

活動報告

平成11年度中期構造生物学坂部プロジェクトの活動

運営委員会委員長
坂部知平

I. TARA用第1実験ステーションBL6B

1. 利用状況

平成11年度中期のビームタイムは平成11年10月4日(月)から開始され、12月19日(日)に終了した(表1)。今期よりbonus timeが復活したので、この日を予備日とし、それ以外の予備日は取らないことにした。bonus timeというのは入射器のマシスタディーで朝9時の入射は通常通り行われるが、その後の入射は保証されない。従って、最悪の場合、運転モードになった直後にビームダンプが生じて、再入射の保証はない。しかし、実際には入射迄の待ち時間は長くなったとしても、多くの場合入射してもらえる。bonus timeもこれまでのcamera maintenanceと同様1週間前迄に急を要する要求がなければキャンセルを行った。

今期も最初の2週間ほどは予約のない日が多い、それに対し後半は予約がぎっしりつまりbonus timeも殆ど予約された。

2. ビームラインアシスタント

ビームラインアシスタントを希望する院生さんの数は每期大きく変動する、先回は9名の方々がいたが今期は下記の2名であった。実はもう一人いて丁度巧く埋まっていたのだが、体調を崩され、キャンセルされた。幸い、シングルバンチモード等と重なっていたことや、日本結晶学会などのため希望者を見付けることも難しかったので、PFスタッフや、中丸幸雄さん達の努力で乗り切ることになった。諸氏に感謝する。今期のビームラインアシスタント名簿を掲載すると共に両氏に感謝する。

| 氏名 | 所属 | 期間 |
|-------|-----------|---------------|
| 渡辺 充 | 関西学院大・山口研 | 10月4日～10月31日 |
| 糸川 泰弘 | 徳島文理大・津下研 | 11月30日～12月21日 |

3. 装置の状況

モノクロメーターの改良結果のチェックを11月5日から始める予定であったがモノクロメーター結晶を台座に張り付けるための技術的開発が間に合わず、結局今期も波長固定のまま使用することになった。現在モノクロメーターを台座に固定するのに鉋物油を使用しているがX線による損傷を受け炭化する。そこでIn-Gaを用いたが均一性を欠いたため、この方法は一旦保留にした。接合部の均一性を良くするため金蒸着法を試みたが接着強度

| USER NAME a:administer c:industry d:non-industry -:free | | | |
|---------------------------------------------------------|-----|-----------------------------|--------------------------------------|
| A:50% area for long works, B:50% area for short works | | | |
| | | day: am:9:00-pm:9:00 | night: pm:9:00-am:9:00(the next day) |
| 10月4日 | MON | B Banyu Pharm. c (day) | Banyu Pharm. c (night) |
| 10月5日 | TUE | B Camera maintenance (day) | Camera maintenance (night) |
| 10月6日 | WED | B Camera maintenance (day) | Camera maintenance (night) |
| 10月7日 | THU | B Nippon Roche c (day) | (night) |
| 10月8日 | FRI | B BERI c (day) | BERI c (night) |
| 10月9日 | SAT | B (day) | (night) |
| 10月10日 | SUN | B (day) | (night) |
| 10月11日 | MON | A machine study (day) | machine study (night) |
| 10月12日 | TUE | A (day) | (night) |
| 10月13日 | WED | A (day) | (night) |
| 10月14日 | THU | A Fujisawa Pharm. c (day) | (night) |
| 10月15日 | FRI | A (day) | (night) |
| 10月16日 | SAT | A (day) | (night) |
| 10月17日 | SUN | A (day) | (night) |
| 10月18日 | MON | B machine study (day) | machine study (night) |
| 10月19日 | TUE | B bonus time (day) | bonus time (night) |
| 10月20日 | WED | B Banyu Pharm. c (day) | (night) |
| 10月21日 | THU | B Mitsubishi Chem. c (day) | (night) |
| 10月22日 | FRI | B Yamanouchi Pharm. c (day) | (night) |
| 10月23日 | SAT | B (day) | (night) |
| 10月24日 | SUN | B (day) | (night) |
| 10月25日 | MON | A machine study (day) | machine study (night) |
| 10月26日 | TUE | A bonus time (day) | bonus time (night) |
| 10月27日 | WED | A Ajinomoto Co. Inc c (day) | Ajinomoto Co. Inc c (night) |
| 10月28日 | THU | A Ajinomoto Co. Inc c (day) | (night) |
| 10月29日 | FRI | A (day) | (night) |
| 10月30日 | SAT | A setting test (day) | setting test (night) |
| 10月31日 | SUN | A Konno Michiko d (day) | Nitanai Yasushi d (night) |
| 11月1日 | MON | B machine study (day) | machine study (night) |
| 11月2日 | TUE | B Eom Soo Hyun b (day) | Eom Soo Hyun b (night) |
| 11月3日 | WED | B Mizuno Hiroshi d (day) | (night) |
| 11月4日 | THU | B Kuramitsu Seiki d (day) | setting test (night) |
| 11月5日 | FRI | B beam maintenance (day) | 3GeV multi-bunch (night) |
| 11月6日 | SAT | B beam maintenance (day) | 3GeV multi-bunch (night) |
| 11月7日 | SUN | B beam maintenance (day) | 3GeV multi-bunch (night) |
| 11月8日 | MON | A machine study (day) | machine study (night) |
| 11月9日 | TUE | A bonus time (day) | bonus time (night) |
| 11月10日 | WED | A beam maintenance (day) | 3GeV single-bunch (night) |
| 11月11日 | THU | A beam maintenance (day) | 3GeV single-bunch (night) |
| 11月12日 | FRI | A beam maintenance (day) | 3GeV single-bunch (night) |
| 11月13日 | SAT | A beam maintenance (day) | 3GeV single-bunch (night) |
| 11月14日 | SUN | A beam maintenance (day) | 3GeV single-bunch (night) |
| 11月15日 | MON | B machine study (day) | machine study (night) |
| 11月16日 | TUE | B bonus time (day) | bonus time (night) |
| 11月17日 | WED | B Miki Kunio d (day) | (night) |
| 11月18日 | THU | B Nippon Roche c (day) | Sankyo Co. Ltd c (night) |
| 11月19日 | FRI | B Daiichi Pharm. c (day) | Sankyo Co. Ltd c (night) |
| 11月20日 | SAT | B Fujisawa Pharm. c (day) | Nonaka Takamasa d (night) |
| 11月21日 | SUN | B Liang Dong-cai b (day) | Liang Dong-cai b (night) |
| 11月22日 | MON | A machine study (day) | machine study (night) |
| 11月23日 | TUE | A bonus time (day) | bonus time (night) |

| | | | | | | |
|--------|-----|---|---------------------|-------|---------------------|---------|
| 11月24日 | WED | A | Banyu Pharm. c | (day) | Banyu Pharm. c | (night) |
| 11月25日 | THU | A | Liang Dong-cai b | (day) | Liang Dong-cai b | (night) |
| 11月26日 | FRI | A | Kirin Brewery c | (day) | Kirin Brewery c | (night) |
| 11月27日 | SAT | A | Chang Wen-rui b | (day) | Chang Wen-rui b | (night) |
| 11月28日 | SUN | A | Pai Emil F. b | (day) | Pai Emil F. b | (night) |
| 11月29日 | MON | B | machine study | (day) | machine study | (night) |
| 11月30日 | TUE | B | bonus time | (day) | bonus time | (night) |
| 12月1日 | WED | B | BERI c | (day) | BERI c | (night) |
| 12月2日 | THU | B | Ajinomoto Co. Inc c | (day) | Ajinomoto Co. Inc c | (night) |
| 12月3日 | FRI | B | Yamanouchi Pharm. c | (day) | | (night) |
| 12月4日 | SAT | B | Eisai Co. Ltd c | (day) | | (night) |
| 12月5日 | SUN | B | | (day) | | (night) |
| 12月6日 | MON | A | machine study | (day) | machine study | (night) |
| 12月7日 | TUE | A | | (day) | | (night) |
| 12月8日 | WED | A | Mitsubishi Chem. c | (day) | Mitsubishi Chem. c | (night) |
| 12月9日 | THU | A | Ajinomoto Co. Inc c | (day) | | (night) |
| 12月10日 | FRI | A | Camera maintenance | (day) | Camera maintenance | (night) |
| 12月11日 | SAT | A | Nakagawa Atsushi d | (day) | Nakagawa Atsushi d | (night) |
| 12月12日 | SUN | A | setting test | (day) | setting test | (night) |
| 12月13日 | MON | B | machine study | (day) | machine study | (night) |
| 12月14日 | TUE | B | setting test | (day) | Liaw Shwu-Huey b | (night) |
| 12月15日 | WED | B | Banyu Pharm. c | (day) | Liaw Shwu-Huey b | (night) |
| 12月16日 | THU | B | Nippon Roche c | (day) | Yasuoka Noritake d | (night) |
| 12月17日 | FRI | B | Daiichi Pharm. c | (day) | setting test | (night) |
| 12月18日 | SAT | B | Fujisawa Pharm. c | (day) | Yamgata Yuriko d | (night) |
| 12月19日 | SUN | B | Sasaki Kyoyu d | (day) | Sasaki Kyoyu d | (night) |

