

タンパク質の研究に 行き着くまで

最終講義

平成22年3月12日

山根 隆

花や葉を離れ、茎を握め

Victor Horta
(1861-1947)

今日の内容

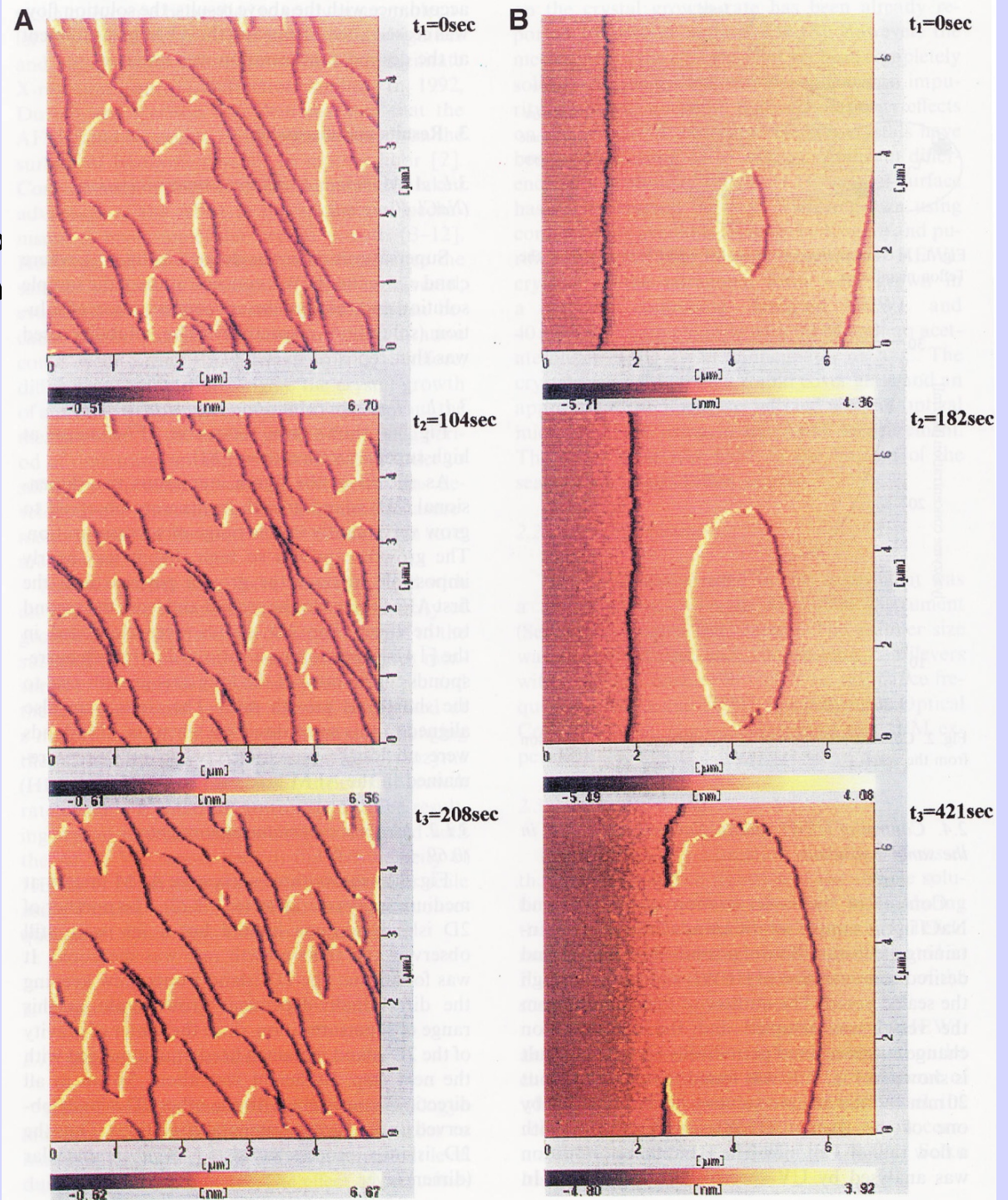
- Part 1 : タンパク質の結晶化
- Part 2 : タンパク質の構造と機能
- Part 3 : インドとの国際交流
– 構造解析の方法論の開発

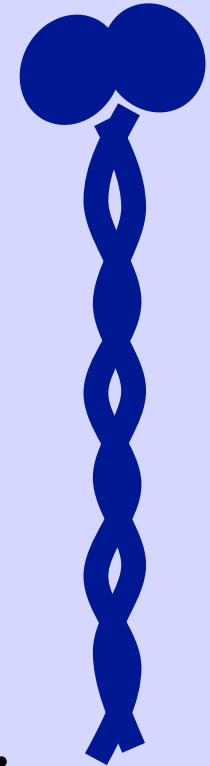
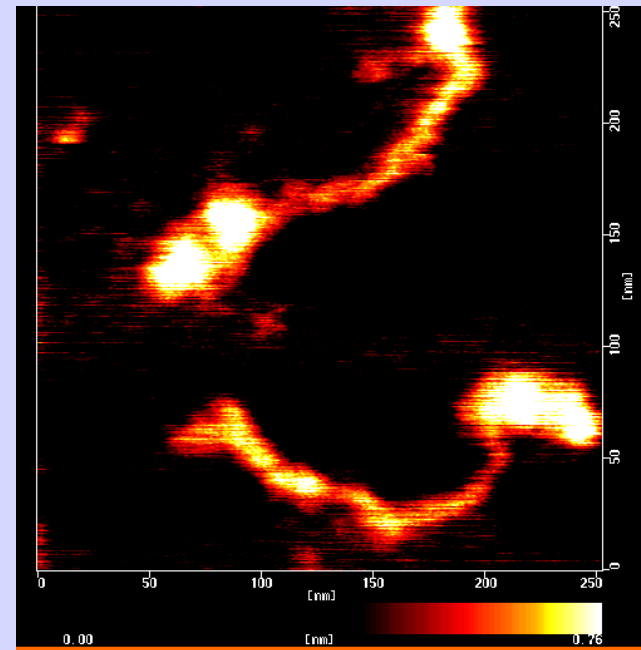
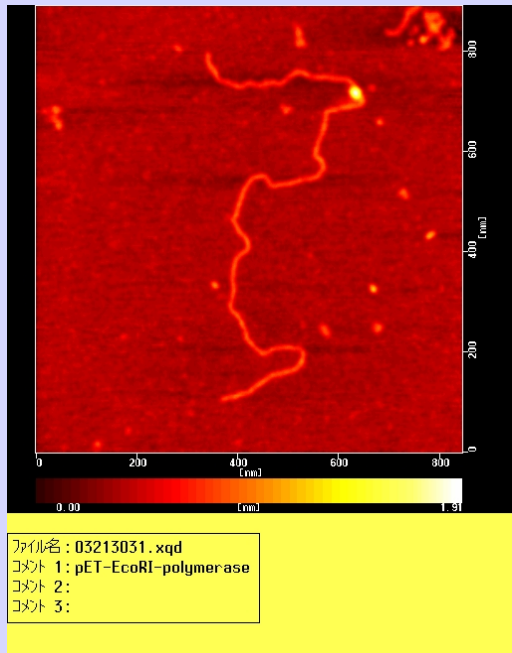
Part 1 : タンパク質の結晶化

- タンパク質の結晶成長
 - AFM, cytochrome c
- 宇宙でタンパク質結晶を作る
 - congerin
- タンパク質結晶の凍結
 - pectate lyase

原子間力顕微鏡によるタンパク質の結晶成長速度

- Dr. L. Rong,
- 新村信雄先生





- **MgATP induced conformational changes in a single myosin molecule observed by atomic force microscope: Periodicity of substructures in myosin rods, [M. Taniguchi](#), O. Matsumoto, [S. Suzuki](#), Y. Nishino, T. Taga & T. Yamane, *Scanning*, 25 No.5, 223-229 (2003)**
- **Measurement and control of the crystal growth rate of tetragonal hen egg-white lysozyme imaged with an atomic force microscope, [Long Rong](#), T. Yamane and N. Niimura, *J. Crystal Growth*, 217, Nos. 1/2, 161-169 (2000)**

Characteristics of mixed reverse micelles

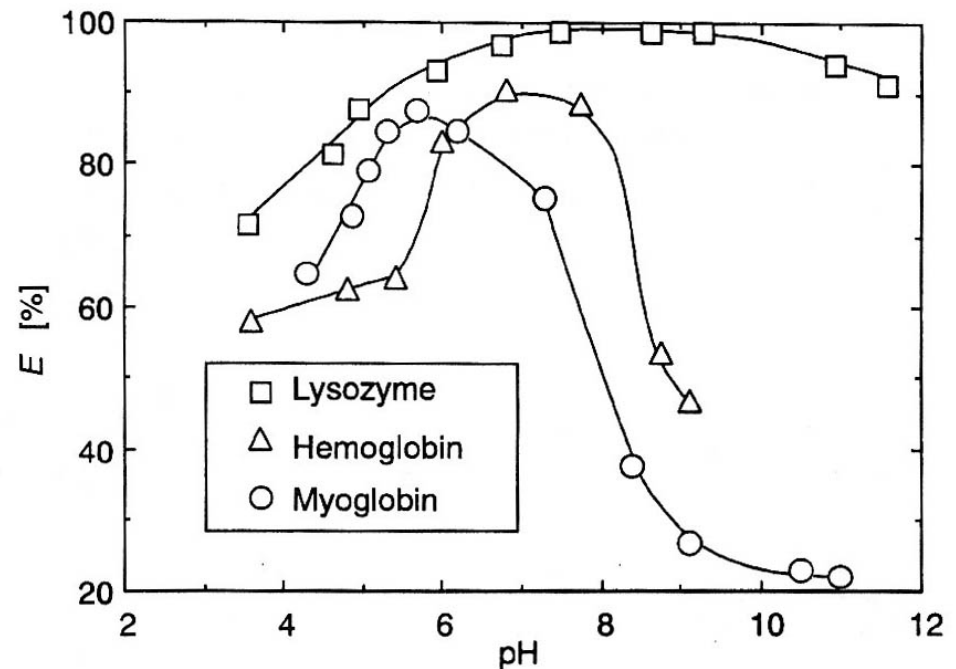
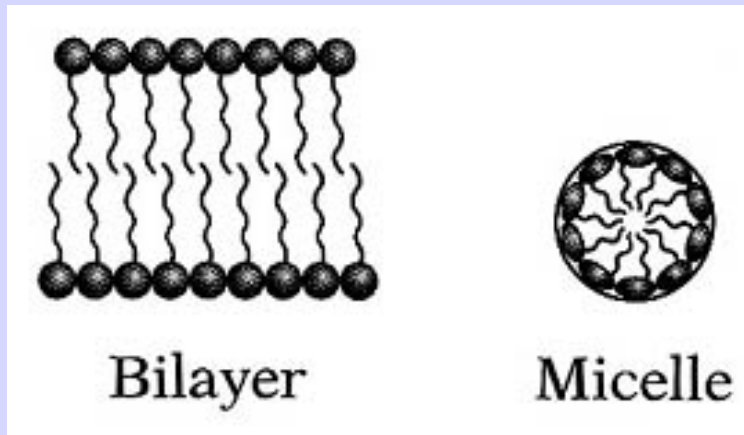


Fig. 4 pH dependence of percent extraction for lysozyme, myoglobin and hemoglobin in ternary surfactant system. $C_s = 0.02M$, $[KCl] = 0.2M$, protein concentration: 0.5 mg/ml

- Dr. Long Rong (榮龍)

The effect of nitrate ions in the packing of cytochrome c crystal

Table 1(a). Crystallization conditions of *horse* and *bovine* cytochrome c

Method	Hanging drop vapor diffusion
Protein conc.	2.0 %(w/v)
Buffer	0.05 M Ammonium Phosphate
Precipitant*	0.52 g/ml Ammonium Sulfate 0.18 g/ml Sodium Nitrate
pH	6.0
Temperature	20 °C
Period	7 days
Size	0.5 × 0.5 × 0.5 mm³

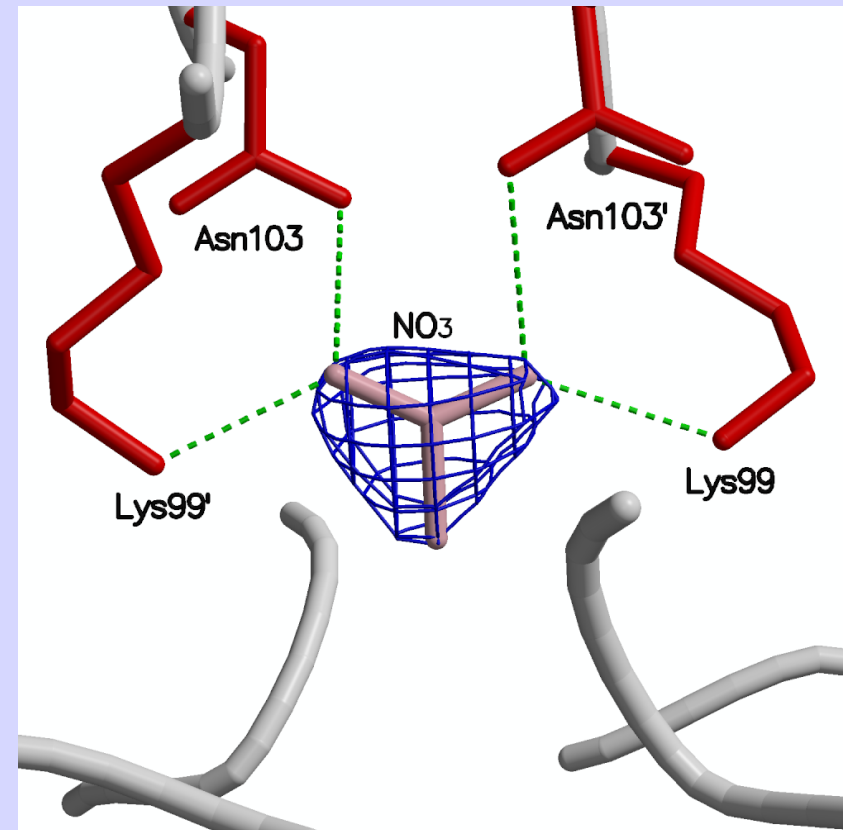
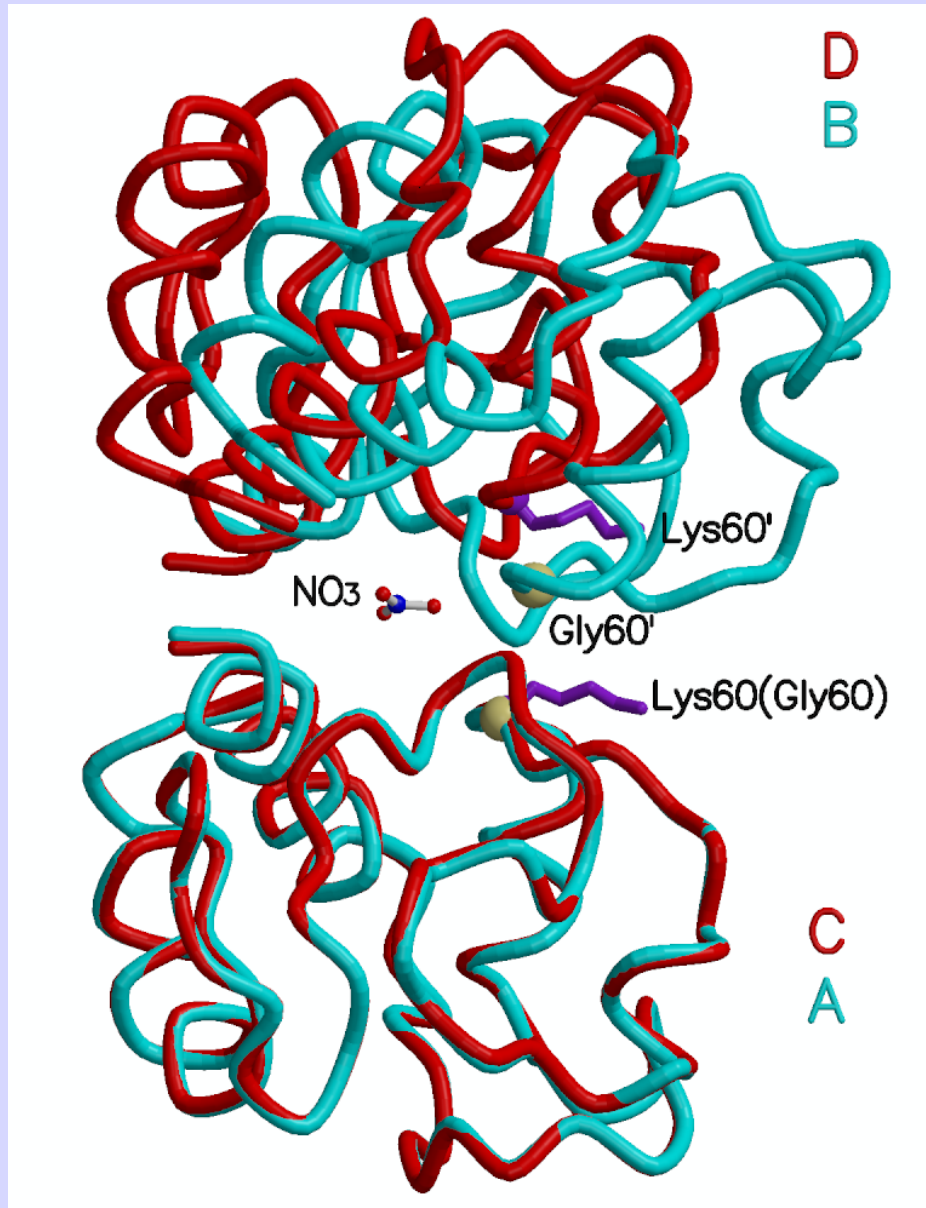
*These amounts of the precipitants were directly dissolved in 1 ml of the buffer solution.

Table 1(b). Crystallization conditions of *tuna* cytochrome c

Method	Batch
Protein conc.	2.0 %(w/v)
Buffer	0.05M Ammonium Phosphate
Precipitant*	0.35 g/ml Ammonium Sulfate 0.10 g/ml Sodium Nitrate
pH	6.0
Temperature	20 °C
Period	7 days
Size	0.2 × 0.2 × 1.0 mm³

*These amounts of the precipitants were directly dissolved in 1 ml of the buffer solution.

Cytochrome cの結晶成長因子



- **2.1/2.3/1.8 Å resolution**
- M. Akita, J. Noda, T. Shirai, K. Homma, M. Ataka



NASDA

STS-107 宇宙実験計画

STS-107 Space Experiment Project

宇宙環境を利用した蛋白質結晶成長実験
Protein Crystal Growth Experiment in Space

STS-107ミッションの概要

宇宙開発事業団 (NASDA) は、国際宇宙ステーションに取り付ける日本実験棟「きぼう」による本格的な宇宙環境利用の先駆けとして、平成14年6月打上げ予定のスペースシャトル (STS-107) に搭載される蛋白質結晶成長実験装置 (CMPCG: Commercial Macromolecular Protein Crystal Growth) を利用し、生物学上の基礎研究、医薬品への応用研究等を目的として、約16日間にわたる蛋白質結晶成長実験を行います。

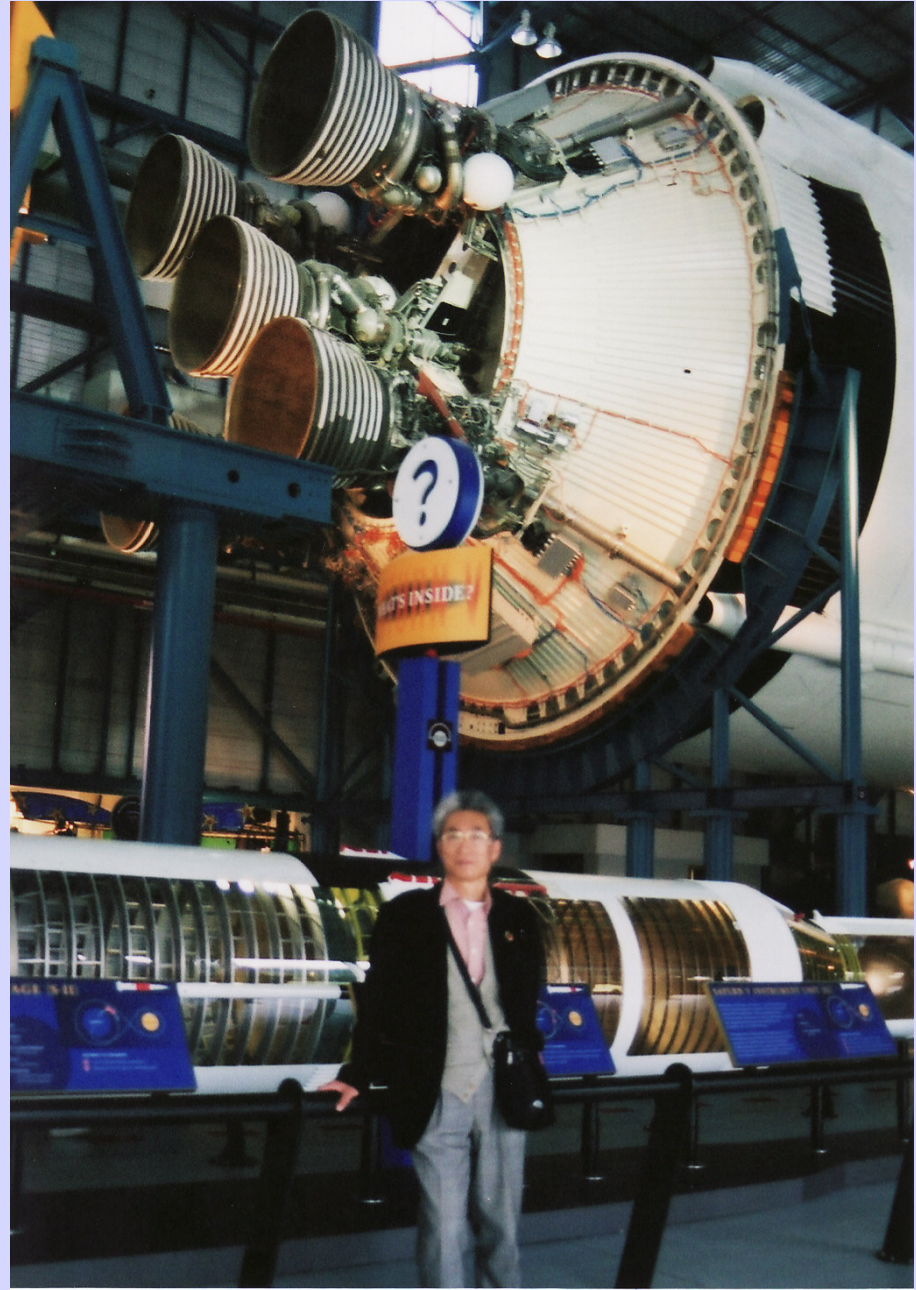
STS-107 Mission Overview

The National Space Development Agency of Japan (NASDA) will implement protein crystal growth experiments on space shuttle mission STS-107 before the Japanese Experiment Module (JEM) "KIBO" utilization starts. The experiments related to biological and medical researches and pharmaceutical applications will be conducted in the Commercial Macromolecular Protein Crystal Growth (CMPCG) for about 16 days. STS-107 will be launched in June 2002.

