生体関連物質化学 遷移金属触媒を用いる炭素ー炭素結合形成反応の開発

工学研究科 合成・生物化学専攻 村上 正浩



村上 正浩(むらかみ まさひろ)

昭和 31 年生。昭和 54 年東京大学理学部卒、昭和 59 年同大大学院博士課程修了。理 学博士(東京大学)。昭和 59 年東京大学理学部助手、昭和 62 年京都大学工学部助手、 平成 5 年同助教授を経て、平成 14 年 1 月より同大学大学院工学研究科合成・生物化 学専攻教授、現在に至る。平成元年度日本化学会進歩賞・平成 16 年度日本化学会学 術賞。

(1) アルキンの官能基化に基づく炭素骨格構築反応の開発:ロジウム触媒とアリールボロン酸との金属交換によって生成したアリールロジウム錯体は、アルキンと反応してビニルロジウム中間体を与えることが知られている。今回、このビニルロジウム中間体をさらなる炭素-炭素結合形成反応に利用した、様々な炭素骨格構築反応の開発を行った。

まず、アリルエーテル部位を持つ1,6-エンイン化合物1との反応では、ビニルロジウム中間体から連続的な炭素-炭素結合形成反応が進行してビニルシクロペンタン3が得られた(式1)。さらに、不斉配位子としてBINAPを用いると、97%の鏡像体過剰率で生成物を与えた。また、エンジイン化合物を用いると、一挙に三つの炭素-炭素結合形成反応を行い、2つのシクロペンタン骨格を炭素-炭素二重結合で架橋した化合物を合成することにも成功した。



次に、エステルやニトリル部位を持つアルキン化合物について検討を行った。エステル化合物 4 との反応では、ビニルロジウム中間体からロジウムが1,4-転位した後に、エステルとの求核付 加反応が進行することを見いだした(式2)。この反応は、遷移金属の転位反応を経由する点でま れな反応である。さらに、一般的にカルボニル化合物に比べて反応性の乏しいニトリルでも、求 核付加反応が進行して付加生成物8が得られた(式3)。これらの一連の結果によりロジウム(I) 錯体はヘテロ元素官能基を強く活性化するルイス酸性を併せ持つことが明らかになった。



(2) 環拡大に基づく中員環炭素骨格構築反応の開発:中員環炭素骨格は天然化合物や生理活性物 質に広くみられることから、その簡便な構築法の開発は、これら化合物の合成に有力な手法を提 供するものと考えられる。最近筆者らは、ロジウム触媒の存在下で4-イン-1-オン化合物9を用 いると、ビニルロジウム中間体が分子内のカルボニル基に求核付加してシクロブタノール10を 与えること、ついで逆アルドール反応により炭素4員環が開環して、結果的に1,3-アシル転位が 進行した生成物11が得られることを見いだしている(式4)。



今回、この反応を基盤として新しい中員環炭素骨格構築法を開発した。ロジウム触媒の存在下 でβ-ケトエステル部位を環状骨格に持つアルキン化合物 12 との反応では、2 炭素増炭型環拡大 が起こり中員環ケトン 14 が得られた(式 5)。さらに、この反応はジケトン部位を持つアルキン 化合物にも適用することができた。



(3) 有機インジウム試薬を用いる共役付加反応の開発:金属交換は遷移金属触媒反応の重要な鍵 反応である。最近、有機インジウム試薬はパラジウム触媒と金属交換することが見いだされ、ク ロスカップリング反応に使用されている。今回、ロジウム触媒を用いる1,4-付加反応に有機イン ジウム試薬が使用できるか検討した。水酸基を持つ有機インジウム試薬16を用いたところ、ロ ジウム触媒との金属交換が円滑に起こり、エノン15への共役付加反応が進行することを見いだ した(式6)。さらに、光学活性ロジウム触媒を用いると高い鏡像体過剰率で生成物17が得られ た。これによって、従来共役付加反応に用いられてきた有機ホウ素試薬や有機ケイ素試薬に加え て、有機インジウム試薬も使用できることが明らかになった。



Research of transition metal-catalyzed carbon-carbon bond formations

Masahiro Murakami

Born in 1956. He received his Ph.D. from The University of Tokyo under the direction of Professor T. Mukaiyama in 1984. He held the position of Reserch Assistant at the University of Tokyo (1984-1987) and Kyoto University (1987-1993). From 1991 to 1992, he worked as a postdoctoral fellow with Professor A. Eschenmoser at ETH Zürich, Switzerland. He was promoted to Associate Professor in 1993 and full Professor in 2002 at Kyoto University. He received the Chemical Society of Japan Award for Young Chemists in 1989 and the chemical Society of Japan Award for Creative work in 2004.

(1) Synthesis of carbocyclic compounds triggered by rhodium(I)-catalyzed addition of arylboranes to alkynes: There has been a considerable progress in the development of the rhodium(I)-catalyzed carbon-carbon bond forming reactions using organoboron reagents for the past few years. On the other hand, the intermediate organorhodium(I) complexes are rarely used for further carbon–carbon bond formation in spite of their potential usefulness. We envisaged that the intramolecular trapping of the intermediate species might be feasible if a functional group was placed at an appropriate position in the molecule. In the first place, the cyclization of 1,6-enynes 1 possessing an allylic ether was examined. When 1,6-enyne 1 was treated with phenylboronic acid (2) in the presence of $[Rh(OH)(cod)]_2$ in dioxane at room temperature, (Z)-1-(1-phenylethylidene)-2-vinylcyclopentane 3 was obtained in 72% yield (eq 1). In addition, its asymmetric version using a chiral phosphine ligand (BINAP) instead of the cod ligand was examined. A high level of asymmetric induction (97% ee) was observed with the product 3. These results promoted us to assess the reactivity of other types of functional groups under similar reaction conditions. Nucleophilic addition of an organorhodium(I) species to ester and cyano groups has been observed in the rhodium(I)-catalyzed reaction with arylboronic acids (eqs 2 and 3). The results obtained demonstrated that multiple carboncarbon bond forming processes for the synthesis of complex carbocyclic compounds can operate with a catalytic system using rhodium(I).

(2) Synthesis of medium-sized ring compounds via two-carbon-atom ring expansion: The preparation of medium-sized ring organic compounds has been among the most difficult to achieve due to a lack of efficient and versatile synthetic methods. Hence, their development remains an important challenge in organic chemistry. We have recently reported that a cyclopentanol derivative is synthesized from 5-alkyn-1-one by intramolecular nucleophilic addition of an intermediate organorhodium(I) species to the ketonic carbonyl group in a 5-exo-trig mode. We next examined the possibility of an analogous cyclization reaction in a 4-exo-trig mode, although such a four-membered ring forming process would suffer from developing ring strain. The 4-alkyn-1-one 9 was treated with phenylboronic acid (2) in the presence of $[Rh(OH)(cod)]_2$ in dioxane/H₂O (100/1) at room temperature. The substrate 9 was consumed, and subsequent chromatographic isolation on silica gel afforded not the expected cyclobutanol derivative 10, but rather the α , β -unsaturated ketone 11 in 69% yield (eq 4). We envisioned that, if a β -keto ester moiety was installed in a cyclic skeleton, an analogous 1,3-acyl migration process would expand the ring by two carbons to serve as a synthetic method of mediumsized ring carbocyclic skeletons. Thus, the cyclic substrates 12 were reacted under similar conditions and the resulting reaction mixture was successively treated with aq. NH₄Cl to promote the retro-aldol process. As expected, the desired products 14 were produced in yields ranging from 49% to 63% through phenyl addition and ring expansion (eq 5). In addition, cyclic 1,3-diketones also underwent analogous ring-expansion reaction.

(3) Rhodium-catalyzed 1,4-addition of organoindium reagents to enones: The transmetalation between a main-group organometallic reagent and a transition metal catalyst is an important method to endow the original organometallic reagent with a different character of reactivities toward organic substrates. Indeed, a number of metal-mediated synthetic reactions involve the transmetalation as a key elementary step. Recently, the rhodium-catalyzed addition reactions of various organometallic reagents like organo-boron, -silicon and -tin to unsaturated functionalities have emerged as a new and useful method for the formation of carbon–carbon bonds under mild conditions. There has been no report, however, on the use of organoindium reagents as a carbon nucleophile source with rhodium

catalysts. We developed the rhodium-catalyzed 1,4-addition reaction of organoindium reagents to enones in aqueous media, together with its extension to an asymmetric version. The enone **15** was treated with diphenylindium hydroxide (**16**) in the presence of $[Rh(OH)(cod)]_2$ in THF/H₂O (12/1) at room temperature to afford the 1,4-addition product **17** in 82% yield (eq 6).

Selected Publications

• Lectures

- 1. M. Murakami, "Torque Control by Metal-Orbital Interactions", The 13th International Symposium on OrganoMetallic Chemistry directed towards Organic Synthesis (OMCOS-13), 2005.7.17-21, Geneva, Switzerland (Invited)
- 2. M. Murakami, "Expansion of Carbon Frameworks through β-Carbon Elimination", The 4th Asian-European Symposium on Metal-Mediated Efficient Organic Synthesis, 2005.11.6-9, Nagasaki, Japan (Invited)

\cdot Articles

- 1. Synthesis and Structural Analysis of Oligo(naphthalene-2,3-diyl)s, T. Motomura, H. Nakamura, M. Suginome, M. Murakami, Y. Ito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 142-146 (2005)
- 2. Synthesis and Reactions of Cyclic Silylboranes, M. Suginome, H. Noguchi, T. Hasui, M. Murakami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 323-326 (2005)
- 3. Rhodium-Catalyzed Cyclization of 1,6-Enynes Triggered by Addition of Arylboronic Acids, T. Miura, M. Shimada, M. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1094-1095 (2005)
- 4. Contrasteric Stereochemical Dictation of the Cyclobutene Ring-Opening Reaction by a Vacant Boron p Orbital, M. Murakami, I. Usui, M. Hasegawa, T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1366-1367 (2005)
- 5. Ketone Synthesis by Intramolecular Acylation of Organorhodium(I) with Ester, T. Miura, T. Sasaki, H. Nakazawa, M. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1390-1391 (2005)
- Rhodium-Catalyzed Addition-Cyclization Reactions of 5-Yn-1-ones with Arylboronic Acids, T. Miura, M. Shimada, M. Murakami, *Synlett.*, 667-669 (2005)
- Palladium-Catalyzed Addition of Cyanoboranes to Alkynes: Regio- and Stereoselective Synthesis of α, β-Unsaturated β-Boryl Nitriles, M. Suginome, A. Yamamoto, M. Murakami, *Angew. Chem. Int.* Ed., 44, 2380-2382 (2005)
- 8. Acids Direct 2-Styrylcyclobutanone into Two Distinctly Different Reaction Pathways, M. Murakami, S. Kadowaki, A. Fujimoto, M. Ishibashi, T. Matsuda, *Org. Lett.*, **7**, 2059-2061 (2005)
- 9. Nickel-Catalyzed Intermolecular Alkyne Insertion into Cyclobutanones, M. Murakami, S. Ashida, T. Matsuda, J. Am. Chem. Soc., **127**, 6932-6933 (2005)
- 10. Intramolecular Nucleophilic Addition of an Organorhodium(I) to a Nitrile, T. Miura, H. Nakazawa, M. Murakami, *Chem. Commun.*, 2855-2856 (2005)
- 11. Synthesis of Seven-Membered Ring Ketones by Arylative Ring-Expansion of Alkyne-Substituted Cyclobutanones, T. Matsuda, M. Makino, M. Murakami, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 4608-4611 (2005)
- 12. Rhodium-Catalyzed Annulation Reactions of 2-Cyanophenylboronic Acid with Alkynes and Strained Alkenes, T. Miura, M. Murakami, *Org. Lett.*, 7, 3339-3341 (2005)
- 13. Asymmetric Carroll Rearrangement of Allyl α -Acetamido- β -ketocarboxylates Catalyzed by a Chiral Palladium Complex, R. Kuwano, N. Ishida, M. Murakami, *Chem. Commun.*, 3951-3952 (2005)
- 14. Addition/Ring-Opening Reaction of Organoboronic Acids to Cyclobutanones Catalyzed by Rhodium(I)/ P(t-Bu)₃ Complex, T. Matsuda, M. Makino, M. Murakami, Bull. *Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1528-1533 (2005)
- 15. Molybdenum-Catalyzed Ring-Closing Metathesis of Allenynes, M. Murakami, S. Kadowaki, T. Matsuda, *Org. Lett.*, 7, 3953-3956 (2005)
- 16. Synthesis of 1H-Inden-1-ol Derivatives via Rhodium-Catalyzed Annulation of o-Acylphenylboronic Acids with Alkynes, T. Matsuda, M. Makino, M. Murakami, *Chem. Lett.*, **34**, 1416-1417 (2005)
- 17. Intramolecular Cyanoboration of Alkynes via Activation of Boron-Cyanide Bonds by Transition Metal Catalysts, M. Suginome, A. Yamamoto, M. Murakami, *J. Organomet. Chem.*, **690**, 5300-5308 (2005)
- 18. Rhodium-Catalyzed 1,4-Addition of Diarylindium Hydroxides to α , β -Unsaturated Carbonyl Compounds, T. Miura, M. Murakami, *Chem. Commun.*, 5676-5677 (2005)
- Acyl 1,3-Migration in Rhodium-Catalyzed Reactions of Acetylenic β -Ketoesters with Aryl Boronic Acids: Application to Two-Carbon-Atom Ring Expansions, T. Miura, M. Shimada, M. Murakami, Angew. Chem., Int. Ed., 7598-7600