表1 . 平成11年度中期BL6Bビームタイム使用状況

が弱く、現段階では成功していない。再度In-Ga法を採用し3月上旬にテストを行う予定である。

9月に大型読取装置の改良が行われ、これまで頻繁に生じていたIP読み込み或いは排出時エラーが少なくなった。しかしIPを押さえる金具がはずれるなどユーザーでは対応できないエラーも生じている。表2にStation Checking sheetに記載されたエラーをまとめて掲載した。

この他、カメラの方では10月9日振動写真を撮影中に angleの振動が途中で止まるエラーが2回あったがリセットで復帰した。同様のエラーが11月20日にも1回生じている。又同じエラーかどうか分からないが、モーターエラーが2回起こり、resetとdatumで復帰させた等の記載があった。カメラに関しては何れも利用者が対処出来るエラーであった。

軸の狂いは夏のシャットダウン中にベアリングを交換した結果症状は改善されたが、未だ十分な精度が出ていない。そこで、思い切って1月のシャットダウン中にユニット全体を取り替えることにしビームタイムの終了した12月20日に中丸幸雄氏が交換部分をカメラ本体から外し理学電機株の工場に発送した。

. TARA第2実験ステーションBL6C

日本学術振興会未来開拓推進事業の産学連携研究費で開発中の全自動データ収集システム（愛称；galaxy）のIP読取部にX線による一様露光装置が取り付けられた。10月15日に放射線管理センター職員と共に試運転を行い、安全に関するテストが行われ安全が確認された。法的な手続き（人事院への設置報告）は筑波大学から行われた。

表2．大型IP読取機のエラー

| 月 日 | 読取装置機種 | エラーの種類 | |
|--------|---------|--------------|-----|
| 10月11日 | IP5 | バックセンサーエラー | 1回 |
| 14 | ? | IP排出エラー | 1回 |
| 22 | IP5 | AC/DCモーターエラー | 1回 |
| 31 | IP5 | IP排出エラー | 1回 |
| 11月17日 | IP5 & 6 | IP巻き取りエラー | 各1回 |
| 18 | IP2 | IP排出エラー | 1回 |
| 20 | IP5 | IP排出エラー | 1回 |
| 22 | IP5 | IP排出エラー | 1回 |
| 27 | IP2 | AC/DCモーターエラー | 1回 |
| 29 | IP5 & 6 | センサーエラー | 各1回 |
| 12月 8日 | IP6 | IP読込エラー | 1回 |
| 16 | IP2 | IP排出エラー | 1回 |
| 18 | IP6 | IP排出エラー | 1回 |
| 19 | IP2 | IP排出エラー | 3回 |
| 19 | IP6 | IP排出エラー | 2回 |

X線によるIPの一様露光は通常、X線発生装置から5m以上離れた位置にIPを置き、IPを2次的に動かしながら露光を行う方式が取られる。線源から離すほどX線ビームが広がるため一様度が良くなり、容易に一様露光出来るためである。しかしgalaxyの場合は読取部の狭い空間にX線発生装置を取り付ける必要があるため、線源からIP迄の距離はわずか5cmしかない。むら無く一様露光するためにはIPカセットを秒速2回転で回転させながらX線源を円筒軸に平行にゆっくり移動させる方式を採用した。現在多角的にテストを行っている。例えば均一性の欠如が露光装置に起因するのか或いは読取装置による物かも区別する必要がある。その為に400mm×200mmのIPをIPカセットに張り付けて一様露光した物を既製品のIP読取装置で読ませたり、逆に、富士写真フィルム(株)の研究所で一様露光した物をこちらのIPカセットに張り付けて読ませたりしている。その結果、読取部にも可成りのノイズが残っていることが分かり、フォトマルの高圧部にフィルターを入れたり、各所にシールドを施したりして読取ノイズは可成り減った。IPカセットの回転に預かっている左右のローラーを結ぶベルトを外したところ、長波長のノイズが消えた。一様露光装置にも欠点が見付かった。今後、最も均一性が良く、しかも出来るだけ短時間の露光で済む条件を求めるが、駆動系にも不備が見付かったので改作する。一様露光装置が完成すると、これを用いて読取部にある5個の読取ヘッドの感度調節、位置むら補正、ノイズ対策などX-ray photon検出に必要な本格的な取り組みが始まる。その結果は順次報告する予定であるが、

今回は先ず現段階に於けるフォトマルの最高印荷電圧を決めるために必要なフォトマルからADC迄のノイズについて報告する。

表3はフォトマルから出るノイズ(暗電流)と電子回路からのノイズを観測するため、レーザー電源を切り、読取ヘッドを遮光した状態で測定を行った。100×100ピクセルの平均値とその最小自乗偏差を示している。各ヘッド共に印荷電圧が700Vまでは殆ど変化無く、平均値が12前後、偏差は4前後である。平均値は零点調節でいかなるような数値にもなり得るのであまり意味がない。例えば平均値が12と言うことは、各ピクセル毎に4回ADCのゲートを開き加算を行っているので、ゲート毎の値は3前後に0点が調整されていることを意味する。これに対し偏差がノイズを意味するので重要である。印荷電圧0V時の偏差値がプリアンプ以降のノイズを表している。この値は大きくはないが、未だこれからの努力で下げられる可能性は十分ある。印荷電圧600V迄は各ヘッドとも偏差値の上昇は殆ど認められない。従って暗電流によるノイズの上昇は全く無視してさし支えないことが判明した。印荷電圧0Vから600Vまでの各ヘッドの平均値を最下段に示す。偏差値はヘッド2と4が1, 3, 5に比べて1レベル大きいこれは問題にするほどの差ではない。700Vで少しノイズが観測され、800Vでは明らかに偏差値の増加が見られる。ヘッド1の800V印荷の際偏差値が平均値を大幅に上回っているのは1231も有る大きなノイズが1回発生し、これが2乗で効いてくるため異常な値となっている。恐らく測定中に宇宙線がたまたまフォトマルを照射したのであろう。

表3 . フォトマルの印荷電圧とノイズの関係

| フォトマル 印荷電圧 | 読取ヘッド1 | | 読取ヘッド2 | | 読取ヘッド3 | | 読取ヘッド4 | | 読取ヘッド5 | |
|---------------|--------|------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
| | 平均 | 偏差 | 平均 | 偏差 | 平均 | 偏差 | 平均 | 偏差 | 平均 | 偏差 |
| 0V | 12.0 | 3.3 | 11.7 | 4.0 | 10.6 | 3.1 | 12.9 | 4.7 | 8.4 | 3.6 |
| 100 | 11.7 | 3.3 | 12.9 | 4.0 | 11.2 | 3.0 | 13.3 | 4.4 | 10.0 | 3.7 |
| 200 | 11.7 | 3.3 | 13.1 | 4.2 | 11.7 | 3.1 | 14.1 | 4.2 | 11.1 | 3.8 |
| 300 | 12.9 | 3.3 | 12.2 | 4.4 | 12.2 | 3.2 | 14.3 | 4.1 | 12.3 | 3.8 |
| 400 | 12.4 | 3.5 | 13.6 | 5.0 | 11.0 | 3.1 | 14.6 | 4.4 | 11.9 | 3.9 |
| 500 | 11.7 | 3.6 | 14.1 | 5.0 | 12.0 | 3.2 | 15.6 | 4.1 | 14.2 | 3.8 |
| 600 | 11.4 | 3.8 | 12.6 | 4.9 | 10.4 | 3.3 | 13.4 | 4.6 | 12.6 | 3.9 |
| 700 | 12.1 | 4.9 | 14.3 | 7.0 | 11.8 | 4.1 | 14.2 | 4.6 | 13.6 | 5.1 |
| 800 | 12.7 | 23.6 | 14.2 | 7.9 | 12.2 | 9.8 | 15.2 | 6.9 | 15.4 | 8.3 |
| 0~600 | 12.0 | 3.4 | 12.9 | 4.5 | 11.3 | 3.1 | 14.0 | 4.4 | 11.5 | 3.8 |

