

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 水谷公彦
	大学院博士後期課程	2名
	大学院修士課程	3名
	専攻4回生	3名

A. 研究活動（2010.4～2011.3）

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（ α -アミラーゼ、プルラーゼ、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1.

β -アミラーゼや α -アミラーゼ、プルラ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。

c) 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 2.

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 arginine 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。

d) 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

原著論文 (書評論文を含む)

・Ochiai A., Yamasaki M., Mikami B., Hashimoto W., Murata K.: Crystal structure of exotype alginate lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Biol. Chem.*, 285, 24519-24528 2010. 査読有

・Chu H.N., Kobayashi J., Yoshikane Y., Mikami B., Yagi T.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of SDR-type pyridoxal dehydrogenase from *Mesorhizobium loti*. *Acta Crystallogr. Sect F*, 66, 718-720. 2010. 査読有

・Takahashi N., Maeda M., Yamasaki M., Mikami B.: Protein-engineering study of contribution of conceivable D-serine residues to the thermostabilization of ovalbumin under alkaline conditions. *Chem. Biodivers.*, 7, 1634-1643 2010. 査読有

・Maruyama Y., Ochiai A., Itoh T., Mikami B., Hashimoto W., Murata K.: Mutational studies of the peptidoglycan hydrolase FlgJ of *Sphingomonas* sp. strain A1. *J. Basic. Microbiol.*, 50, 311-317 2010. 査読有

• Mizutani K., Toyoda M., Sagara K., Takahashi N., Sato A., Kamitaka Y., Tsujimura S., Nakanishi Y., Sugiura T., Yamaguchi S., Kano K., Mikami B. :X-ray analysis of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* at 2.3 Å resolution using a twinned crystal. *Acta Crystallogr. Sect F*, 66, 765-770 2010. 査読有

• Toyoda M., Jitsumori K., Mikami B., Wackett L.P., Kurihara T., Esaki N. :Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-azetidine-2-carboxylate hydrolase from *Pseudomonas* sp. strain A2C. *Acta Crystallogr. Sect F*, 66, 801-804 2010. 査読有

• Nakagawa M., Ueyama M., Tsuruta H., Uno T., Kanamaru K., Mikami B., Yamagata H. :Functional analysis of the cucumisin propeptide as a potent inhibitor of its mature enzyme. *J. Biol. Chem.*, 285, 29797-29807 2010. 査読有

• Takase R., Ochiai A., Mikami B., Hashimoto W., Murata K. :Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas* sp. *Al.Biochim. Biophys. Acta.*, 1804, 1925-1936 2010. 査読有

• Takehara S., Zhang J., Yang X., Takahashi N., Mikami B., Onda M. :Refolding and polymerization pathways of neuroserpin. *J. Mol. Biol.*, 403, 751-762 2010. 査読有

• Tandang-Silvas M.R., Carrasco-Peña L., Barba de la Rosa A.P., Osuna-Castro J.A., Utsumi S., Mikami B., Maruyama N. : Expression, purification and preliminary crystallization of amaranth 11S proglobulin seed storage protein from *Amaranthus hypochondriacus* L. *Acta Crystallogr. Sect F*, 66, 919-922 2010. 査読有

• Shutov A.D., Prak K., Fukuda T., Rudakov S.V., Rudakova A.S., Tandang-Silvas M.R., Fujiwara K., Mikami B., Utsumi S., Maruyama N. : Soybean basic 7S globulin subunit heterogeneity and molecular evolution.. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1631-1634 2010. 査読有

• Masuda T., Goto F., Yoshihara T., Mikami B. :The universal mechanism for iron translocation to the ferroxidase site in ferritin, which is mediated by the well conserved transit site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 400, 94-99 2010. 査読有

• Maeda Y., Doubayashi D., Ootake T., Oki M., Mikami B., Uchida H. :Crystallization and preliminary X-ray analysis of formate oxidase, an enzyme of the glucose-methanol-choline oxidoreductase family. *Acta Crystallogr. Sect F*, 66, 1064-1066. 2010. 査読有