生体関連物質化学 ヘム蛋白質の分子工学

工学研究科 分子工学専攻 石森 浩一郎



石森 浩一郎(いしもり こういちろう)

1961年京都市生。1984年京都大学工学部石油化学科卒業。1989年同大学院分子工学専攻博士課程修了。 工学博士(京都大学)。1989年同大学院工学研究科分子工学専攻助手、1995年同助教授、2004年分子科学 研究所客員助教授併任(2005年より客員教授)、2005年より北海道大学大学院理学研究科化学専攻教授、 現在に至る。この間、1987年から2年間日本学術振興会特別研究員、1993年から文部省在外研究員とし て米国ウィスコンシン大学マジソン校客員研究員(1994年まで)、2005年兵庫県立大学大学院生命理学専 攻非常勤講師、平成18、19年度日本生物物理学会副会長などを務める。金属蛋白質の構造と機能を物理化 学的、分子生物化学的手法により分子レベルで解明し、その応用として人工的な蛋白質の設計を試みている。

生体内で種々の重要な働きを果たしている金属酵素蛋白質を中心に、分子の特異的な性質と機 能の発現には蛋白質構造や活性中心の微細分子構造のみならず電子の挙動が重要であるとの観点 に立ち、分子のミクロ構造、電子構造や分子的、電子的諸過程の実験的解明、これらを制御する 静的及び動的構造因子の探索を通じ、新しい特性を示す新規機能性蛋白質の分子設計を行ってき た。具体的な研究対象として、(1)蛋白質における分子、電子レベルでの構造機能相関の解明、(2) 新規金属蛋白質の制御メカニズムの解明などを取り上げ、種々の物理化学的、生化学的、分子生 物学的手法を縦横に駆使して研究を推し進めている。以下では、これらの研究の成果を紹介する。

(1) 蛋白質における分子、電子レベルでの構造機能相関の解明:バクテリアの CYP51 への選択 的活性阻害機構

シトクロム P450 はヘムを活性中心とする金属酵 素のひとつで、生物界に広く分布し、種々の代謝経 路における酸素添加反応を触媒している。近年、こ のシトクロム P450 の一種である CYP51 が多くのバ クテリア類において、その原形質膜の合成に深くか かわり、この酵素の活性阻害によりバクテリアの増 殖を阻害できることから、新たな抗菌剤の標的酵素 として注目されている。しかし、実際にはバクテリ アの宿主である高等動物も同様な CYP51 を有して いることから、バクテリアの CYP51 に対する活性 阻害剤の投与は多くの場合、宿主についても強い副 作用を引き起こすことが多い。一方、いくつかのア ゾール化合物はバクテリア類、特に結核菌の CYP51 に対する選択的阻害活性の強い誘導体が見出されて きており、抗菌剤として期待されているが、その選 択的阻害活性の分子機構は明らかではない。そこで 我々は電子スピン共鳴(EPR)や共鳴ラマンスペク トルなどの種々の分光学手手法を駆使することによ り、アゾール化合物の阻害活性に影響を与える構 造的要因や蛋白質-基質間相互作用を明らかにし、 CYP51 における B' ヘリックスと C ヘリックス間の 疎水性残基と強い相互作用をするアゾール化合物が



Fig. 1 (*a*), Sequence Alignment of Mt (*Mycobacterium tuberculosis*), Ca (*Candida albicans*), and Hu(human) CYP51 in the regions of the B'-C helices and the I helix. (*b*), Amino acid residues interacting with fluconazole in the region of the B' and C helices of MtCYP51. 結核菌の CYP51 に対して高い選択的活性阻害能を示すことを明らかにした.(米国 Vanderbilt 大 学部、岡崎統合バイオサイエンスセンター、大阪大学大学院基礎工学研究科との共同研究)

(2) 新規金属蛋白質の制御メカニズムの解明:鉄代謝制御蛋白質 IRP2 の機能発現の分子機構

鉄イオンは生体内で蛋白質の活性中心などとして種々の重要な働きをしており、細胞内の鉄イ オン濃度を常に保つ必要がある。このような鉄イオン濃度の制御は IRP (Iron Regulatory Protein) という蛋白質により、細胞内の鉄イオン濃度が感知され、その濃度の高低により、種々の鉄代謝 蛋白質の発現が制御されていると考えられている。IRP には2種類の相同性の高い蛋白質が存在 しており、そのなかでも生体内での主要な鉄濃度センサーである IRP2 について、我々はその鉄

イオン濃度の感知には IRP2 へのへムの結合が 重要であること、さらにヘム結合により IRP2 の酸化的修飾が触媒され、その結果、IRP2 が ユビキチン化修飾を受け、最終的にユビキチン 依存性プロテアソームで分解されることを提案 してきた (*Nature Cell Biol.* 5, 336, 2003)。今回 この IRP2 に対するへムの結合について、さら にその構造化学的研究を進めることで、IRP2 のへムの結合について、IRP2 の配列中に存在 するへム制御モチーフ (HRM) にへムが結合し、 この結合がユビキチン化の端緒となること、ま た、この結合の際にはへム鉄の還元によりへム 鉄に配位しているアミノ酸が置換し、その置換



Fig. 2 Proposed Mechanism for IRP2.

の様式がユビキチン化のシグナルとしては重要なことを示した。(大阪市立大学大学院医学研究 科、大阪大学大学院基礎工学研究科との共同研究)

Molecular Engineering of Hemoproteins

Koichiro Ishimori

Born in 1961. He received his Ph.D. degree from Kyoto University. He was a research associate in the Division of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University (1989-1995) and an associate professor in the Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University (1995-2005). Now he has been a professor in Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University (2005-). He was also a visiting researcher in University of Wisconsin-Madison (1993-1994) and a visiting professor in the Institute of Molecular Science (2004-2006). He is a vice-president of the Biophysical Society of Japan (2005-2007). His research interests are the molecular mechanisms in metalloproteins and their functional designs.

(1) Structural Diversities of Active Site in Clinical Azole Bound Forms between Sterol 14 α -demethylases (CYP51) from Human and *Mycobacterium tuberculosis*: To gain insights into the molecular basis of the design for the selective azole anti-fungals, we compared the binding properties of azole-based inhibitors for cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) from human (HuCYP51) and *Mycobacterium tuberculosis* (MtCYP51). Spectroscopic titration of azoles to the CYP51s revealed that HuCYP51 has higher affinity for ketoconazole (KET), an azole derivative that has long lipophilic groups, than MtCYP51, but the affinity for fluconazole (FLU), which is a member of the anti-fungal armamentarium, was lower in HuCYP51. The affinity for 4-phenylimidazole

(4-PhIm) to MtCYP51 was quite low compared with that to HuCYP51. In the resonance Raman spectra for HuCYP51, the FLU binding induced only minor spectral changes, whereas the prominent high frequency shift of the bending mode of the heme vinyl group was detected in the KET- or 4-PhIm-bound forms. On the other hand, the bending mode of the heme propionate group for the FLU-bound form of MtCYP51 was shifted to high frequency as found for the KET-bound form, but that for 4-PhIm was shifted to low frequency. The EPR spectra for 4-PhIm-bound MtCYP51 and FLU-bound HuCYP51 gave multiple g values, showing heterogeneous binding of the azoles, whereas the single g_x and g_z values were observed for other azole-bound forms. Together with the alignment of the amino acid sequence, these spectroscopic differences suggest that the region between the B' and C helices, particularly the hydrophobicity of the C helix, in CYP51s plays primary roles in determining strength of interactions with azoles; this differentiates the binding specificity of azoles to CYP51s.

(2) Involvement of Heme Regulatory Motif in Heme-Mediated Ubiquitination and Degradation of IRP2: Iron regulatory protein 2 (IRP2), a regulator of iron metabolism, is modulated by ubiquitination and degradation. We have shown that IRP2 degradation is triggered by heme-mediated oxidation. We report here that not only Cys201, an invariant residue in the heme regulatory motif (HRM), but also His204 is critical for IRP2 degradation. Spectroscopic studies revealed that Cys201 binds ferric heme, whereas His204 is a ferrous heme binding site, indicating the involvement of these residues in sensing the redox state of the heme iron and in generating the oxidative modification. Moreover, the HRM in IRP2 has been suggested to play a critical role in its recognition by the HOIL-1

ubiquitin ligase. Although HRMs are known to sense heme concentration by simply binding to heme, the HRM in IRP2 specifically contributes to its oxidative modification, its recognition by the ligase, and its sensing of iron concentration after iron is integrated into heme.

Publications

- Specific Collapse Followed by Slow Hydrogen-bond Formation of β-sheet in the Folding of Singlechain Monellin, Kimura, T., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I., Takahashi, S., Konno, T., Akiyama, S., Fujisawa, T., (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 2748-2753.
- Structural Diversities of Active Site in Clinical Azole Bound Forms between Sterol 14α-demethylases (CYP51) from Human and *Mycobacterium tuberculosis*, Matsuura, K., Yoshioka, S., Tosha, T., Hori, H., Ishimori, K., Kitagawa, T., Morishima, I., Kagawa, N., Waterman, M. R., (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 9088-9096.
- 3. Two Heme Binding Sites Are Involved in the Regulated Degradation of the Bacterial Iron Response Regulator (Irr) Protein, Yang, J., Ishimori, K., O'Brian, M. R., (2005) J. Biol. Chem., 280, 7671-7676.
- 4. Specifically Collapsed Intermediate in the Early Stage of the Folding of Ribonuclease A, Kimura T, Akiyama S, Uzawa T, Ishimori K, Morishima I, Fujisawa T, Takahashi S., (2005) *J. Mol. Biol.*, *350*, 349-362.
- 5. Involvement of Heme Regulatory Motif in Heme-Mediated Ubiquitination and Degradation of IRP2, Ishikawa H, Kato M, Hori H, Ishimori K, Kirisako T, Tokunaga F, Iwai K. (2005) *Mol. Cell.*, *19*, 171-181.
- Absence of a Detectable Intermediate in the Compound I Formation of Horseradish Peroxidase at Ambient Temperature, Shintaku, M., Matsuura, K., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I. (2005) J. Biol. Chem., 280, 40934-40938.
- 7. Dehydration in the Folding of Reduced Cytochrome c Revealed by the Electron-Transfer-Triggered Folding under High Pressure, Kimura, T., Sakamoto, K., Morishima, I., Ishimori, K. (2006) J. Am. Chem. Soc., 128, 670-671.
- Time-Resolved Small Angle X-ray Scattering Investigation on the Folding Dynamics of Heme Oxygenase: Implication of the Scaling Relationship for the Submillisecond Intermediates of Protein Folding, Uzawa, T., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Matsui, T., Ikeda-Saito, M., Takahashi, S., Akiyama, S., Fujisawa, T. (2006) *J. Mol. Biol.*, in press.