表4は読取部を正常な状態にして、消去直後のIPカセットを用いたテストである。このテストにより、IP自体の反射や乳剤から出る残留蛍光など諸々のノイズが推定される。この場合も印荷電圧500V迄は殆ど変化が観測されない。即ち、IP等外的条件のノイズも500V迄は回路のノイズレベル以下である。しかし印荷電圧が600Vになると明らかにIP等の外的要因によるノイズが観測される。これを除くには現在のIPタイプ;ST-VをブルーIPに変える必要があるかも知れない。今後検討を続ける予定である。

1 X-ray photonを検出でき、しかもダイナミックレンジを大きく取るためには、1 X-ray photon が2~3レベルに相当する感度にフォトマルの印荷電圧を調整する必要がある。今回

掲げたデータはその基礎になる値で、印荷電圧600V迄は現在のままで問題なく、又群青色IP（例えばBASMS）にすれば恐らく700V迄掛けられるであろう。実際の電圧は今後、多くの照射実験を繰り返し決定する。

装置の開発は常に思いがけない故障或いはエラーが頻発し、それを改善していくのが開発の大きな要素の一つである。その一例を示す。装置を制御するためのソフトは開発中で、user friendlyではないが一応最低限マックサイエンスの技術者が操作する限り働くような個々のモジュールが出来上がり、それらのモジュールを繋ぎ自動運転も試みた。マックサイエンスからは太田秀男工場長、松本知之部長、千葉大氏等3人、当方は坂部知平、坂部貴和子、鈴木守と五十嵐教之の4人が参加して、12月7日午前10時頃からビームアライメントを行い、コリメーターホルダの調整を行って 回転軸をX線ビームが10 μm

表4. IP消去直後のバックグラウンドノイズ

| フォトマル 印荷電圧 | 読取ヘッド1 | | 読取ヘッド2 | | 読取ヘッド3 | | 読取ヘッド4 | | 読取ヘッド5 | |
|---------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| | 平均 | 偏差 | 平均 | 偏差 | 平均 | 偏差 | 平均 | 偏差 | 平均 | 偏差 |
| 0V | 14.6 | 3.1 | 9.4 | 4.4 | 10.5 | 3.1 | 12.2 | 5.0 | 7.4 | 3.9 |
| 100 | 15.3 | 3.2 | 10.1 | 4.5 | 10.7 | 3.1 | 10.8 | 5.6 | 8.3 | 3.9 |
| 200 | 16.2 | 3.2 | 11.0 | 4.6 | 10.6 | 3.1 | 11.6 | 5.2 | 7.3 | 3.8 |
| 300 | 15.7 | 3.3 | 11.1 | 5.0 | 10.4 | 3.1 | 12.0 | 5.3 | 7.8 | 4.0 |
| 400 | 15.7 | 3.4 | 12.2 | 5.3 | 12.0 | 3.3 | 13.4 | 5.2 | 9.5 | 4.0 |
| 500 | 17.9 | 4.0 | 14.0 | 6.3 | 14.1 | 4.1 | 14.8 | 5.3 | 11.8 | 4.9 |
| 600 | 31.6 | 14.1 | 35.5 | 18.6 | 35.9 | 16.6 | 30.1 | 14.0 | 31.3 | 16.6 |
| 700 | 98.7 | 60.0 | 122.4 | 69.1 | 128.4 | 66.9 | 96.6 | 55.3 | 116.4 | 63.9 |
| 800 | 173.6 | 144.3 | 214.8 | 160.6 | 248.8 | 180.4 | 189.6 | 145.8 | 202.3 | 155.7 |
| 0~500 | 15.9 | 3.4 | 11.3 | 5.0 | 11.4 | 3.3 | 12.5 | 5.3 | 8.7 | 4.1 |

以内に交わるように調整した。この時点で既に午後11時を過ぎていた。測定試料は中国科学院から共同研究者として招待したLiang Don-Cai 教授とChang Wenrui教授に提供して頂き、この時点から実験に参加して頂いた。結晶を付けセンタリングを済ませ、測定条件も入力し、胸を躍らせながら自動測定に入ろうとしたが下方のスクリーンがdatum 位置に動いただけで止まってしまった。原因は計算機とインターフェースの接続が切れたためであることは直ちに分かった。その後リブートを行っても繋がらない。結局午前7時まで頑張ったがどうにもならないので、試料結晶を外し後はマックサイエンスに任せ我々は帰宅した。翌日原因が分かり回路の修正を行い正常に働くようになったとの報告を受けた。原因は一度にあまりにも多くの指令がインターフェースに来たためとのことであった。7月の時点ではmanualモードを加えながらではあるが兎に角最初から2カセットのテストデータ収集に成功している。しかも今回は予備の実験では完全自動運転が行えたにも拘わらず、実際のデータ収集時にはエラーが起きたわけである。大変残念では有ったが、エラーが起きたお陰で修正が出来一歩前進できたことになる。

12月16日にはSRビームを使用した実験を行った。この時点では完全自動運転には不安があるとのメーカー側の助言に基づいて、入射ビームポジションのフレーム毎の一致度を調べる実験と、プロセス用プログラムのテストデータ収集を行った。先ず入射ビームポジ

ションのフレーム毎の一致度を調べるため1カセット毎に6枚のフレーム分割(開口角60度)を行いシリコン及びアルミナの粉末写真を撮影した。またデータプロセス用プログラムのチェックと現状でのデータのqualityを調べる目的にはNaBrから結晶化した卵白リゾチームを使って振動法により54度範囲のデータ収集を行った。測定条件は振動角3度、symmetry settingで開口角60度とした。18フレーム収集する必要があるため3回IPカセットの自動交換が行われた。重原子を含む結晶を使ったのは異常分散は精度評価の目安に使えること、1波長で集めた異常分散効果を利用して構造変化を追跡できるような精度の高いデータが得られる装置にしたいという努力目標によるものである。実験参加者は坂部知平、坂部貴和子、西野泰暢、マックサイエンスからは松本、千葉の両名であった。東常行氏の報告によるとシリコンの2本の回折線を使って粉末図に外接する長方形をかぶせ、その中心をセンターとする方法により調べた結果フレーム毎にはセンター位置の変化は50 μ m以下であった。これは予想以上の結果である。現段階でプロセスされたデータの評価に向けての計算が進行中である。データプロセスプログラムのチェックは自動運転が可能になった2月以降に行われる予定である。リゾチーム結晶の調整は鈴木守氏により行われた。

平成11年中に完全自動運転を可能にしたいと思い、マックサイエンスの井上弘直氏にソフト開発を急いで貰った。その結果12月28日に自動測定ソフトがやっと書き上がり、12月29日及び30日に坂部知平、坂部貴和子、宮本康弘、井上弘直氏ら4人でテストを行った。29日は主に井上弘直氏がソフトを入力しバグ出しを行い、振動写真のみの完全自動運転には成功した。そこで30日はワイセンベルグ法を取り入れた自動運転をテストするためまず基本動作のテストを行った。その結果を次に示す。

(1) 軸の台形駆動速度のテスト

軸を-180度から+180度迄、360度回転させるに要した時間は19秒であった。台形駆動の立ち上げ及び立ち下げに各々0.5秒必要であるから最大回転速度は20度/秒であり、これは仕様を満足している。

(2) 振動写真測定条件下でのテスト

軸を0-12度、回転速度を1度/秒に設定し振動回数1回に要する時間は24秒であった。これは合格である。しかし、回転速度を上げると速度が指定通りでなく、また振動幅も不具合になるなどの現象が現れた。これがソフトによるものかハードによるものかまだ判明していない。早急に原因を解明する必要がある。

(3) カメラ部におけるIPカセット回転速度のテスト

これは撮影後次の画像を撮影するためにIPカセットを回転させるのに必要な時間を調べるテストである。IPカセットを0-180度回転するに要した時間は12秒であった。これは15度/秒に相当し仕様を満足している。しかし、単色X線による時間分割を行う場合はもっと速くした方がよい。どこまで速く出来るかは今後の課題である。