• Cabanos C., Urabe H., Masuda T., Tandang-Silvas M.R., Utsumi S., Mikami B., Maruyama N. :Crystallization and preliminary X-ray analysis of the major peanut allergen Ara h 1 core region. Acta Crystallogr. Sect F, 66, 1071-1073 2010. 査読有

• Nakamichi Y., Maruyama Y., Mikami B., Hashimoto W., Murata K.. :Structural determinants in streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolase for recognition of glycosaminoglycan sulfate groups. J. Biol. Chem. 286, 6262-6271 2010. 査読有

• Mizutani K., Yoshioka S., Mizutani Y., Iwata S., Mikami B.. :High-throughput construction of expression system using yeast *Pichia pastoris*, and its application to membrane proteins. Protein Expr. Purif, 77, 1-8 2010. 査読有

• Maruyama Y., Ochiai A., Mikami B., Hashimoto W., Murata K. :Crystal structure of bacterial cell-surface alginate-binding protein with an M75 peptidase motif. Biochem. Biophys. Res. Commun., 405, 411-416. 2011. 査読有

• Maruyama Y., Chuma A., Mikami B., Hashimoto W., Murata K. :Heterosubunit composition and crystal structures of a novel bacterial M16B metallopeptidase. J. Mol. Biol., 407, 180-192 2011. 査読有

• Chu H.N., Kobayashi J., Mikami B., Yagi T. :The crystal structure of SDR-type pyridoxal 4-dehydrogenase of *Mesorhizobium loti*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 75, 388-390. 2011. 査読有

報告書・その他

• Mikami, B., Moriya, T., Tandang, M., Masuda, T., Utsumi S. : X-Ray crystallographic analysis of mung bean 8S globulin. SPring-8 User Experiment Report 2010A1309, 2010.

• Mikami, B., Tanabe, A., Hashizume, R., Yoshimura, T. : X-Ray crystallographic analysis of mutant beta-amylase/maltose complex.-Titration of two loop conformations of V99N by maltose- SPring-8 User Experiment Report 2010A1489, 2010.

・Mikami, B., Urabe, H., Tandang, M., Masuda, T., Maruyama, N., Utsumi S. : X-Ray crystallographic analysis of peanut conarachin. Spring-8 User Experiment Report 2010A6538, 2010.

・Mikami, B., Tanabe, A., Adachi, M., Okumura, T. : X-Ray crystallographic analysis of mutant beta-amylase/maltose complex.-Titration of two loop conformations of K295A by maltose-. SPring-8 User Experiment Report 2010B1181, 2010.

・Mikami, B., Yamazaki, Y., Maruyama, N., Tandang, M., Masuda, T., Itoh, T., Utsumi S. : X-Ray crystallographic analysis of a mutant mung bean 8S globulin. SPring-8 User Experiment Report 2010B1456, 2010.

・Mikami, B., Maruyama, N., Utsumi S. : X-Ray crystallographic analysis of vacuolar sorting receptor (VSR) from soybean cells . SPring-8 User Experiment Report 2010B6538, 2010.

b) 学会発表

- ・日本農芸化学会2011年度大会 (11 件)
- ・日本生化学会日本分子生物学会2010年度合同大会 (3件)
- ・日本蛋白質科学会2010年度年会 (3件)

A-3. 国内における学会活動など①

所属学会等 (役割)

- ・三上 文三：日本応用糖質学会 (編集委員)

A-3. 国内における学会活動など②

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・タンパク質のループ工学

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

・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：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①

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）

A-4. 国際交流・海外活動②

外国人研究者の受入

・外国人共同研究者 1名名（インドネシア）

B. 教育活動（2010.4～2011.3）

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：同志社大学生命医科学部（特別講義）
- ・ 高橋 延行：武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科（生化学）
- ・ 高橋 延行：京都産業大学工学部（生物物理学）
- ・ 水谷 公彦：近畿大学農学部（生命科学基礎）

公開講座等

- ・ 三上 文三：宇治キャンパス公開講演会 宇治キャンパス公開実行委員会

C. その他

- ・ 三上文三：（独）原子力研究開発機構 中性子ビーム利用専門部会専門委員