生体関連物質化学 たんぱく質によるたんぱく質修飾の構造生物化学

工学研究科 分子工学専攻 白川 昌宏



白川 昌宏(しらかわ まさひろ)

昭和 35 年生。昭和 63 年大阪大学理学研究科博士後期課程修了、日本学術振興会特 別研究員を経て、平成 1-7 年大阪大学蛋白質研究所助手、平成 7-13 年奈良先端科学 技術大学院大学バイオサイエンス研究科助教授、平成 13-16 年横浜市立大学大学院 総合理学研究科教授。平成 17 年 1 月から現職。核磁気共鳴法、X 線結晶法を使った 細胞応答に関与するたんぱく質の構造生物化学と、磁気共鳴法を使った生体計測手 法の開発に従事。

(1) ユビキチン認識たんぱく質の立体構造

ユビキチンはその C 末端のカルボキシル基が被修飾蛋白質のリジン残基側鎖 ε-アミノ基とイ ソペプチド結合を形成することでたんぱく質を修飾するモディファイアーたんぱく質である。た んぱく質のユビキチン化には1分子のユビキチンが結合するモノユビキチン化と、複数のユビキ チン分子からなる鎖が結合するポリユビキチン化が存在する。またポリユビキチン化におけるユ ビキチン鎖の形成には、ユビキチンのリジン 48 やリジン 63 でリンクされる場合があり、それぞ れ K48 リンク、K63 リンクポリユビキチン化と呼ばれる。モノユビキチン化はエンドサイトー シスや転写制御、K48 リンクのポリユビキチン化はプロテアソームによるたんぱく質分解、K63 リンクのポリユビキチン化は DNA 修復や細胞のストレス応答などに関与する。

ユビキチン化は多くの場合、ユビキチン認識モチーフを持つたんぱく質に認識されることに より、細胞機能に関与すると考えられている。6種類以上のユビキチン認識モチーフが見つかっ ているが、そのうちもっとも頻繁に見つかっているのがユビキチン会合 (ubiquitin-associating: UBA)ドメインとユビキチン相互作用モチーフ (ubiquitin-interacting motif: UIM)である。我々は プロテアソーム S5a サブユニットの持つ UIM とヒト HR23B のユビキチン様ドメイン (ubiquitinlike domain: UbL)の複合体の立体構造解析に引き続いて、酵母 Dsk2p の UBA ドメインとユビキ



Fig. 1 Structure of the UBA domain of yeast Dsk2p (red) in complex with ubiquitin (blue)

チンの複合体の溶液中での立体構造を、多重共鳴多 次元 NMR によって決定した。複合体中の UBA ドメ インは 3 本の α ヘリックス (α1-3) とそれらを結ぶ ループからなり、α1-α2間のループ、α3 の C 末端 部分がユビキチチンのβシート上の疎水性パッチと 相互作用することでユビキチンを認識していること が判った。また UBA ドメインのメチオニン 342 の側 鎖メチル基がユビキチンのイソロイシン 44 やロイシ ン 8 などからなる疎水性ポケットにはまり込み、主 鎖のカルボニル基がユビキチンのグリシン 47 の主鎖 アミド基と水素結合を形成することを示すデータを 得た。これから UBA ドメインのメチオニン 342 がユ ビキチン認識に決定的な役割を果たすことが判った。

(2) ポリユビキチン鎖の高次構造

たんぱく質のユビキチン化において、K48 リンクのポリユビキチン化がプロテアソームによる たんぱく質分解を導くのに対して、K63 リンクのポリユビキチン化はたんぱく質分解と無関係に DNA 修復や細胞のストレス応答などに関与する。これは K48 リンクと K63 リンクのポリユビキ チン鎖が異なる高次構造を持つことを示唆する。これらのポリユビキチン鎖の溶液中での高次構 造を解析するために、我々は特定のサブユニットが安定同位体標識された K48 リンクと K63 リ ンクの 2 量体ユビキチン、4 量体ユビキチンを合成し、NMR を使ってサブユニット間相互作用 の解析を行った。合成には Pickart らの開発した、ユビキチン変異体とたんぱく質の化学修飾を 利用した段階的合成法を利用した。

化学シフト摂動法と交差飽和法による解析からは、K48 リンクの2量体ユビキチンは2つの サブユニットがβシート面でお互いに相互作用していることを示す結果が得られた。一方、K63 リンクの2量体ユビキチンがサブユニット間の非共有的相互作用をほとんど持たないことが判っ た。同様な結果はK48 リンク、K63 リンクの4量体ユビキチンの1番目と3番目のサブユニッ トの化学シフト摂動法による解析からも得られた。これらの実験結果は、K48 リンクの2量体ユ ビキチン、4量体ユビキチンでは一定のサブユニット間相互作用を持つのに対して、K63 リンク の2量体ユビキチン、4量体ユビキチンはサブユニット間相互作用をほとんど持たない数珠繋ぎ 状の構造を持つことを示す。これはFushmanらによる報告と一致する結果である。

(3) SUMO 化を受けたたんぱく質の立体構造

SUMO (Small ubiquitin-like modifier)は、ユビキチンとよく似た酵素経路によって被修飾蛋白 質のリジン残基側鎖 ε-アミノ基とイソペプチド結合を形成することでたんぱく質を修飾するモ ディファイアーたんぱく質である。SUMO 化はたんぱく質分解に非依存的に、たんぱく質の核 内への輸送、転写制御、クロマチン構造制御、核内構造体形成、DNA 修復などの細胞機能に関 与する。

SUMO 化を受けるたんぱく質のひとつであるチミン DNA グリコシラーゼ (thymine DNA glycosylase) は、T-G、U-G ミスマッチ塩基対を持つ DNA からチミン、ウラシル塩基を切り取る 酵素活性を持つ DNA 修復たんぱく質である。この酵素たんぱく質は塩基が切り取られてできる DNA 上の脱塩基部位に結合する活性を持つ。しかし SUMO 化によって DNA から解離することが わかっていた。

我々は SUMO 化によるチミン DNA グリコシラーゼの DNA からの解離機構を明らかにするた

めに SUMO-1 化されたチミン DNA グリコシラー ゼの中央部分 (残基 112-339)の結晶構造を決定し た。得られた構造から、SUMO 化によって、チ ミン DNA グリコシラーゼの酵素活性ドメインや SUMO-1 には大きな構造変化はないことが推察 された。一方、SUMO 化部位近傍の残基 307-330 の領域には構造変化が起こることが示唆された。 SUMO-1 化されたチミン DNA グリコシラーゼ中 央領域の立体構造を基に DNA との結合モデルを 作成したところ、SUMO 化に伴う立体構造変化が 示唆される残基 317-329 に存在するヘリックス部 分が、DNA と立体障害を起こしうることが示唆さ



Structure of the central region of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1

れた。このことから SUMO 化によって誘起された立体構造変化により、チミン DNA グリコシラー ゼが DNA から解離するという仮説を提唱することができた。

Structural biochemistry of modifier proteins

Masahiro Shirakawa

Born in 1960. He received his Ph.D. degree from Osaka University. He was a research associate in Institute of Protein Research, Osaka University (1989-1995), an assistant professor in Graduate School of Bioscience, Nara Institute of Science and Technology (1995-2001), a professor in Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University (2001-2004). Now he has been a professor in Graduate School of Engineering, Kyoto University (2005-). He has been devoted in structural biology and biochemistry.

Ubiquitin and SUMO (small ubiquitin-like modifier) are modifier proteins, which are involved in a wide variety of cellular events. Ubiquitination signals are often recognized by downstream effecter proteins, which have one or more ubiquitin interaction motifs. Of these motifs, UBA (ubiquitin-associating) domain and UIM (ubiquitin-interacting motif) are most frequently found. We have determined solution structures of the UBA of yeast Dsk2p in complex with ubiquitin, by means of NMR spectroscopy.

The higher order structures of Lys 48- and Lys 63-linked di- and tetra-ubiquitin chains are analyzed by solution NMR spectroscopy. The results of chemical shift perturbation and cross saturation experiments suggest that the subunits of Lys 48-linked diubiquitin interact with each other to some extent, whereas those of Lys 63-linked diubiquitin have few non-covalent contact.

Crystal structure of the central region, residues 112-339, of human thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1 has been determined. The structure shows the presence of a helix that form a protrusion form the protein surface. This protrusion presumably interfere its binding to DNA, as deduced from a model building.

Publications

- Baba, D., Maita, N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., Shirakawa, M. Crystal Structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. (2005) *Nature* 435, 979-982.
- 2. Hara, T., Kamura, T., Kotoshiba, S., Fujiwara, K., Onoyama, I., Shirakawa, M. and Nakayama, K.-I., The UBL-UBA protein KPC2 is required for degradation of p27 at G1 phase. (2005) *Molecular and Cellular Biology* **25**, 9292-303.
- Hashimoto, K., Kato, Z., Nagase, T., Shimozawa, N., Kuwata, K., Omoya, K., Li, A., Matsukuma, E., Yamamoto, Y., Ohnishi, H., Tochio, H., Shirakawa, M., Suzuki, Y., Wanders, R. J. A., Kondo, N. (2005) Molecular mechanism of a temperature-sensitive phenotype in peroxisomal biogenesis disorder. *Pediatric Research*, 58, 263-9
- Takasu, H., Jee, J. G., Ohno, A., Goda, N., Fujiwara, K., Tochio, H., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. (2005). Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 460-465.
- 5. Auesukaree, C., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2005). Plc1p, Arg82p, and Kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis, are essential for phosphate regulation

and polyphosphate accumulation in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* 280, 25127-25133.

- 6. Ohno, A., Jee, J-G, Fujiwara, K., Tenno, T., Goda, N., Tochio, H., Kobayashi, H., Hiroaki, H., Shirakawa, M. (2005) Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with Ubiquitin: Molecular Determinants for Ubiquitin Recognition. *Structure* **13**, 521-532.
- Rajesh, S., Heddle, J. G., Kurashima-Ito, K., Nietlispach, D., Shirakawa, M., Tame, J. R., and Ito, Y. (2005). Backbone ¹H, ¹³C, and ¹⁵N. coli nickel binding protein NikA. *J Biomolecular NMR* 32, 177.
- 8. Tanikawa, J., Nomura, T., Macmillan, E. M., Shinagawa, T., Jin, W., Kokura, K., Baba, D., Shirakawa, M., Gonda, T. J., and Ishii, S. (2004). p53 suppresses c-Myb-induced trans-activation and transformation by recruiting the corepressor mSin3A. *Journal of Biological Chemistry* 279, 55393-55400.
- 9. Tanaka, T., Mizuno, T., Fukui, S., Hiroaki, H., Oku, J., Kanaori, K., Tajima, K. and Shirakawa, M. (2004) Two-Metal Ion, Ni(II) and Cu(II), Binding a-Helical Coiled-coil Peptide. *Journal of American Chemical Society* 126, 14023-14028.
- Shiozawa, K. Maita, N., Tomii, K, Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., Hiroaki, H. (2004) Structure of the N-terminal domain of PEX1 AAA-ATPase: characterization of a putative adaptor-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 50060-50068.
- 11. Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., and Hiroaki, H. (2004). Crystallographic characterization of the N-terminal domain of PEX1. *Acta Crystallography D Biological Crystallography* 60, 2098-2099.
- Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E. H., Hayashi, H., Murata, S., Hiroaki, H., Sato, M., Tanaka, K., and Shirakawa, M. (2004). Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48linked polyubiquitin chains. *Genes to Cells* 9, 865-875.
- Komatsu, T., Mizusaki, H., Mukai, T., Ogawa, H., Baba, D., Shirakawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Yamamoto, H., Kikuchi, A., and Morohashi, K. (2004). Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Molecular Endocrinology* 18, 2451-2462.
- 14. Tominaga, Y., Ushijima, Y., Tsuchimoto, D., Mishima, M., Shirakawa, M., Hirano, Sakumi, K., Nakabeppu, Y. (2004) MUTYH prevents OGG1 or APEX1 from inappropriately processing its substrate or reaction product with its C-terminal domain. *Nucleic Acid Research* **15**, 3198-3211.
- Mishima, M., Sakai, Y., Itoh, N., Kamiya, H., Furuichi, M., Takahashi, M., Yamagata, Y., Iwai, S., Nakabeppu, Y., and Shirakawa, M. (2004). Structure of human MTH1, a Nudix family hydrolase that selectively degrades oxidized purine nucleoside triphosphates. *Journal of Biological Chemistry* 279, 33806-33815.
- Tenno, T., Goda, N., Tateishi, Y., Tochio, H., Mishima, M., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. (2004) High-throughput expression vector of isotopically labeled peptides for use in NMR studies. *Protein Engineering, Design & Selection* 17, 305-314.
- Nomura, M., Kobayashi, T., Kohno, T., fujiwara, K., Tenno, T., Shirakawa, M., Ishizaki, I., Yamamoto, K., Matsuyama, T., Mishima, M., Kojima, C. (2004) Paramagnetic NMR study of Cu2+-IDA complex locatization on a protein surface and its application to elucidate long distance information. *FEBS Letters* 566, 157-161.
- 18. Auesukaree, C., Homma, T., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2004) Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in Saccaromyces cerevisiae *Journal of Biological Chemistry* **279**, 17289-17294.
- 19. Fujiwara, K., Tenno, T., Sugasawa, K., Jee, J.-G., Ohki, I., Kojima, C., Tochio, H., Hiroaki, H., Hanaoka, F., and Shirakawa, M. Structure of the ubiquitin-interacting motif of S5a bound to the ubiquitin-like domain of HR23B (2004) *Journal of Biological Chemistry* **279**, 4760-4767.
- 20. Goda, N., Tenno, T., Takasu, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. The PRESAT-vector. Asymmetric T-vector for high throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics (2004) *Protein Science* **13**, 652-658.