(4) ワイセンベルグ運動のテスト

ワイセンベルグ運動とは軸の振動とIPカセットが光軸に垂直な方向に並進運動を同期して行う方法である。この際、軸の回転(θ)に対するIPカセットの移動距離(Z)をCoupling Constant(CC)と言い、 $CC = \theta / Z$ (deg/mm)と定義する。また、以下のテストは(2)の理由により軸の回転速度は常に1度/秒とした。IPカセットの最高並進距離は入射X線用穴の大きさに等しい15mmで有るが、今回は10mmに固定した。テストの結果を表5に示した。この表でVibrationというのはカメラ部の振動であるが、計器による測定

ではないため数値による表現は出来なかった。このVibration以外はすべて予想通りの動きであり、その意味では合格である。しかし、Vibrationが大きいと、試料結晶が動く可能性がある。総合判断ではこれを考慮している。この振動は470kgもあるIPカセットを動かすためにトルクの大きいパルスモーターを使用していることが原因と考えられる。1パルス当たりの移動量を現在の1/5程度にする、或いはエンコーダー制御のDCサーボモーターに変えるなど今後の検討課題である。

表5. ワイセンベルグ運動テスト結果

| / Z (deg/mm) | speed (deg) | Z (deg/sec) | Zspeed (mm) | N (mm/sec) | Time (times) | Vibration (sec) | Comment 総合判断 |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| 1.0 | 10.0 | 1.0 | 10.0 | 1.0 | 0.5 | 10 | small OK |
| 1.0 | 10.0 | 1.0 | 10.0 | 1.0 | 2.0 | 40 | small OK |
| 0.5 | 5.0 | 1.0 | 10.0 | 2.0 | 4.0 | 40 | a bit may be not OK |
| 0.25 | 2.5 | 1.0 | 10.0 | 4.0 | 8.0 | 40 | large no good |
| 0.1 | 1.0 | 1.0 | 10.0 | 10.0 | 20.0 | 40 | very large Bad使用不可 |

これまでのテストにより現在作動できる基本的なパラメーターが分かったので、我々が解析しているGGT結晶をBL6A実験ステーションでデータ収集した際の記録を参考にして条件を入力し全自動データ収集のテストを行った。SRビームはシャットダウン中なので、結晶はマウントせず入力パラメーターに従ってフルデータセットを収集する動作をテストした。具体的なパラメーターを次に示す。

全自動運転用パラメーター

(1) 振動写真1

振動角 = 2度、振動速度 = 1度/秒、CC = 0 (振動写真を意味する)、Z = 0mm、振動回数(N) = 2往復、露光時間 = 8秒、開始角度 = 0度、終了角度 = 2度、overlap = 0度、フレーム数 = 1ショット、symmetric setting、開口角 = 40度

(2) 振動写真2

振動角 = 2度、振動速度 = 1度/秒、CC = 0 (振動写真を意味する)、Z = 0mm、振動回数(N) = 2往復、露光時間 = 8秒、開始角度 = 45度、終了角度 = 47度、overlap = 0度、フレーム数 = 1ショット、symmetric setting、開口角 = 40度

(3) ワイセンベルグ写真

振動角 = 5.6度、振動速度 = 1度/秒、CC = 2.5度/mm、Z = 2.24mm、振動回数(N) = 4往復、露光時間 = 44.8秒、開始角度 = 45度、終了角度 = 155.6度、overlap = 0.6度、フレーム数 = 22ショット、symmetric setting、開口角 = 40度

次に、測定順序を(1)、(2)、(3)、(2)と指定した。最初の振動写真はプロセス時に必要な方位マトリックス決定用であり、(3)は強度データ収集用のワイセンベル

グ写真、最後の(2)は途中で結晶が動かなかったか或いは損傷の具合などを検討するための振動写真で有る。開口角が40度であるから、カセット当たり9ショット撮影が出来る。合計25ショットであるから3カセットが必要になる。最初のカセットは消去済みで有るがだめ押しにスタート後30秒消去を行なった。スタートからの時間経過を下記する。

自動運転テスト

| | | | |
|-------------------------|------------|-------------|-------|
| スタート時刻 | 17時13分40秒、 | | |
| カセット1消去終了時刻 | 14分10秒、 | 所要時間 | 30秒 |
| カセット1カメラ部へ搬送終了時刻 | 17分0秒、 | 所要時間 | 2分50秒 |
| カセット1撮影終了時刻 | 24分13秒、 | 所要時間 | 7分13秒 |
| カセット1読取部へ搬送終了時刻 | 26分30秒、 | 所要時間 | 2分17秒 |
| カセット1読取終了予想時刻 | 34分30秒、 | 所要時間 | 8分0秒 |
| カセット2カメラ部へ搬送終了時刻 | 28分45秒、 | 所要時間(2分15秒) | |
| カセット2 datum終了後タイムアウトで停止 | | | |

カセット1の読取とカセット2の搬送は同時進行する。又、最初のカセット1は消去部から移動を開始するので搬送に2分50秒を要したが、カセット2はカセット1がカメラ部から読取部に搬送中に消去部から消去部前のベンチに移動しているため、そこからカメラ部への搬送時間は2分15秒であった。

ほぼ計算通りの速度で順調に運転されていた装置が突然止まってしまった。上記のテストを3回繰り返したが、現象は全く同じであった。原因を突き止めない限り自動化は出来ない。自動運転中カセット1がdatumを行った後、最初の位置迄回転する速度が極めて遅いことが観測された。これも、常に起こる現象であることが判明した。原因を解明し早急に対処する必要がある。

III. コンピュータ関係

1. ネットワークとデータサーバの利用状況

10月~12月のビームタイム期間におけるデータサーバは、おおむね保存期間を7日間にして運用した。しかし、測定データがディスク容量の80%を越えたため保存期間を11月29日には6日間に変更し、12月1日~9日間は5日間で運用した。今期にBL6A/6B/18Bの3つのビームラインからサーバーに書き込まれたデータの総量を図1に示す。

2. サーバのダウン

10月9日~12日にかけてサーバシステムのダウンが6回続けて発生した。サポートセンターでの解析結果、tape loaderへアクセスした時この現象が起きることが分かり、cam-changerのリンクを張り直し、カーネルの再構築をした。これ以後はこの現象は起きていない。10月9日~11日の間はバックアップを実行できなかったが、修理が終わった12日にすべてのバックアップを取った。ユーザが自分で消去したもの以外は、すべての測定データのバックアップは取れている。

3. ネットワーク機器の2000年問題への対応

構造生物学坂部プロジェクトのネットワークには、SGI, COMPAQ(旧DEC), SUNの3

社のコンピュータが接続している。その中で中心になっているAlphaServer4000は業者に依頼して対応を済ませた。IP readerのコントローラとして接続しているもの以外のSGI社製のコンピュータは、Y2K対応済みと言われるOSのIRIX6.5ではDENZOが動かないのでIRIX6.3にパッチを当てて対応した。旧DECのコンピュータは、OSがDigital Unix4.0d

