

活動報告

## 平成12年度後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12年度後期のビームタイムは平成13年1月19日(金)に開始され3月8日(木)に終了した。予約状況を表1に示す。前回と同様bonus日(入射器のマシンスタディー)を予備日とし、それ以外の予備日は取らなかった。bonus timeは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。

#### 2. ビームラインアシスタント

今期も各期間一人でお願いした。

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諸氏に感謝する。

氏名	所属	期間
和田 啓	大阪府立大学・多田研	1月18日～2月6日
日高 将文	東京大学・若木研	2月12日～3月10日

#### 3. 装置の状況

今期station checking sheetに書かれたコメントは合計12件あった(表2)。中期に引き続き今期も大型IP読取装置の真空エラー及びClose Doorの記述はなかった。どうやらこれはおさまったらしい。それに代わってRS232CやSCSIエラーが気になる。1月24日のゴニオメーター不調は三浦氏に尋ねたところ、本体の方ではなく、低温用ゴニオメーターの磁石を取り付けるネジが緩んでいたためであった。前号のこの欄で述べた、ゴニオメーターの交換は、BL6Aのカメラを交換するのに伴って不要になる調子の良いBL6Aのゴニオメーターと調子の芳しくないBL6Bのゴニオメーターとを入れ替える作業であるが、BL6Aの作業が3月の時点で実行されなかったため、BL6Bもそのままの状態である。用意が出来次第交換する予定である。

前号に記載したように、今期より5台の大型IP読取機装置がBL6B用として使えるようになったので、休日や夜間、IP読取装置が故障して困ると言うことは殆ど無くなった。保守が確実にいえるよう、エラーの症状などをStation Checking Sheetに出来るだけ詳しく記述して頂きたい。宜しくお願い致します。

#### 4. お知らせ

##### 1) BL6Bの波長可変について

BL6Bが建設されて以来、結晶を交換せずに全領域の波長を最適条件で選り出せる回転

表 1 . 平成 1 2 年度中期 B L 6 B ビームタイム使用状況

LAST UPDATE: 3/5/2001 15:55  
 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: pm9.00-am:9.00(the next day)

1/19	FRI	B	bonus_time (day)	bonus_time (night)
1/20	SAT	B	Nippon_Roche_c (day)	- (night)
1/21	SUN	B	- (day)	- (night)
1/22	MON	B	machine_study (day)	machine_study (night)
1/23	TUE	B	setting_test (day)	setting_test (night)
1/24	WED	B	Fujisawa_Pharm._c (day)	- (night)
1/25	THU	B	Ajinomoto_Co._Inc_c (day)	- (night)
1/26	FRI	B	setting_test (day)	Watanabe_Nobuhisa_d (night)
1/27	SAT	B	- (day)	- (night)
1/28	SUN	B	- (day)	- (night)
1/29	MON	A	machine_study (day)	machine_study (night)
1/30	TUE	A	setting_test (day)	bonus_time (night)
1/31	WED	A	Kyowa_Hakko_Kogyo_c (day)	- (night)
2/ 1	THU	A	Nippon_Roche_c (day)	Nippon_Roche_c (night)
2/ 2	FRI	A	Yamanouchi_Pharm._c (day)	- (night)
2/ 3	SAT	A	Nippon_Roche_c (day)	- (night)
2/ 4	SUN	A	- (day)	- (night)
2/ 5	MON	B	machine_study (day)	machine_study (night)
2/ 6	TUE	B	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
2/ 7	WED	B	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
2/ 8	THU	B	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
2/ 9	FRI	B	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
2/10	SAT	B	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
2/11	SUN	B	3GeV_single-bunch (day)	3GeV_single-bunch (night)
2/12	MON	A	machine_study (day)	machine_study (night)
2/13	TUE	A	Nippon_Roche_c (day)	- (night)
2/14	WED	A	- (day)	- (night)
2/15	THU	A	Kirin_Brewery_c (day)	Kirin_Brewery_c (night)
2/16	FRI	A	setting_test (day)	- (night)
2/17	SAT	A	BERI_c (day)	BERI_c (night)
2/18	SUN	A	- (day)	- (night)
2/19	MON	B	machine_study (day)	machine_study (night)
2/20	TUE	B	setting_test (day)	bonus_time (night)
2/21	WED	B	Kyowa_Hakko_Kogyo_c (day)	- (night)
2/22	THU	B	- (day)	- (night)
2/23	FRI	B	setting_test (day)	- (night)
2/24	SAT	B	Chugai_Pharm._c (day)	Chugai_Pharm._c (night)
2/25	SUN	B	Chugai_Pharm._c (day)	Chugai_Pharm._c (night)
2/26	MON	A	machine_study (day)	machine_study (night)
2/27	TUE	A	- (day)	- (night)
2/28	WED	A	Fujisawa_Pharm._c (day)	- (night)
3/ 1	THU	A	Nippon_Roche_c (day)	- (night)
3/ 2	FRI	A	Eisai_Co._Ltd_c (day)	- (night)
3/ 3	SAT	A	setting_test (day)	setting_test (night)
3/ 4	SUN	A	setting_test (day)	setting_test (night)
3/ 5	MON	A	machine_study (day)	machine_study (night)
3/ 6	TUE	A	Nippon_Roche_c (day)	- (night)
3/ 7	WED	A	setting_test (day)	- (night)
3/ 8	THU	A	setting_test (day)	- (night)