生体関連物質化学生体機能物質の創製と機能

化学研究所 杉浦 幸雄・二木 史朗



杉浦 幸雄 (すぎうら ゆきお)

昭和 17 年生。昭和 39 年京都大学薬学部薬学科卒業。薬学博士(京都大学)。昭和 40 年京都 大学薬学部助手、昭和57年同助教授を経て、昭和63年京都大学化学研究所教授、平成17 年停年退職、京都大学名誉教授。この間、平成10年~12年に京都大学化学研究所長、平 成 12 年~14 年京都大学付属図書館宇治分館長を務める。平成 17 年より同志社女子大学薬 学部教授、現在に至る。平成17年より日本薬学会会頭を務める。主として遺伝子の発現に 深くかかわっている亜鉛フィンガータンパク質の構造と機能を明らかにするとともに、新 しい人工亜鉛フィンガータンパク質を設計・創製し、遺伝子発現の制御を展開する。昭和 59年日本薬学会奨励賞、平成4年アップジョン科学研究賞、平成12年日本薬学会賞を受賞。



二木 史朗(ふたき しろう)

昭和 34 年生。昭和 58 年京都大学薬学部卒業、昭和 60 年京都大学大学院薬学研究科 修士課程修了、昭和 62 年同博士後期課程中退。薬学博士 (京都大学)。同年徳島大学 薬学部助手(平成元年~3年米国ロックフェラー大学博士研究員)、平成5年同助教授、 平成9年京都大学化学研究所助教授を経て、平成17年より同教授、現在に至る。また 平成14年より科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業さきがけ個人研究員を併任。 主として、機能性ペプチドの人工設計および細胞機能制御への展開に取り組んでいる。 平成9年日本ペプチド学会奨励賞および有機合成化学協会・第一製薬研究企画賞受賞、 平成10年日本薬学会奨励賞を受賞。

リンカー改変型亜鉛フィンガータンパク質の創製およびその DNA 結合性

転写因子 Sp1 は DNA 結合ドメインとして3つの連続する亜鉛フィンガーモチーフを有し、 GC ボックスと呼ばれる約 10 塩基対に結合する。我々はこれまでに、このドメイン同士を通常よ り長いリンカーで連結した6つの亜鉛フィンガーを有する人工タンパク質が、離れた2つのGC ボックスに結合することが示してきた。さらに本年度は、リンカーの改変によって、亜鉛フィン ガーに新しい機能を付加することを目的とし、性質の異なるアミノ酸残基をリンカーとして用い、 リンカー部分の性質が DNA 結合に及ぼす影響を調べた。また、DNA の加水分解能を有するこ とが知られている金属結合アミノ酸配列を、二種類の亜鉛フィンガーを連結するリンカーとして 導入することによって、亜鉛フィンガー型 DNA 配列選択的エンドヌクレアーゼの創製を行った。

まず、Sp1 の DNA 結合ドメイン (Sp1ZF3) 同士をグリシンまたはアルギニンからなるリンカー で連結した蛋白質、Sp1ZF6 (Gly) 10、Sp1ZF6 (Arg) 8 を、遺伝子工学的手法および大腸菌発現 系を用いて作製した。基質 DNA として、連続する 2 つの GC ボックス配列 2GC (0)、または 10 塩基対離れた 2 つの GC ボックス配列 2GC (10) を用いた。ゲルシフト法によって Sp1ZF6 (Gly) 10、Sp1ZF6 (Arg) 8 の各基質への親和性を算出し、またフットプリント法によって、結合 DNA 配列の特異性を検討した。その結果、Sp1ZF6 (Gly) 10 は、基質 2GC (0)、2GC (10) とも、ほと んど同じ結合親和性を有し、どちらの基質においても両 GC ボックス配列に結合することが明ら かとなった。一方、Sp1ZF6 (Arg) 8 は、10 塩基対離れた 2 つの GC ボックス配列・2GC (10) に は高い親和性で特異的に結合するが、連続した2つのGCボックス・2GC(0)に対する親和性は、 2GC (10) への親和性に比べて 20 倍以上低く、非特異的な結合が見られた。アルギニンリンカー を用いることによって、標的塩基配列の配置に依存した、結合選択性が生じることが示唆された。

また、Sp1、GLI 亜鉛フィンガーの2つのフィンガー (Sp1zf23、GLIzf45) を、カルシウム結合 ループ配列 (DKDGDGYISAAE) を用いて連結した新規亜鉛フィンガー蛋白質 Sp1 (P1) GLI を作 製した。Sp1、GLI 亜鉛フィンガーの結合 DNA 配列間に3 塩基対挿入した標的塩基配列に対して、

その DNA 切断活性を、セリウ ムイオンの存在下および非存在 下でのゲル電気泳動によって検 討した。その結果、この亜鉛フィ ンガータンパク質は、ランタノ イド系金属イオンと結合し、セ リウムイオンの結合によって、 配列選択的な DNA 切断活性を 示すことが明らかとなった。こ れらの結果は、亜鉛フィンガー ドメイン内のリンカー領域を改 変することによって、DNA 結 合標的配列の選択性や新しい機 能が付加できることを示唆して いる。



Fig. 1 Schematic model of artificial zinc finger proteins with various linkers. Two zinc finger-type DNA binding domains are connected with consensus linker, polyglycine linkers, polyarginine linker, and metal binding loop.

このほか本研究室では、オリゴアルギニンペプチドが細胞膜を効率よく透過するという性質を 見いだし、「細胞膜透過ペプチドベクターの開発とその透過メカニズム」に関する研究を行ってい る。また、「環境応答型機能性ペプチドのデザイン」に関する研究にも取り組み、金属イオンとの 相互作用によるペプチド二次構造の変換に成功している。外的刺激によるペプチド構造、ひいて はその機能制御に向けて重要な方向性を示した。

Investigation and Creation of Biofunctional Materials

Yukio Sugiura

Born in 1942. He received his Ph.D. degree from Kyoto University. He was a postdoctoral fellow in Wayne State University and University of North Carolina (USA), a research associate (1965) and an associate professor (1982) in the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, and a professor in the Institute for Chemical Research, Kyoto University (1988-2005). He was also a visiting professor in the University of Manchester, UK (1998-2004). Now he is an emeritus professor of Kyoto University and a professor in the department of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's University. He got the Upjohn Scientific Research Award (1992) and the Award of Pharmaceutical Society of Japan (2000). He has been devoted in the fields of bioinorganic chemistry and biofunctional chemistry.

Shiroh Futaki

Born in 1959. He received his Ph.D. degree from Kyoto University. He was a postdoctoral fellow in Rockefeller University (USA) (1989-1991), a research associate (1987) and an associate professor (1993) in the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima, and an associate professor (1997) in the Institute for Chemical Research, Kyoto University. Now he has been a professor in the Institute for Chemical Research, Kyoto University (2005-). He got the Japanese Peptide Society Award for Young Scientists (1997) and the PSJ (Pharmaceutical Society of Japan) Award for Young Scientists (1998). He has been active in creation of novel bioactive and functional peptides.

Artificial 6-zinc finger peptides with various linkers: The Cys2His2-type zinc finger protein is an attractive motif for design of artificial transcription factors with desired target sequences because of its characteristic DNA binding properties: (1) recognition of overlapped 4 bp per one motif, (2)

tandemly connected modular structure, and (3) binding to non-palindrome sequences. By randomizing amino acid residues on the α -helix important for DNA recognition, a number of successful zinc finger peptides have been selected to bind to the specific DNA sequence and to control gene expression. Additionally, 6-zinc finger peptides in which two 3-zinc finger domains are connected with the consensus linker, have been shown to bind to the expected long sequence containing continuous two target sites for the original 3-zinc finger peptides. The DNA binding domain of human transcription factor Sp1 includes 3-zinc finger motifs (Sp1ZF3) and binds to the double strand DNA (5' - GGG GCG GGGC-3') sequence called "GC-box". We have created Sp1ZF6 by connecting two Sp1ZF3s with consensus linker (TGEKP) and shown its DNA binding ability to two continuous GC-box sequences (2GC(0)). On the other hand, the states of target DNA structure should be important as well as the target sequence toward the artificial gene regulation. We aim to control the DNA binding characteristics of zinc finger peptides by changing its linker region to various amino acid sequences. To create a peptide that could distinguish the separated target sequences from the continuous ones, we introduced a bulky and cationic polyarginine linker between two Sp1ZF3 units. The peptide, Sp1ZF6(Arg)8, was suggested to bind to only the separated target sequences by gel mobility shift assays and DNaseI footprinting assays. On the other hand, Sp1ZF6(Gly)10, which has a flexible and neutral polyglycine linker, binds to both separated and continuous two target sequences. The results indicate that the simple polyarginine linker gives the 6-zinc finger peptide DNA binding selectivity to the separated target sequences. Finally, we created a zinc finger-type endonuclease by introducing a cerium binding peptide sequence as a linker between fingers 2 & 3 of the Sp1 zinc finger domain (Sp1(zf23)) and fingers 4 & 5 of the GLI zinc finger domain (GLI(zf45)). The 4-zinc finger peptide, Sp1(P1)GLI, was demonstrated to bind to a cerium ion and cleave DNA in the sequence specific manner. Our results provide helpful information for the linker design of future zinc finger peptides targeting various DNA states in addition to the sequence specific recognition.

We also aim at design and synthesis of artificial functional peptides and development of novel intracellular delivery systems toward elucidation and control of cellular functions.

Publications

- Effects of linking 15-zinc finger domains on DNA binding specificity and multiple DNA binding modes. T. Hirata, W. Nomura, M. Imanishi & Y. Sugiura, Bioorg. Med. Chem. Lett., 15, 2197-2201 (2005).
- An artificial six-zinc finger peptide with polyarginine linker: selective binding to the discontinuous DNA sequences. M. Imanishi, W. Yan, T. Morisaki & Y. Sugiura, Biochem. Biophys. Res. Commun., 333, 167-173 (2005).
- Site-specific DNA cleavage by artificial zinc finger-type nuclease with cerium-binding peptide. T. Nakatsukasa, Y. Shiraishi, S. Negi, M. Imanishi, S. Futaki & Y. Sugiura, Biochem. Biophys. Res. Commun., 330, 247-252 (2005).
- 4. Arginine magic with new counterions up the sleeve. M. Nishihara, F. Perret, T. Takeuchi, S. Futaki, A. N. Lazar, A. W. Coleman, N. Sakai & S. Matile, Org. Biomol. Chem., 3, 1659-1669 (2005).
- Anionic fullerenes, calixarenes, coronenes, and pyrenes as activators of oligo/polyarginines in model membranes and live cells. F. Perret, M. Nishihara, T. Takeuchi, S. Futaki, A. N. Lazar, A. W. Coleman, N. Sakai & S. Matile, J. Am. Chem. Soc., 127, 1114-1115 (2005).
- Direct observation of anion-mediated translocation of fluorescent oligoarginine carriers into and across bulk liquid and anionic bilayer membranes. N. Sakai, T. Takeuchi, S. Futaki & S. Matile, Chembiochem, 6, 114-122 (2005).
- 7. Swapping of the beta-hairpin region between Sp1 and GLI zinc fingers: significant role of the betahairpin region in DNA binding properties of C2H2-type zinc finger peptides. Y. Shiraishi, M. Imanishi,

T. Morisaki & Y. Sugiura, Biochemistry, 44, 2523-2528 (2005).

- 8. Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy. H. Akita, R. Ito, I. A. Khalil, S. Futaki & H. Harashima, Mol. Ther., 9, 443-451 (2004).
- 9. Control of peptide structure and recognition by Fe (III)-induced helix destabilization. S. Futaki, T. Kiwada & Y. Sugiura, J. Am. Chem. Soc., 126, 15762-15769 (2004).
- 10. RNase S Complex Bearing Arginine-rich Peptide and Anti-HIV Activity. S. Futaki, I. Nakase, T. Suzuki, D. Nameki & E. Kodama, J. Mol. Recogn., 18, 169-174 (2004).
- Arginine carrier peptide bearing Ni(II) chelator to promote cellular uptake of histidine-tagged proteins.
 S. Futaki, M. Niwa, I. Nakase, A. Tadokoro, Y. Zhang, M. Nagaoka, N. Wakako & Y. Sugiura, Bioconjug. Chem., 15, 475-481 (2004).
- 12. Total synthesis of artificial zinc-finger proteins: Problems and perspectives. S. Futaki, K. Tatsuto, Y. Shiraishi & Y. Sugiura, Biopolymers, 76, 98-109 (2004).
- 13. Gramicidin-based channel systems for the detection of protein-ligand interaction. S. Futaki, Y. Zhang, T. Kiwada, I. Nakase, T. Yagami, S. Oiki & Y. Sugiura, Bioorg. Med. Chem., 12, 1343-1350 (2004).
- 14. Effects of Zn (II) binding and apoprotein structural stability on the conformation change of designed antennafinger proteins. Y. Hori & Y. Sugiura, Biochemistry, 43, 3068-3074 (2004).
- Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. T. Kakudo, S. Chaki, S. Futaki, I. Nakase, K. Akaji, T. Kawakami, K. Maruyama, H. Kamiya & H. Harashima, Biochemistry, 43, 5618-5628 (2004).
- Mechanism of improved gene transfer by the N-terminal stearylation of octaarginine: enhanced cellular association by hydrophobic core formation. I. A. Khalil, S. Futaki, M. Niwa, Y. Baba, N. Kaji, H. Kamiya & H. Harashima, Gene. Ther., 11, 636-644 (2004).
- 17. Total Synthesis of Large CCK Isomers Using a Thioester Segment Condensation Approach. K. Kitagawa, H. Adachi, Y. Sekigawa, T. Yagami, S. Futaki, J. Y. Gu & K. Inoue, Tetrahedron, 60, 907-918 (2004).
- Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method. K. Kogure, R. Moriguchi, K. Sasaki, M. Ueno, S. Futaki & H. Harashima, J. Control Release, 98, 317-323 (2004).
- Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J. C. Simpson, A. T. Jones, Y. Sugiura & S. Futaki, Mol. Ther., 10, 1011-1022 (2004).
- 20. Creation and characteristics of unnatural CysHis(3)-type zinc finger protein. S. Negi, M. Itazu, M. Imanishi, A. Nomura & Y. Sugiura, Biochem. Biophys. Res. Commun., 325, 421-425 (2004).