最初の宇宙実験 STS-84 mission

- **STS-84: May 15 - May 24, 1997**
- **Cape Canaveral Kennedy Space Center, Florida**



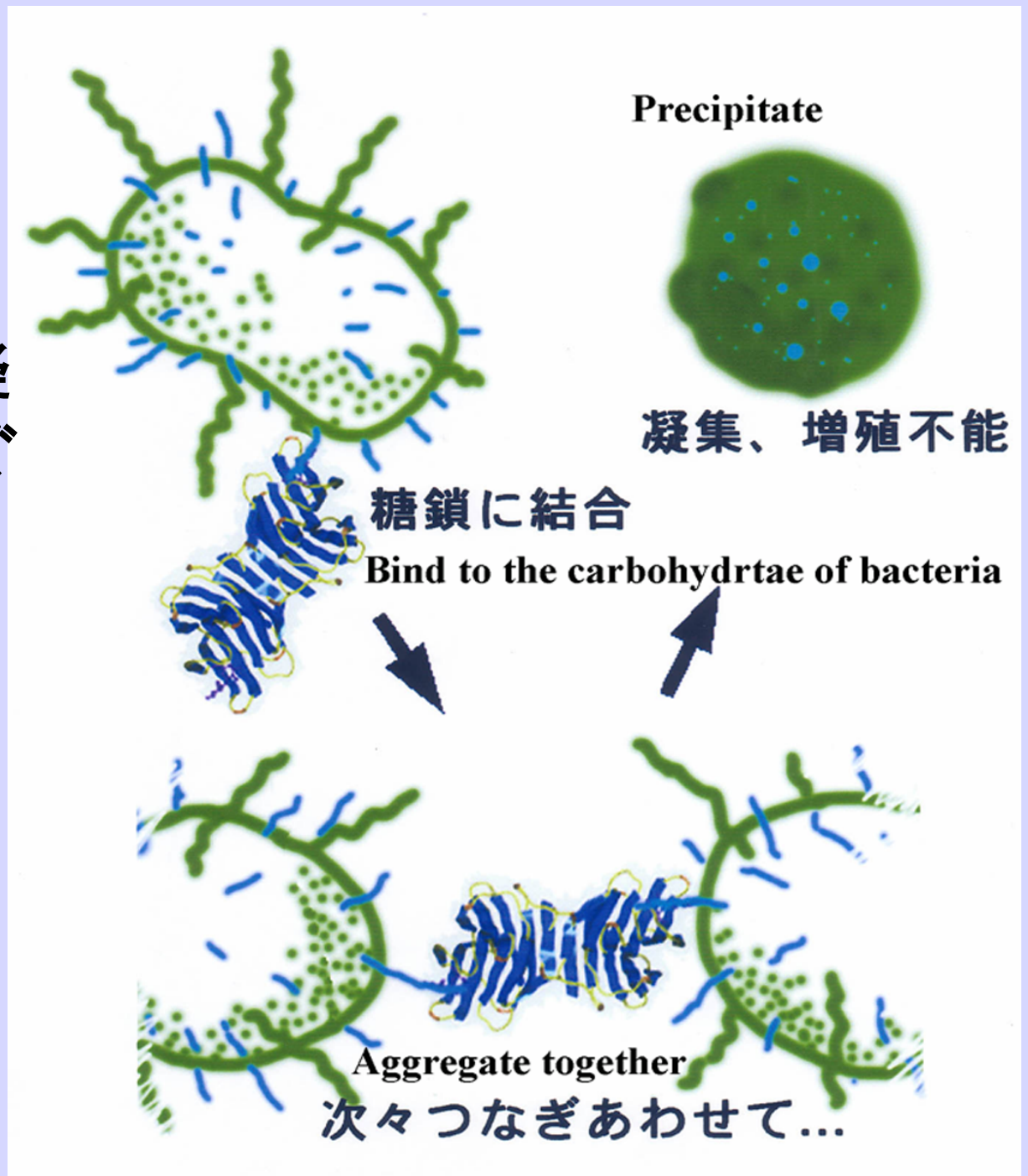


思い出すのはM1の夏;1969年7月20日

Congerinの構造と機能

- バクテリアなどを凝集させ、侵入を防ぐ生態防御の機能

白井剛先生、
光山くらら、
松井優香、
小川智久先生、
村本光二先生



Crystallization of congerin II

The other crystal form of congerin II

Mother liquor

Protein conc. 1%(w/v)

Buffer 0.1M Tris-HCl (pH 7.4)

Reservoir solution

Precipitant 1.6M MgSO₄ in

0.1M MES (pH 6.5) buffer

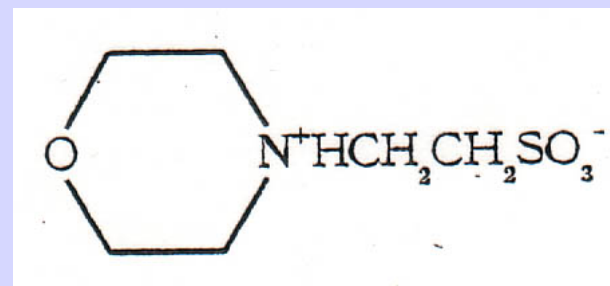
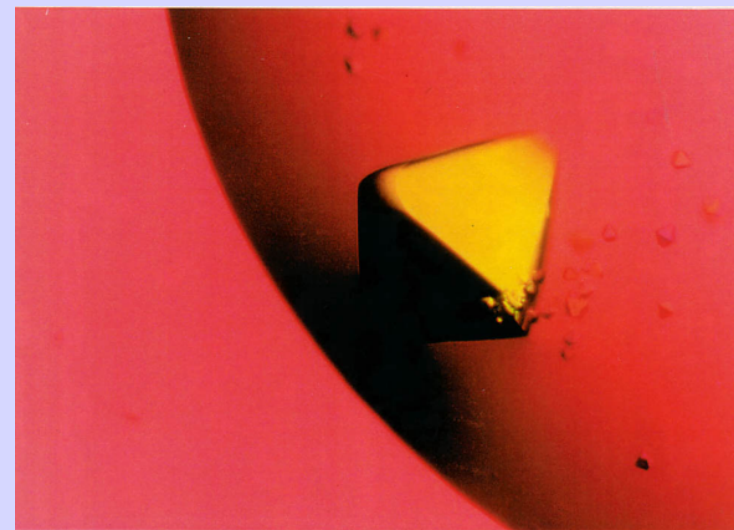
Drop 3ml(mother liq.)+3ml(reservoir sol.)

Period 1 month

Size 0.5 x 0.5 x 0.5 mm

P42212, a=61.2, c=80.9 Å

(Isomorphous to the crystal without MES)



MES: 2-morpholinoethane-sulfonic acid

Structure analyses of congerin I and congerin II

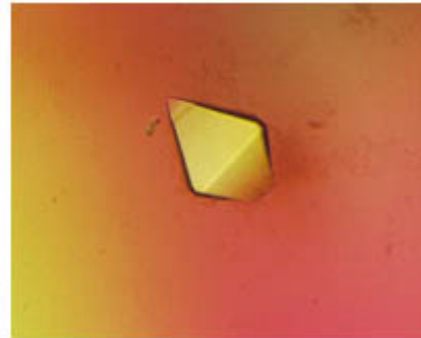
- 1) Congerin I complexed with lactose at 1.5 Å resolution (R=0.206)
- 2) Lactose-free congerin I at 1.6 Å resolution (R=0.196)
- 3) Congerin II complexed with lactose and MES at 1.45 Å resolution (R=0.199)
- 4) Congerin II crystallized using the refined conditions

Resolution	25-0.99 Å
Completeness	99.2%
Rmerge	0.091
Number of reflections	74,403
Rc 0.127	Rfee 0.156

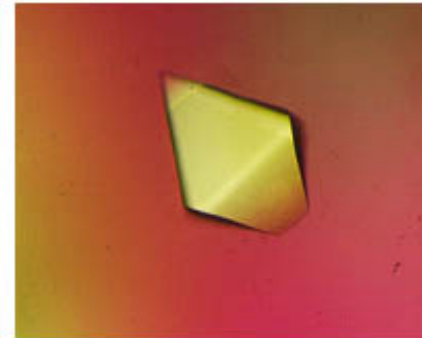
タンパク質の結晶化は芸術



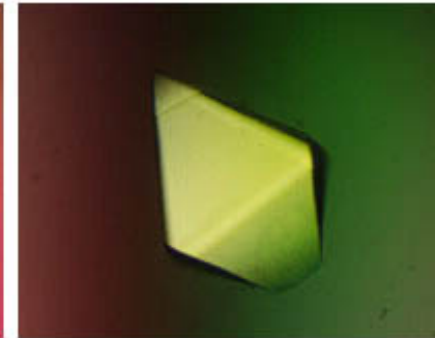
8 days later



9 days later



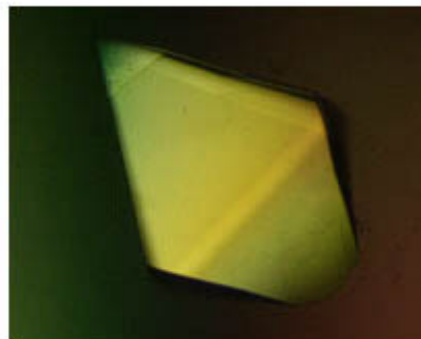
10 days later



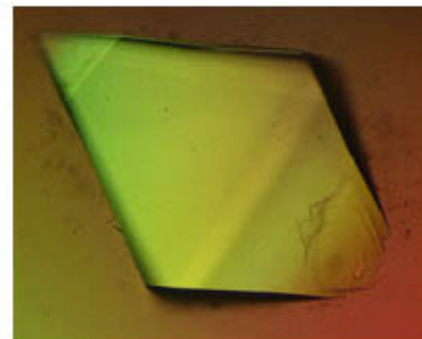
11 days later



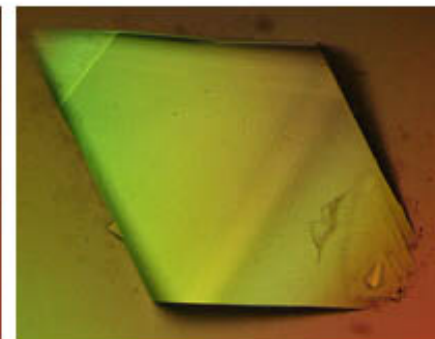
12 days later



13 days later



15 days later

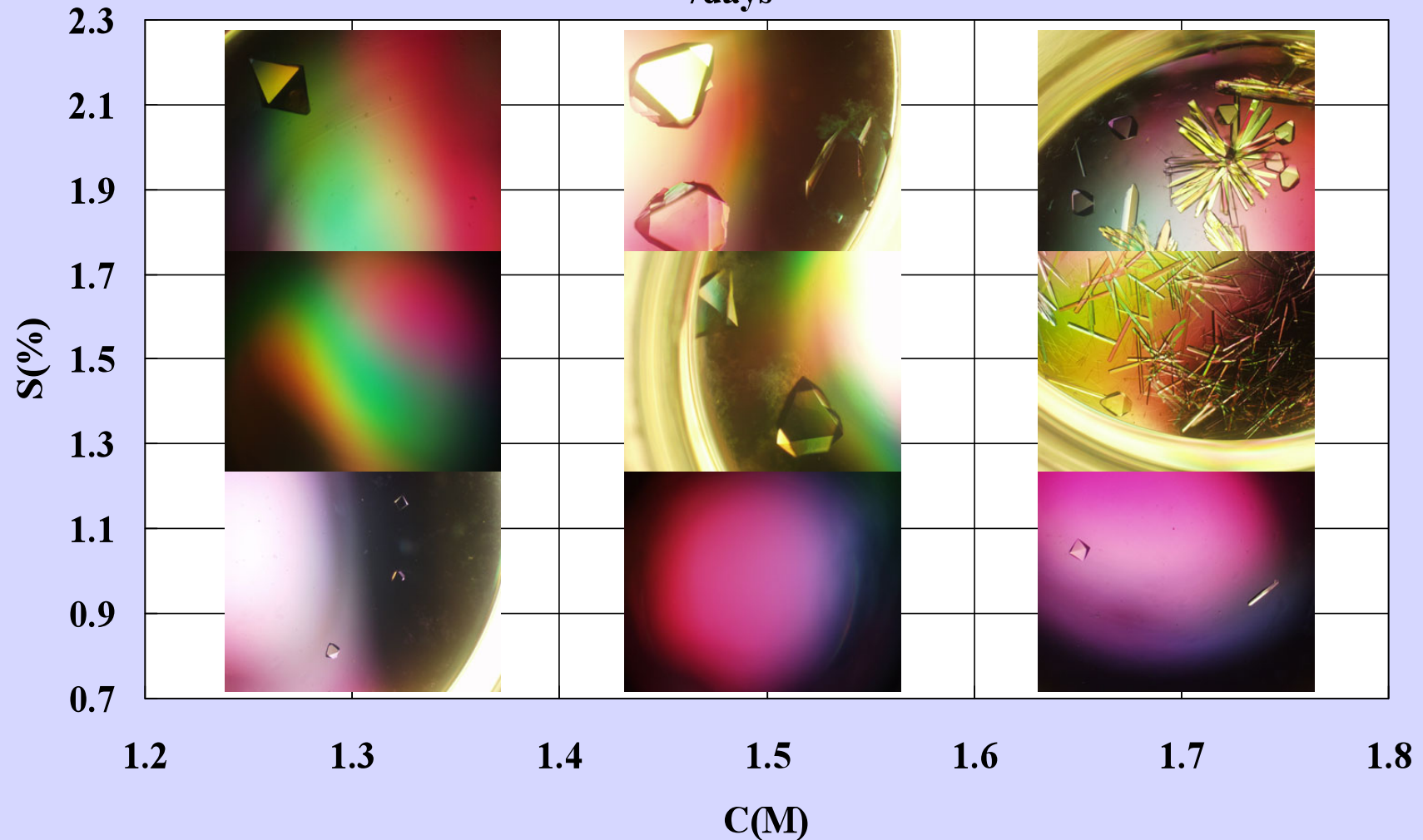


17 days later

丹羽裕輔、宮部優美子、光山くらら、安宅光雄先生、
小川智久先生、村本光二先生、相原茂雄先生

After 7 days

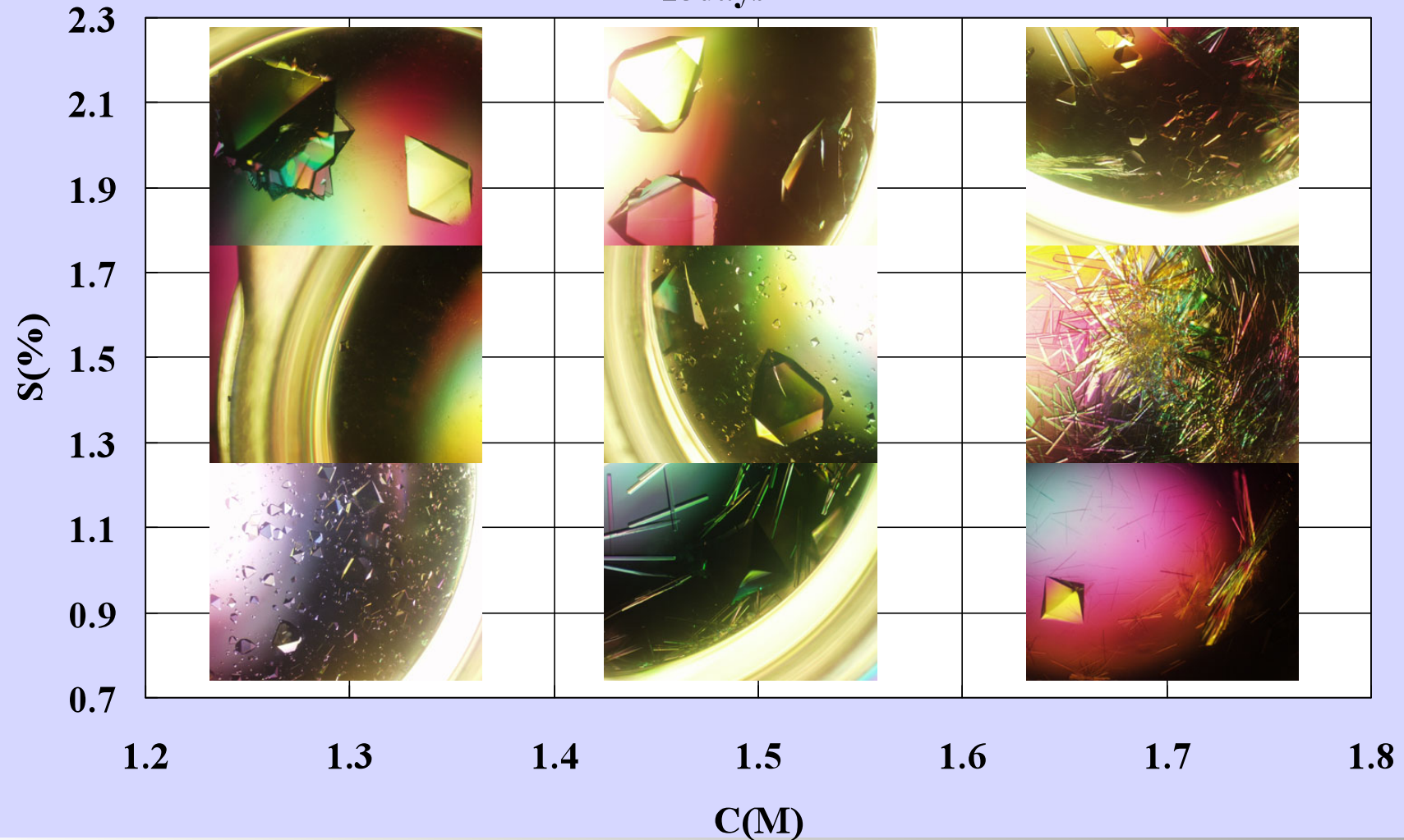
7days



Congerin II ;crystal morphology

After 15 days

15days

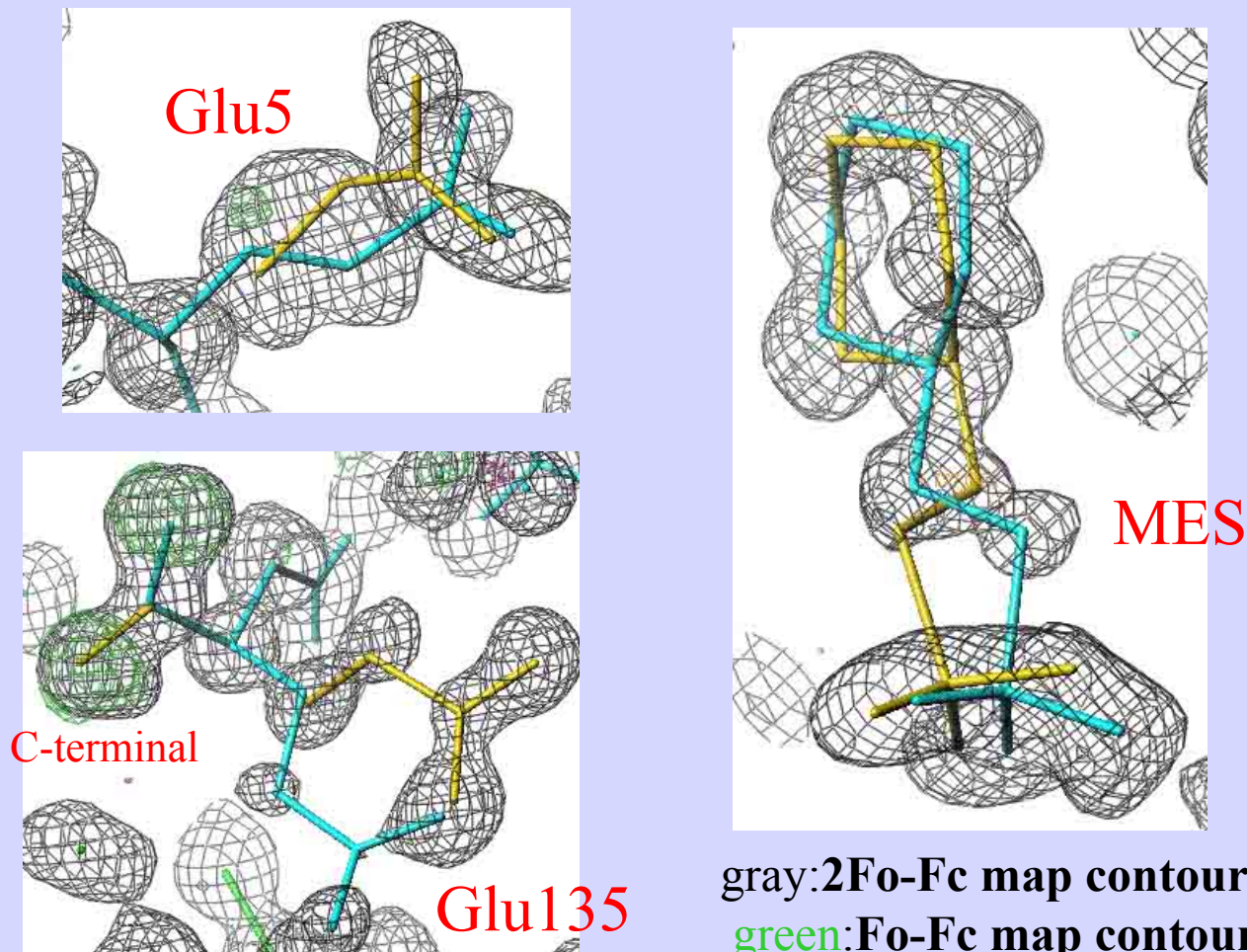


Congerin II ;crystal morphology

STS-107 mission (Jan 16-Feb 1, 2003)