 top  home  rule  help  booking

For booking system MAIL: [sasaki@info.human.nagoya-u.ac.jp](mailto:sasaki@info.human.nagoya-u.ac.jp)

表2 今期発生した装置（主に大型読取装置）の問題点

月 日	装置名	エラーの種類
1月20日	IP4, 6 IP5	IP読みエラー（スイッチOFF/ON）で回復 core dumpで落ちる、但しimageOK（2回）
1月24日	カメラ	ゴニオメーター不調
2月2日	カメラ IP6	0.1mm cryo用コリメータ先端の金具が外れた back sensor error
2月24日	IP4 カメラ	IP読みエラー RS232Cエラー
2月25日	カメラ	RS232Cエラー
2月28日	IP6	IP排出エラー
3月1日	カメラ	RS232Cエラー
3月2日	IP3, 6	SCSIエラー（2回と1回）

傾斜集光型モノクロメーターの開発を進めてきた。昨年後期よりBL6Bにテスト的に取り付け使用し、良好な結果を得たので、4月12日~4月14日に五十嵐教之氏、鈴木守氏、渡邊信久氏がモノクロメーターの精密調整を行った。その結果、0.9~1.7 に対し、波長可変になった。

強度は全領域最適条件のため大きいですが、2結晶モノクロメーターではないので、波長変更はBL18B程、が楽ではない。従って、当分は下記のようにして頂きたい。

各自が前もって三浦さんに波長変更を依頼して下さい。

土日、及び深夜の対応は出来ませんのでご承知ください。

標準波長以外で実験された場合、実験終了後、次の実験者がその波長を望まない限り、標準波長に戻します（戻すよう三浦さんに頼んでください）。

## 2) パソコンの設置について

BL6Bのカメラ制御用PCの横に、HDデータバックアップ用及び端末用のパソコンを設置した。Ultra SCSIの接続ポートを利用し、FTPでSCSI機器にデータを転送することができる。OSはwindows2000がインストールされている。また、同じ場所にユーザー持ち込みパソコン用のイーサーケーブルが設置されているので、併せてご利用頂きたい。

## . TARA第2実験ステーションBL6C

BL6Cには平成8年度から平成12年度の計画で、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した全自動データ収集システム（愛称；galaxy）が設置されている。時折、RS232Cのエラーを起こし、色々検討を行ってきたが、結局制御用の計算機をデータ転送用とし別のパソコンを制御用に使うことでこれも解決した。現在は利用に供するための準備を行っている。Galaxyの取扱説明書及びデータプロセス用のマニュアルも出来、これらはSBSPのホームページに掲載されている。多数の人に一度に説明するより、各自に装置を操作してもらいながら行う講習会の方が良く理解して頂けるので、4月21日には手始めとして、筑波地区の2グループ、山之内製薬の栗原氏、片山氏及び藤沢薬品工業の木下氏の方々に来てもらいリゾチームとシチジン結晶を使って実習を行った。今後頻繁に小規模の講習会を行う計画である。

