用いて解析した結果に基づき考察する。

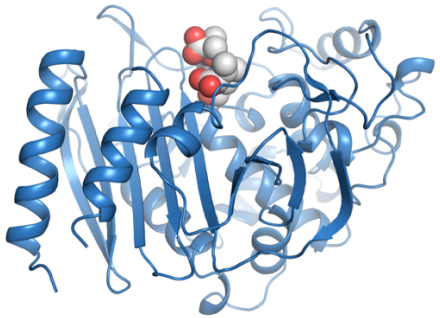


図 $AmpC^{Ent385}$ とセフタジジムの複合体構造

(1) Kawai A., *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 64, e00198-20, 2020

FC-II-19

昆虫ステロイドホルモン生合成に必要な グルタチオン *S*-転移酵素 Noppera-bo の阻害剤探索

○海老原佳奈[1]・稲葉和恵[1]・小祝孝太郎[2]・吉野龍ノ介[3]・広川貴次[4]・今村理世[5]・小島宏建[5]・岡部隆義[5]・井上英史[6]・藤川雄太[6]・佐久間 知佐子[7]・嘉糠洋陸[7]・湯本史明[2]・千田俊哉[2]・丹羽隆介[2,8]

([1]筑波大・生命環境・[2]高エネ研・物構研・構造生物・[3]筑波大・医学医療・[4]産総研・創薬分子プロファイリング研究セ・[5]東大・創薬機構・[6]東京薬大・生命科学・[7]慈恵医大・熱帯医学・[8]筑波大・TARA セ)

昆虫の発生・生理の調節に重要なステロイドホルモンであるエクジステロイドは、コレステロールを原材料として複数の酵素群により生合成される。過去 15 年の間に、エクジステロイド生合成に関与する一連の酵素群が同定された。本研究では、エクシステロイド生合成酵素の一つである Noppera-bo（Nobo）に着目した（Enya et al. *Sci. Rep.* 2014）。Nobo はグルタチオン *S*-転移酵素(GST)ファミリーに属しており、ハエ目にのみ保存されていることから、限定された昆虫群に特異的な殺虫剤開発において好適であると考えた。

まず、ネッタイシマカ *Aedes aegypti* の Nobo（AeNobo）を用いて、AeNobo の活性を抑制する化合物の阻害剤探索を行った。その結果、IC_{50}(酵素活性を 50%阻害濃度)が 10μM 以下のフラボノイド骨格を持つ化合物が複数得られた。次に、阻害化合物と Nobo との結合様式を明らかにするために、X 線結晶構造解析を行い、三種の阻害化合物との複合体構造を明らかにした。得られた複合体構造を基に、類縁化合物を用いて、構造活性相関を評価した。その結果、①AeNobo-E113 との水素結合②化合物の平面性が阻害活性において重要であることを明らかにした。さらに、蚊を用いた殺虫試験の結果、これらの阻害化合物は蚊に対して殺虫効果を発揮することを明らかにした。

今後は、得られた知見を基に、より高い Nobo 阻害活性・殺虫活性を示す阻害化合物のデザインを目指す。

FC-II-20

自然免疫に関わるシグナル分子 TIFA の構造学的研究

○中村照也[1,2]、橋川智恵[2]、岡部航太郎[2]、横手祐哉[3]、池鯉鮒麻美[2]、
藤間祥子[4]、中村成志[3]、松尾美保子[1]、上仮屋美歩[3]、岡本良成[2]、
合田仁[5]、秋山泰身[6]、仙波憲太郎[7]、池水信二[2]、大塚雅巳[2]、井上純一郎[5]、山縣ゆり子[2,8]
([1]熊本大院先導機構、[2]熊本大院薬、[3]熊本大薬、[4]奈良先端大先端科学技術、[5]東大医科研、
[6]理研生命医科学研究センター、[7]早稲田大理工学術院、[8]尚絅大)

シグナル分子 TIFA は，TNF 受容体のみならず Toll 様/IL-1 受容体の下流でも働くユニークなシグナル分子 TRAF6 の相互作用因子として同定された．その後，細菌代謝産物である ADP-heptose がキナーゼ ALPK1 を活性化して TIFA のリン酸化を引き起こし，リン酸化依存的に TIFA オリゴマーが形成されること，さらに TIFA オリゴマーが TRAF6 と複合体を形成することで，TRAF6 が自身のポリユビキチン化を引き起こして NF-κB 活性化シグナルを伝えることが新たに報告されて以来，TIFA は細菌感染に対する新規自然免疫の重要なシグナル分子として注目されている．