The Crystal structure of congerin II at 1 Å resolution; 近藤和良 アミノ酸134残基の内、15残基の側鎖とMESに double conformationが存在



gray: 2Fo-Fc map contoured at 1.5σ
green: Fo-Fc map contoured at 3.0σ

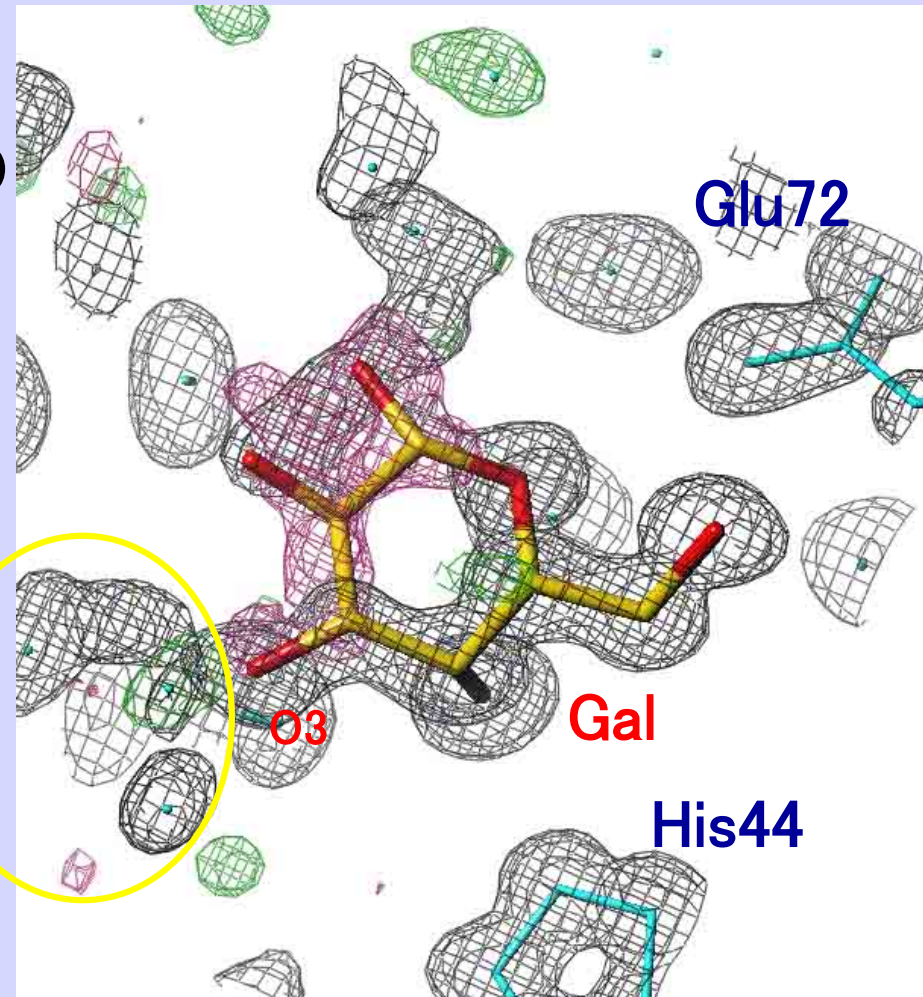
The Crystal structure of congerin II at 1 Å resolution

糖鎖結合部位

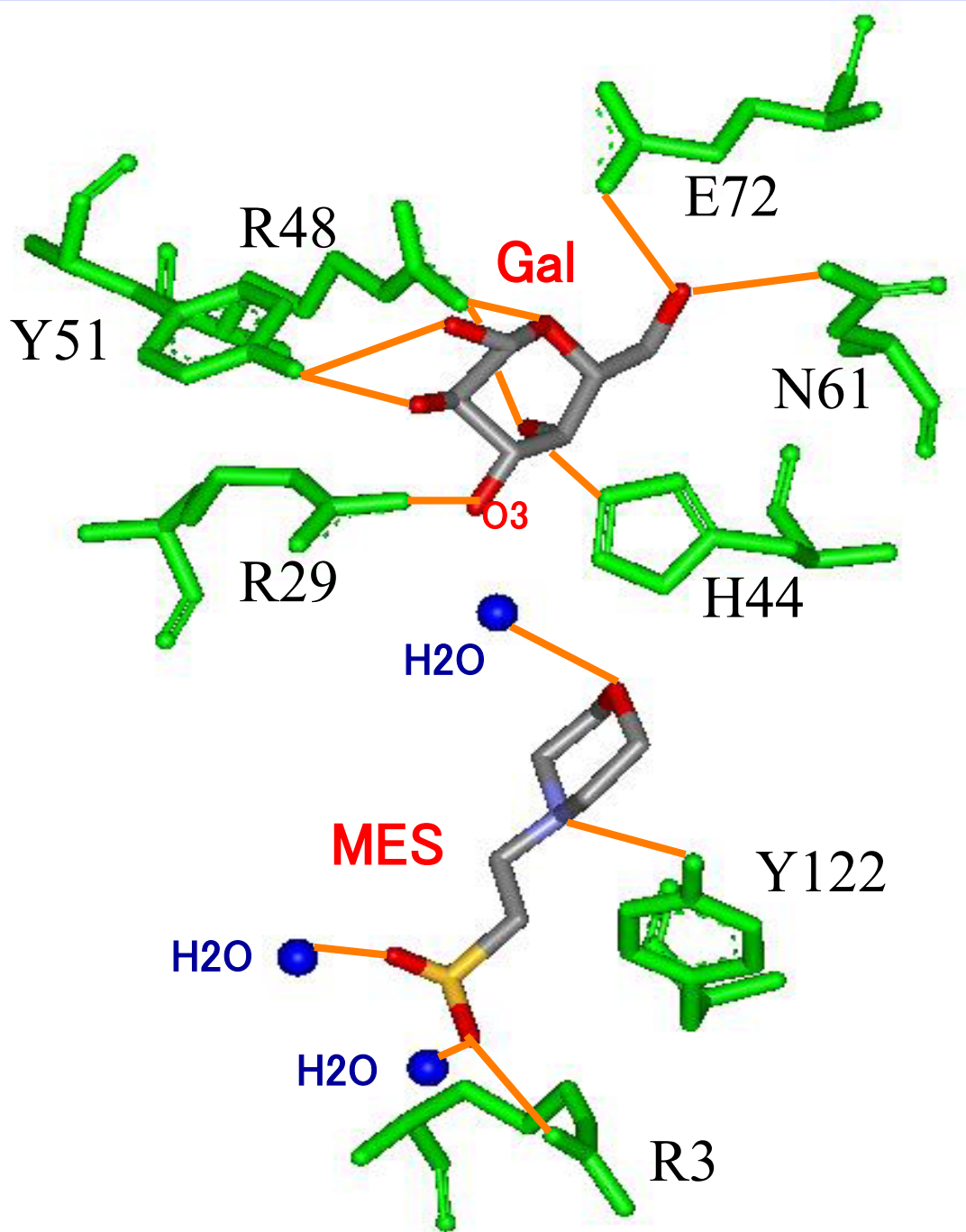
糖鎖結合部位にGalactoseのような電子密度が存在

また、Gal-O3の先端にも電子密度が現れ、糖が存在する可能性がある。

gray: 2Fo-Fc map contoured at 1.5σ
green: Fo-Fc map contoured at 3.0σ
red: Fo-Fc map contoured at -3.0σ



微小重力のための動物レクチン(コンジェリン)の結晶化条件の精密化および結晶の評価
山根隆・丹波祐輔・宮部優美子・塩生くらら・近藤和良・鈴木淳巨・
小川智久・村本光二・中村裕彦・佐藤勝・吉崎泉・安宅光雄 (2004).
日本マイクロ重力応用学会誌, 21, (1), 52 - 62.



糖鎖結合部位

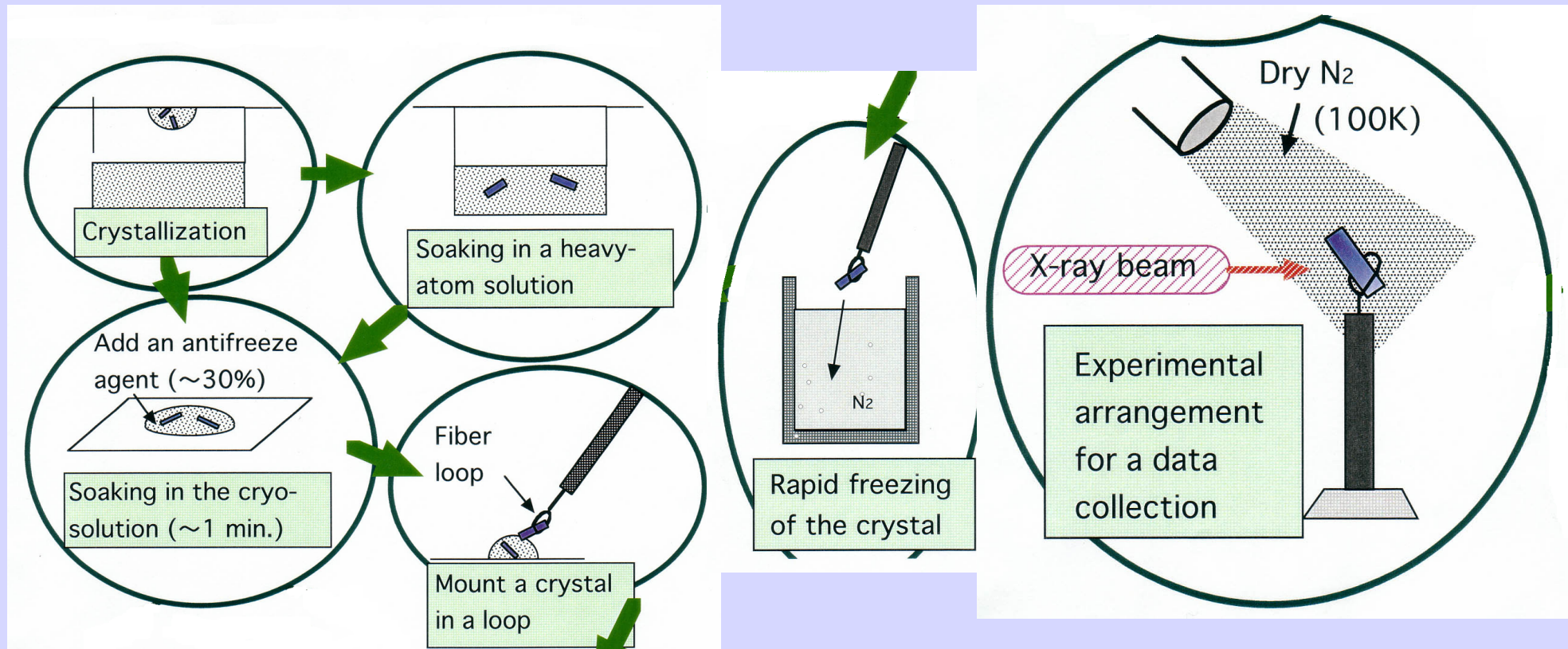
これまでGalは8ヶ所、MESは2ヶ所でアミノ酸の側鎖と相互作用することが分かっていたが、新たに3つの水分子がMESと水素結合を形成していることが分かった。

タンパク質結晶凍結

秋田昌岳

1) 抗凍結溶液中に結晶をソーク. 2) 急速凍結.

結晶は氷を作らないように 100 Kまで、急激に冷やさなければならない



The crystal structure of high-alkaline, low molecular-weight pectate lyase, Pel-15

**Masatake Akita,¹ Atsuo Suzuki,^{1*} Tohru
Kobayashi,² Susumu Ito² and Takashi Yamane¹**

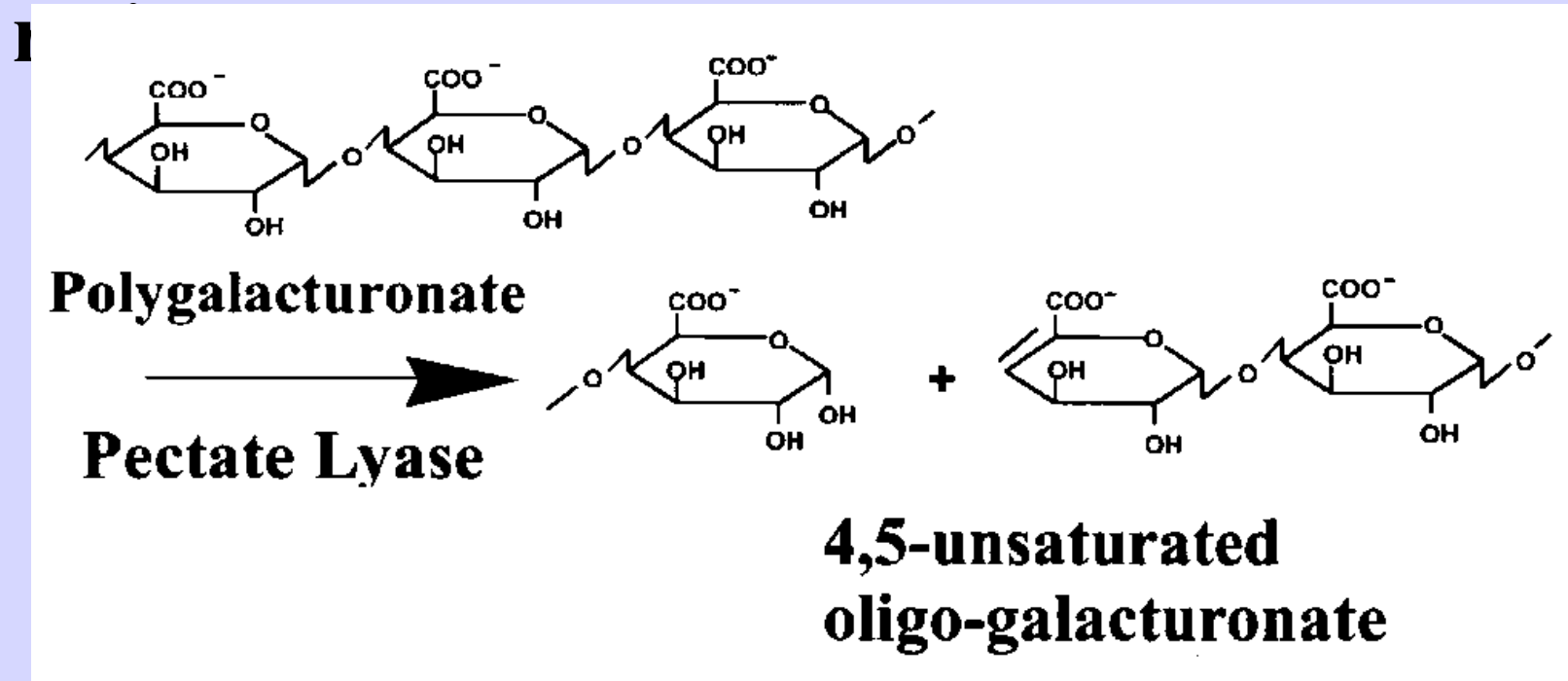
*¹Department of Biotechnology, Graduate School of
Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya
464-8603, Japan*

*²Tochigi Research Laboratories of Kao Corporation,
2606 Akabane, Ichikai, Haga, Tochigi 321-3497,
Japan*

Pectate lyases

植物の細胞壁に含まれるpectin成分を分解

- The molecular weight of Pel-15 is 20 924 Da, and consists of 197 amino acid



Pel-15の構造と機能

- バイオ精錬
- 化学精錬品に比べて風合いがよい
- 理由は化学精錬と比べて徹底した精錬ではないため
- しかも、化学精錬品と比べて吸水性・強度では優れている



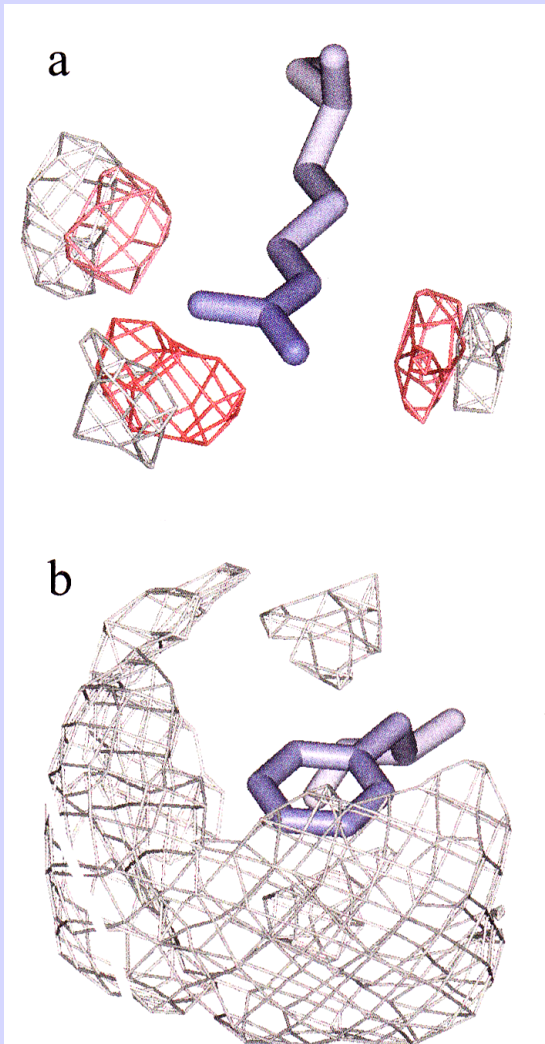
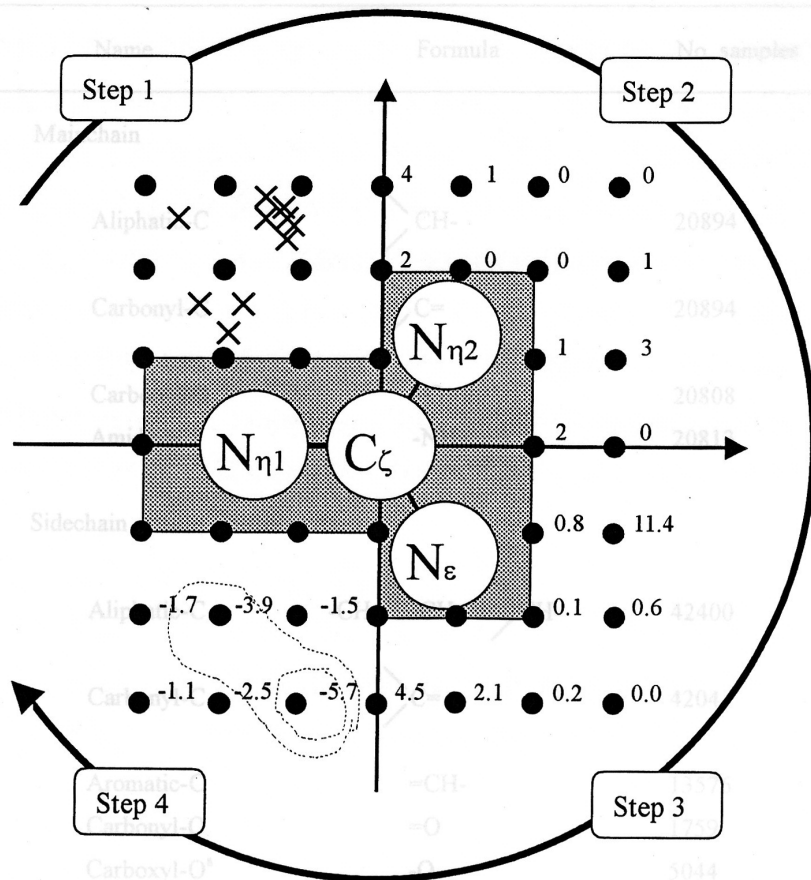
"The first structure of pectate lyase belonging to polysaccharide lyase family 3"

M. Akita, A. Suzuki, T. Kobayashi, S. Ito and T. Yamane, *Acta Crystallogr.* **D57**, 1786-1792 (2001)

Part 2 : タンパク質の構造と機能

- タンパク質立体構造・リガンド予測
 - EMPLICS
- 細胞内タンパク質分解に関する酵素
 - Atg4b, Fbs2-Skp1
- D-アミノ酸代謝に関する酵素
 - D-amino acid amidase, ACL racemase

データベース経験則に基づくタンパク質立体構造・リガンド予測法



Empirical
Peptide-
protein
Potential
(EP3)

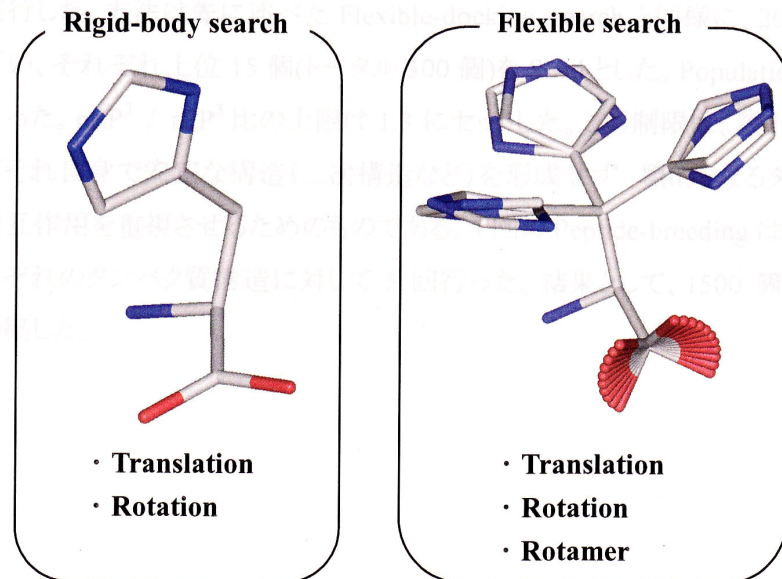
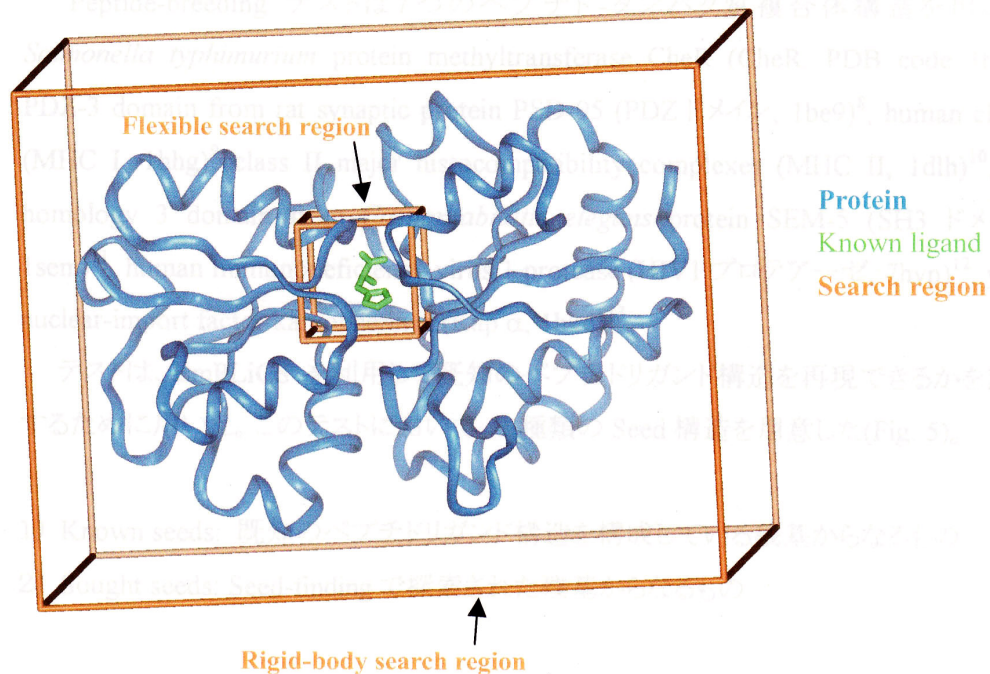
石田裕一
、白井剛
先生

A scheme of the process of EP³ from protein coordinates.