生体関連物質化学 超好熱始原菌の全ゲノム解析および多重遺伝子破壊系の構築

工学研究科 合成・生物化学専攻 今中 忠行



今中 忠行 (いまなか ただゆき)

昭和 20 年生。学歴:昭和 42 年 3 月大阪大学工学部発酵工学科卒業、昭和 44 年 3 月大阪 大学大学院工学研究科修士課程修了、昭和 44 年 12 月大阪大学大学院工学研究科博士課 程中退。学位:工学博士(昭和 48 年 2 月大阪大学)職歴:昭和 45 年 1 月大阪大学工学部 助手、昭和 48 年 2 月 MIT 博士研究員(出張)~49 年 10 月。昭和 56 年 11 月大阪大学工 学部助教授。平成元年 3 月大阪大学工学部教授。平成 7 年 4 月大阪大学大学院工学研究 科応用生物工学専攻教授(組織替え)。平成 8 年 7 月京都大学大学院工学研究科合成・生 物化学専攻教授。平成 17 年 10 月より日本学術会議会員(第 20 期)。専門:生物工学(遺 伝子工学、タンパク質工学、応用微生物学、極限環境微生物学、環境バイオテクノロジー)。

(1) 超好熱始原菌の全ゲノム解析:現存す る生物の中で原始生命体に最も近い生物と 考えられている超好熱始原菌は、生命の基 本原理や進化を理解する上で格好のモデ ル生物である。Thermococcus kodakaraensis KOD1 株は鹿児島県小宝島の硫気孔より 分離した超好熱始原菌である。本菌につい てはこれまでにも、その高温環境適応機構 や耐熱性酵素についての解析を進めてきた が、これらの解析を包括的に進めることを 目的として、本研究では本菌の全ゲノム解 析を行った。T. kodakaraensis KOD1 株のゲ ノム DNA よりショットガンクローンライ



Fig. 1 Function prediction of genes on the *T*. *kodakaraensis* genome

ブラリを作製し、シークエンシング、アセンブル、ギャップクロージングにより 2,088,737bp からなる全塩基配列を決定した。ゲノム中の ORF は 2,306 個が同定され、NCBI nr データベースに対する相同性検索により機能推定可能な遺伝子は約 50% (1,165 ORFs) であった (Fig. 1)。その他の約 38% (880 ORFs) はおおまかな機能推定のみが可能か、あるいは既知の機能未知遺伝子と相同であった。残りの約 11% (261 ORFs) は既知遺伝子との有意な相同性が見られない固有遺伝子であった。

(2) 超好熱始原菌の多重遺伝子破壊系の構築:超好熱始原菌は数々の興味深い特性を示すにもかかわらず、これまでに遺伝子破壊系が確立されていなかった。そのため細胞内における遺伝子の機能解明はほとんど進んでいない。我々は超好熱始原菌 Thermococcus kodakaraensis について pyrF 欠損ウラシル要求性株 KU25 株を宿主とした単一遺伝子による遺伝子破壊系を構築している。本研究では複数のマーカー遺伝子が使用可能な宿主とマーカー遺伝子の再利用法を確立し、多重遺伝子破壊が可能な系



Fig. 2 Schematic diagram of targeted disruption of *pyrF*, *trpE*, and *hisD* in *T. kodakaraensis*

を構築した。相同的組換えにより *pyrF* 遺伝子を特異的に欠失させた KU216 株 (Δ *pyrF*)を 5-7 ルオロオロチン酸を用いた優先選抜で単離した (Fig. 2)。次に KU216 株を宿主とし、トリプトファ ン合成系遺伝子 *trpE* を欠失させた KW128 株 (Δ *pyrF*, Δ *trpE::pyrF*)を作製した (Fig. 2)。さらに *trpE* マーカーによるトリプトファン要求性相補を指標とした KW128 株の形質転換が可能である ことを示した (Fig. 2)。一方、*pyrF* 両側にリピート領域を付加したマーカーカセットではポップ アウトによる *pyrF* 脱離株が単離でき、マーカー再利用が可能であった。この手法により 2 種類 の選択マーカー *pyrF* および *trpE* を使用できる宿主 KUW1 株 (Δ *pyrF*, Δ *trpE*) を作製した。

Complete genome analysis and multiple gene disruption system of a hyperthermophilic archaeon

Tadayuki Imanaka

Born in 1945. He received his Ph.D. degree from Osaka University. He was an assistant professor (1970-1981), an associate professor (1981-1989) and a professor (1989-1996) at the Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University. He was also a postdoctoral fellow at MIT, USA (1973-1974). Now he has been a professor at the Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University (1996-).

(1) Complete genome analysis of a hyperthermophilic archaeon: The genus *Thermococcus*, comprised of sulfur-reducing hyperthermophilic archaea, belongs to the order Thermococcales along with the closely related genus *Pyrococcus*. The members of *Thermococcus* are ubiquitously present in natural high temperature environments, and are therefore considered to play a major role in the ecology and metabolic activity of microbial consortia within hot-water ecosystems. To obtain insight into this important genus, the complete 2,088,737-base genome of *Thermococcus kodakaraensis* strain KOD1 was determined and annotated. A total of 2,306 open reading frames (ORFs) have been identified, among which half (1,165 ORFs) are annotatable whereas the functions of 41% (936 ORFs) cannot be predicted from the primary structures (Fig. 1).

(2) Multiple gene disruption system of a hyperthermophilic archaeon: We have also recently developed a gene disruption system for *T. kodakaraensis* by utilizing a *pyrF*-deficient mutant KU25 as a host strain and the *pyrF* gene as a selectable marker. To achieve multiple genetic manipulations for more advanced functional analyses of genes in *vivo*, a new host strain KU216 ($\Delta pyrF$) was constructed by specific and almost complete deletion of endogenous *pyrF* through homologous recombination (Fig. 2). Secondly, a new host-marker combination of a *trpE* deletant KW128 ($\Delta pyrF$, $\Delta trpE::pyrF$) and *trpE* gene was developed (Fig. 2). The system made it possible to isolate transformants through a more simple selection procedure as well as to deduce the transformation efficiency, overcoming practical disadvantages of the first system. Furthermore, repeated utilization of the counterselectable *pyrF* marker was established through its excision by pop-out recombination. Both endogenous and exogenous sequences could be applied as tandem repeats flanking the marker *pyrF* for pop-out recombination. A double deletion mutant KUW1 ($\Delta pyrF$, $\Delta trpE$), constructed with the pop-out strategy, was demonstrated to be a useful host for the dual markers, *pyrF* and *trpE*. The transformation systems developed here now provide the means for extensive genetic studies in hyperthermophilic archaea.

Selected Publications

Presentation & Lectures

1. T. Imanaka, "Complete genome analysis, gene disruption, and metabolic analysis of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*", 8th. International Conference on Thermophiles Research (Thermophiles 2005), 2005.9.18-22, Gold Coast, Australia (Invited)

• Articles

- 1. "Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with Pyrococcus Genomes", T. Fukui, H. Atomi, T. Kanai, R. Matsumi, S. Fujiwara and T. Imanaka, *Genome Res.*, 15(3), 352-363 (2005).
- 2. "Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*", T. Sato, T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7) :3889-3899 (2005).
- "Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", T. Kanai, H. Imanaka, A. Nakajima, K. Uwamori, Y. Omori, T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka, *J. Biotechnol.*, 116(3), 271-282 (2005).
- 4. "Characterization of an archaeal malic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", W. Fukuda, Y. S. Ismail, T. Fukui, H. Atomi and T. Imanaka, *Archaea*, 1(5):293-301 (2005).
- "Allophanate hydrolase of *Oleomonas sagaranensis* involved in an ATP-dependent degradation pathway specific to urea" T. Kanamori, N. Kanou, S. Kusakabe, H. Atomi and T. Imanaka, *FEMS Microbiol. Lett.*, 245(1), 61-65 (2005).
- "Biochemical properties of a putative signal peptide peptidase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1" R. Matsumi, H. Atomi and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, 187(20): 7072-7080 (2005).
- "Characterization of a novel glucosamine-6-phosphate deaminase from a hyperthermophilic archaeon" T. Tanaka, F. Takahashi, T. Fukui, S. Fujiwara, H. Atomi and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, 187(20): 7038-7044 (2005).
- "Thermostable direct hemolysin of *Vibrio* parahaemolyticus is a bacterial reversible amyloid toxin" T. Fukui, K. Shiraki, D. Hamada, K. Hara, T. Miyata, S. Fujiwara, K. Mayanagi, K. Yanagihara, T. Iida, E. Fukusaki, T. Imanaka, T. Honda and I. Yanagihara, *Biochemistry*, 44(29): 9825-9832 (2005).
- "Unfolding mechanism of a hyperthermophilic protein O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase", S. Nishikori, K. Shiraki, S. Fujiwara, T. Imanaka and M. Takagi, *Biophys Chem.*, 116(2):97-104 (2005).
- "Structural mechanism for coordination of proofreading and polymerase activities in archaeal DNA polymerases" T. Kuroita, H. Matsumura, N. Yokota, M. Kitabayashi, H. Hashimoto, T., Inoue, T. Imanaka and Y. Kai, *J. Mol. Biol.*, 351(2):291-298 (2005).
- "Expression of acetylcholine (ACh) and ACh-synthesizing activity in Archaea", T. Yamada, T. Fujii, T. Kanai, T. Amo, T. Imanaka, H. Nishimasu, T. Wakagi, H. Shoun, M. Kamekura, Y. Kamagata, T. Kato and K. Kawashima, *Life Sci.*, 77(16):1935-1944 (2005).
- 12. "Structure of RadB recombinase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1: An implication for the formation of a near-seven-fold helical assembly", T. Akiba, N. Ishii, N. Rashid, M. Morikawa, T. Imanaka and K. Harata, *Nucleic Acids Res.*, 33(10), 3412-3423 (2005).
- "Comparison of dibenzothiophene-degrading bacteria under low oxygen conditions", F. Kitauchi, S. Hirano, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa and S. Kanaya, *J. Environ. Biotechnol.*, 4, 117-120 (2005).
- "Thermodynamic and enzymolgical characterization of type II isopentenyl diphosphate isomerase from hyperthermophilic archaeon", M. A. Siddiqui, A. Yamanaka, K. Hirooka, T. Bamaba, A. Kobayashi, T. Imanaka, E. Fukusaki and S. Fujiwara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331(4):1127-1136 (2005).
- 15. "Enzymatic characterization of a prokaryotic urea carboxylase", T. Kanamori, N. Kanou, H. Atomi and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, 186, 2532-2539 (2004).
- "On-site manipulation of single whole-genome DNA molecules using optical tweezers", H. Oana, K. Kubo, K. Yoshikawa, H. Atomi and T. Imanaka, *Appl. Phys. Lett.*, 85, 5090-5092 (2004).
- 17. "Thermostable carboxylesterases from hyperthermophiles", H. Atomi and T. Imanaka, *Tetrahedron: Asymmetry*, 15, 2729-2735 (2004).