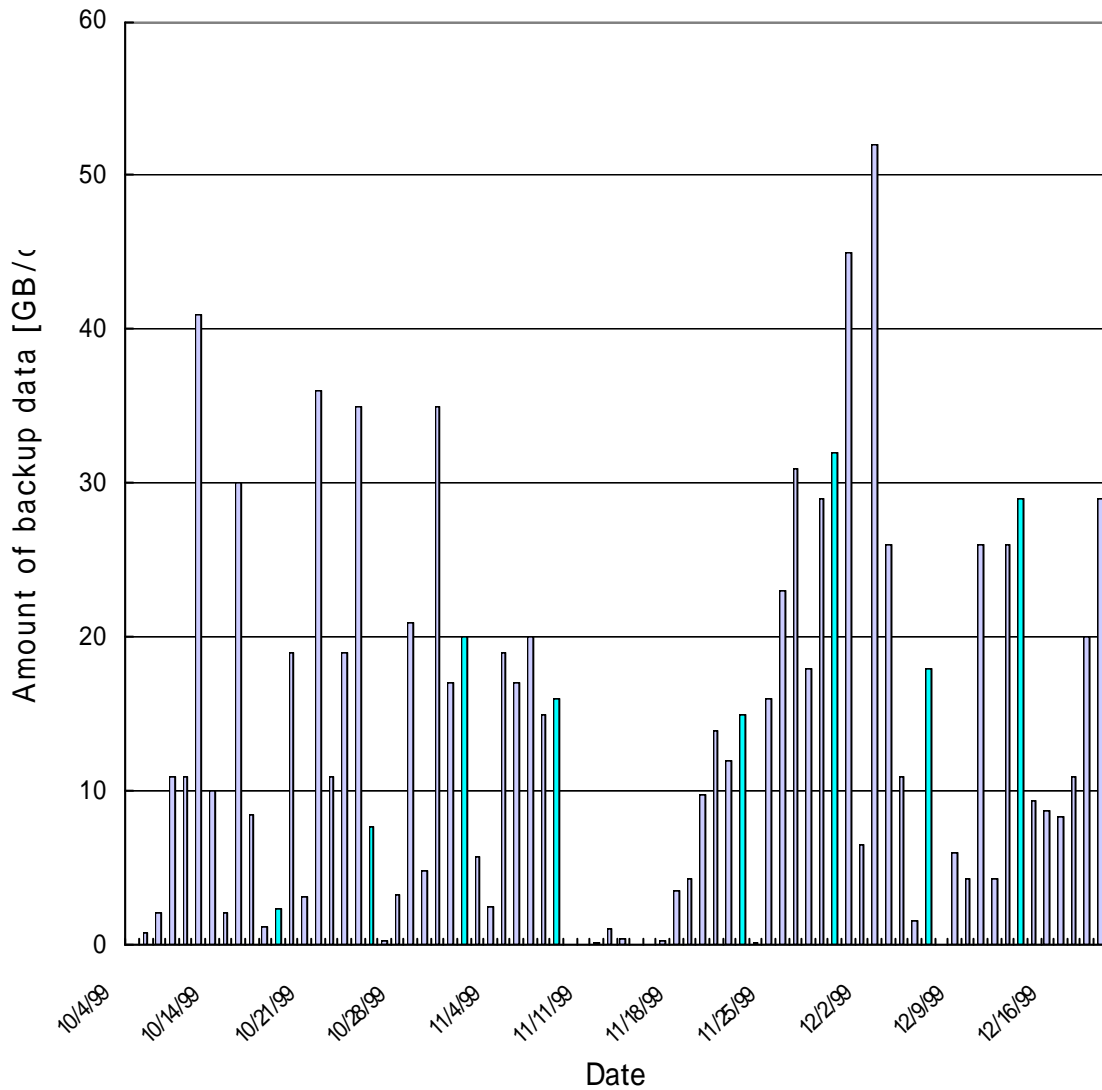


図1 . 平成11年前期に於けるDLTバックアップ状況

以降が対応しているが、Digital Unix4.0cの2台、3.2の1台については1月のビームタイムが始まるまでに使える状態にしたい。しかし、メーカーがパッチを用意していないDEC3600および3700については、現在ユーザの利用が無い状態なので利用目的があれば対応したいと考えている。

・各種委員会報告

1. 編集委員会

第13回編集委員会が平成11年11月4日開催された。出席者は、石川弘紀、栗原宏之、坂部貴和子、坂部知平、曾我部智、田仲可昌（五十音順）氏等6名であった。構造生物Vol. 5, No. 3の原稿最終チェックならびに印刷等のスケジュール確認が行われた。続いて、次号(Vol.6, No.1)の内容についての検討が行われ、執筆をお願いする方々を決定した。

2. 行事委員会

9月3日（金）に筑波大学大学会館国際会議場にて、国際的に著名なCleveland Clinic FoundationのDr. Dennis J. StuehrやUniversity of CaliforniaのProf. Thomas L. Poulos等6名を招待し、TARA公開セミナー「TARA構造生物学国際シンポジウム」を開催した。参加者は筑波大学関係者31名、その他35名の合計66名であった。講演内容は次号Vol.6, No.1に掲載される予定である。

V. 業績紹介

TARAプロジェクトとして行った研究であることが明確である論文のみを掲載する。尚、本プロジェクトのメンバー名と所属を各論文の文頭に掲げた。

1. S. H. Liaw (Yang-Ming University)

Crystallization and Preliminary Diffraction Data of 60-kDa Glycosylated Pollen Isoallergens from Bermuda Grass

Journal of Structural Biology, **127**, 83-87, (1999)

Shwu-Huey Liaw^{1,2}, Donna Y. Lee², Sue-Yee Yang³, and Song-Nan Su³

¹Department of Life Science, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

²Institute of Molecular Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

³Department of Medical Research, Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan

Summary

Crystals grown from a 60-kDa isoallergen mixture of Bermuda grass pollen have been obtained in 30% PEG 4000 and 25% isopropanol. The crystals diffract beyond 2- resolution and belong to a tetragonal space group with the unit cell dimensions $a = b = 86$ and $c = 310$. The preferential crystal growth of the larger isoallergens with a blocked N-terminus indicates that crystallization can isolate proteins with compact conformation.

2. D. I. Stuart (Oxford University)

Killer Cell Immunoglobulin Receptors and T Cell Receptors Bind Peptide-Major Histocompatibility Complex Class I with Distinct Thermodynamic and Kinetic Properties

The Journal of Biological Chemistry, **274**, 28329-28334, (1999)

Katsumi Maenaka^{1,2}, Takeo Juji², Takahiro Nakayama², Jessica R. Wyer³, George F. Gao³, Taeko Maenaka¹, Nathan R. Zaccai¹, Akiko Kikuchi², Toshio Yabe², Katsushi Tokunaga², K

enji Tadokoro², David I. Stuart^{1,4}, E. Yvonne Jones^{1,4}, and P. Anton van der Merwe⁵

¹Structural Biology, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Roosevelt Drive, Headington, Oxford OX3 7BN, United Kingdom

²Japanese Red Cross Central Blood Center, 4-3-1 Hiro-o, Shibuya-ku, Tokyo 120, Japan

³MRC Human Immunology Unit, Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DS

⁴Oxford Center for Molecular Sciences, New Chemistry Building, South Parks Road, Oxford OX1 3QT

⁵Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford OX1 3RE, United Kingdom

Summary

Human natural killer cells and a subset of T cells express a repertoire of killer cell immunoglobulin receptors (KIRs) that recognize major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. KIRs and T cell receptors (TCRs) bind in a peptide-dependent manner to overlapping regions of peptide-MHC class I complexes. KIRs with two immunoglobulin domains (KIR2Ds) recognize distinct subsets of HLA-C alleles. Here we use surface plasmon resonance to study the binding of soluble forms of KIR2DL1 and KIR2DL3 to several peptide-HLA-Cw7 complexes. KIR2DL3 bound to the HLA-Cw7 allele presenting the peptide RYRPGTVAL with a 1:1 stoichiometry and an affinity ($K_d = 7 \mu\text{M}$ at 25 °C) within the range of values measured for other cell-cell recognition molecules, including the TCR. Although KIR2DL1 is reported not to recognize the HLA-Cw7 allele in functional assays, it bound RYRPGTVAL/HLA-Cw7, albeit with a 10 - 20-fold lower affinity. TCR/peptide-MHC interactions are characterized by comparatively slow kinetics and unfavorable entropic changes (Willcox, B. E., Gao, G. F., Wyer, J. R., Ladbury, J. E., Bell, J. I., Jakobsen, B. K., and van der Merwe, P. A. (1999) *Immunity* 10, 357-365), suggesting that binding is accompanied by conformational adjustments. In contrast, we show that KIR2DL3 binds RYRPGTVAL/HLA-Cw7 with fast kinetics and a favorable binding entropy, consistent with rigid body association. These results indicate that KIR/peptide-MHC class I interactions have properties typical of other cell-cell recognition molecules, and they highlight the unusual nature of TCR/peptide-MHC recognition.

3 . Hanna S. Yuan (Institute of Molecular Biology)

The crystal structure of the DNase domain of colicin E7 in complex with its inhibitor Im7 protein

Tzu-Ping Ko¹, Chen-Chung Liao², Wen-Yen Ku^{1,3}, Kin-Fu Chak² and Hanna S Yuan¹
Structure, 7, 91-102, (1999)

¹Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan 11529, Republic of China

²Institute of Biochemistry, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan, Republic of China

³National Defense University, Institute of Life Science, Taipei, Taiwan, Republic of China.

Summary

Background: Colicin E7 (ColE7) is one of the bacterial toxins classified as a DNase-type E-group colicin. The cytotoxic activity of a colicin in a colicin-producing cell can be counteracted by binding of the colicin to a highly specific immunity protein. This biological event is a good model system for the investigation of protein recognition.