"EmPLiCS: An empirical approach for structure-based design of natural peptide drugs"

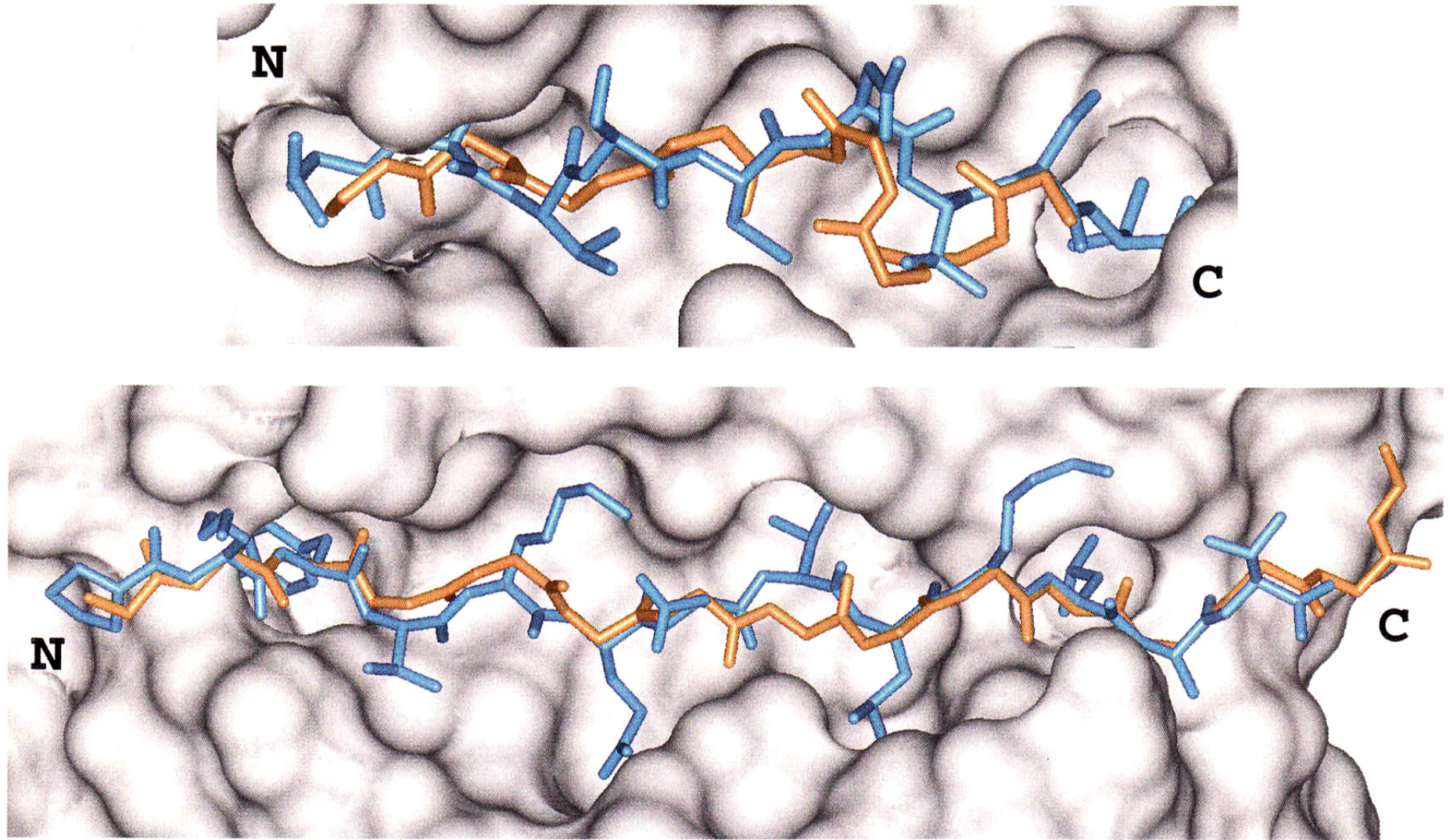
H. Ishida, T. Shirai, Y. Kato, M. Ohno, T. Isaji and T. Yamane, *J. Biochem.*, **128**, No.4, 561-574 (2000)

Docking Search



Two types Docking search.

- Rigid-body search
回転異性体は既知のリガンド構造で固定。探索領域はタンパク質全体
- Flexible-docking search
探索領域は結合部位周辺



Views of the complexes of designed peptide (yellow) and the target protein (white surface).

Upper MHC I, Lower MHC II

The known peptides are shown in blue.

"EmPLiCS: An empirical approach for structure-based design of natural peptide drugs"

H. Ishida, T. Shirai, Y. Kato, M. Ohno, T. Isaji and T. Yamane, *J. Biochem.*, **128**, No.4, 561-574 (2000)

タンパク質を補充しないと？

- 細胞が飢餓状態（栄養失調）
↓ オートファジー（自食作用）が働く
- オートファジーは、細胞周辺の栄養が枯渇した時に自分の組織を分解して栄養源にする基本的な生理現象で、人では空腹時の肝臓細胞で起きている
- **無理なダイエットは体に害！**

Part 2a: 細胞内タンパク質分解

水島恒裕先生、田中啓二先生

- タンパク質分解酵素ープロテアーゼ
- 細胞外タンパク質分解酵素
 - 胃腸でのタンパク質分解、血液凝固
- 細胞内タンパク質分解系
- オートファジー系
- ユビキチンープロテアソーム系

オートファジーに関係する Atg4bの構造と機能

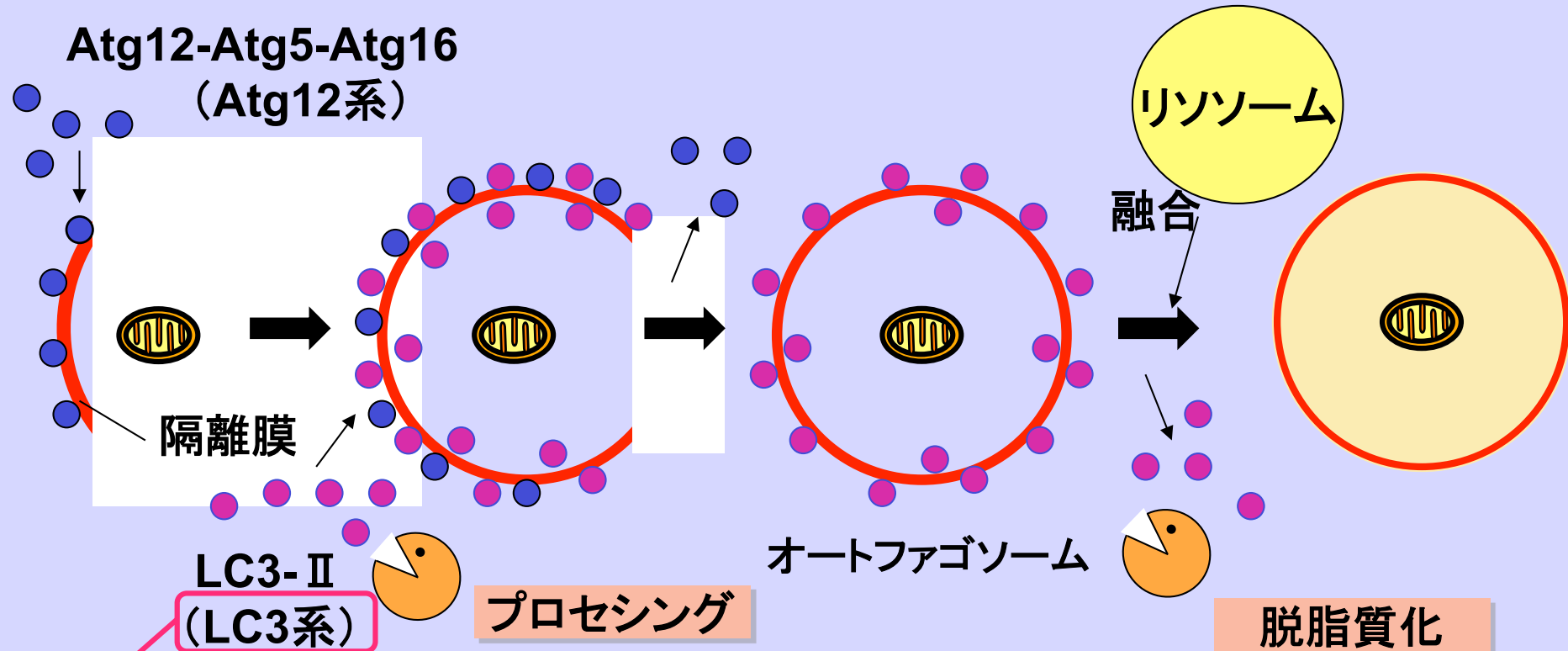
熊埜御堂太一

細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防ぐ
細胞の代謝回転、余分なオルガネラの除去

オートファジーが起こらなくさせたマウス
では、神経細胞内に異常タンパク質が蓄積
して運動障害（パーキンソン病）を発症

細胞のがん化抑制に関与

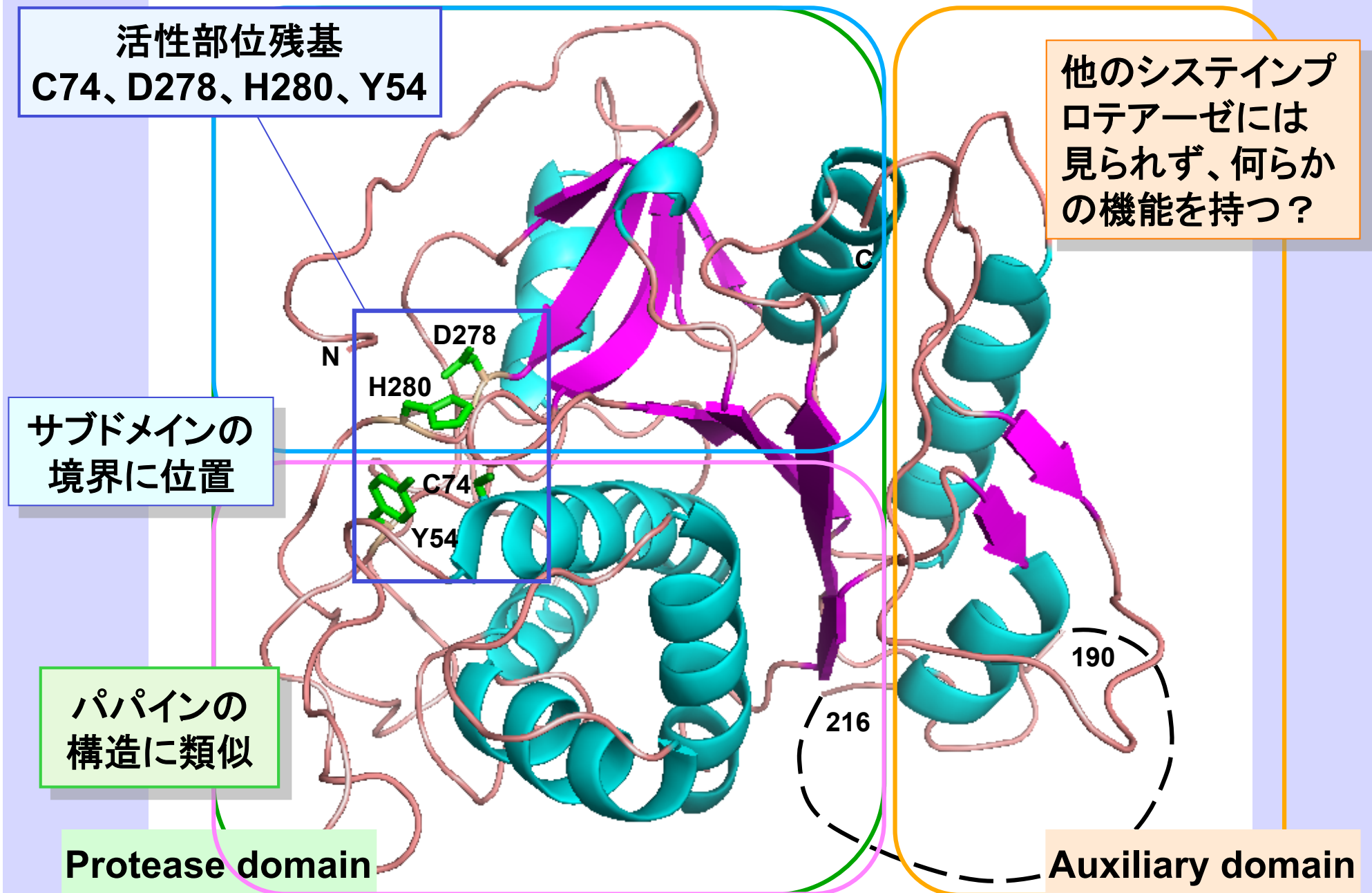
オートファジーの機構



Atg4bはシステインプロテアーゼとして機能

- ・オートファジーには、分解するタンパク質などを取り込んで隔離する[オートファゴソーム]と呼ぶ特殊な袋が必要
- ・2つのユビキチン様結合システム (Atg12系とLC3系) が必須

Atg4bのドメインの分類



"The Crystal Structure of Human Atg4b, a Processing and Deconjugating Enzyme for Autophagosome-forming Modifiers"

Taichi Tanida, Yu-shin Sou, Takashi Ueno, Eiko Kominami, Keiji Tanaka, Takashi Yamane, *J. Mol. Biol.*, 355(4), 612-618 (2006)

Atg4bの活性部位

UCH-L3
HAUSP
Papain
Cathepsin B

Tyr54
オキシアニオンホール

His280
Cys-S⁻/His-Im⁺
の形成

 Catalytic water

逆側に位置

Cys74
ペプチド結合のカルボ
ニル炭素原子を攻撃

3.59Å

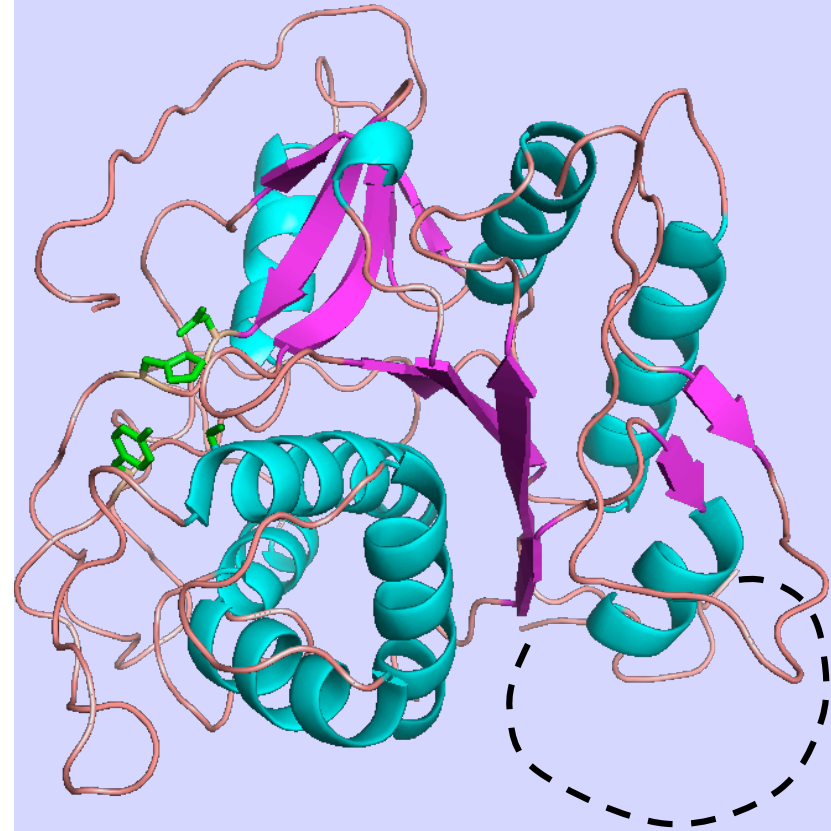
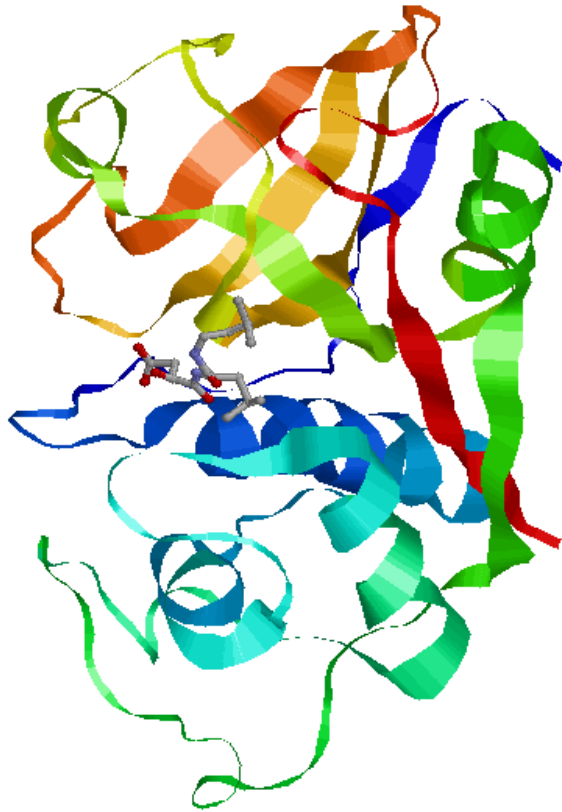
2.78Å

3.23Å

Asp278
触媒反応に適した方向
にHis280を向ける

"The Crystal Structure of Human Atg4b,
a Processing and Deconjugating Enzyme for
Autophagosome-forming Modifiers"
Taichi Tanida, Yu-shin Sou, Takashi Ueno,
Eiko Kominami, Keiji Tanaka, Takashi Yamane,
J. Mol. Biol., **355**(4), 612-618 (2006)

Atg4bとパパイン (papain from papaya)



Protease domain

"The Crystal Structure of Human Atg4b, a Processing and Deconjugating Enzyme for Autophagosome-forming Modifiers"
Taichi Tanida, Yu-shin Sou, Takashi Ueno, Eiko Kominami, Keiji Tanaka, Takashi Yamane,
J. Mol. Biol., **355**(4), 612-618 (2006)

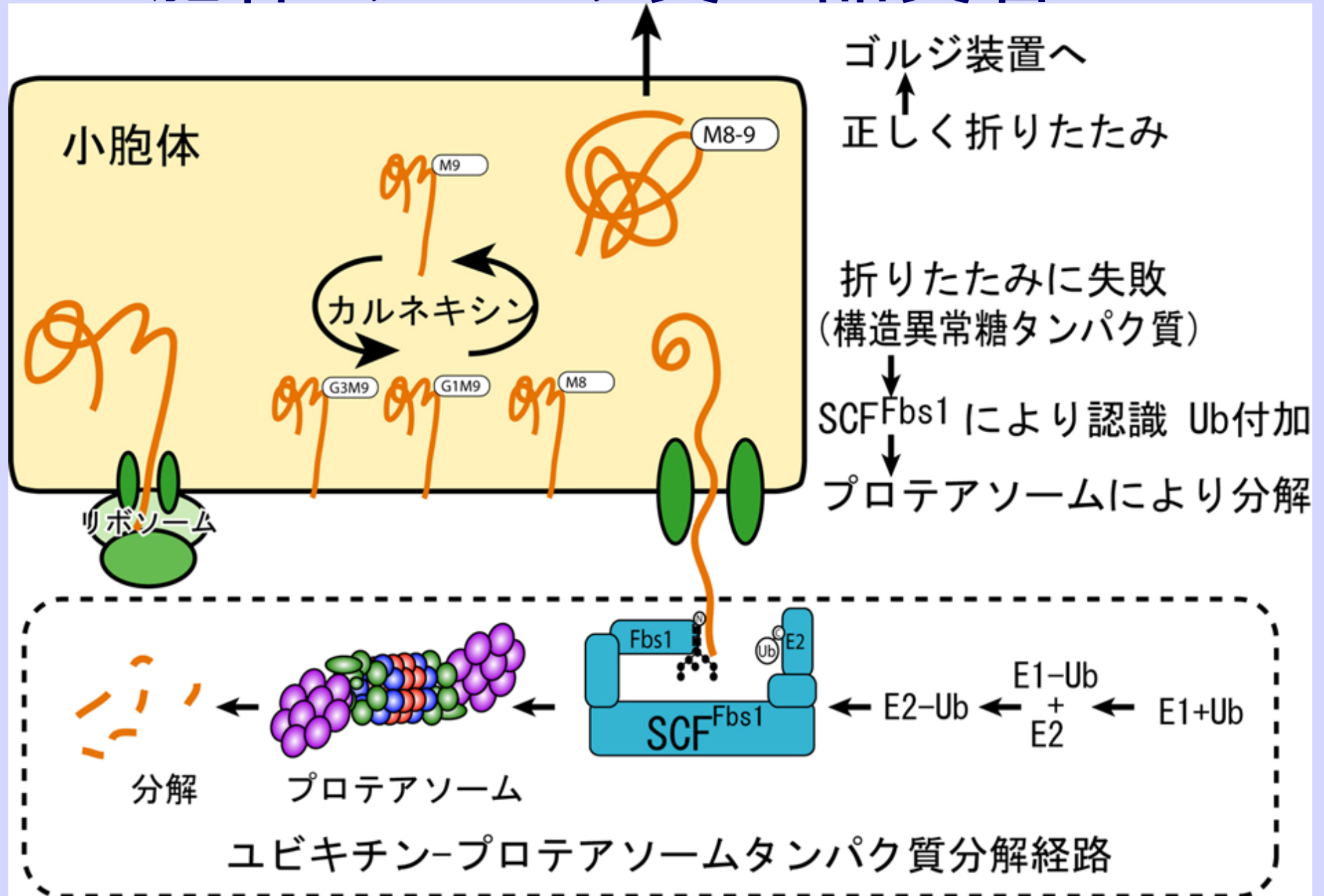
制御された 細胞内タンパク質分解 破綻すると脳・神経疾患

- タンパク質の品質管理
- 不良品の割合は？
 - 工業製品の不良品は
1/1,000,000以下
 - タンパク質の不良品は？

タンパク質の機能の発現

- タンパク質の機能は精妙な立体構造に基づき発現されるが！
 - その立体構造の構築は、細胞内の条件・タンパク質の作られ方に依存
 - タンパク質に出来損ないは無いのか
- タンパク質の品質管理システム
 - 合成時における品質管理
 - 利用時における品質管理