位置感度斑補正、測定速度等最近行ったことについて紹介する。

## 1. 先読み効果の補正

2次元補正も考えられるが、主な原因が先読み効果によるものであるから、読取走査線毎に変化を生じる。特に大きな変化は読取ヘッド間の繋ぎ目である。例えば、第1ヘッドと第2ヘッドの繋ぎ目を考えると第2ヘッドの第1ラインは先読みが無いので強度が大きい、第2ラインは先読みにより少し弱くなる、第3ラインは第1ラインと第2ラインによる先読みにより更に弱くなるが減少の割合は次第に少なくなっていく。一方、第1ヘッドの読取が第2ヘッドの第1ラインに近づくと、既に第2ヘッドによる先読みを受け、更に第1ヘッドによる先読みも同様に受けるので、2重に先読みを受けることになり強度が下がる。これを補正するため次の手順で補正テーブルを作った。

- 1) 一様露光をしたIPカセットを10分間待ってから読み出す。10分間待つのは、露光直後の急速なfadingを避けるためである。
- 2) 走査ライン毎の平均値を計算する。1画素100 $\mu\text{m}$ の場合、1ライン2万5千画素以上あるので、十分統計は成り立つと考え、特別な操作は行わなかったが、ただIPの端5mmは平均から省いた。IPカセットの中央にあるX線入射口及びその周りもIPの端と考え5mm平均から省いた。
- 3) 平均値の平坦部分の平均値を1にノルマライズし、その逆数を補正テーブルとした。
- 4) 補正テーブルは条件が異なる毎に作成した。即ち、IPカセット毎に画素サイズごとに、回転速度毎に作成する。
- 5) その他条件が変わった時点では必ず補正テーブルを作り変える必要がある。経年変化は時間が経って見ないと分からないが、定期的にチェックする必要があるであろう。

## 2. 位置感度斑補正の例

回転速度；毎秒2回転、画素サイズ；200 $\mu\text{m}$ ×200 $\mu\text{m}$ の条件で求めたカセット1の補正テーブルを図3に示す。1~450ラインが読み取りヘッド1で読み出す第1チャンネル、次の450~900が第2チャンネルで最後は1,801~2,250が第5チャンネルである。チャンネルの継ぎ目に当たるところで「先読みによる」係数の大きな変化が見られる。補正値の大きいラインは強度が弱いことを意味している。第1チャンネルに先読みによる変化が無いのは第1チャンネルはIPの3mm外部から読取をスタートしており、更にIPの淵5mmは統計に入れず補正テーブルはその間を外挿しているからである。理由は解明していないが、第2と第3チャンネル間では他の3ヶ所より補正値の変化が大きい。この図から先読み効果により30~40%も強度が下がっていることが分かる。どのチャンネルも、極少しではあるが右肩下がりになっている。これはIPに記録されたイメージ強度のfadingによるものである。第3チャンネルは波打った曲線になっているが、この原因は未だ解明されていないが恐らく半導体レーザーの励起初期変動であろう。例えばこの半導体レーザーはペルチェにより温度制御がなされているが、起動直後は変動が大きいので少しではあるが温度変化を起こし、レーザー強度が変動するのではないかと考えている。第2及び第4チャンネルの補正曲線も少しだが波を打っている。

図4に一様露光したデータの補正前と後のイメージを示す。左の図が強度補正前、右が補正後である。補正前の図では明らかに明暗があるが補正後の図はチャンネル間の区別をつけることは出来ないほど均一な値になっている。尚各図の右には明暗を調整するための帯がある。亦、その次にある細い白線は第1チャンネルがIPの無いところを読んだ線である。第3チャンネルに35個矩形の白色部分があるが、これはX線の入射口である。入射口は合計36個あいている。最後の1個はIPの繋ぎ目と重なりこの図では認識できない。これらの画は補正のために打ち出した特殊な画で、通常データ収集では補正後フレーム毎に切り出されたものが大型データサーバに保存される。