Results: The crystal structure of a one-to-one complex between the DNase domain of colicin E7 and its cognate immunity protein Im7 has been determined at 2.3 Å resolution. Im7 in the complex is a varied four-helix bundle that is identical to the structure previously determined for uncomplexed Im7. The structure of the DNase domain of ColE7 displays a novel β -sheet fold and contains a Zn^{2+} ion bound to three histidine residues and one water molecule in a distorted tetrahedron geometry. Im7 has a V-shaped structure, extending two arms to clamp the DNase domain of ColE7. One arm (helices 12-13; where * represents helices in Im7) is located in the region that displays the greatest sequence variation among members of the immunity proteins in the same subfamily. This arm mainly uses acidic sidechains to interact with the basic sidechains in the DNase domain of ColE7. The other arm (loop 23-34) is more conserved and it interacts not only with the sidechain but also with the main chain atoms of the DNase domain of ColE7.

Conclusions: The protein interfaces between the DNase domain of ColE7 and Im7 are charge-complementary and charge interactions contribute significantly to the tight and specific binding between the two proteins. The more variable arm in Im7 dominates the binding specificity of the immunity protein to its cognate colicin. Biological and structural data suggest that the DNase active site for ColE7 is probably near the metal-binding site.

4 . 岡村直道、馬場 忠 (筑波大)

A Porcine Homolog of the Major Secretory Protein of Human Epididymis, HE 1, Specifically Binds Cholesterol

Biochimica et Biophysica Acta, **1438**, 377-387 (1999)

Naomichi Okamura^{1,2,3}, Sachiko Kiuchi^{3,4}, Michiko Tamba¹, Takayuki Kashima^{3,4}, Shinsuke Hiramoto¹, Tadashi Baba^{2,4}, Françoise Dacheux⁵, Jean-Louis Dacheux⁵, Yoshiki Sugita⁶, Yin-Zhe Jin¹

¹Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

²Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA researcher for Sakabe-Shoun project), University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

³College of Medical Technology and Nursing, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

⁴Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

⁵Laboratoire de Physiologie de la Reproduction, INRA, Monnaie, France

⁶Ibaraki Prefectural University of Health Sciences, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0331, Japan

Summary

A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, was for the first time purified from the porcine cauda epididymal fluid. The HE1 homolog was secreted in to the epididymal fluid as a 19-kDa glycoprotein, whose sugar moiety was gradually processed to form a 16-kDa protein during transit through the epididymis. The HE1 homolog mRNA was detected only in the caput and corpus epididymis among the porcine tissues examined. The purified HE1 homolog specifically bound cholesterol with high affinity ($K_d = 2.3 \mu M$). The binding stoichiometry was determined to be 0.94 mol/mol, suggesting that 1 mol of cholesterol binds to 1 mol of the protein. It was also found that the HE1 homolog is a major cholesterol-binding protein in the porcine epididymal fluid. The possibility that the HE1 homolog is involved in the regulation of the lipid composition of the sperm membranes during the maturation in epididymis is discussed.

5. 甲斐 泰 (阪大)

Crystallization and preliminary X-ray analysis of plastocyanin from cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942

Acta Cryst. **D55**, 683-684 (1999)

Tsuyoshi Inoue¹, Hajime Sugawara¹, Sawako Hamanaka¹, Hitomi Tsukui², Eiji Suzuki², Takamitsu Kohzuma² and Yasushi Kai^{1*}

¹Department of Materials Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

²Faculty of Science, Ibaraki University, Mito, Ibaraki 310-8512, Japan

Summary

A plastocyanin from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 has been crystallized in two different forms by hanging-drop vapour diffusion with ammonium sulfate as precipitant. Form I is hexagonal, space group $P6_1$ or $P6_5$ with unit-cell dimensions $a = b = 34.62$ and $c = 107.22$. Form II is tetragonal, space group $P4_1$ or $P4_3$, with unit-cell dimensions $a = b = 43.05$ and $c = 56.94$. Form I crystals diffract to 2.5 using graphite-monochromated CuK radiation from a Rigaku RU-300 rotating-anode generator operated at 40 kV and 100 mA. Form II crystals diffract to 1.9 using synchrotron radiation at beamline BL6A of the Photon Factory (KEK). Molecular-replacement calculations using the structure of plastocyanin from *Ulva pertusa* have been performed.

6. 甲斐 泰 (阪大)

Crystal Structure Determinations of Oxidized and Reduced Plastocyanin from the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942

Biochemistry **38**, 6063-6069 (1999)

Tsuyoshi Inoue, Hajime Sugawara, Sawako Hamanaka, Hitomi Tsukui¹, Eiji Suzuki¹, Takamitsu Kohzuma¹, and Yasushi Kai

Department of Materials Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Ibaraki University, Mito, Ibaraki, Japan

Summary

The crystal structures of oxidized and reduced plastocyanins from *Synechococcus* sp. PCC 7942 have been determined at 1.9 and 1.8 Å resolution, respectively, at pH 5.0. The protein consists of only 91 amino acid residues, the smallest number known for a plastocyanin, and apparently lacks the mostly conserved acidic patch that is believed to be important for recognition with electron-transfer partners. The protein has two acidic residues, Glu42 and Glu85, around Tyr83, which is thought to be a possible conduit for electrons, but these are neutralized by Arg88 and Lys58. Residue Arg88 interacts with Tyr83 through a π -cation interaction in which the guanidinium group of the former completely overlaps the aromatic ring of the tyrosine. Reduction of the protein at pH 5.0 causes a lengthening of one Cu-N(His) bond by 0.36 Å, despite the small rms deviation of 0.08 Å calculated for the backbone atoms. Moreover, significant conformational changes of Arg88 and Lys58, along with the movement of a water molecule adjacent to the OH group of Tyr83, were observed on reduction; the guanidinium group of Arg88 rotates by more than 11° and the water molecule moves by 0.42 Å. The changes around the copper site and the alterations around Tyr83 may be linked to the reduction of the copper.

7. 甲斐 泰 (阪大)

Crystal Structure Determinations of Oxidized and Reduced Pseudoazurins from *Achromobacter cycloclastes*

CONCERTED MOVEMENT OF COPPER SITE IN REDOX FORMS WITH THE REARRANGEMENT OF HYDROGEN BOND AT A REMOTE HISTIDINE*

The Journal of Biological Chemistry **274**, 17845-17852, (1999)

Tsuyoshi Inoue, Nobuya Nishio, Shinnichiro Suzuki¹, Kunishige Kataoka¹, Takamitsu Kohzuma², and Yasushi Kai

From the Department of Materials Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

¹the Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

²the Department of Chemistry, Faculty of Science, Ibaraki University, Mito, Ibaraki 310-8512, Japan

Summary

The crystal structures of oxidized and reduced pseudoazurins from a denitrifying bacterium, *Achromobacter cycloclastes* IAM1013, have been determined at 1.35- and 1.6- Å resolutions,

respectively. The copper site in the oxidized state exhibits a distorted tetrahedral structure like those of other pseudoazurins. However, not only a small change of the copper geometry, but concerted peptide bond flips are identified. The imidazole ring of remote His⁶ has a hydrogen bonding distance of 2.73 Å between N-1(His₆) and O-1(Thr₃₆) in the oxidized protein. When the protein is reduced at pH 6.0, the imidazole ring rotates by 30.3° and moves 1.00 Å away from the position of the oxidized state. A new hydrogen bond between N-2(His₆) and O-1(Glu₄) is formed with a distance of 3.03 Å, while the hydrogen bond between N-1(His₆)-O-1(Thr₃₆) is maintained with an interatomic distance of 2.81 Å. A concomitant peptide bond flip of main chain between Ile³⁴ and Thr³⁶ occurs.