小胞体: タンパク質の品質管理



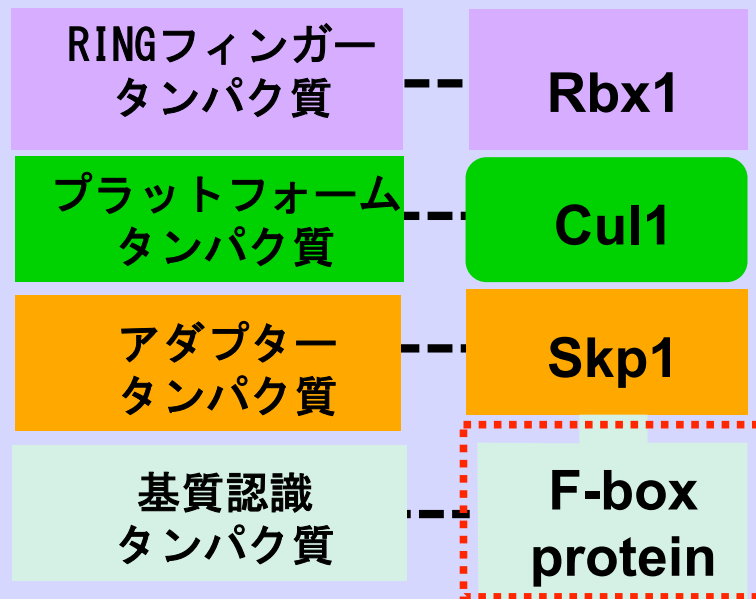
糖鎖を認識する ユビキチンリガーゼ SCF^{Fbs}ファミリーの構造と機能

役割→不良タンパク質を認識してユビキチンを
付加して分解サイクルにまわす

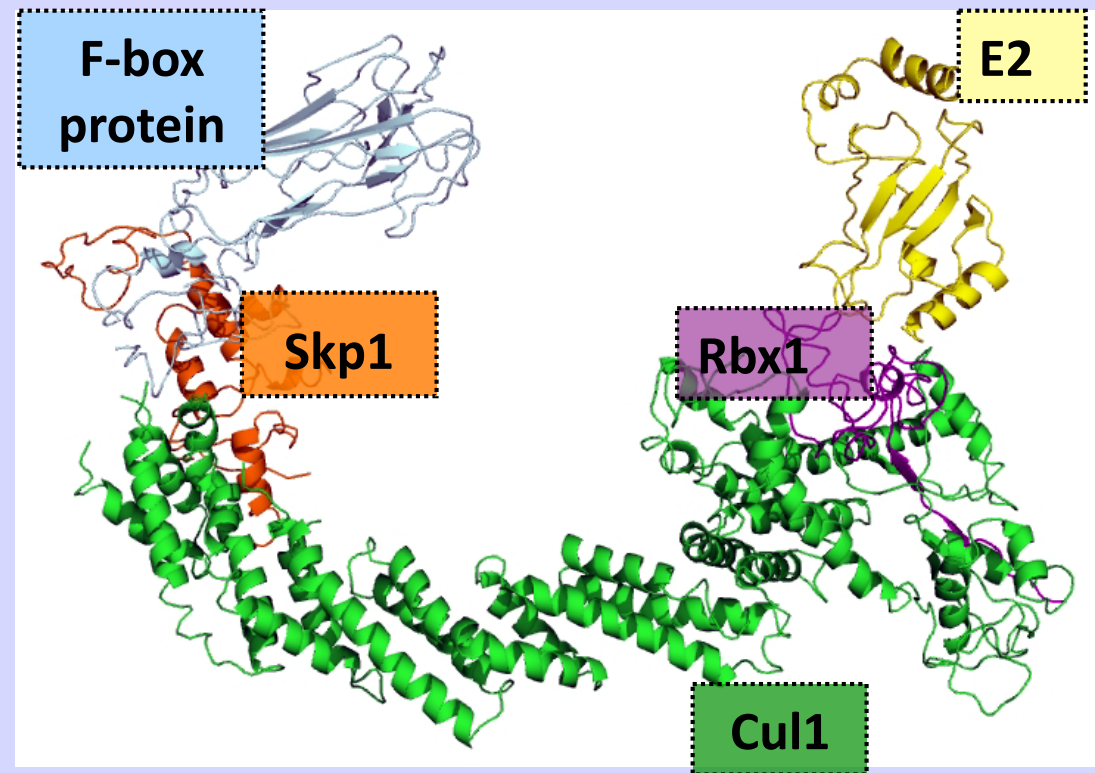
三輪由紀子、手嶋直人、中西麻里、鈴木舞美、
中川朋美、高橋信彦、川上龍邦、立浪和也、武市裕貴、
三輪美希子、尾崎洋子、長谷川優子、熊埜御堂太一、
高木賢治、小西奈緒、高橋健、大場由記子、
金相佑博士、水島恒裕先生

多数のタンパク質を認識する ユビキチンリガーゼE3の戦略

SCF complex (E3)



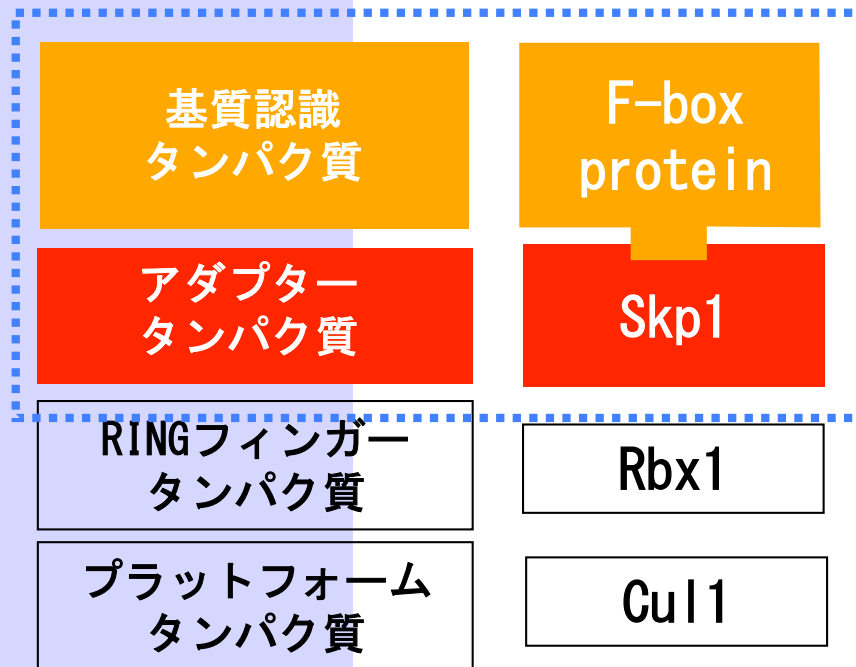
100種以上



Fbs2-Skp1複合体構造

長谷川優子、小西奈緒、
高橋健、熊埜御堂太一

SCF complex



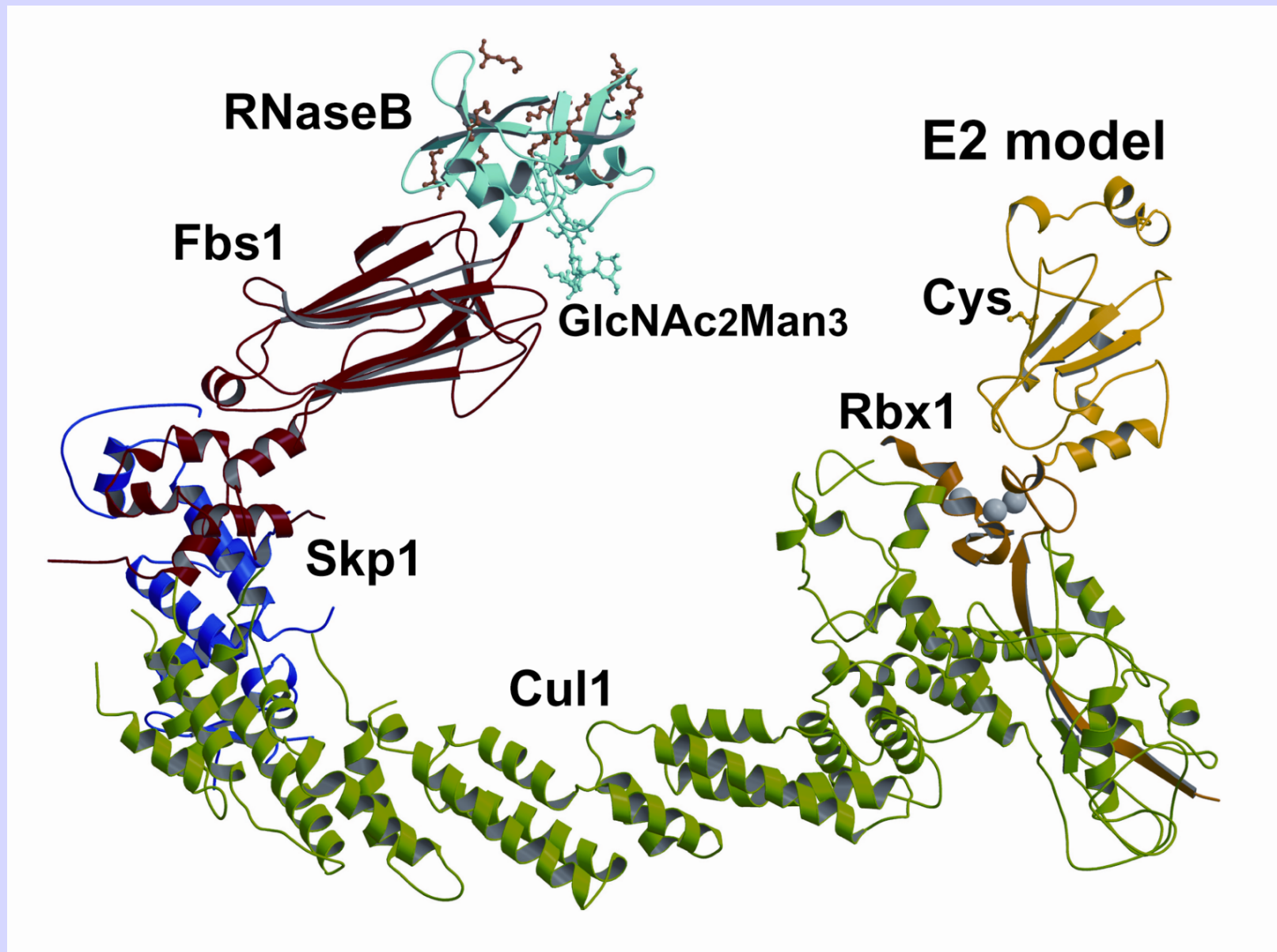
高橋健 名古屋大学卒業論文
(2009年度)

発現・培養

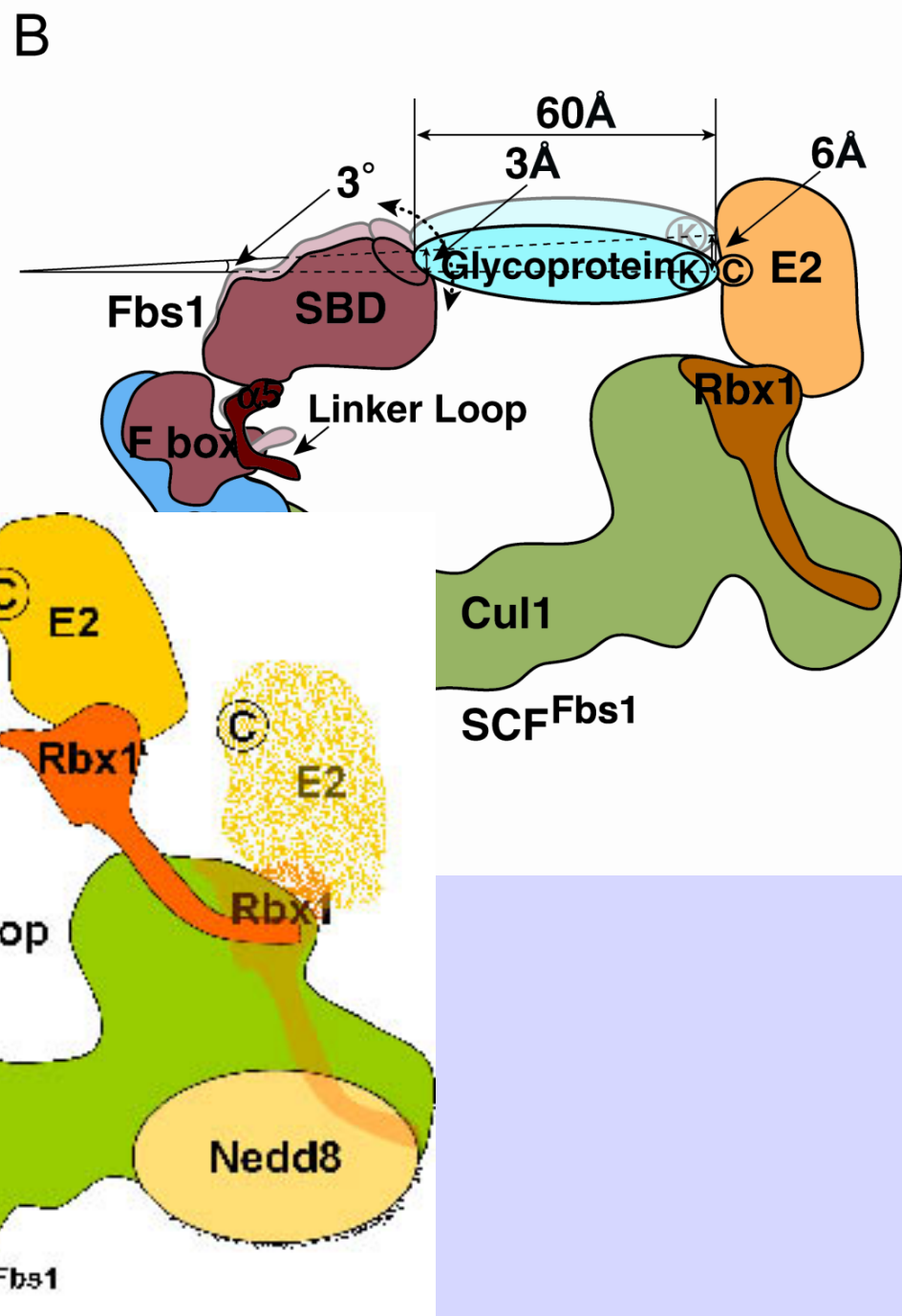
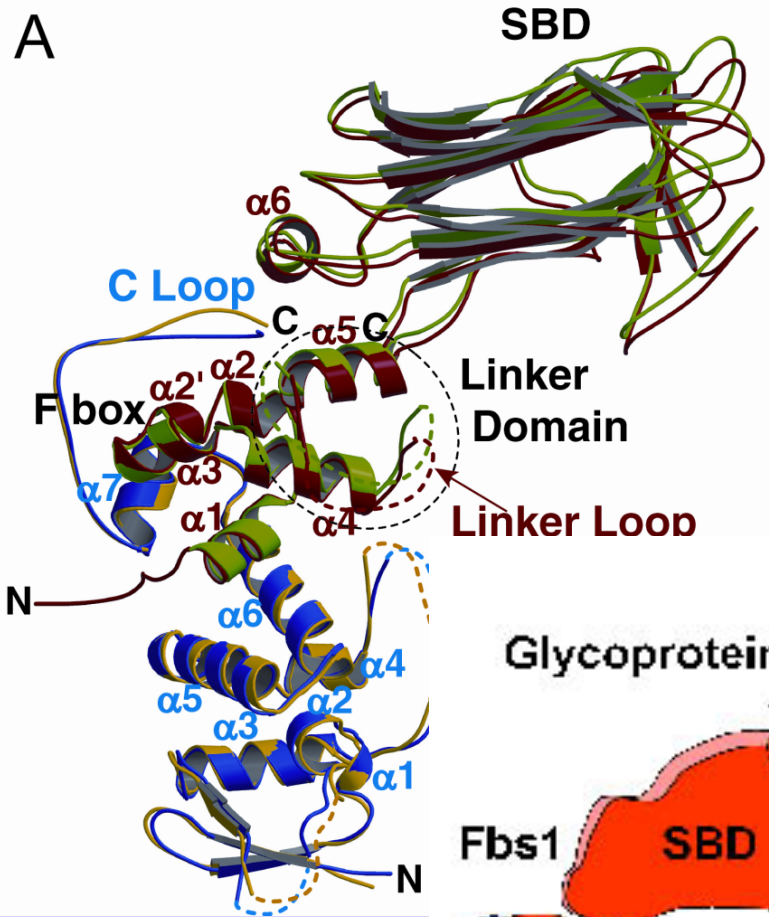
精製

結晶化

構造解析



Fbs1-glycoRNaseB複合体1に基づく 基質-E2-E3 3元モデル構造



The Tenth Korea-China-Japan Joint Symposium on Enzyme Engineering
Haeundae Centum Hotel & BEXCO, Busan, Korea, November 2 – 5 2008

The novel structure and function of pyridoxal-5'-phosphate-dependent fold-type I racemase, α -amino- ϵ - caprolactam racemase

Seiji Okazaki^{1,2}, Atsuo Suzuki¹, **Hidenobu Komeda³**,
Yasuhisa Asano³, Takashi Yamane¹

¹ Department of Biotechnology, Graduate School of
Engineering, Nagoya University

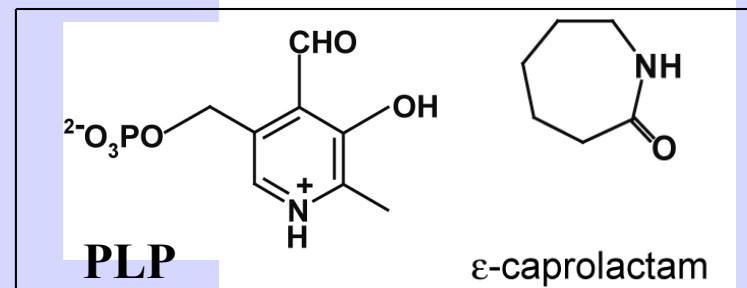
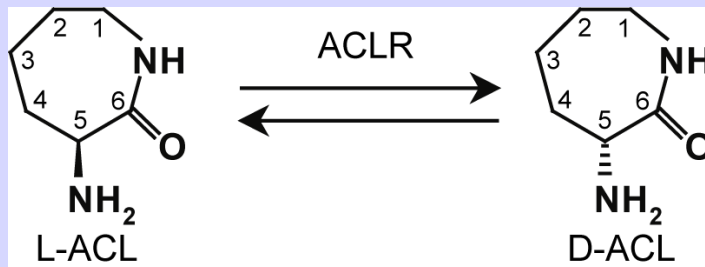
² Venture Business Laboratory, Nagoya University

³ **Biotechnology Research center, Toyama
Prefectural University**



α -amino- ϵ -caprolactam racemase (ACLR)

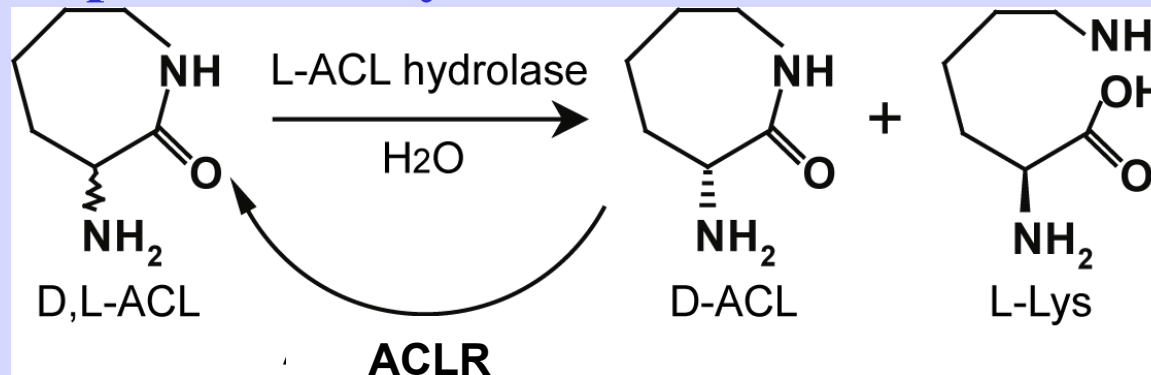
- ACLR from *Achromobactor obae* is a unique **pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme** that catalyzes the racemization of **aminolactam or amino acid amide**.
- **ACLR can not racemize amino acids.**



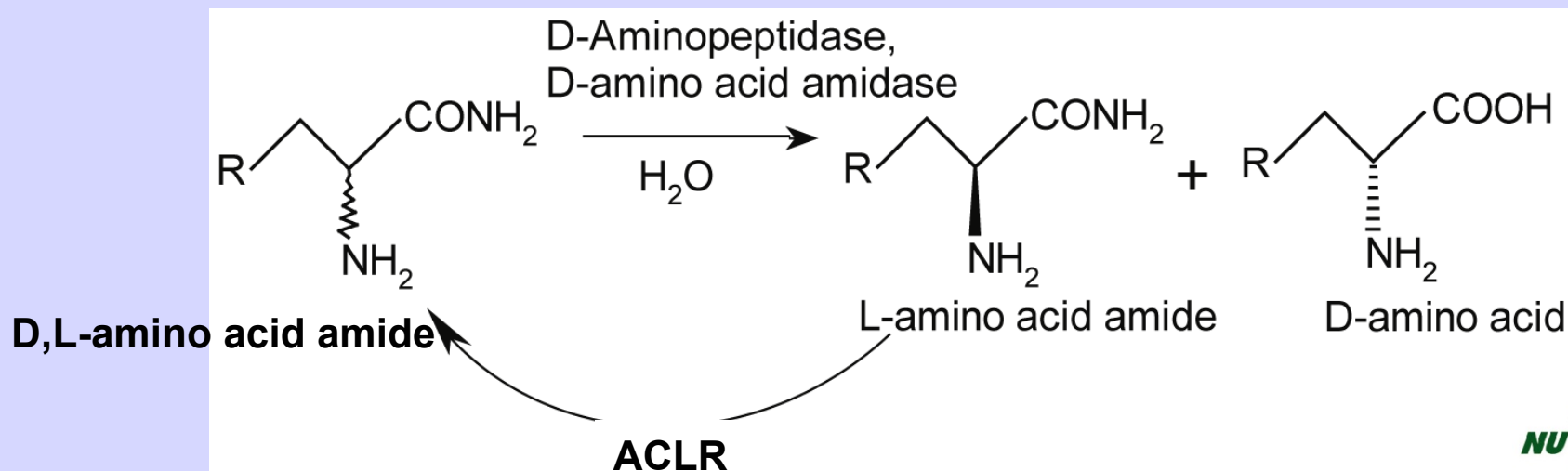
- ACLR is composed of 436 residues.
- **α -Amino- ϵ -caprolactam (ACL)** is one of the substrates.
- Amino acid and ϵ -caprolactam are known as inhibitors.