生体関連物質化学 翻訳のマニピュレーションとテクノロジー

工学研究科 合成・生物化学専攻 青山 安宏



青山 安宏(あおやま やすひろ)

昭和 20 年生。昭和 49 年京都大学工学研究科博士課程終了。同年九州大学助手(工学部)、昭和 56 年長岡技術科学大学助教授(工学部)、昭和 63 年同教授、平成 7 年九州 大学教授(有機化学基礎研究センター)、平成 13 年より現職。日本化学会学術賞、フ ルカ賞、新潟日報学術賞を受賞。有機化合物の構造と物性に関する第 2 回ゴードンコ ンファレンス(平成 11 年)、超分子化学に関する第 11 回国際シンポジウム議長(平成 12 年)。ラジカル反応機構、生物有機・無機化学、分子認識・構造有機化学、結晶工学・ 固体触媒・糖鎖工学などを経て現在の専門分野は生体認識化学・化学生物学。

(1) リボレギュレーターを用いる遺伝子のセンシング:タンパク合成が短い RNA により on/off 制御される例が見出されている。原核細胞のタンパク合成は mRNA のリボソーム結合部位 (RBS、 赤で示す) にリボソームが結合することから始まる。rpoS mRNA においてはヘアピン構造をとる ために RBS がブロックされ off 状態になっている (Fig. 1)。ここに DsrA RNA がやってくるとヘ アピンが解除され RBS がフリーになるのでタンパク合成が on 状態になる。これを参考にモレキュ ラービーコン型のリボレギュレーターを設計した (Fig. 2)。 RBS はヘアピン構造により off 状態 になっているが、ターゲット結合部位であるループ部分 (黄色) がターゲット (ここでは HIV 関連 ODN) と相補鎖を形成することによりヘアピンが解除され、下流のレポータータンパク (この場 合はルシフェラーゼ) が合成され、これによりターゲットが検出できるという仕組みである。こ の方法はルシフェラーゼの合成が触媒的であるのみならず、ルシフェラーゼの発光酵素反応もま た触媒的であり、その点で「二重増幅」検出である。また、細胞のタンパク合成系そのものを利用 しており、加えて、mRNA の鋳型になっている DNA をプローブとして用いることも可能である 点で細胞無毒性 (cell-friendly) であり、細胞内の遺伝子診断には理想的な方法であると言えよう。





Fig. 1 Illustration of on/off regulation of protein translation with a reboregulator.



(2) タンパクの mRNA タグ付け:タンパク質をリボソームに表示 (ディスプレイ) する場合の大きな問題はリボソームトンネルである。生成したタンパク質はリボソーム内のトンネルに存在する。トンネルの大きさは幅が約 1.5nm、長さが 10nm である。従って、たとえ全長のタンパクが合成できても、これをリボソームに表示するにはトンネル内に収まる適当なスペーサーを導入する必要がある。従来行われてきた ribosome display では終止コドンを取り除き、スペーサー (Fig.

3 の青色の部分に相当)を導入した人工 mRNA を用いてきたが、我々は天然型 mRNA を用いる 全長タンパクの表示を可能にする方法を見出した (Fig. 3)。



Fig. 3 Illustration of protein display on its mRNA

(3) センスコドンに非天然アミノ酸を導入する:タ ンパク合成においてアミノ酸は、まず、アミノアシ ル AMP に変換され、対応する合成酵素 (RS) により tRNA に結合し (アミノアシル tRNA)、リボソームに 運ばれる。アミノ酸 (例えば Phe) のスルファモイル AMP (Phe-SA、Fig. 4) は RS の強力な阻害剤であり、 これの存在下ではアミノ酸 (Phe) のタンパクへの導 入が事実上起こらない。このような状況下で Phe の tRNA (tRNA^{Phe}) に非天然アミノ酸 (例えばナフチルア



Fig. 4 Structure of Phe-SA

ラニン; Nap) を化学的に結合した suppressor tRNA を用いると本来は Phe 用のセンスコドンに効率よく非天然アミノ酸 (Nap) が導入される。

Manipulation and technology of protein translation

Yasuhiro Aoyama

Born in 1945. He received his Ph.D degree from Kyoto University. He was a research associate in Kyushu University (1974-1981), an associate professor in Nagaoka University of Technology (1981-1988), and professor there (1988-1995). He then moved to Kyushu University as professor in the Institute for Fundamental Research of Organic Chemistry (1995-2001) and moved again to Kyoto University, where he is now professor (2001-) in the Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering. He received the Divisional Award of the Chemical Society of Japan, the Fluka Prize, and the Daily Niigata Cultural Award. He served as Chairman in the 2nd Gordon Research Conference on the Structure and Property of Organic Compounds as well as in the 11th International Synposium on Supramolecular Chemistry. He used to work on reaction mechanisms, bioorganic/bioinorganic chemistry, molecular recognition and structural organic chemistry, crystal engineering, solid catalysis, and glycoengineering and his current research activity is directed to biorecognics and chemical biology.

(1) Gene sensing using riboregulator: Recent reports show that protein translation can be on/off regulated with short RNAs. Prokaryotic protein translation starts with binding of ribosome on the ribosome binding site (RBS, shown in red) of the mRNA. The RBS in the rpoS mRNA is blocked due to the hairpin structure of the mRNA and hence translation is in the off state (Fig. 1). The translation is switched-on when DsrA RNA, a riboregulator, binds to the mRNA to open the hairpin. With this bio-process in mind, we designed a molecular beacon-type riboregulator (Fig. 2). When target (an HIV-related ODN in this case) binds to the yellow-colored loop domain of the probe, the otherwise hairpin-blocked RBS is opened to start translation of the reporter gene (luciferase in this case). In this way, the target can be detected. This sensing method is doubly amplifiable and is cell-friendly since it

utilizes the natural translation system in combination with mRNA-coding DNA and hence ideal for the gene sensing of living cells.

(2) Genotype-phenotype coupling: A general problem in attempted protein display on the mRNA via ribosome is the presence of the ribosome tunnel. The 3'-terminus of the protein synthesized stays in the tunnel, which is ~ 1.5 nm-wide and ~ 10 nm-long. We need an appropriate spacer as an anchor to be buried in the tunnel to squeeze the protein therefrom. In the conventional ribosome display are used artificial mRNAs with stop codon deleted and a spacer (blue domain in Fig. 3) added. We discovered a new technique, read-through ribosome display, for display of full-length protein using natural mRNAs.

(3) Sense codon suppression: In ribosomal protein translation, amino acid is first activated in the form of aminoacyl AMP, lonked to tRNA by the action of aminoacyl-tRNA synthetase (RS), and transported to the ribosome. Sulfamoyl adenosine derivative (SA) of amino acid (e.g. phenylalanine) is a potent inhibitor of RS, and in its presence the incorporation of the amino acid (phenylalanine, Phe) is completely inhibited. When the tRNA for Phe chemically misacylated with an unnatural amino acid, e.g., naphthylalanine (Nap) is provided as a suppressor in the presence of Phe-SA, we could introduce the unnatural Nap in the position of natural Phe efficiently.

Selected Publications

Presentation & Lectures

- 1. Y. Aoyama, "Calix [4] resorcarene-Based Proteoglycan Mimics", 8th International Conference on Calixarenes, 2005.7.25-29, Prague, Czech Republic (Invited)
- 2. Y. Aoyama, "Manipulation of Protein Translation", BINDEC Symposium, 2005.10.11-13, Osaka, Japan (Invited)
- Articles
- Termination-Free Prokaryotic Protein Translation Using Anticodon-Adjusted E. coli tRNA^{Ser} as Unified Suppressors of the UAA/UGA/UAG Stop Codons. Read-Through Ribosome-Display of Full-Length DHFR with Translated UTR as a Buried Spacer Arm, A. Ogawa, S. Sando, Y. Aoyama, *ChemBioChem*, 6, in press (2005)
- 2. A Small-Molecule-Based Approach to Sense Codon-Templated Natural-Unnatural Hybrid Peptides. Selective Silencing and Reassignment of the Sense Codon by Orthogonal Reacylation Stalling at the Single-Codon Level, S. Sando, K. Kanatani, N. Sato, H. Matsumoto, T. Hohsaka, Y. Aoyama, J. Am. Chem. Soc., **127**, 7998-7999 (2005)
- 3. Glycovirus, Y. Aoyama, Trends *Glycosci. Glycotech.*, **17**, 39-47 (2005)
- 4. Doubly Catalytic Sensing of HIV-Related CCR5 Sequence in Prokaryotic Cell-Free Translation System Using Riboregulator-Controlled Luciferase Activity, S. Sando, A. Narita, K. Abe, Y. Aoyama, J. Am. Chem. Soc., **127**, 5300-5301 (2005)
- 5. Locked TASC Probes for Homogeneous Sensing of Nucleic Acids and Imaging of Fixed E-coli Cells, S. Sando, A. Narita, T. Sasaki, Y. Aoyama, *Org. Biomolec. Chem.*, **3**, 1002-1007 (2005)
- Thermoresponsive Controlled Association of Protein with a Dynamic Nanogel of Hydrophobized Polysaccharide and Cyclodextrin: Heat-Shock Protein-Like Activity of Artificial Molecular Chaperon, *Biomacromolecules*, 6, 447-452 (2005)

• Patents

- 1. タンパク質の表示方法,青山安宏,山東信介,小川敦司,特願 2005-145194,国際出願 PCT/ JP2005/018680
- 2. 非天然アミノ酸含有及び/又はヒドロキシ酸含有有機化合物の製造方法(センスコドンへの非天 然アミノ酸の導入方法),青山安宏、山東信介,金谷啓一郎,特願 2005-065315
- 3. 遺伝子検出用試薬及びその利用 (リボレギュレーターを用いた遺伝子診断法),青山安宏,山東信 介,成田敦,特願 2005-043104

生体関連物質化学 カルコゲン機能素子の物性と構築

化学研究所 江崎 信芳



江崎 信芳 (えさき のぶよし)

1949年大阪市生まれ。1973年京都大学農学部農芸化学科卒業、1979年同大学院農 学研究科博士課程修了。京都大学農学博士。同年京都大学化学研究所助手、1989年 同助教授を経て、1996年同教授、現在に至る。1998~2000年および2002~2004 年、日本生化学会理事。1999~2003年、日本農芸化学会理事。1999~2003年、 日本生物工学会理事。2000~2003年、日本学術会議第18期生物工学研究連絡委員。 2001~2004年、科学研究費特定領域研究を推進。2005年~京都大学化学研究所所長。

(1) 酵素によるセレン / 硫黄識別機構

セレンの生体内濃度は極めて低いため、周期表で同族に属しセレンよりはるかに多く生体内に 存在する硫黄と厳密に区別される必要がある。セレノシステインリアーゼ (SCL) は L-システイン には反応せず、L-セレノシステインをセレンと L-アラニンに分解する酵素である。本酵素が、い かにして L-セレノシステインと L-システインを区別しているのか興味深い。そこで、SCL の基質 認識機構について検討を行った。

ラット由来の野生型 SCL と L-セレノシステインまたは L-システインをインキュベーション し、UV/vis スペクトルを測定した。L-セレノシステインの場合、補酵素である pyridoxal 5' -phosphate (PLP) と SCL のリジン残基で形成されるシッフ塩基に由来する 416nm のスペクトル に変化はなく、反応産物であるセレンに由来すると考えられる低波長側の吸収の増加が見られた。 一方、L-システインを酵素に加えた場合では、416nm のピークが減少するとともに、350nm の吸 収が増加した。この 350nm の吸収増大は、基質とならないチオール化合物の添加によっても見 られた。したがって、350nm の吸収は、PLP と SCL のリジン残基とで形成されるシッフ塩基の プロトンに L-システインのチオール基が配位したことに由来すると考えられた (Fig. 1)。さらに、 このことは、X線結晶構造解析からも支持された (Fig. 2)。





Fig. 1 A proposed model for the deprotonation of Schiff base by a thiol compound.

Fig. 2 Active site structure of the L-cysteine-SCL complex.

(2) [2Fe-2S] 型鉄硫黄クラスターを持つ鉄ーシデロフォアレダクターゼの解析

細菌は鉄を取り込むための多様な仕組みを進化させてきた。中でもシデロフォアにより鉄をキ レートして取り込む系では、鉄 - シデロフォアの細胞内への取り込みと、それに続く鉄 - シデロ フォアからの鉄の遊離過程が必要である。鉄 - シデロフォアからの鉄の遊離については、シデロ フォアを分解することによるとする説や鉄 - シデロフォアを特異的に還元することによるとする 説などがあるが、詳細は不明である。大腸菌の FhuF はシデロフォアの一種である ferrioxamine Bに結合した鉄の利用に重要であり、鉄-シデロフォアレダクターゼと考えられている。FhuFのX線結晶構造解析により、本タンパク質は[2Fe-2S]型の鉄硫黄クラスターを持つことが明らかとなった(Fig. 3A)。鉄硫黄クラスターはメインドメインとは離れたサブドメインに配位しており、溶媒からアクセスしやすい環境に存在することが示された(Fig. 3B)。



Fig. 3 Overall structure (A) and the [2Fe-2S] site structure (B) of FhuF.

Properties and construction of chalcogenic functional materials

Nobuyoshi Esaki

Born in 1949. He received his Ph.D. degree from Kyoto University. He was a research associate (1979-1989), an associate professor (1989-1996) and a professor in the Institute for Chemical Research of Kyoto University (1996-). He was a director of The Japanese Biochemical Society (1998-2000, 2002-2004), a director of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry (1999-2003) and a director of The Society for Biotechnology, Japan (1999-2003). He promoted researches supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Area (2001-2004). He took a director of Institute for Chemical Research, Kyoto University (2005-).