8. 甲斐 泰 (阪大)

The Structure and Unusual pH Dependence of Plastocyanin from the Fern *Dryopteris crassirhizoma*

THE PROTONATION OF AN ACTIVE SITE HISTIDINE IS HINDERED BY INTERACTIONS

The Journal of Biological Chemistry 274, 11817-11823, (1999)

Takamitsu Kohzuma, Tsuyoshi Inoue¹, Fuminori Yoshizaki², Yuki Sasakawa, Kazuhiko Onodera, Shigenori Nagatomo³, Teizo Kitagawa³, Sachiko Uzawa², Yoshiaki Isobe², Yasutomo Sugimura², Masaharu Gotowda¹, and Yasushi Kai¹

Faculty of Science, Ibaraki University, Mito, Ibaraki 310-8512, Japan

¹Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

²Faculty of Science, Toho University, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

³Institute for Molecular Science, Okazaki, Aichi 444-8585, Japan

Summary

Spectroscopic properties, amino acid sequence, electron transfer kinetics, and crystal structures of the oxidized (at 1.7 Å resolution) and reduced form (at 1.8 Å resolution) of a novel plastocyanin from the fern *Dryopteris crassirhizoma* are presented. Kinetic studies show that the reduced form of *Dryopteris* plastocyanin remains redox-active at low pH, under conditions where the oxidation of the reduced form of other plastocyanins is inhibited by the protonation of a solvent-exposed active site residue, His⁸⁷ (equivalent to His⁹⁰ in *Dryopteris* plastocyanin). The x-ray crystal structure analysis of *Dryopteris* plastocyanin reveals π-π stacking between Phe¹² and His⁹⁰, suggesting that the active site is uniquely protected against inactivation. Like higher plant plastocyanins, *Dryopteris* plastocyanin has an acidic patch, but this patch is located closer to the solvent-exposed active site His residue, and the total number of acidic residues is smaller. In the reactions of *Dryopteris* plastocyanin with inorganic redox reagents, the acidic patch (the "remote" site) and the hydrophobic patch surrounding His⁹⁰ (the "adjacent" site) are equally efficient for electron transfer. These results indicate the significance of the lack of protonation at the active site of *Dryopteris* plastocyanin, the equivalence of the two electron transfer sites in this protein, and a possibility of obtaining a novel insight into

the photo-synthetic electron transfer system of the first vascular plant fern, including its molecular evolutionary aspects. This is the first report on the characterization of plastocyanin and the first three-dimensional protein structure from fern plant.

9 . 甲斐 泰 (阪大)

Crystal Structure of Carboxylase Reaction-oriented Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from a Thermophilic Red Alga, *Galdieria partita*

The Journal of Biological Chemistry, **274**, 15655-15661, (1999)

Hajime Sugawara, Hiroki Yamamoto, Naoki Shibata¹, Tsuyoshi Inoue, Sachiko Okada², Chikahiro Miyake², Akiho Yokota², and Yasuhi Kai

Department of Materials Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita 565-0871, Japan

¹Present address: Dept. of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Hyogo 678-1297, Japan

²Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma 630-0101, Japan

Summary

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco, EC 4.1.1.39) obtained from a thermophilic red alga *Galdieria partita* has the highest specificity factor of 238 among the Rubiscos hitherto reported. Crystal structure of activated Rubisco from *G. partita* complexed with the reaction intermediate analogue, 2-carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate (2-CABP) has been determined at 2.4 Å resolution. Compared with other Rubiscos, different amino residues bring about the structural differences in active site, which are marked around the binding sites of P-2 phosphate of 2-CABP. Especially, side chains of His-327 and Arg-295 show the significant differences from those of spinach Rubisco. Moreover, the side chains of Asn-123 and His-294 which are reported to bind the substrate, ribulose 1,5-bisphosphate, form hydrogen bonds characteristic of *Galdieria* Rubisco. Small subunits of *Galdieria* Rubisco have more than 30 extra amino acid residues on the C terminus, which make up a hairpin-loop structure to form many interactions with the neighboring small subunits. When the structures of *Galdieria* and spinach Rubiscos are superimposed, the hairpin region of the neighboring small subunit in *Galdieria* enzyme and apical portion of insertion residues 52-63 characteristic of small subunits in higher plant enzymes are almost overlapped to each other.

10 . 甲斐 泰 (阪大)

Crystallization and Preliminary Crystallographic Studies of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from a Red Alga, *Galdieria partita*, with a High Specificity Factor

J. Biochem. **120**, 1064-1066 (1999)

Naoki Shibata, Hiroki Yamamoto, Tsuyoshi Inoue, Koichi Uemura¹, Akiho Yokota¹, and Yas

ushi Kai

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871
Plant Molecular Physiology Laboratory, Research Institute of Innovative Technology for the Earth, Soraku-gun, Kyoto 619-02

Summary

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) from a red alga, *Galdieria partita*, has been crystallized by the hanging drop vapor diffusion method. Two forms (Forms I and II) of crystals were obtained under distinct conditions. The Form I crystal belongs to monoclinic space group C2 with cell dimensions of $a = 190.2$, $b = 140.0$, $c = 189.0$ Å, and $\beta = 102.6^\circ$, and diffracts up to 3.0 Å resolution. Diffraction from the Form II crystal was too weak to determine crystal data.

11. 甲斐 泰 (阪大)

Novel Insight into the Copper-Ligand Geometry in the Crystal Structure of *Ulva pertusa* Plastocyanin at 1.6-Å Resolution

STRUCTURAL BASIS FOR REGULATION OF THE COPPER SITE BY RESIDUE 88

The Journal of biological Chemistry, 274, 4225-4230 (1999)

Naoki Shibata, Tsuyoshi Inoue, Chizuko Nagano, Nobuya Nishio, Takamitsu Kohzuma¹, Kazuhiko Onodera¹, Fuminori Yoshizaki², Yasutomo Sugimura², and Yasuhi Kai

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

¹Department of Chemistry, Ibaraki University, Mito, Ibaraki 310-8512, Japan

²Department of Biology, Faculty of Science, Toho University, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

Summary

The crystal structure of plastocyanin from a green alga, *Ulva pertusa*, has been determined at 1.6-Å resolution. At its copper site, *U. pertusa* plastocyanin has a distorted tetrahedral coordination geometry similar to other plastocyanins. In comparison with structures of plastocyanins reported formerly, a Cu(II)-S (Met⁹²) bond distance (2.69 Å) is shorter by about 0.2 Å and a Cu(II)-S (Cys⁸⁴) distance is longer by less than 0.1 Å in *U. pertusa* plastocyanin. These subtle but significant differences are caused by the structural change at a His-Met loop (His⁸⁷-Met⁹²) due to an absence of a O(Asp⁸⁵)-O (Ser⁸⁸) hydrogen bond which is found in *Enteromorpha prolifera* plastocyanin. In addition, poplar and *Chlamydomonas reinhardtii* plastocyanins with a glutamine at residue 88 have a weak cation-π interaction with Tyr⁸³. This interaction lengthens the Cu(II)-S (Met⁹²) bond of poplar and *C. reinhardtii* plastocyanins by 0.14 and 0.20 Å, respectively. As a result of structural differences, *U. pertusa* plastocyanin has a less distorted geometry than the other plastocyanins. Thus, the cupric geometry is finely tuned by the interactions between residues 85 and 88 and between residues 83 and 88. This re-

sult implies that the copper site is more flexible than reported formerly and that the rack mechanism would be preferable to the entatic theory. The His-Met loop may regulate the electron transfer rate within the complex between plastocyanin and cytochrome f.

12. 甲斐 泰 (阪大)

Crystallographic Studies on a Family B DNA Polymerase from Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* Strain KOD1

J. Biochem. 125, 983-986 (1999)

Hiroshi Hashimoto, Tomoya Matsumoto, Motomu Nishioka¹, Toru Yuasa¹, Shoko Takeuchi, Tsuyoshi Inoue, Shinsuke Fujiwara¹, Masahiro Takagi¹, Tadayuki Imanaka², and Yasushi Kai
Department of Materials Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

¹Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

²Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshidahonmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501

Summary

A hyperthermostable family B DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus kodakaraensis* strain KOD1, has been crystallized by the hanging-drop vapor diffusion method at 293 K with 2-methyl-2,4-pentanediol as the precipitant. The diffraction pattern of a crystal extends to 3.0 Å resolution, and two full sets of 3.0 Å resolution diffraction data for native crystals were successfully collected at 290 K and 100 K upon exposure to synchrotron radiation at KEK-PF, Japan. The crystals belong to the space group, $P2_12_12_1$, with unit-cell dimensions of $a = 112.8$, $b = 115.4$, and $c = 75.4$ Å at 290 K, and $a = 111.9$, $b = 112.4$, and $c = 73.9$ Å at 100 K. Structural analysis by means of the multiple isomorphous replacement method is now in progress.