Novel application of ACLR

- 1 ACLR is combined with L-ACL hydrolase from *Cryptococcus Laurentii* to **produce L-lysine from D,L-ACL**.



- 2 ACLR can be used to **produce D-amino acid** effectively by combining with D-stereospecific amino acid amidase.



D-体特異的認識酵素の利用

- D-アミノ酸は、多くの医薬品や食品添加物や除草剤の合成中間体として利用されていて、その需要はますます拡大している。
- D-アミノ酸やD-アミノ酸含有ペプチドのほとんどが、高いD-立体特異性を有する酵素(例えば、D-アミノペプチターゼ(DAP)や、**D-アミノ酸アミダーゼ(DAA)**など)を用いた酵素法により生産されている。
- DAPやDAAは、ラセミ体のアミノ酸アミドをD-立体選択的に加水分解し、D-アミノ酸とアンモニアを生成するセリンプロテアーゼ(アミダーゼ)である。

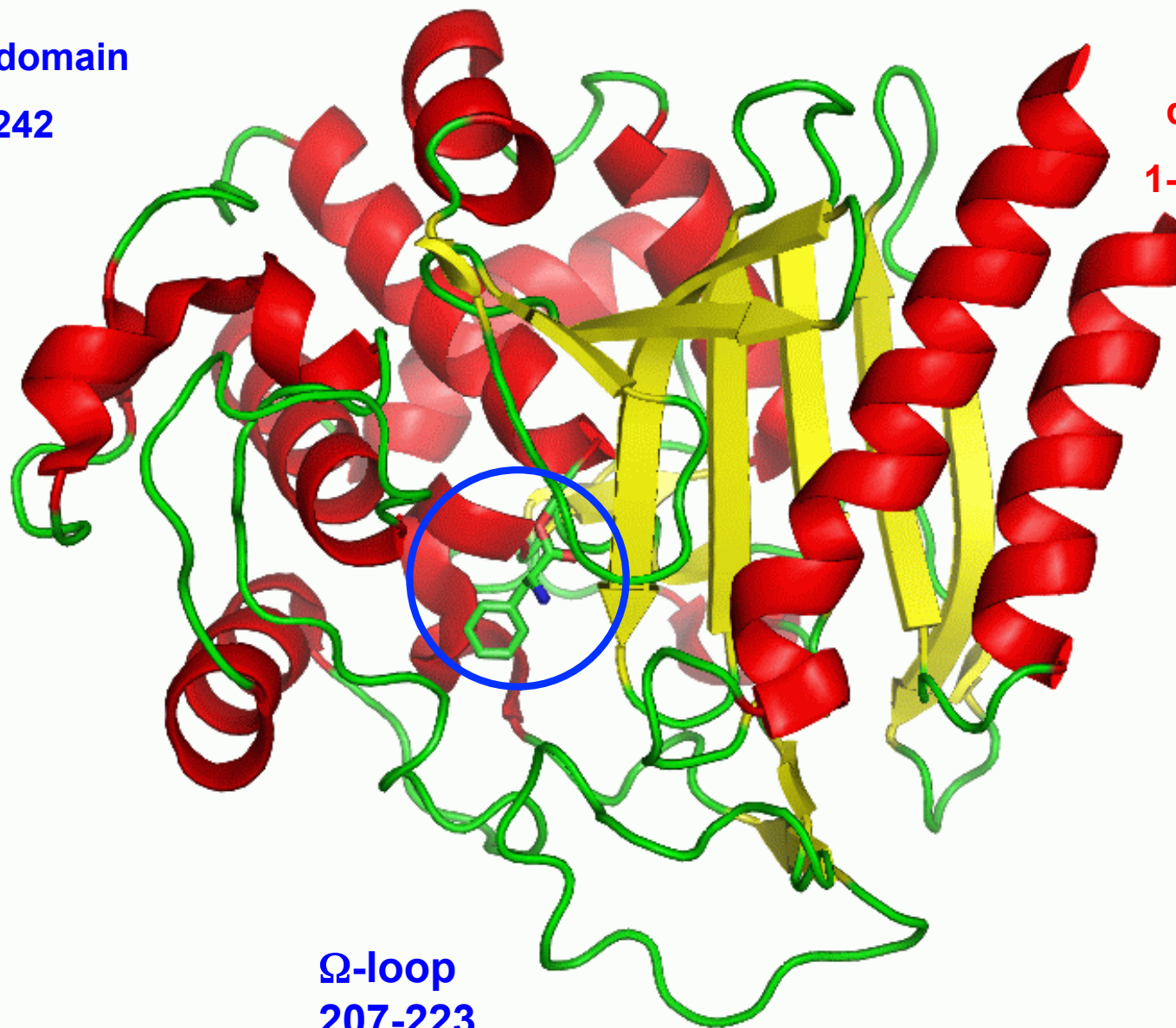
DAAのD-Phe複合体の全体構造

Helical domain

61-242

α/β domain

1-60, 243-363

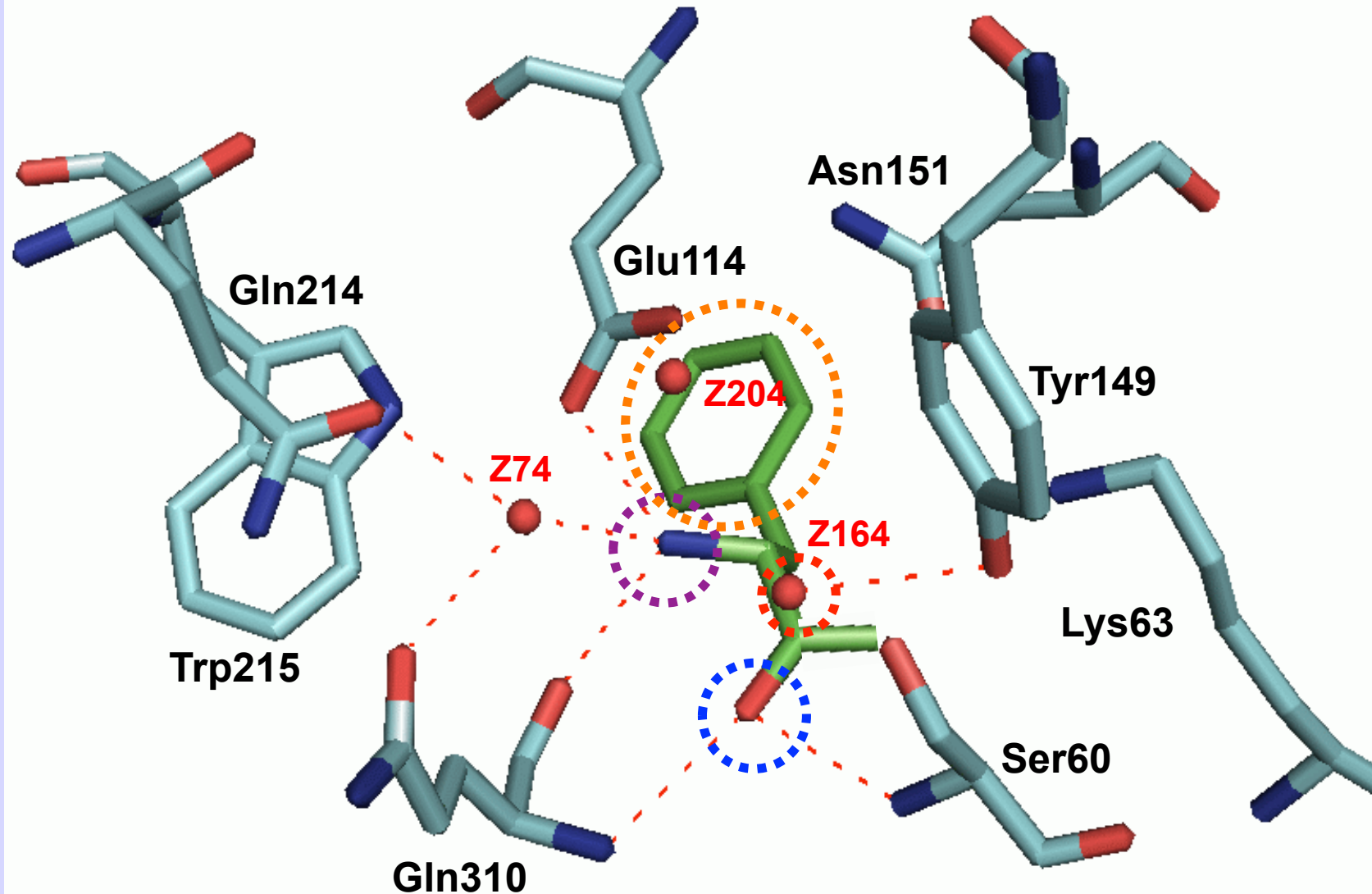


Ω -loop

207-223

"Crystal structure and functional characterization of a D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi* SV3, a new member of the penicillin-recognizing proteins." ,Seiji Okazaki, Atsuo Suzuki, Hidenobu Komeda, Shigenori Yamaguchi, Yasuhisa Asano, and Takashi Yamane, *J. Mol. Biol.*, **368**(1) 79-91 (2007)

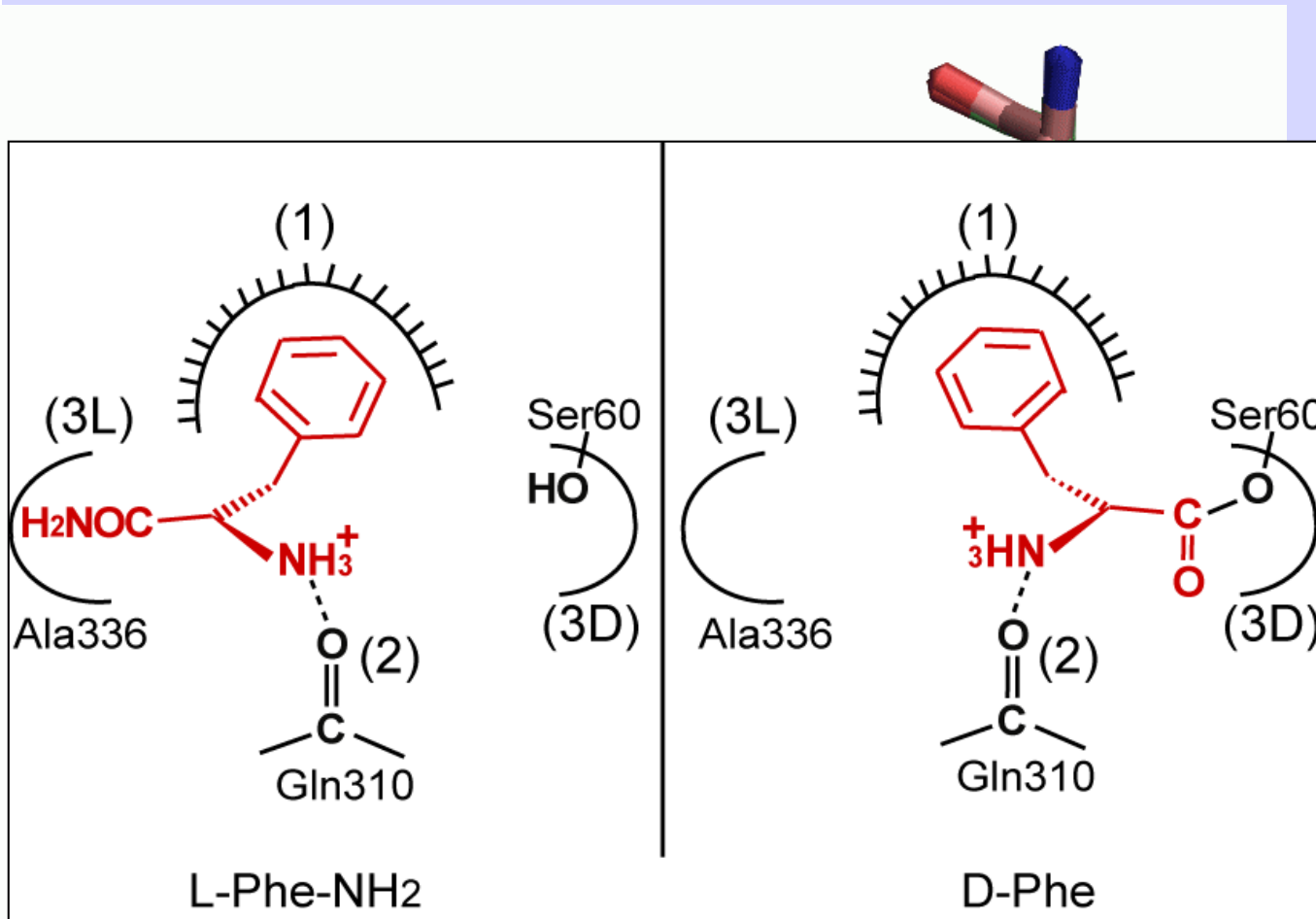
DAAのD-Phe複合体における活性部位



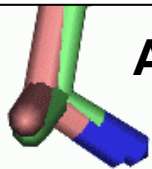
D-Pheの側鎖のフェニル基は、Ala59、Phe113、Glu114、Trp215、Phe234、Ala239、Ala242、Gly243、Ile311により形成される疎水性ポケットに位置。

かさ高い疎水性側鎖を好む、DAAの基質特異性を決定。

DAAのD-立体選択性の構造的要因



- (1) 基質の側鎖を収容する疎水性空洞領域
- (2) 基質のアミノNの固定化に関与するGln310 OとGlu114の側鎖
- (3) Ser60 O_γとAla336の近くの、2つの空間



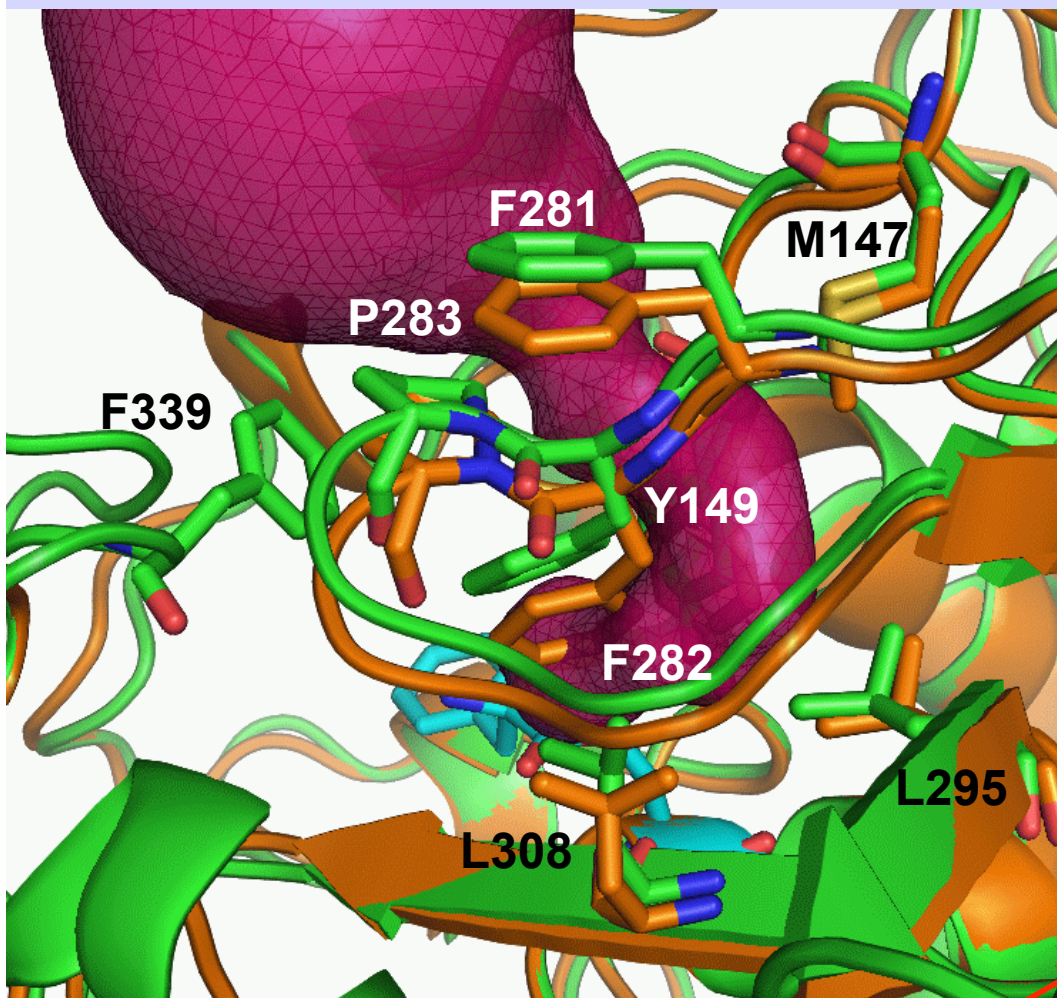
Ala336

Gln310

"Crystal structures of D-amino acid amidase complexed with L-phenylalanine amide: Insight into D-stereospecificity of

- D-Phe 複合体 : **ピンク** ; D-Phe : **マゼンダ**
 - L-Phe-NH₂ 複合体 : **薄緑** ; L-Phe-NH₂ : **深緑**
- Seiji Okazaki, Atsuo Suzuki, Tsunehiro Mizushima, Hidenobu Komeda, Yasuhisa Asano and Takashi Yamane, *Acta Crystallogr. D* **64**(3), 331-334(2008)

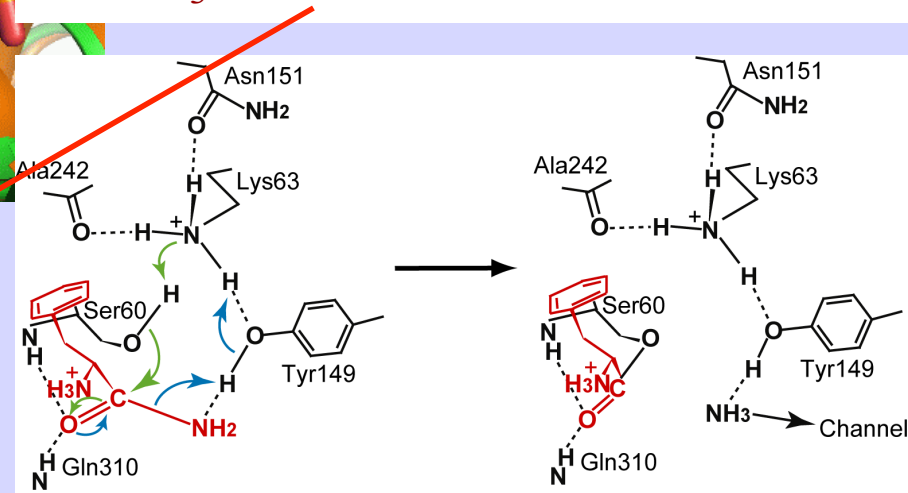
DAAにおける推定上のNH₃チャンネル



- 長さ約20Åの疎水性チャンネル (Tyr149 O η から開始し、多くの疎水性残基の側鎖から形成)。
- 誘導適合における基質結合状態に近い状態と考えられるOrdered type(分子A-E)でのみ存在し、disordered type(分子F)では、Phe282の側鎖により閉鎖。
- NH₃を排出するのに適した位置。

ordered typeの分子C : 緑
disordered typeの分子F : 橙

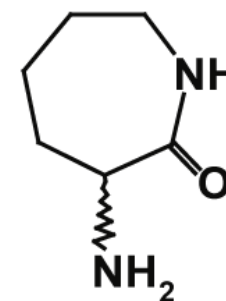
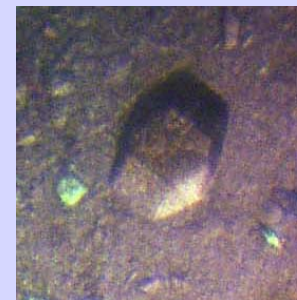
この疎水性チャンネルは、NH₃チャンネルの有力な候補。



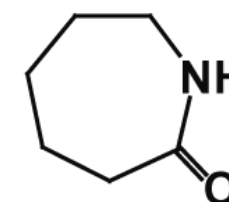
Crystallization of ACLR

Crystallization conditions

Mother liquor	23.3 mg/ml ACLR 70 mM KPB (pH 7.0) 100 μ l PLP
Reservoir sol.	30%(w/v) PEG4000 0.2 M MgCl ₂ 0.1 M Tris-HCl (pH 8.7)
Additive sol.	30%(w/v) Sucrose
Mixing ratio	1.3:1.5:0.3
Size	0.5×0.05×0.03mm ³
Period	2 weeks