(1) Discrimination between selenium and sulfur by an enzyme

Selenium, a sulfur analog, is an essential trace element of mammals. The concentration of selenium in cells is much lower than that of sulfur. Therefore, the discrimination between selenium and sulfur is an important process for normal selenium/sulfur metabolism. However, little is known about selenium-specific enzyme and initial steps of selenoprotein biosynthesis. Selenocysteine lyase (SCL) decomposes L-selenocysteine into selenium and L-alanine. The enzyme does not act on L-cysteine. Because the discrimination between selenium and sulfur by the enzyme is a key step in selenoprotein biosynthesis, we investigated the substrate recognition mechanism of the enzyme. UV/vis spectrum of SCL incubated with L-selenocysteine exhibited an increase in the absorbance at 350 nm with a concomitant decrease in the absorbance at 416 nm. Incubation of the enzyme with other thiol-containing compounds, 2-mercaptoethanol, 2-mercaptopropionic acid, and D-cysteine also resulted in the spectrum change similar to that observed for the incubation with L-cysteine. The results suggest that the deprotonation of the PLP-Lys internal aldimine of SCL by thiol group of L-cysteine is responsible for the spectrum change. This was supported by our X-ray crystallographic analysis of SCL complexed with L-cysteine.

(2) Analysis of Fe-siderophore reductase containing a [2Fe-2S]-type iron-sulfur cluster

Bacteria have developed a variety of mechanism for iron uptake during evolution. One of such system, uptake of iron by a chelator siderophore, involves an introduction process of Fe-siderophore into the cell and an iron-release from siderophore. Two models were proposed for the iron release process: one involves degradation of siderophore, and the other involves a specific reduction of iron in siderophore. However, little is known about that process. *E. coli* FhuF is essential for the utilization of iron chelated to ferrioxamine B, a fungal siderophore. Therefore, FhuF is proposed to be an iron-siderophore reductase. We solved an X-ray structure of FhuF and found that the protein contains a [2Fe-2S]-type iron-sulfur cluster. The iron-sulfur cluster is located on the subdomain of the protein, which is far from the main domain. Thus, the iron-sulfur cluster is probably accessible to the solvent.

Publications

- DnaK from Vibrio proteolyticus: Complementation of a dnaK-null mutant of Escherichia coil and the role of its ATPase domain, K. Yoshimune, A. Galkin, L. Kulakova, T. Yoshimura, N. Esaki, J. Biosci. Bioeng., 99, 136-142 (2005)
- 2. Cold-active DnaK of an Antarctic psychrotroph *Shewanella* sp. Ac10 supporting the growth of *dnaK*-null mutant of *Escherichia coli* at cold temperatures, K. Yoshimune, A. Galkin, L. Kulakova, T. Yoshimura, N. Esaki, *Extremophiles*, **9**, 145-150 (2005).
- 3. Site-directed mutagenesis alters DnaK-dependent folding process, K. Yoshimune, N. Esaki, M. Moriguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 74-78 (2005).
- 4. Robust NADH-regenerator: improved alpha-haloketone-resistant formate dehydrogenase, H. Yamamoto, K. Mitsuhashi, N. Kimoto, Y. Kobayashi, N. Esaki, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 33-39 (2005).
- High-level expression and bulk crystallization of recombinant L-methionine gamma-lyase, an anticancer agent, T. Takakura, T. Ito, S. Yagi, Y. Notsu, T. Itakura, T. Nakayama, K. Inagaki, N. Esaki, R. M. Hoffman, A. Takimoto, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press (2005).
- A new family of NAD(P)H-dependent oxidoreductases distinct from conventional Rossmann-fold proteins, H. Muramatsu, H. Mihara, M. Goto, I. Miyahara, K. Hirotsu, T. Kurihara, N. Esaki, *J. Biosci. Bioeng.*, 99, 541-547 (2005).
- 7. The putative malate/lactate dehydrogenase from *Pseudomonas putida* is an NADPH-dependent Δ^1 -piperideine-2-carboxylate/ Δ^1 -pyrroline-2-carboxylate reductase involved in the catabolism of D-lysine and D-proline, H. Muramatsu, H. Mihara, R. Kakutani, M. Yasuda, M. Ueda, T. Kurihara, N. Esaki, *J. Biol. Chem.*, **280**, 5329-5335 (2005).
- 8. *N*-Methyl-L-amino acid dehydrogenase from *Pseudomonas putida*, a novel member of unusual NAD(P)-dependent oxidoreductase superfamily, H. Mihara, H. Muramatsu, R. Kakutani, M. Yasuda, M. Ueda, T. Kurihara, N. Esaki, *FEBS J.*, **272**, 1117-1123 (2005).
- 9. 2-Haloacrylate reductase: A novel enzyme of the medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily that catalyzes the reduction of a carbon-carbon double bond of unsaturated organohalogen compounds, A. Kurata, T. Kurihara, H. Kamachi, N. Esaki, *J. Biol. Chem.*, **280**, 20286-20291 (2005).
- D-Amino acid-N-acetyltransferase of Saccharomyces cerevisiae: a close homologue of histone acetyltransferase Hpa2p acting exclusively on free D-amino acids, G.-Y. Yow, T. Uo, T. Yoshimura, N. Esaki, Arch. Microbiol., 182, 396 - 403 (2004).
- A Novel NADH-Dependent Carbonyl Reductase from *Kluyveromyces aestuarii* and Comparison of NADH-Regeneration System for the Synthesis of Ethyl (S)-4-Chloro-3-hydroxybutanoate, H. Yamamoto, K. Mitsuhashi, N. Kimoto, A. Matsuyama, N. Esaki, Y. Kobayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 638-649 (2004).
- 12. Assay method for antitumor L-methionine γ -lyase: comprehensive kinetic analysis of the complex reaction with L-methionine, T. Takakura, K. Mitsushima, S. Yagi, K. Inagaki, H. Tanaka, N. Esaki, K. Soda, A. Takimoto, *Anal. Biochem.*, **327**, 233-240 (2004).
- 13. Enzymatic synthesis of *N*-methyl-L-phenylalanine by a novel enzyme, *N*-methyl-L-amino acid dehydrogenase, from *Pseudomonas putida*, H. Muramatsu, H. Mihara, R. Kakutani, M. Yasuda, M. Ueda, T. Kurihara, N. Esaki, *Tetrahedron: Asymmetry*, **15**, 2841-2843 (2004).

- 14. Expression analysis of mammalian selenocysteine lyase, S. Kurokawa, H. Mihara, T. Kurihara, N. Esaki, *Biomed. Res. Trace Elem.*, **15**, 278-280 (2004).
- 15. Asymmetric reduction of 2-chloroacrylic acid to (*S*)-2-chloropropionic acid by a novel reductase from *Burkholderia* sp. WS, A. Kurata, T. Kurihara, H. Kamachi, N. Esaki, *Tetrahedron: Asymmetry*, **15**, 2837-2839 (2004).
- Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization and the effects of Gly->Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability, L. Kulakova, A. Galkin, T. Nakayama, T. Nishino, N. Esaki, *Biochim. Biophys. Acta*, 1696, 59-65 (2004).
- 17. A novel zinc-containing α -keto ester reductase from *Actinomycete*: An approach based on protein chemistry and bioinformatics, K. Ishihara, H. Yamaguchi, T. Omori, T. Uemura, N. Nakajima, N. Esaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2120-2127 (2004).
- 18. Characterization of Slr0077 of *Synechocystis* sp.PCC6803, a homolog of chloroplastic cysteine desulfurase of higher plants, M. Igarashi, N. Maruoka, S.-I. Kato, H. Mihara, T. Kurihara, N. Esaki, *Trace Nutr. Res.*, **21**, 51-58 (2004).
- 19. Reactivity of asparagine residue at the site of the D105N mutant of fluoroacetate dehalogenase from *Moraxella* sp. B, S. Ichiyama, T. Kurihara, Y. Kogure, S. Tsunasawa, H. Kawasaki, N. Esaki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1698**, 27-36 (2004).
- 20. Conversion of cofactor specificities of alanine dehydrogenases by site-directed mutagenesis, H. Ashida, A. Galkin, L. Kulakova, Y. Sawa, N. Nakajima, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **30**, 173-176 (2004).
- 21. Conversion of the catalytic specificity of alanine racemase to a D-amino acid aminotransferase activity by a double active-site mutation, G.-Y. Yow, A. Watanabe, T. Yoshimura, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **23**, 311-319 (2003).
- 22. Amino acid racemases: functions and mechanisms, T. Yoshimura, N. Esaki, J. Blosci. Bioeng., 96, 103-109 (2003).
- 23. A novel esterase from a psychrotrophic bacterium, *Acinetobacter* sp. strain no. 6, that belongs to the amidase signature family, Y.-I. Wei, T. Kurihara, T. Suzuki, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **23**, 357-365 (2003).
- Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp. strain B11-1, T. Suzuki, T. Nakayama, D. W. Choo, Y. Hirano, T. Kurihara, T. Nishino, N. Esaki, *Protein Express. Purif.*, **30**, 171-178 (2003).
- 25. A new DL-2-haloacid dehalogenase acting on 2-haloacid amides: Purification, characterization, and mechanism, C. Park, T. Kurihara, T. Yoshimura, K. Soda, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **23**, 329-336 (2003).
- 26. Mass spectrometric analysis of the reactions catalyzed by L-2-haloacid dehalogenase mutants and implications for the roles of the catalytic amino acid residues, Y.-F. Li, T. Kurihara, S. Ichiyama, M. Miyagi, S. Tsunasawa, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **23**, 337-345 (2003).
- Effects of selenium deficiency on the expression of selenoprotein mRNAs in mouse brain, E. Kuwana, S. Kurokawa, H. Mihara, T. Kurihara, T. Yoshimura, N. Esaki, *Biomed. Res. Trace Elem.*, 14, 293-296 (2003).
- 28. Purification, characterization, and gene cloning of a novel fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. FA1, T. Kurihara, T. Yamauchi, S. Ichiyama, H. Takahata, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **23**, 347-355 (2003).
- 29. Improvement of thermostability of cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* sp. strain Ac10 by rational mutagenesis, L. Kulakova, A. Galkin, T. Nakayama, T. Nishino, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **22**, 113-117 (2003).
- 30. Purification and characterization of alanine dehydrogenase from a marine bacterium, *Vibrio proteolyticus*, S.-I. Kato, T. Ohshima, A. Galkin, L. Kulakova, T. Yoshimura, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **23**, 373-378 (2003).
- Cold-active enzymes from cold-adapted microorganisms: Their possible applications and structural relationships with mesophilic and thermophilic counterparts, A. Galkin, L. Kulakova, T. Nakayama, T. Nishino, N. Esaki, *Rec. Adv. Marine Biotechnol.*, 8, 1-27 (2003).
- 32. D-Amino acid aminotransferase: Fragmentation at a flexible loop is an efficient method to generate mutant enzymes with new substrate specificities and elevated activities, Y. Fuchikami, T. Yoshimura, N. Esaki, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **23**, 321-328 (2003).