本研究では，TIFA と TRAF6 の複合体形成からはじまるシグナル伝達機構の構造学的基盤を明らかにすることを目的に TIFA の構造学的研究を行った．TIFA の X 線結晶構造を 2.6 Å 分解能で決定し，さらに X 線小角散乱解析を行うことで，TIFA はこれまでの報告通りホモ二量体構造を形成していることを確認した．また，TRAF6 との結合に重要な TIFA の会合状態を議論するため，TIFA のリン酸化を受ける Thr を Asp もしくは Glu に変異させたリン酸化ミミック TIFA の結晶構造を 3.05 Å と 2.9 Å 分解能でそれぞれ決定した．これら結晶構造から得られた TIFA 分子間の相互作用様式に加え，ゲルろ過実験により TIFA (野生型および変異体) と TRAF6 との複合体形成を調べることで，TIFA-TRAF6 複合体モデルを提案した[1]．

1) T. Nakamura *et al.*: *Sci. Rep.* **10**, 5152 (2020)

FC-II-21

「モジュラー折り紙プラスキラリティ」の技法と知的玩具（i-gami）で制作するウイルスカプシド模型

八十嶋裕、○八十嶋章雄（SSDS　Symmetric）

「モジュラー折り紙プラスキラリティ」は、一言で説明すると、2次元のシートを組み合わせて、3次元の袋状の構造物を形成する技術である。この技術の実用領域を調べる中で、二十面体ウイルスのカプシドの模型が制作できることに気がついた。

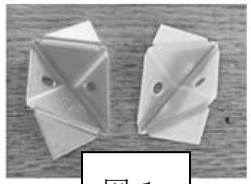


図１

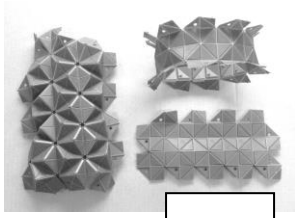


図２

図１．　Ichigami と呼ばれる、「i-gami」のモジュールのひとつ。A 折り（右上がり谷折り）B 折り（左上がり谷折り）のキラルな対の折り方を組み合わせる。

図２．（モジュールで曲面を充填する＞三角錐で充填（左）半角柱で（右上）４枚で平面（右下）

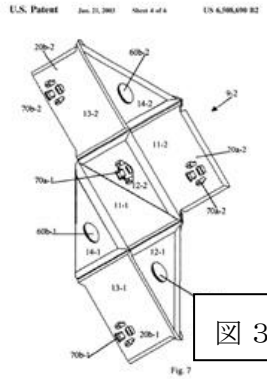


図３

図３「i-gami」中の「ichigami」の接続に関する特許資料

３枚のモジュールで三角錐を構成し、これを「ゴールドバーグの多面体」を構成する方法に従って制作すると、モジュラー折り紙でウイルスカプシドをよく近似できることが判明した。

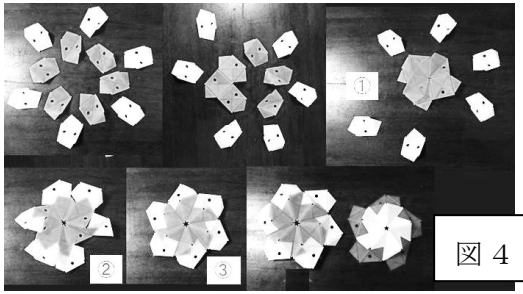
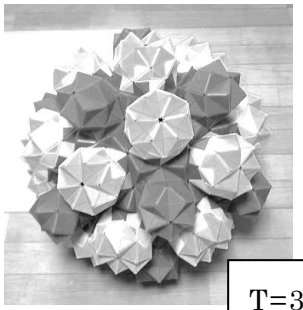
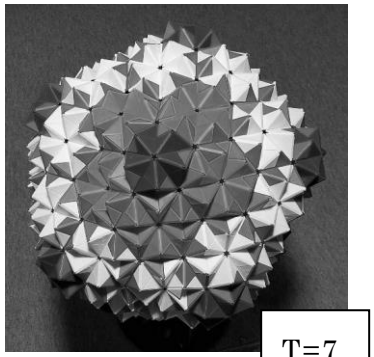


図４



T=3

三角錐で５量体・６量体のサブユニットを制作し（図４）、「ゴールドバーグの多面体」で組み立てると T=1・３・４・７のカプシドの画像をほぼそのまま表現できた。このことは、「モジュラー折り紙プラスキラリティ」を使って、制作されたこれらのウイルスカプシド模型のモジュールを構成する規則の中に、高次のタンパク質立体構造に関わる情報が含まれている可能性があると考える。