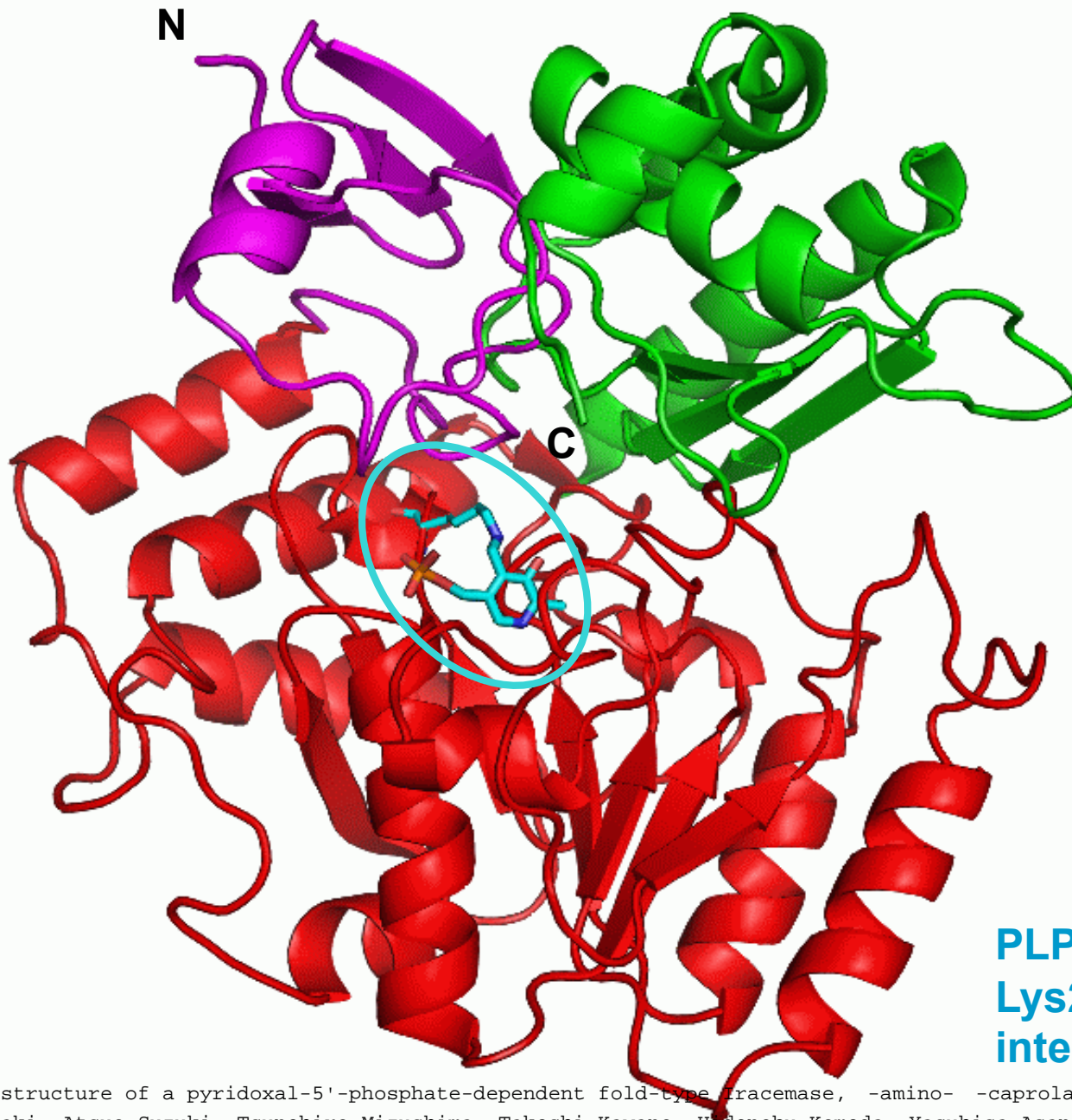
D,L-ACLR



ϵ -caprolactam

- **Crystals of ϵ -Caprolactam complex were prepared by soaking native crystals in the reservoir solution containing 20mM ϵ -caprolactam for 30 second.**

Overall structure of ACLR

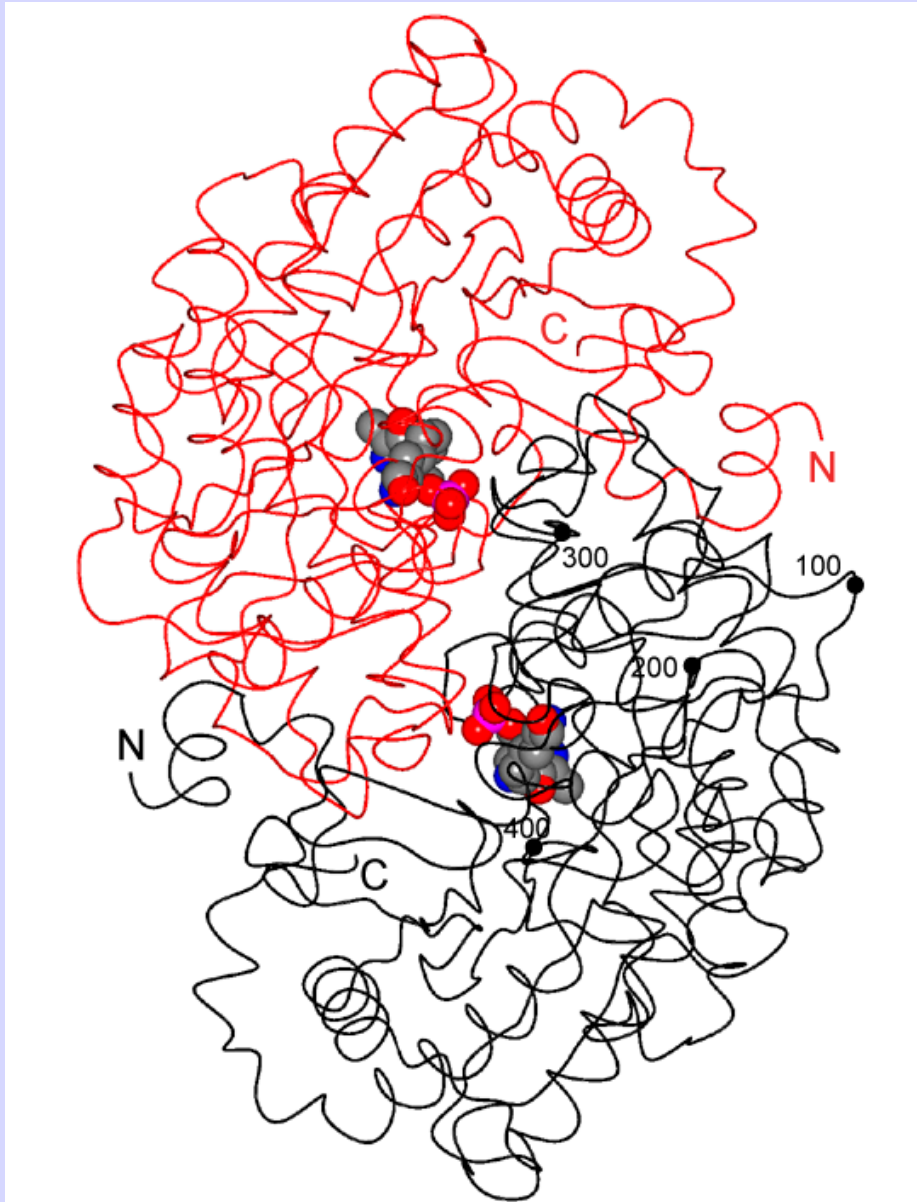


- **N-terminal domain**
(residues 3-58)
- **PLP-binding domain**
(residues 59-318)
- **C-terminal domain**
(residues 319-436)

The active site is located in the cleft between the PLP-binding site and the C-terminal domain

PLP covalently bound to Lys267, to form the internal aldimine linkage

Overall structure of ACLR



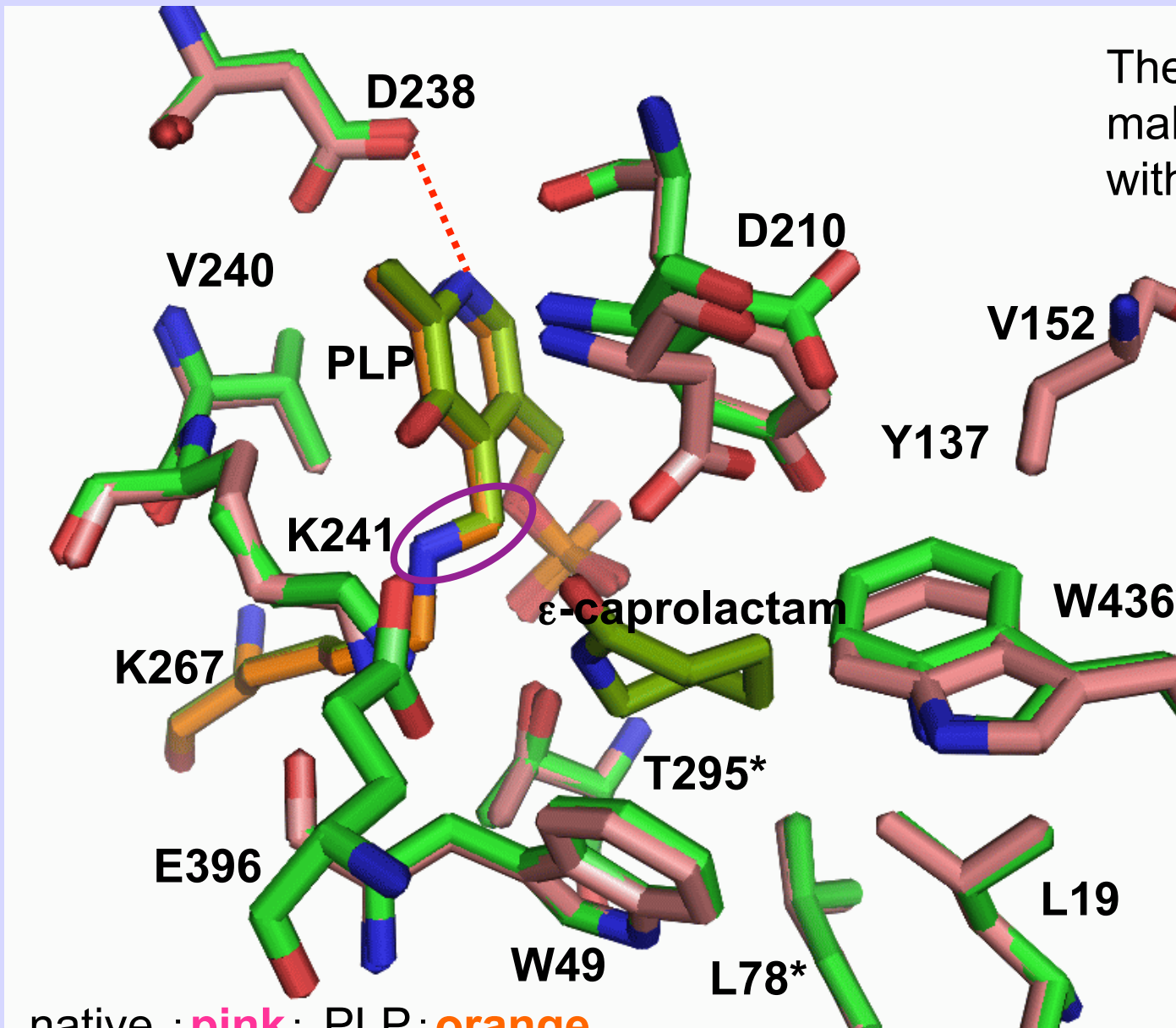
- The two PLP cofactors are located close to each other at the subunit interface of the dimer (the PLP phosphorus atoms are 16.2 Å apart).



- **ACLR forms a dimer in solution like other fold-type I enzymes.**



The active site of ACLR



The pyridine N of PLP makes a salt bridge with Asp238.

ε-caprolactam is sandwiched between W49 and Y137.

native : pink ; PLP : orange

ε-caprolactam complex : green ; PLP and ε-caprolactam : light green

Substrate specificity of ACLR

Supplemental No.1

- L- α -amino- ϵ -caprolactam 100%
- L-2-aminobutyric acid amide 2.7
- L-alanine amide 2.1
- L-threonine amide 1.7
- L-leucine amide 1.3
- L-methionine amide 0.94
- L-serine amide 0.47
- **L-phenylalanine amide 0.052**

Asano *et al.*, *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 36, 22-29. (2005).



ACLRの構造学的研究の展望

- 反応中間体アナログであるN-(5'-phosphopyridoxyl)-L-ACL (PLP-L-ACL)や、PLP-D-ACLとの複合体の結晶構造を決定することにより、基質と酵素間の相互作用や、反応機構を解明。
- L-アミノ酸アミドに対するラセマーゼ活性は、ACLに比べると50~100倍ほど弱いので、変異を導入することにより、L-アミノ酸アミドに対するラセマーゼ活性を向上させ、産業上有用な変異ACLラセマーゼを創出。

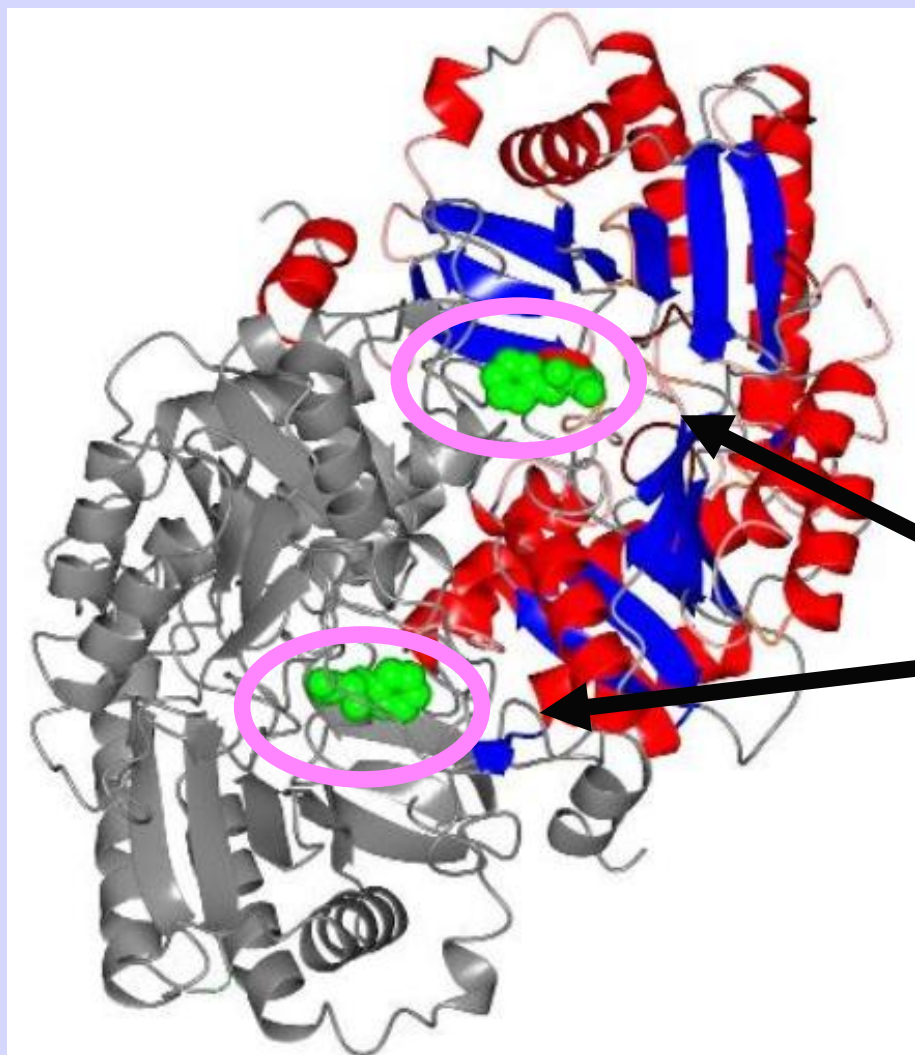


- **L19V, L78T変異ACLラセマーゼの合成、構造解析**
鈴木康二

結晶学データと精密化

	Apoenzyme	L-Phe-NH ₂ complex	L-Leu-NH ₂ complex	L-Ile-NH ₂ complex
Space group	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁	<i>P2</i> ₁
Unit cell parameters				
a (Å)	56.5	56.5	56.8	56.7
b (Å)	61	61.4	61.1	61.1
c (Å)	104.9	104.6	105.2	105.2
β (°)	102.9	103.2	102.9	102.9
Wavelength (Å)	0.9	0.9	0.9	0.9
Resolution (Å)	50-1.77 (1.80-1.77)	50-1.8 (1.83-1.80)	50-1.8 (1.83-1.80)	50-1.8 (2.83-1.80)
R _{merge} (%) ^a	4.5 (18.9)	5.0 (21.5)	5.7 (21.2)	5.1 (16.5)
Average I/σ(I)	47.4 (8.9)	30.4 (6.1)	27.5 (4.3)	32.3 (6.1)
Completeness (%)	99.9 (100)	97.6 (96.7)	99.4 (98.8)	98.1 (96.5)
Multiplicity	3.8 (3.6)	7.4 (5.2)	5.1 (5.0)	5.6 (5.6)
R _{work} /R _{free}	0.165/0.210	0.171/0.225	0.185/0.244	0.191/0.252

ACLラセマーゼ変異体の全体構造

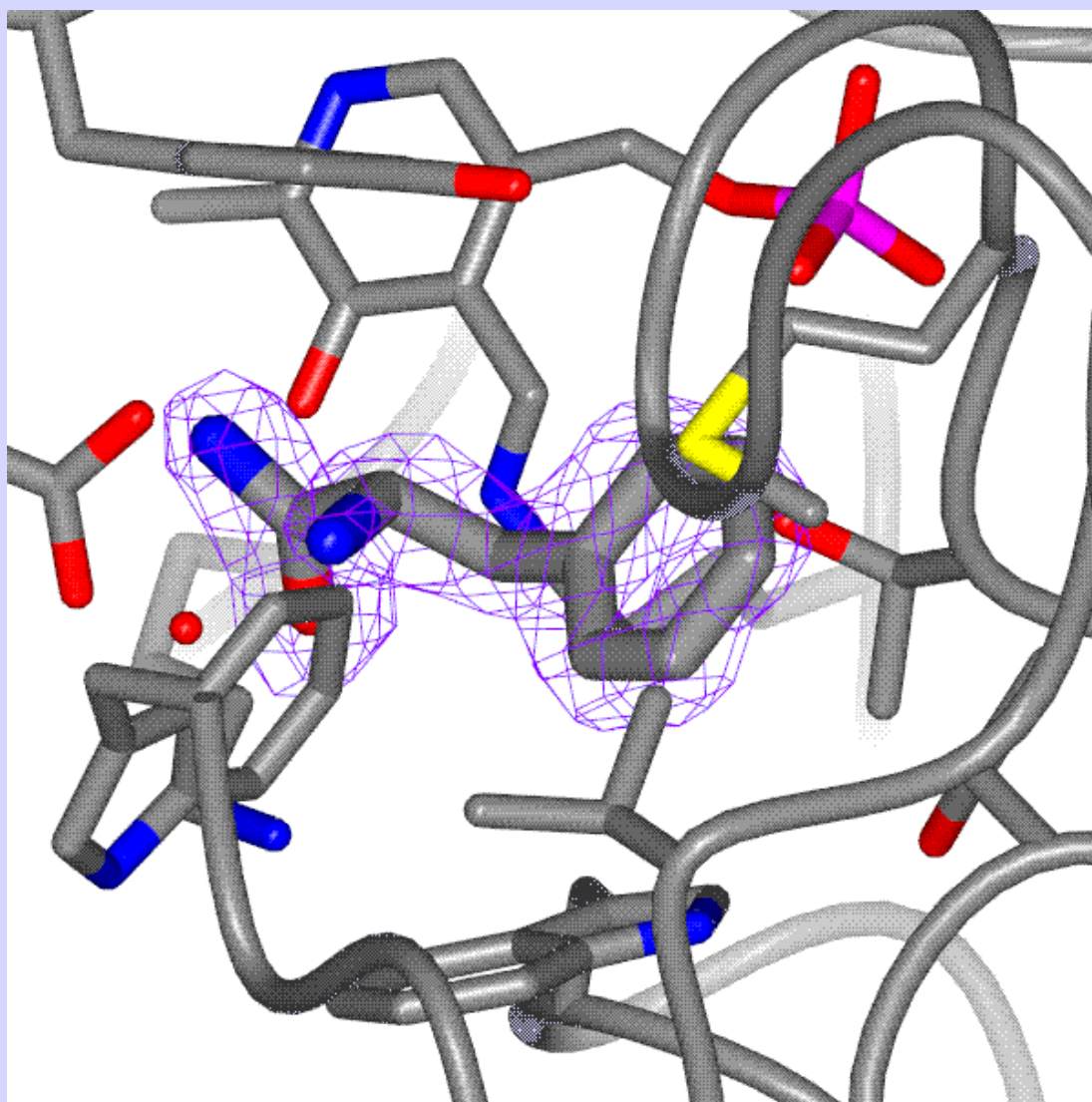


L-Phe-NH₂複合体構造

Phe-NH₂ !

