2.3.11　　研究分野：応用構造生物学

構成員：	教授	三上　文三
	助教	高橋　延行
	助教	水谷　公彦
	大学院博士後期課程	1 名
	大学院修士課程	3 名
	専攻 4 回生	3 名

A.研究活動（2009.4～2010.3）

A-1.研究概要

a)タンパク質・酵素の立体構造の決定に関する研究

タンパク質（卵白タンパク質、種子タンパク質、レクチン、免疫関連タンパク質など）や酵素（アミラーゼ、プルラナーゼ、トランスグルタミナーゼ、プロテイングルタミナーゼ、セルラーゼ、多糖リアーゼなど）の立体構造をＸ線結晶構造解析法によって決定している。オボトランスフェリン等については水素原子の位置を明らかにするため、高分解能Ｘ線回折と中性子線回折を行っている。また、トランスグルタミナーゼとプロテイングルタミナーゼについては、アポ型と成熟型の立体構造を解明し、変異体を用いてその触媒機構の解明を行っている。

b)Ｘ線結晶構造解析を用いたタンパク質の機能解析とタンパク質工学

β－アミラーゼやプルラナーゼはデンプンからマルトースやグルコースの工業的製造に用いられている酵素であり、これらの酵素の機能をその立体構造に基づいてタンパク質工学により改変することを試みている。ダイズ起源のβ－アミラーゼの至適 pH は酸性側にあるのに対して微生物起源のβ－アミラーゼの至適 pH は中性付近にある。両者の構造を詳細に検討した結果、触媒残基周辺の少数の残基が相違し、これらのアミノ酸残基の相互変換により、両β－アミラーゼの至適 pH を相互に変換することに成功した。また、活性部位周辺の可動ループ上の残基のアミノ酸置換により生成物特異性を変更できることを明らかにしている。また、プルラナーゼについては活性部位周辺のループのアミノ酸置換体を作製して基質特異性の変更を試みている。
卵白タンパク質の主成分であるオボアルブミンは、脊椎動物にあって生理的に重要な役割を果たす serine proteinase inhibitor（セルピン）と祖先を共通にするが、阻害機能をもたない。そこで立体構造に基づく変異を加え、オボアルブミンに阻害活性

を付与するための研究を行っている。その結果、オボアルブミンの ariginine 残基（339 番目）を threonine に置換した変異体 R339T では、serine proteinase による P1-P1’サイトの切断後、阻害活性の発現に不可欠のステップである loop 挿入による大きな立体構造変化を起こすことを結晶構造解析により初めて証明した。また、loop 挿入速度を顕著に増強した変異体の取得にも成功している。オボアルブミン以外にもニューロセルピン等の構造機能相関の解明を行っている。

c)X 線結晶構造解析のためのタンパク質発現系構築法の開発

酵母（Saccharomyces cerevisiae および Pichia pastoris）を用いた真核生物の膜タンパク質、分泌タンパク質の簡便かつ迅速な発現系の構築法を開発し、タンパク質の X 線結晶構造解析の効率化、迅速化を試みている。

A-2.研究業績（国内・国外含む）

a)成果刊行

著　書

・三上文三、丸山伸之、内海　成：グロブリンタンパク質．大豆のすべて（喜多村啓介他編）p.115-121、サイエンスフォーラム、東京、2010.

原著論文（査読付）

・Sakurama H, T. Takita, B. Mikami, T. Itoh, K. Yasukawa, K. Inouye: Two crystal structures of lysyl-tRNA synthetase from Bacillus stearothermophilus in complex with lysyladenylate-like compounds: insights into the irreversible formation of the enzyme-bound adenylate of L-lysine hydroxamate. J. Biochem., 145 (5); 555-563, 2009.

・Ochiai A, T. Itoh, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata: Structural determinants responsible for substrate recognition and mode of action in family 11 polysaccharide lyases. J. Biol. Chem., 284 (15):10181-10189, 2009.

・Takehara S, M. Onda, J. Zhang, M. Nishiyama, X. Yang, B. Mikami, D.A. Lomas; The 2.1-Å crystal structure of native neuroserpin reveals unique structural elements that contribute to conformational instability. J. Mol. Biol., 388 (1): 11-20 2009.

・Hashimoto W., A. Ochiai, K. Momma, T. Itoh, B. Mikami, Y. Maruyama, K. Murata: Crystal structure of the glycosidase family 73 peptidoglycan hydrolase FlgJ. Biochem. Biophys. Res. Commun., 381 (1):16-21 2009.

・Hashimoto W., A. Ochiai, J. He, T. Itoh, B. Mikami, K. Murata: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the cell-surface alginate-binding protein Algp7 isolated from Sphingomonas sp. A1. Acta Crystallogr. Sect. F, 65

(Pt 5): 515-517, 2009.

・Maruyama Y., Y. Nakamichi, T. Itoh, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata: Substrate specificity of streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolases for sulfated glycosaminoglycan. J. Biol. Chem., 284 (27):18059-18069, 2009.

・Matsuda S., N. Yokochi, Y. Yoshikane, J. Kobayashi, C.N. Huy , S. Baba, S. Kuramitsu, B. Mikami, T. Yagi: Crystallization and preliminary X-ray analysis of 4-pyridoxolactonase from Mesorhizobium loti. Acta Crystallogr. Sect F, 65 (Pt 9); 886-889, 2009.

・Ogura K., M. Yamasaki, T. Yamada, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata K: Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action. J. Biol. Chem., 284 (51); 35572-35579, 2009.

・Masuda T., F. Goto, T. Yoshihara, B. Mikami: Crystal structure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin. J. Biol. Chem., 285 (6):4049-4059, 2010.