T=7

FC-II-22

プレートスキャン法を用いた[NiFe]ヒドロゲナーゼの常温構造解析

○今西 隆浩、奥村英夫、仲村勇樹、熊坂崇、松浦滉明、樋口芳樹
（兵庫県立大学大学院生命理学研究科、高輝度光科学研究センター、理化学研究所放射光科学研究センター）

[NiFe]ヒドロゲナーゼは水素の分解および合成を高効率に触媒する金属酵素である。その高効率な水素分解能力は新規のバイオ燃料電池の素材として注目されてきた。しかし、[NiFe]ヒドロゲナーゼは酸素存在下で不活性化しやすいことが、電極触媒として応用利用する上での大きな障壁となっていた。

近年、*Citrobacter* sp. S-77 株由来の[NiFe]ヒドロゲナーゼ（S77-Hyd）のように，酸素存在下でも酵素活性を維持できる酸素耐性酵素が見つかってきている。本酵素は生体内では 4 量体で存在するが、このうちヒドロゲナーゼ活性に必須であるのは大サブユニットと小サブユニットから成るヘテロ 2 量体である。大サブユニットは Ni-Fe 活性中心を、小サブユニットは電子伝達を担う 3 個の鉄硫黄クラスターを持つ。S77-Hyd の結晶構造はクライオ条件において様々な酸化還元状態で決定されており、その酸素耐性の分子機構は活性部位に最近接の鉄硫黄クラスターの可逆的な構造変化により説明されている。

今回、我々はより生理的条件に近い常温での構造を調べるため，プレートスキャン法を用いた常温構造解析を行った。100 個の結晶から約 10° ずつ回折データセットを取得し、マージすることで，分解能 1.8 Å で空気酸化型の常温構造を決定した。現在，クライオ条件で得られた構造との詳細な比較を行っている。

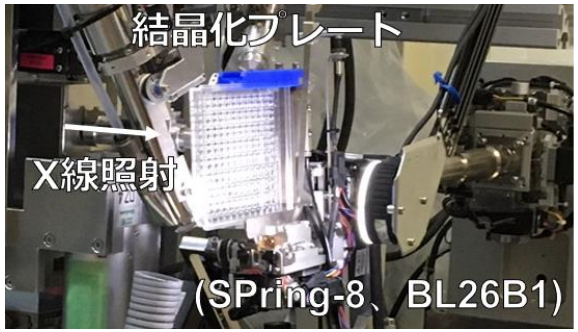


図１． プレートスキャンのセッティング
各結晶について振動範囲：- 9.0 - + 3.0 °,
振動幅：0.1°でデータ収集

FC-II-23

迅速に結晶構造を決定するための戦略

○千田美紀、千田俊哉
（高エネルギー加速器研究機構）

X 線結晶構造解析の最大のメリットは、結晶さえあれば迅速な構造決定が可能な点である。我々のグループでは BINDS プロジェクトをはじめとする共同研究で結晶化や位相決定の多くの経験を蓄積してきており、これらの経験は新たな結晶構造解析を行う際に大いに役立っている。本発表では、迅速な結晶構造決定のために実践しているストラテジーについて紹介したい。

タンパク質の結晶化は、ロボットの発達により初心者であっても気軽に試すことができるようになった。しかし、初期スクリーニングで得られた結晶をそのまま使って解析が完了することは稀であり、結晶化条件やクライオ条件などの最適化が必要なことが多い(1)。これらの条件検討は、基本的には今までの経験に基づき確立した手順で行っているが、各サンプルの状況に応じて変更している。条件を振った結晶の性質を評価し良い条件を選んでいくためには、結晶の見た目だけではなく実際に X 線を当てて判断することが有効であるが、その際には全自動測定が便利である。

最近では、既に PDB に登録されている構造をモデルとした分子置換法で位相決定できるケースが増えている。しかしながら、分子置換法で得られたモデルバイアスを含む電子密度マップからモデルを少しずつ修正してモデル構築を完了させるのは大変手間がかかる。その際、低エネルギーX 線で測定した native SAD データ(2)があれば、MR-native SAD 法により実験的な位相で計算した電子密度マップが得られ、プログラムを用いて半自動で多くの部分のモデルを組むことが可能になる。MR-native SAD 法は迅速なモデル構築のために非常に有効であり、多くのケースに適用できると考えている。

References

1. Senda *et al.* (2016) *Crystal growth & Design* 16, 1565.
2. Liebschner *et al.* (2016) *Acta Crystallogr. D* 72, 728.