生体関連物質化学生体分子間相互作用の構造生物学

理学研究科 化学専攻 三木 邦夫



三木 邦夫 (みき くにお)

1952 年生。1978 年同大学院工学研究科博士後期課程中退、1981 年工学博士(大阪大学)、1978 年大阪大学工学部助手(1982 ~ 1983 年マックスプランク生化学研究所博士研究員)、1991 年東京 工業大学資源化学研究所助教授,1994 年京都大学理学部教授,1995 年より現職。1999 年より理 化学研究所播磨研究所主任研究員(兼務)。日本化学会進歩賞,日本結晶学会学術賞。Zeitschrift für Kristallographie, Editor, PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics, Editorial Board, Acta Crystallographica Section D (Biological Crystallography), Co-Editor。現在、文部科学省タンパ ク 3000 プロジェクト・個別的解析プロジェクト中核拠点代表者(「タンパク質高次構造形成と機 能発現」領域)。タンパク質結晶学の手法に基づいた構造生物学の研究を行っている。

生体分子間相互作用の構造生物学的研究として、以下のようなタンパク質の立体構造を、シン クロトロン放射光を用いたX線結晶解析によって決定し、その詳細な三次元構造を得るとともに、 その構造に基づいてそれぞれの機能の解明を目指した。

(1) FAD を補欠因子とする青色光受容体タンパ **ク質**:近年、フラビン (FAD) を補欠因子とする 新しい青色光受容体として、BLUF (the sensor for Blue-Light Using FAD) ドメインが見いだされ た。このドメインは約100残基のアミノ酸から なり、ゲノム解析により細菌やシアノバクテリア などの生物種に広く保存されていることが明ら かになった。青色光受容機構について立体構造か ら明らかにすること目的として、BLUF ドメイン を含む Tll0078 タンパク質 (Thermosynecococcus elongatus BP-1 由来) を研究対象とし、その結晶構 造解析を行った。Tll0078 はアミノ酸残基数 143 からなる短鎖の BLUF タンパク質である。結晶 構造解析の結果、Tll0078は、5個の単量体が5 回軸で関係づけられるリングを作り、そのリン グ2個が2回軸で関係づけられる10量体を形成 していることが分かった (Fig.1)。Tll0078 の単量 体は、N末端ドメインとC末端ドメインからな



Fig. 1 Crystal structure of the sensor protein (T110078), containing the BLUF domain for blue-light using FAD

る。N 末端ドメインに相当する BLUF ドメインは、5 本のストランドからなる βシートと 2 本の α ヘリックスからなり、リングの外側に配置されている。一方、C 末端ドメインはリングの内側で、 βシートに垂直な 2 本のヘリックスを形成していた。FAD は BLUF ドメインの 2 本のヘリックス にはさまれており、BLUF タンパク質種間で保存性の高い残基と結合を作っていた。

(2) マシコヒゲムシの巨大ヘモグロビンの結晶構造:マシコヒゲムシは有鬚(ゆうしゅ)動物門に 属する海産底生性の動物であり、口や消化管を持たず、かわりに体内に共生させた独立化学栄養 細菌がつくりだす有機物を栄養源にしていると考えられている。マシコヒゲムシは分子量約40 万の巨大な細胞外ヘモグロビン複合体を有しており、これにより宿主が利用する酸素と、共生細 菌が利用する硫化水素を同時に運搬するという、極めて特徴的な機能を発現している。酸素結合 型マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビン複合体の結 晶構造を 2.85 Å で決定した。この巨大ヘモグロ ビンは、一般的なミオグロビンフォールドを持 つ4種のサブユニットからなる24量体を形成し ており、外径約 120 Å、内部に直径約 50 Å の空 洞が存在する球状構造であった (Fig.2)。また、 12量体を形成するように、サブユニット間での disulfide 結合が確認された。今回の構造解析は、 硫化水素非結合型で行ったが、構造決定に用い た水銀化合物置換体結晶において、硫化水素結 合部位と予想されていた複数の Cys 残基すべて について水銀化合物が結合しており、これらの 様子から硫化水素結合の機構が示唆された。特 に、Cys 残基の周囲を Phe が取り囲んでいる部 位が存在し、これは、この部位において Phe の 芳香環による静電相互作用によって、結合した 硫化水素が安定化される機構が存在することを 示唆するものである。

(3) 鉄イオウクラスター生合成関連ABC ATPase SufC:近年、鉄イオウクラスター形 成に関わる遺伝子として、新たに Suf オペロ ンが同定された。大腸菌において、Sufオペ $\Box > lt$, SufA, SufB, SufC, SufD, SufE, SufS で構成されており、酸化ストレスまたは鉄欠 乏状態において誘導され、鉄イオウクラスター の形成に関わることが知られている。ほとん どの Suf タンパク質は、細菌から高等植物に 至るまで広く保存されており、最も保存され ているのは、SufC および SufB タンパク質 である。SufC タンパク質は、ABC トランス ポーターに共通に見られる Walker A, Walker B, ABC signature モチーフを有する ABC-ATPase であり、おそらく最も重要な Suf タン パク質である。SufCは SufB および SufD と



Fig. 2 Crystal structure of *Oligobrachia* hemoglobin 24mer



Fig. 3 Crystal structure of SufC from *Thermus* thermophilus HB8 with the ABC α/β domain (blue) and the α helical domain (pink)

複合体を形成し、SufBCD 複合体として鉄イオウクラスター形成に関与することが示唆されて いる。*Thermus thermophilus* HB8 由来の SufC タンパク質について、基質非結合型および ADP 結 合型の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定した。全体構造は、ABC トランスポーター由 来の ABC ATPase と同様に、2 枚の β シートと α ヘリックスで構成された RecA 類似の α/β ドメ インと α ヘリカルドメインで構成されていた (Fig.3)。他の ABC ATPase との構造比較の結果、 Walker B モチーフの直後で、他には見られない 3¹⁰ ヘリックスが形成されていた。また二つのド メイン間のリンカー領域の構造が大きく異なっており、SufC と SufB および SufD の相互作用は ABC トランスポーターと異なる様式であることが示唆される。

Structural biology of biological intermolecular interactions

Kunio Miki

Born in 1952. He received his Ph.D. degree from Osaka University. He was a research associate in the Faculty of Engineering, Osaka University (1978-1990), an associate professor in the Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology (1991-1994), and a professor in the Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University (1994-1995). Now he has been a professor in the Graduate School of Science, Kyoto University (1995-) and also a chief scientist (a director of laboratory) in the RIKEN Harima Institute at SPring-8 (1999-). He was awarded the Progress Prize of the Chemical Society of Japan and the Academic Prize of the Crystallographic Society of Japan. He has been devoted in the studies of structural biology by means of X-ray crystallography.

(1) Crystal structure of the sensor protein (Tll0078) from Thermosynechococcus elongatus BP-1, containing the BLUF domain for blue-light using FAD: The sensor proteins for bluelight using the FAD (BLUF) domain belong to the third family of the photoreceptor proteins using a flavin chromophore, where the other two families are phototropins and cryptochromes. As the first structure of this BLUF domain, we have determined the crystal structure of the Tll0078 protein from Thermosynechococcus elongatus BP-1, which contains a BLUF domain bound to FAD, at 2 Å resolution. Five Tll0078 monomers are located around the non-crystallographic five-fold axis to form a pentamer, and two pentamers related by two-fold noncrystallographic symmetry form a decameric assembly (Fig.1). The monomer consists of two domains, the BLUF domain at the N-terminal region and the C-terminal domain. The overall structure of the BLUF domain consists of a five-stranded mixed β -sheet with two α -helices running parallel to it. The isoalloxazine ring of FAD is accommodated in a pocket formed by several highly-conserved amino acid residues in the BLUF domain. Of these, the three apparent key residues (Asn31, Asn32 and Gln50) were substituted with Ala. Mutant proteins of N31A and N32A showed a nearly normal 10 nm spectral shift of the flavin upon illumination, while the Q50A mutant did not exhibit such a shift at all. Based on the crystal structure, we discussed a possible role of Gln50, which is structurally and functionally linked with the critical Tyr8 (FAD-Gln50-Tyr8 network), with regard to the light-induced spectral shift of the BLUF proteins.

(2) Crystal structure of an extracellular giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobrachia mashikoi*: Mouthless and gutless marine animals, pogonophorans and vestimentiferans obtain their nutrition solely from their symbiotic chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria. These animals have sulfide-binding 400 kDa and/or 3500 kDa hemoglobin (Hb) which transports oxygen and sulfide simultaneously. The symbiotic bacteria are supplied with sulfide by Hb of the host animal, and use it to provide carbon compounds. The crystal structure of a 400 kDa Hb from pogonophoran *Oligobrachia mashikoi* has been determined at 2.85 Å resolution. The structure is hollow-spherical, composed of a total of 24 globins as a dimer of dodecamer (Fig.2). This dodecameric assemblage would be a fundamental structural unit of both 400 kDa and 3500 kDa Hbs. The structure of the mercury derivative used for phasing provides insights into the sulfide-binding mechanism. The mercury compounds bound to all free Cys residues that have been expected as sulfide-binding sites. Some of the free Cys residues are surrounded by Phe aromatic rings, and mercury atoms come into contact with these residues in the derivative structure; it is strongly suggested that sulfur atoms bound to these sites could be stabilized by aromatic-electrostatic interactions by the surrounding Phe residues.

(3) Crystal structure of atypical cytoplasmic ABC ATPase SufC from *Thermus thermophilus* HB8: SufC, a cytoplasmic ABC-ATPase, forms a stable complex with SufB and SufD. The SufBCD

complex interacts with other Suf proteins in the Fe-S cluster assembly. We have determined the crystal structure of SufC from *Thermus thermophilus* HB8 in nucleotide-free and ADP-Mg-bound states at 1.7 Å and 1.9 Å resolution, respectively. The structure of SufC consists of two domains: an ABC α/β domain, which is structurally similar to the typical core fold of ABC ATPase, and an α helical domain (Fig.3). Compared to other ABC ATPase structures, a novel 3₁₀ helix formed at the end of Walker B motif results in an unusual nucleotide-binding conformation. Furthermore, a significant displacement occurs at a linker region between two domains. This linker conformation is stabilized by hydrophobic interaction between conserved residues around the Q loop. These results suggest that the unusual linker conformation conserved among SufC proteins is probably suitable for interacting with SufB and SufD.

Publications

- 1. Crystal Structure of the Co-chaperonin Cpn10 from *Thermus thermophilus* HB8, N. Numoto, A. Kita, and K. Miki, *Proteins: Struct., Funct., Bioinfo.*, **58**, 498-500 (2005).
- An Engineered Chaperonin Caging a Guest Protein: Structural Insights and Potential As a Protein Expression Tool, M. Furutani, J. Hata, Y. Shomura, K. Itami, T. Yoshida, Y. Izumoto, A. Togi, A Ideno, T. Yasunaga, K. Miki, and T. Maruyama, *Prot. Sci.*, 14, 341-350 (2005).
- 3. Crystal Structure of Decameric Peroxiredoxin (AhpC) from *Amphibacillus xylanus*, K. Kitano, A. Kita, T. Hakoshima, Y. Niimura, and K. Miki, *Proteins: Struct., Funct., Bioinfo.*, **59**, 644-647 (2005).
- 4. Structure of a Cynobacterial BLUF Protein, Tll0078, Containing a Novel FAD-binding Blue Light Sensor Domain, A. Kita, K. Okajima, Y. Morimoto. M. Ikeuchi, and K. Miki, *J. Mol. Biol.*, **349**, 1-9 (2005).
- 5. Development of a Fully-Automated Macromolecular Crystallization / Observation Robotic System, HTS-80, H. Miyatake, S.-H. Kim, I. Motegi, H. Matsuzaki, H. Kitahara, A. Higuchi, and K. Miki, *Acta Crystallogr.*, **D61**, 658-663 (2005).
- 6. Electric Charge-Separation of Protein Samples for X-ray Crystallography Using Free-flow Isoelectric Focusing, S.-H. Kim, H. Miyatake, T. Ueno, T. Nagao, and K. Miki, *Acta Crystallogr.*, **D61**, 799-802 (2005).
- Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of Extracellular Giant Hemoglobin from Pogonophoran *Oligobrachia mashikoi*, N. Numoto, T. Nakagawa, A. Kita, Y. Sasayama, Y. Fukumori, and K. Miki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1750**, 103-117 (2005).
- 8. Crystal Structure of Stilbene Synthase from *Arachis hypogaea*, Y. Shomura, I. Torayama, D.-Y. Suh, T. Xiang, A. Kita, U. Sankawa, and K. Miki, *Proteins: Struct., Funct., Bioinfo.*, **60**, 803-806 (2005).
- Characterization of New D- β -Aspartate-containing Proteins in a Lens-derived Cell Line, T. Takata, T. Shimo-Oka, K. Miki, and N. Fujii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334, 1022-1031 (2005).
- Structure of an Extracellular Giant Haemoglobin of the Gutless Beard Worm *Oligobrachia mashikoi*, N. Numoto, T. Nakagawa, A. Kita, Y. Sasayama, Y. Fukumori, and K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14521-14526 (2005).
- Bacillus circulans MH-K1 Chitosanase: Amino Acid Residues Responsible for Substrate Binding, T. Fukamizo, S. Amano, K. Yamaguchi, T. Yoshikawa, T. Katsumi, J. Saito, M. Suzuki, K. Miki, Y. Nagata, and A. Ando, J. Biochem., 138, 563-569 (2005).
- 12. Crystal Structure of Atypical Cytoplasmic ABC-ATPase SufC from *Thermus thermophilus* HB8, S. Watanabe, A. Kita, and K. Miki, *J. Mol. Biol.*, **353**, 1043-1054 (2005).
- 13. Crystal Structure of the Small Form of Glucose-Inhibited Division Protein A from *Thermus* thermophilus HB8, W. Iwasaki, H. Miyatake, and K. Miki, *Proteins: Struct., Funct., Bioinfo.*, **61**, 1121-1126 (2005).
- Crystal Structure of Putative N-Acetyl- γ -glutamyl-phosphate Reductase (AK071544) from Rice (*Oryza sativa*), T. Nonaka, A. Kita, J. Miura-Ohnuma, E. Katoh, N. Inagaki, T. Yamazaki, and K. Miki, *Proteins: Struct., Funct., Bioinfo.*, **61**, 1137-1140 (2005).
- Improved Expression, Purification, and Crystallization of a Putative N-Acetyl-γ-glutamyl-phosphate Reductase from Rice (*Oryza sativa*), J. Miura-Ohnuma, T. Nonaka, S. Katoh, K. Murata, A. Kita, K. Miki, and E. Katoh, *Acta Crystallogr.*, F61, 1058-1061 (2005).