・Tsuruta H., B. Mikami, T. Higashi, Y. Aizono: Crystal structure of cold-active alkaline phosphatase from the psychrophile Shewanella sp. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74 (1): 69-74 2010.

・Mizutani K., K. Hashimoto, N. Takahashi, M. Hirose, S. Aibara, B. Mikami: Structural and functional characterization of recombinant human serum transferrin secreted from Pichia pastoris. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74 (2):309-315 2010.

<u>報告書等</u>

・Masuda, T., S. Kigo, K. Ohta, B. Mikami,N. Kitabatake: 味覚関連タンパク質の機能発現に関する構造生物学的解析 SPring-8 User Experiment Report 2009A1096, 2009.

・Mikami, B., H. Urabe, T. Yoshimura, R. Hashizume, N. Maruyama, S. Utsumi: X-Ray crystallographic analysis of peanut conarachin. SPring-8 User Experiment Report 2009A1165, 2009.

・Mikami, B., Y. Toyoda, T. Saito, M. Adachi, S. Utsumi: X-ray crystallographic analysis of mutant b-amylase/maltose complex. -Titration of two loop conformations of G97A by maltose-. SPring-8 User Experiment Report 2009A1168, 2009.

・Takase, R., A. Ochiai, Y. Nakamichi, T. Itoh, K. Ogura, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata: X-ray Crystal Structure of Sphingomonas sp. A1 α-Keto Acid Reductase for Alginate Metabolism. SPring-8 User Experiment Report 2009A1179, 2009.

・Masuda, T., F. Goto, T. Yoshihara, T. Yoshimura, B. Mikami: X-ray crystallographic analysis of phytoferritin subunit from soybean. SPring-8 User Experiment Report 2009A1249, 2009.
・Maruyama, Y., A. Chuma, A. Ochiai, K. Ogura, Y. Nakamichi, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata: X-ray structural analysis of the metallopeptidase family M16 enzyme. SPring-8 User Experiment Report 2009A1329, 2009.
・N. Kishi, B. Mikami, F. Goto, T. Yoshihara: X-Ray crystallographic analysis of soybean ferritin variant E173A. SPring-8 User Experiment Report 2009A6935, 2009.
・Takase, R., A. Ochiai, T. Itoh, K. Ogura, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata: 植物細胞壁多糖からのバイオエタノール生産に関わる細菌酵素系の構造生物学. SPring-8 User Experiment Report 2009B1177, 2009.
・Maruyama, Y., A. Chuma, A. Ochiai, K. Ogura, Y. Nakamichi, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata: Crystal structure of the metallopeptidase family M16 enzyme from Sphingomonas sp. strain A1. SPring-8 User Experiment Report 2009B1192, 2009.
・Nakamichi, Y., Y. Maruyama, T. Itoh, A. Ochiai, B. Mikami, W. Hashimoto, K. Murata: グリコサミノグリカンの分解に関わる連鎖球菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼのX線結晶構造解析とその医薬分野への応用. SPring-8 User Experiment Report 2009B1192, 2009.
・Masuda, T., S. Kigo, B. Murata, N. Kitabatake: 甘味関連タンパク質の機能発現に関する高分解能構造解析.　SPring-8 User Experiment Report 2009B1379, 2009.
・Mikami, B., M. Tandang, T. Yoshimura, R. Hashizume, T. Masuda, N. Maruyama: X-Ray crystallographic analysis of pro legumin from amaranth. SPring-8 User Experiment Report 2009B1299, 2009.
・Mikami, B., M. Adachi, A. Tanabe, R. Hashizume, T. Yoshimura, S. Utsumi: X-ray crystallographic analysis of loop-less beta-amylase/maltose complex. SPring-8 User Experiment Report 2009B1461, 2009.
・Mikami, B., M. Tandang, N. Maryuama, T. Itoh, S. Takehara, S. Utsumi: X-Ray crystallographic analysis of plant seed globulins. SPring-8 User Experiment Report 2009B6935, 2009.

A-3.国内における学会活動など

所属学会等（役割）

・三上　文三：日本応用糖質学会（編集委員）

競争的資金等獲得状況

①科学研究費補助金

・基盤研究(B) ：三上文三：食糧関連酵素のループ機能の解明

・基盤研究（C)：高橋延行：アミロイド形成抑制の分子論的基盤：オボアルブミン重合体における分子間β構造の役割

②その他の競争的資金

・文部科学省　ターゲットタンパクプロジェクト：橋本　渉（三上　分担）：多糖の輸送・分解に関わる細菌由来超分子の構造生物学とその食品・環境分野への応用

・生研機構基礎研究推進事業　イノベーション創出基礎的研究推進事業:村田幸作(三上　分担）：海性バイオマス（アルギン酸）からのエタノール生産基盤

A-4. 国際交流・海外活動

国際共同研究・海外学術調査等

・有用酵素の高次構造. 三上文三　(韓国、ソウル大学)

B. 教育活動（2009. 4～2010. 3）

B-1. 学内活動

a）開講授業科目（担当教員）

・全学共通科目：　応用生命科学（三上）

・学部：　構造生物学（三上）、応用生命科学入門Ⅰ（三上）、生物理化学実験（三上、高橋、水谷）

・大学院：　応用構造生物学（三上）、応用構造生物学専攻実験（三上、高橋、水谷）、応用構造生物学実習（三上、高橋、水谷）

B-2. 学外における教育活動

学外非常勤講師

・三上　文三：神戸大学農学部（高分子機能化学）、島根大学農学部（食品生化学）、近畿大学農学部（生命科学基礎）、同志社大学生命医科学部（特別講義）

・高橋　延行：武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科（生化学）

C. その他

・三上　文三：原子力機構中性子ビーム利用専門部会専門委員