FC-II-24

深層学習を用いた結晶化プレート内のタンパク質結晶の認識

○篠田　晃，山田 悠介，加藤 龍一，千田 俊哉
（高エネ機構，物構研，構造生物）

タンパク質の結晶化スクリーニングでは結晶化プレート内に結晶化条件の異なる多くのドロップを作成し、その中から結晶が成長する条件を見つけ出す。より多くの結晶化条件を試す事で結晶化の確率は上がるが、大量の結晶化ドロップを日々顕微鏡で観察するには大変な労力を要する。本研究所では全自動結晶化及び観察システム(PXS)を運用している。また PXS を用いて結晶化プレート内のドロップを定期的に自動で撮影しデータベース(PXS-PReMo)に蓄積している。これまで PXS-PReMo の web インターフェイスを通じてユーザーが日々結晶の確認を目で行ってきた。しかし、累積 100 万枚を超える画像を充分に確認出来ているとは言えない。

そこで、ユーザーの目に代わる方法としてソフトウェアを用いた結晶の認識手法の開発を開始した。結晶には様々な形があり従来の画像処理だけでは充分に結晶を認識する事が難しかったため、深層学習を取り入れることを試みた。まず、結晶化ドロップ内の結晶の有無を判別する事を目的とし、クラス分類(Classification)を行う深層学習のネットワークに 1 万枚を超えるサムネイル画像を学習させ高精度な予測結果を得た。次に、フルサイズの画像でのクラス分類を試みたが精度がサムネイル画像に比べて低下した。そこで領域予測(Segmentation)を行う深層学習のネットワークの利用を試みた。領域予測では学習データの作成に高いコストがかかるという課題がある。効率的な学習データの作成手法の確立と、領域予測の深層学習ネットワークの学習結果について最新の研究を紹介する。

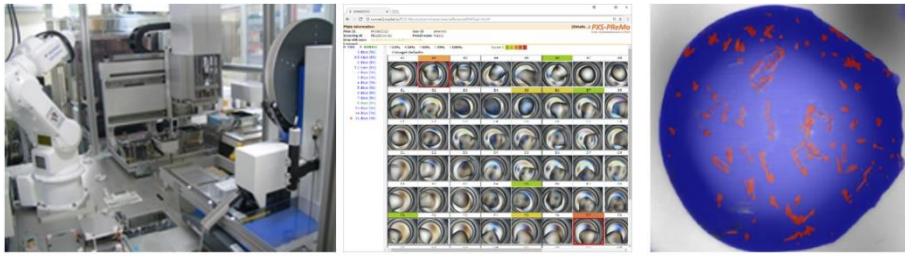


図 1 PXS および PXS-PReMo および機械学習の認識結果

FC-II-25

放射光ビームラインにおける顕微分光の利用

○引田理英、山田悠介、平木雅彦、松垣直宏、千田俊哉
（高エネ機構、物構研、構造生物学研究センター）

タンパク質の機能メカニズム解析研究において、タンパク質の分子・原子レベルでの立体構造は不可欠であり、高輝度放射光源を利用したX線結晶構造解析法は、タンパク質の立体構造を原子レベルで解明するための最も強力なツールとして長く利用されている。一方、タンパク質の動的な構造情報は、振動分光法を利用することで得ることができ、この方法によれば、タンパク質を構成する原子の化学的諸性質を決める化学結合を精密に解析することができる。近年では、X線結晶構造解析法と振動分光法を組み合わせ、これら2つの相補性を利用した研究が展開されている。KEK-PFのタンパク質結晶構造解析ビームラインであるAR-NW12Aでは、これまで行っていたタンパク質結晶のX線回折実験と併せて、レーザー光や白色光源を利用したタンパク質結晶の分光解析が可能な装置の開発及び環境整備を行ってきた。

これまでに、分光実験専用のレーザーブースが、AR-NW12Aに建設され、X線を利用しないオフライン紫外可視顕微分光装置やラマン分光装置の開発を行い、現在のところ、ユーザー利用に供している。本装置は、結晶に照射する光を100 μm程度まで集光することができ、比較的小さい結晶まで測定が可能となっている。また、室温・低温のどちらでも測定が可能である。しかし、スペクトル測定の際には、結晶の厚みや霜などによるバックグラウンドの増加やノイズなどがスペクトルの精度に影響を与えるため、深紫外レーザーを用いたタンパク質結晶の加工装置を利用し、結晶サイズの調整やバックグラウンドを低減させ測定を行っている。

本発表では、オフライン顕微分光装置の利用について、最近の利用例を交えながら紹介する。