鈴木康二 名古屋大学卒業研究論文 (2009年度)

基質結合ポケットの構造



L-Phe-NH₂
複合体構造

電子密度に
フィット！

Part 3 : インドとの国際交流

・ 構造解析の方法論の開発

Prof. D. Velmurugan, University of Madras, India

**Dr. Kanagaraj Sekar, Indian Institute of Science,
India**

Dr. Arul Venkatesan, Pondicherry University, India

**Prof. Amit Sharma, International Centre for Genetic
Engineering and Biotechnology, India**

**Dr. Jayaraman Sivaraman, National University of
Singapore, Singapore**



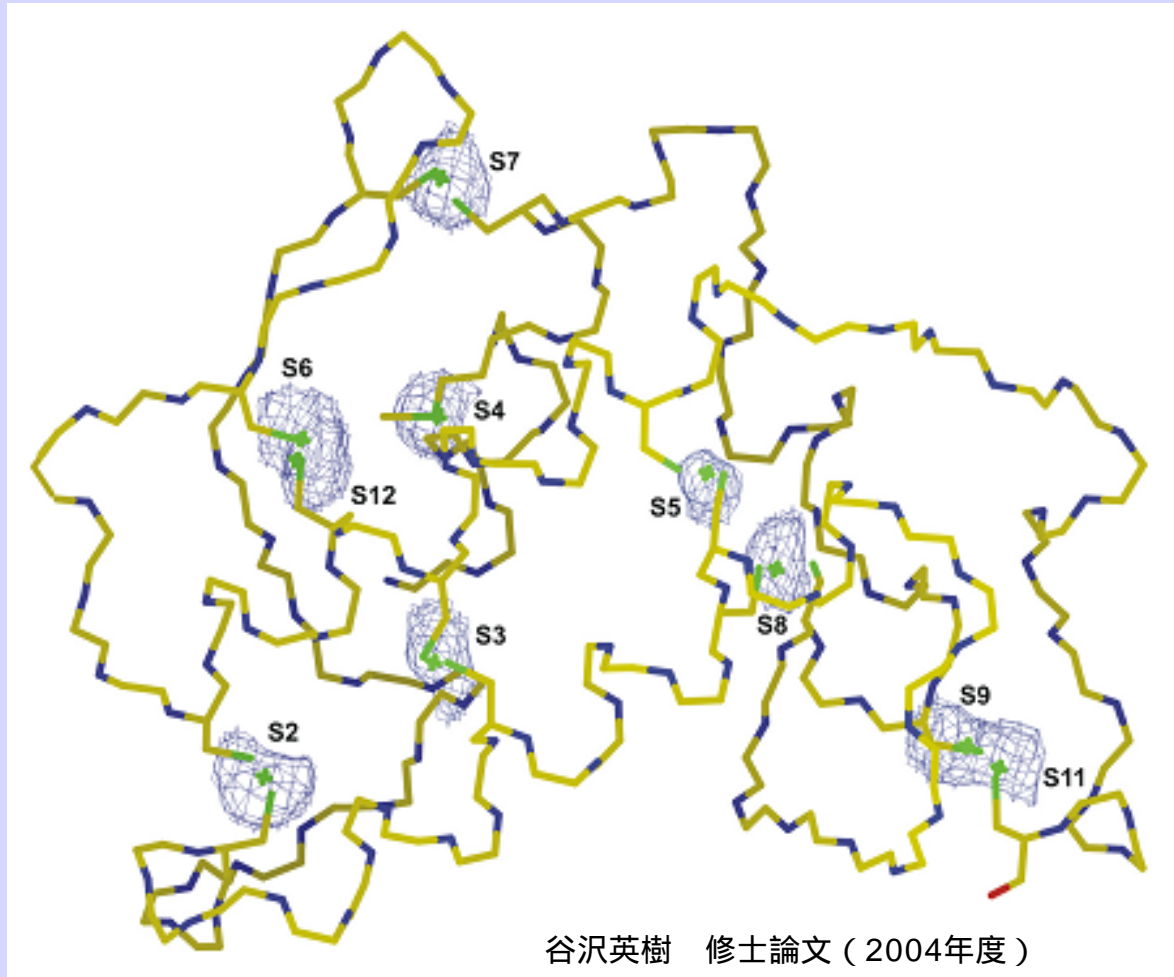
**インドとの国際共同研究 2001～; Prof. D. Velmurugan,
University of Madras & Dr. S. S. S. Raj**

Prof. Devadasan Velmurugan との共同研究の成果

- ・ タンパク質の新しい構造解析法の開発
- ・ 12報発表、1報論文投稿中
- The use of ACORN in solving a 39.5 kDa macromolecule with 1.9 Å resolution laboratory source data, V. Rajakannan, S. Selvanayagam, T. Yamane, T. Shirai, T. Kobayashi, S. Ito and D. Velmurugan, *J. Synchrotron Radiation*, **11**, 358-362 (2004)
- High throughput structure determination for single-wavelength laboratory X-ray source anomalous diffraction data sets using iodine tyrosines, S. Selvanayagam, D. Velmurugan, T. Yamane, and A. Suzuki, *Indian J. Phys.* **82**(1) 27-37 (2008)

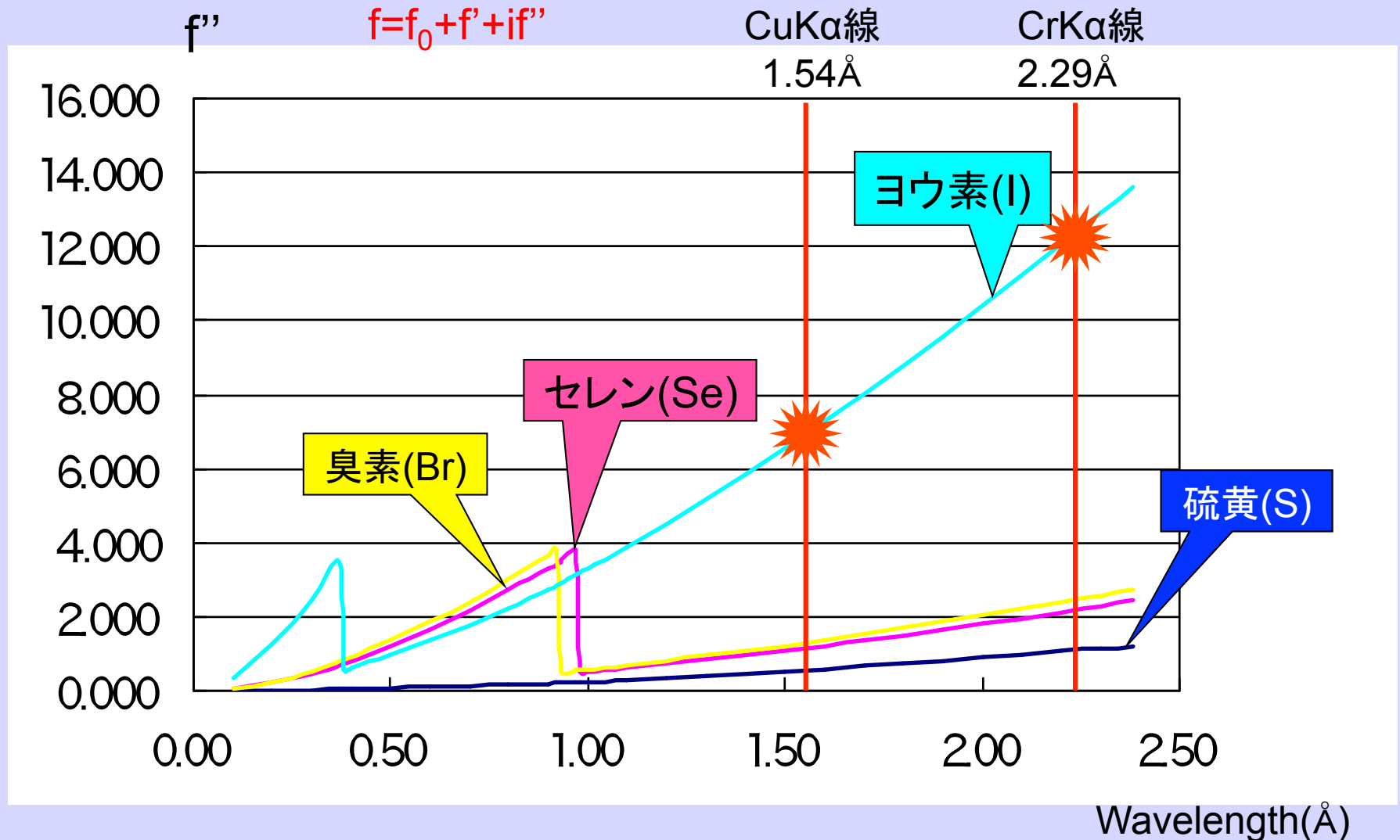
Availability of the X-ray data collected with a Cr rotating-anode for phasing protein crystals

PLA2 from
bovine pancreas,
P3₁21
a=46.2, c=101.4 Å
A total of 89,573 ref.
2.4 Å resolution
Rc=0.211
Rfree=0.249



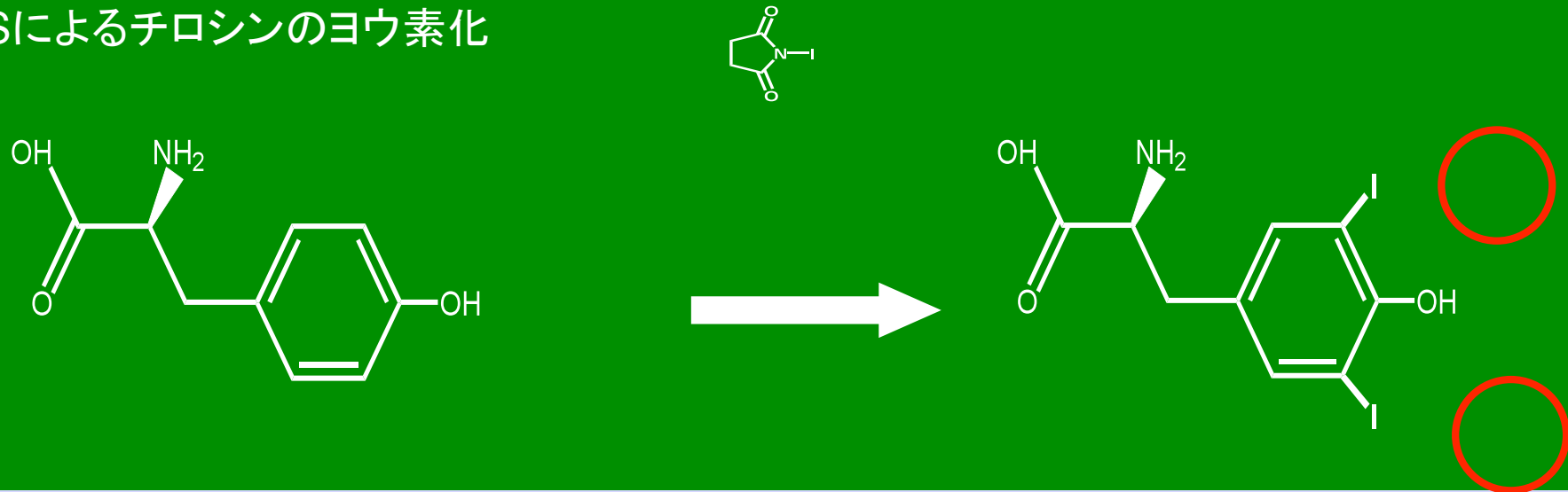
- A. Suzuki, S. Okazaki, Hideki Tanizawa, Tatsuo Hikage, V. Rajakannan, D. Velmurugan, K. Sekar

異常散乱効果の比較



ヨウ素は、実験室系のX線でセレンよりも効果的である。

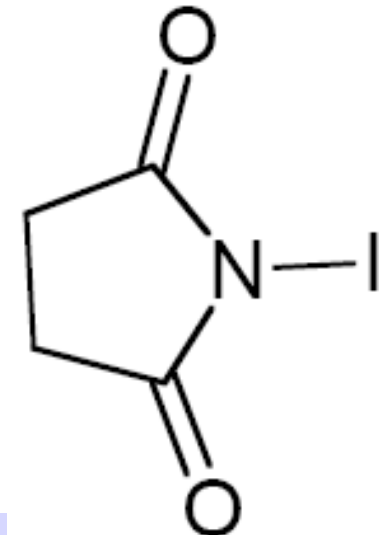
NISによるチロシンのヨウ素化

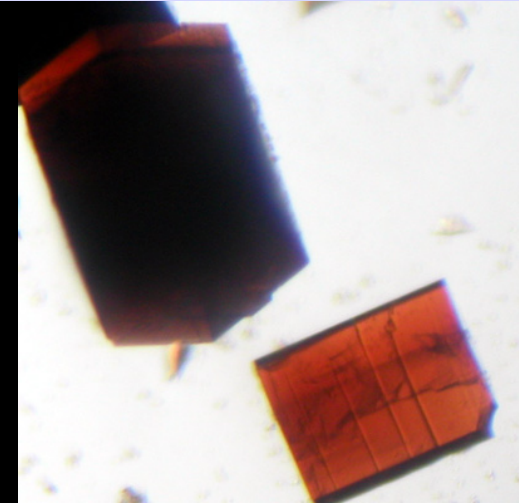
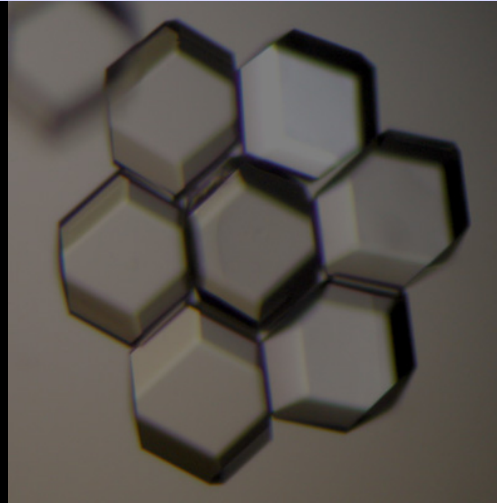


谷沢英樹 修士論文 (2004年度)

NIS(N-iodosuccinimide)を用いた反応

- チロシン残基特異的に反応する。
- 化学反応であるため、高い占有率を期待できる。
- チロシン残基はメチオニン残基より多いため、多くの異常散乱子の導入が期待される。





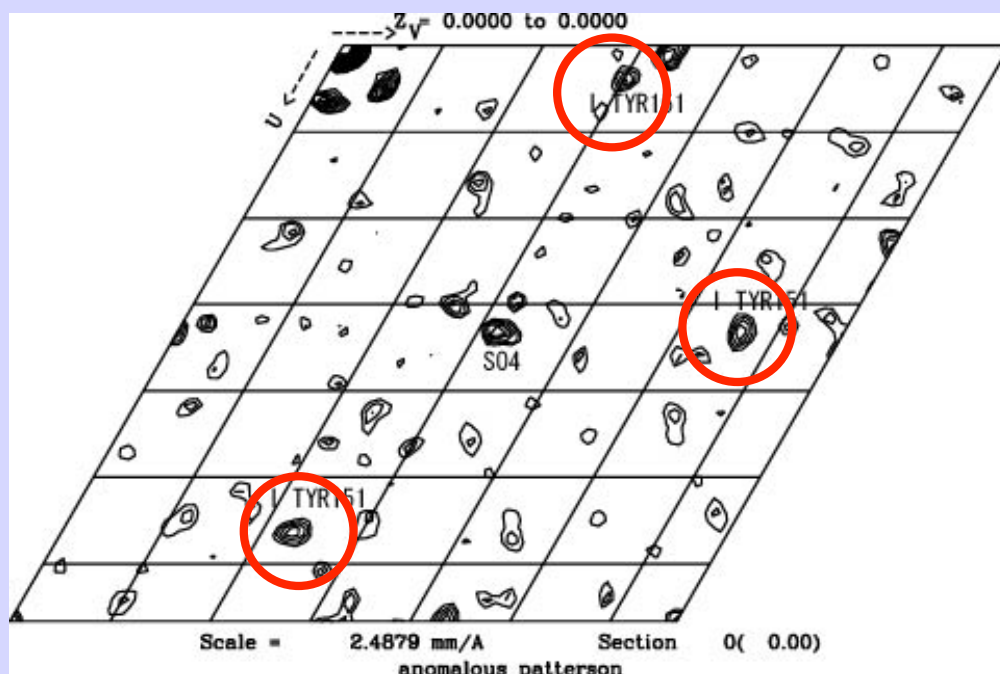
ミオグロビン

ミオグロビン

- 分子量17kDa
- 残基数154
- チロシン残基は3残基
- 硫黄原子は3残基

ミオグロビンは、筋肉中において酸素分子を代謝に必要な時まで貯蔵する色素タンパク質である。

異常分散原子サイトの決定



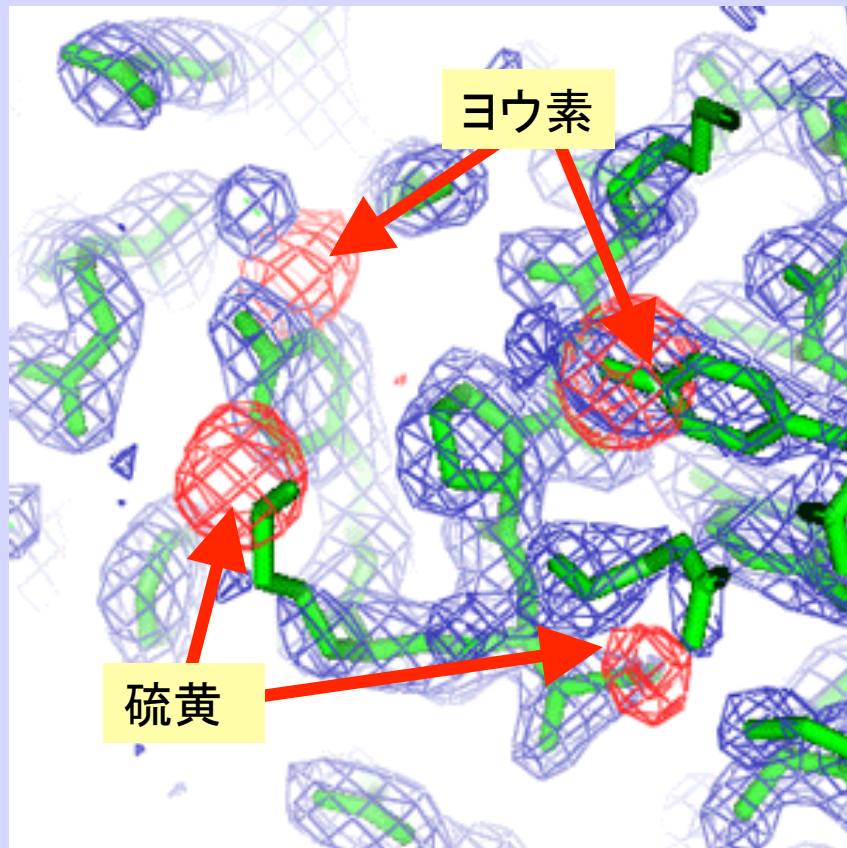
Rank	Relative height	Atom	Site
1	1	I	TYR 151
2	0.797	S	MET 55
3	0.780	S	MET 131
4	0.675	S	SO4
5	0.590	Fe	
6	0.577	S	SO4
7	0.479	I	TYR 103
8	0.312	I?	

Anomalous差パターン図

SHELXによるサイトの
検索結果

3個中2個のチロシン残基のヨウ素修飾を確認

ミオグロビンの分子モデルの 自動構築



青：電子密度

赤：異常散乱効果のある部分

154残基中、152残基
(99%)を自動構築

- 分子量に対するヨウ素の割合が多かったため、容易に解くことができ
- Connectivity Index = 0.99, R=0.207, Rfree=0.251

A photograph of two men standing in front of a building with large windows. The man on the left is younger, with dark hair and a beard, wearing a light-colored jacket over a blue sweater. The man on the right is older, with white hair and glasses, wearing a dark suit jacket over a turtleneck and a light-colored shirt. The building has a reddish-brown textured facade. The text is overlaid in red on the bottom half of the image.

**Guest House, International Center of
Genetic Engineering and Biotechnology,
with Prof. Amit Sharm
(2008年 招へい)**

やりたいと思うタンパク質の 研究に行き着く

- 名古屋医療センターとの共同研究
 - 杉浦亙先生、岩谷靖雅先生、金田次弘先生
 - HIV protease, HIV integrase 他
 - 村瀬泰之、栗本佑介、木村雄貴、北村紳悟
- 東京理科大学との共同研究
 - 小祝修先生
 - 鋳型に依存しないDNA polymerase制御因子他
 - 小祝孝太郎

- 富山県立大学との共同研究

- 浅野泰久先生

- 工業応用に有用な酵素群

- 岡崎誠司、Charles Cielo、鳥本大介、鈴木康二

- 名古屋地区へのシンクロトロン光源

- 設置の実現

- SADへの挑戦

タンパク質構造を決められなかったのは残念

今後の発展は

渡邊信久先生、鈴木淳巨先生に



Helderlinterm, Tuebingen, Germany

幾たびか海外出張の機会に
恵まれて、貴重な経験

何事も行って見ないと解らない

1, 2年の内にドイツに！

謝辞

研究室関係教職員

芦田玉一先生、鈴木淳巨先生、白井剛先生、
水島恒裕先生、渡邊信久先生、日影達夫技
術職員

長坂美奈子さん、光井秀子さん、小島廣子
さん、恒川安代さん、河口洋子さん

Dr. S. Raj, D. V. Rajakannan, 金相佑博士、
岡崎誠司博士、河村高志博士

化学・生物工学科の先生方、事務職員、技
術職員の方々

環境安全衛生管理室、環境安全支援課の
の方々、全学技術センターの方々

共同研究
信州大学

関口順一先生

名古屋大学遺伝子実験施設

杉田護先生、杉山康雄先生

名古屋大学理学研究科

渡辺芳人先生、上野隆文先生

花王栃木研究所

伊藤進先生

日本原子力研究所東海研究所

新村信雄先生

大阪大学理学研究科

倉光成紀先生、増井良治先生

構造解析

石川拓生、加藤雅規、高橋健夫、長谷川輝明、陸田真宏、結城幸一、木伏英史、久山和雄、沼田淳、田崎弘、上野真義、山田裕人、松本房子、森部鎌志、藤掛真広、山田洋樹、岸田信之、大竹康貴、吉田修、田中道明、木林秀行、小田竜一、齋藤玲子、野尻佳子、平岡浩佑、堀田博嗣、篠田宜宏、下田俊明、小山康広、角野広治、Kuang Yunhong、戸田雄之、河野正晴、松脇洋平、加古武士、武本明弘、堀口由紀子、金海松、呉雄介、岩田翔也、毛利雄大、谷内麻美、Siu Ching Tat、岡田和之、山田裕之

タンパク3000

牧香里、河合健太郎、木原崇志、恩田大輝、鬼頭佑輔、大橋菜芳、近藤和良、山下毅、Charles Cielo

インフォマティクスー白井剛先生

石田裕一、加藤裕二、松田佳子、賀島一恵、大野雅範、伊佐治知也、光山くらら、堀田秋津、安井友二郎、恩田基弘、別所真知子、Cetin Hikmet

新規結晶化、解析法ー鈴木淳巨先生

日高輝夫、佐藤敬、大原卓、寺島貴信、長谷川嘉弘、谷澤秀樹、高谷周、松田賢司、福島旭仁、加藤泰平、石井宏明、吉田祐士、米津真之介

AFM研究ー谷口美恵子先生

松原勉、鈴木繁仁、広瀬貴士、松岡透、江坂宗佳、岡田千真理、大西寛貴、平野智子、辰田陽介、白石聡史