13. 森川耿右 (BERI)

Atomic Structure of the GCSF-receptor Complex Showing a New Cytokine-receptor Recognition Scheme

Nature, **401**, 713-717 (1999)

Masaharu Aritomi^{1,3}, Naoki Kunishima¹, Tomoyuki Okamoto^{1,2}, Ryota Kuroki², Yoshimi Ota^{1,4} & Kosuke Morikawa¹

¹Biomolecular Engineering Research Institute, 6-2-3 Furuedai, Suita-city, Osaka 565-0874, Japan

²Central Laboratories for Key Technology, Kirin Brewery Co. Ltd, 13-5 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama-city, Kanagawa 236-0004, Japan

³Present address: Asahi Chemical Industry Co. Ltd, 2-1 Samejima, Fuji-city, Shizuoka 416-85

01, Japan

⁴Present address: Toray Industrial, Inc., 1111 Teburo, Kamakura-city, Kanagawa 248-0036, Japan

Summary

Granulocyte colony-stimulating factor (GCSF) is the principal growth factor regulating the maturation, proliferation and differentiation of the precursor cells of neutrophilic granulocytes and is used to treat neutropenia. GCSF is a member of the long-chain subtype of the class 1 cytokine superfamily, which includes growth hormone, erythropoietin, interleukin 6 and oncostatin M (ref. 3). Here we have determined the crystal structure of GCSF complexed to the BN-BC domains, the principal ligand-binding region of the GCSF receptor (GCSFR). The two receptor domains form a complex in a 2:2 ratio with the ligand, with a noncrystallographic pseudo-twofold axis through primarily the inter-domain region and secondarily the BC domain. This structural view of a gp130-type receptor-ligand complex presents a new molecular basis for cytokine-receptor recognition.

14 . 安岡則武 (姫工大)

A new mode of B₁₂ binding and the direct participation of a potassium ion in enzyme catalysis: X-ray structure of diol dehydratase

Structure, 7, 997-1008, (1999)

Naoki Shibata, Jun Masuda, Takamasa Tobimatsu¹, Tetsuo Toraya¹, Kyoko Suto, Yukio Morimoto and Noritake Yasuoka

Department of Life Science, Himeji Institute of Technology, 1475-2 Kanaji, Kamigori, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Engineering, Okayama University, Tsushima-Naka, Okayama 700-8530, Japan.

Summary

Background: Diol dehydratase is an enzyme that catalyzes the adenosylcobalamin (coenzyme B₁₂) dependent conversion of 1,2-diols to the corresponding aldehydes. The reaction initiated by homolytic cleavage of the cobalt-carbon bond of the coenzyme proceeds by a radical mechanism. The enzyme is an $\alpha_2\beta_2$ heterooligomer and has an absolute requirement for a potassium ion for catalytic activity. The crystal structure analysis of a diol dehydratase-cyanocobalamin complex was carried out in order to help understand the mechanism of action of this enzyme.

Results: The three-dimensional structure of diol dehydratase in complex with cyanocobalamin was determined at 2.2 Å resolution. The enzyme exists as a dimer of heterotrimers ($\alpha_2\beta$)₂. The cobalamin molecule is bound between the α and β subunits in the 'base-on' mode, that is, 5,6-dimethylbenzimidazole of the nucleotide moiety coordinates to the cobalt atom in the lower axial position. The α subunit includes a (β/α)₈ barrel. The substrate, 1,2-pro

panediol, and an essential potassium ion are deeply buried inside the barrel. The two hydroxyl groups of the substrate coordinate directly to the potassium ion.

Conclusions: This is the first crystallographic indication of the 'base-on' mode of cobalamin binding. An unusually long cobalt-base bond seems to favor homolytic cleavage of the cobalt-carbon bond and therefore to favor radical enzyme catalysis. Reactive radical intermediates can be protected from side reactions by spatial isolation inside the barrel. On the basis of unique direct interactions between the potassium ion and the two hydroxyl groups of the substrate, direct participation of a potassium ion in enzyme catalysis is strongly suggested.

15 . 山縣ゆり子、倉光成紀 (阪大)

Contribution of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds to the Conformational Stability of Human Lysozyme

Biochemistry, 38, 12698-12708, (1999)

Kazufumi Takano, Yuriko Yamagata¹, Jun Funahashi, Yusaku Hioki, Seiki Kuramitsu², and Katsuhide Yutani

Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

²Graduate School of Science, Osaka University, Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan

Summary

In globular proteins, there are intermolecular hydrogen bonds between protein and water molecules, and between water molecules, which are bound with the proteins, in addition to intramolecular hydrogen bonds. To estimate the contribution of these hydrogen bonds to the conformational stability of a protein, the thermodynamic parameters for denaturation and the crystal structures of five Thr to Val and five Thr to Ala mutant human lysozymes were determined. The denaturation Gibbs energy (G) of Thr to Val and Thr to Ala mutant proteins was changed from 4.0 to -5.6 kJ/mol and from 1.6 to -6.3 kJ/mol, respectively, compared with that of the wild-type protein. The contribution of hydrogen bonds to the stability (G_{HB}) of the Thr and other mutant human lysozymes previously reported was extracted from the observed stability changes (G) with correction for changes in hydrophobicity and side chain conformational entropy between the wild-type and mutant structures. The estimation of the

G_{HB} values of all mutant proteins after removal of hydrogen bonds, including protein-water hydrogen bonds, indicates a favorable contribution of the intra- and intermolecular hydrogen bonds to the protein stability. The net contribution of an intramolecular hydrogen bond ($G_{HB [PW]}$), an intermolecular one between protein and ordered water molecules ($G_{HB [PW]}$), and an intermolecular one between ordered water molecules ($G_{HB [WW]}$) could be estimated to be 8.5, 5.2, and 5.0 kJ/mol, respectively, for a 3 long hydrogen bond. This result shows the different contributions to protein stability of intra- and intermolecular hydrogen bonds. The e

ntropic cost due to the introduction of a water molecule (G_{H_2O}) could be also estimated to be about 8 kJ/mol.

16 . 山縣ゆり子、倉光成紀 (阪大)

Contribution of Hydrogen Bonds to the Conformational Stability of Human Lysozyme: Calorimetry and X-ray Analysis of Six Ser to Ala Mutants

Biochemistry, 38, 6623-6629, (1999)

Kazufumi Takano, Yuriko Yamagata¹, Masahiro Kubota, Jun Funahashi, Satoshi Fujii^{1,2}, and Katsuhide Yutani

Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

²Present address: School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Yada, Shizuoka, Shizuoka 422-8002, Japan

Summary

To further examine the contribution of hydrogen bonds to the conformational stability of the human lysozyme, six Ser to Ala mutants were constructed. The thermodynamic parameters for denaturation of these six Ser mutant proteins were investigated by differential scanning calorimetry (DSC), and the crystal structures were determined by X-ray analysis. The denaturation Gibbs energy (G) of the Ser mutant proteins was changed from 2.0 to -5.7 kJ/mol, compared to that of the wild-type protein. With an analysis in which some factors that affected the stability due to mutation were considered, the contribution of hydrogen bonds to the stability (G_{HB}) was extracted on the basis of the structures of the mutant proteins. The results showed that hydrogen bonds between protein atoms and between a protein atom and a water bound with the protein molecule favorably contribute to the protein stability. The net contribution of one intramolecular hydrogen bond to protein stability (G_{HB}) was 8.9 ± 2.6 kJ/mol on average. However, the contribution to the protein stability of hydrogen bonds between a protein atom and a bound water molecule was smaller than that for a bond between protein atoms.

17 . 山縣ゆり子 (阪大)

Experimental verification of the 'stability profile of mutant protein' (SPMP) data using mutant human lysozymes

Protein Engineering, 12, 663-672, (1999)

Kazufumi Takano, Motonori Ota¹, Kyoko Ogasahara, Yuriko Yamagata², Ken Nishikawa¹ and Katsuhide Yutani

Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

¹National Institute of Genetics, Yata, Mishima, Shizuoka 311-8540

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamadaoka, Suita. Osaka 565-0871. Japan

Summary

The stability profile of mutant protein (SPMP) (Ota, M., Kanaya, S. and Nishikawa, K., 1995, *J. Mol. Biol.*, 248, 733-738) estimates the changes in conformational stability due to single amino acid substitutions using a pseudo-energy potential developed for evaluating structure-sequence compatibility in the structure prediction method, the 3D-1D compatibility evaluation. Nine mutant human lysozymes expected to significantly increase in stability from SPMP were constructed, in order to experimentally verify the reliability of SPMP. The thermodynamic parameters for denaturation and crystal structures of these mutant proteins were determined. One mutant protein was stabilized as expected, compared with the wild-type protein. However, the others were not stabilized even though the structural changes were subtle, indicating that SPMP overestimates the increase in stability or underestimates negative effects due to substitution. The stability changes in the other mutant human lysozymes previously reported were also analyzed by SPMP. The correlation of the stability changes between the experiment and prediction depended on the types of substitution: there were some correlations for proline mutants and cavity-creating mutants, but no correlation for mutants related to side-chain hydrogen bonds. The present results may indicate some additional factors that should be considered in the calculation of SPMP, suggesting that SPMP can be refined further.