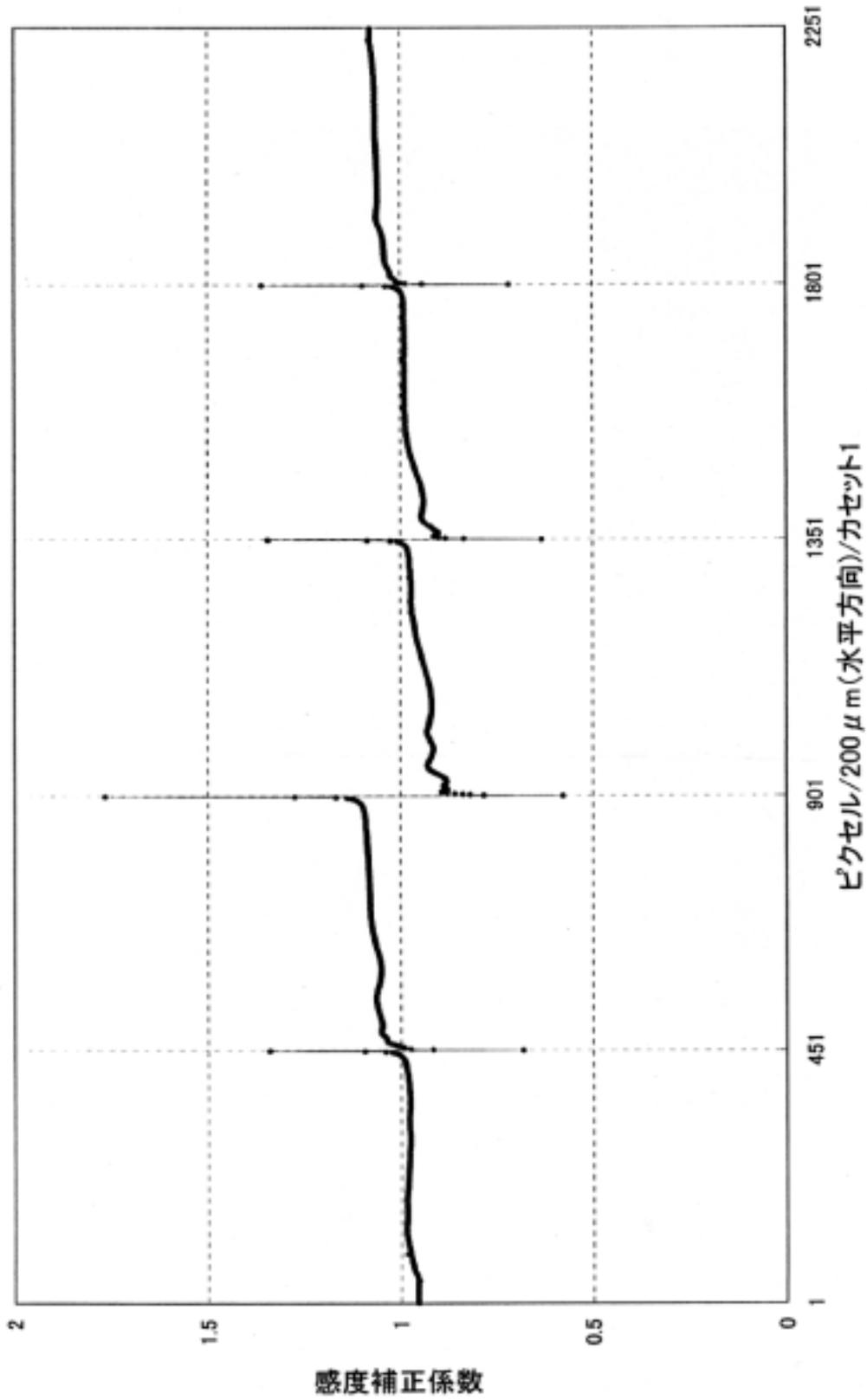


図3 補正データの例

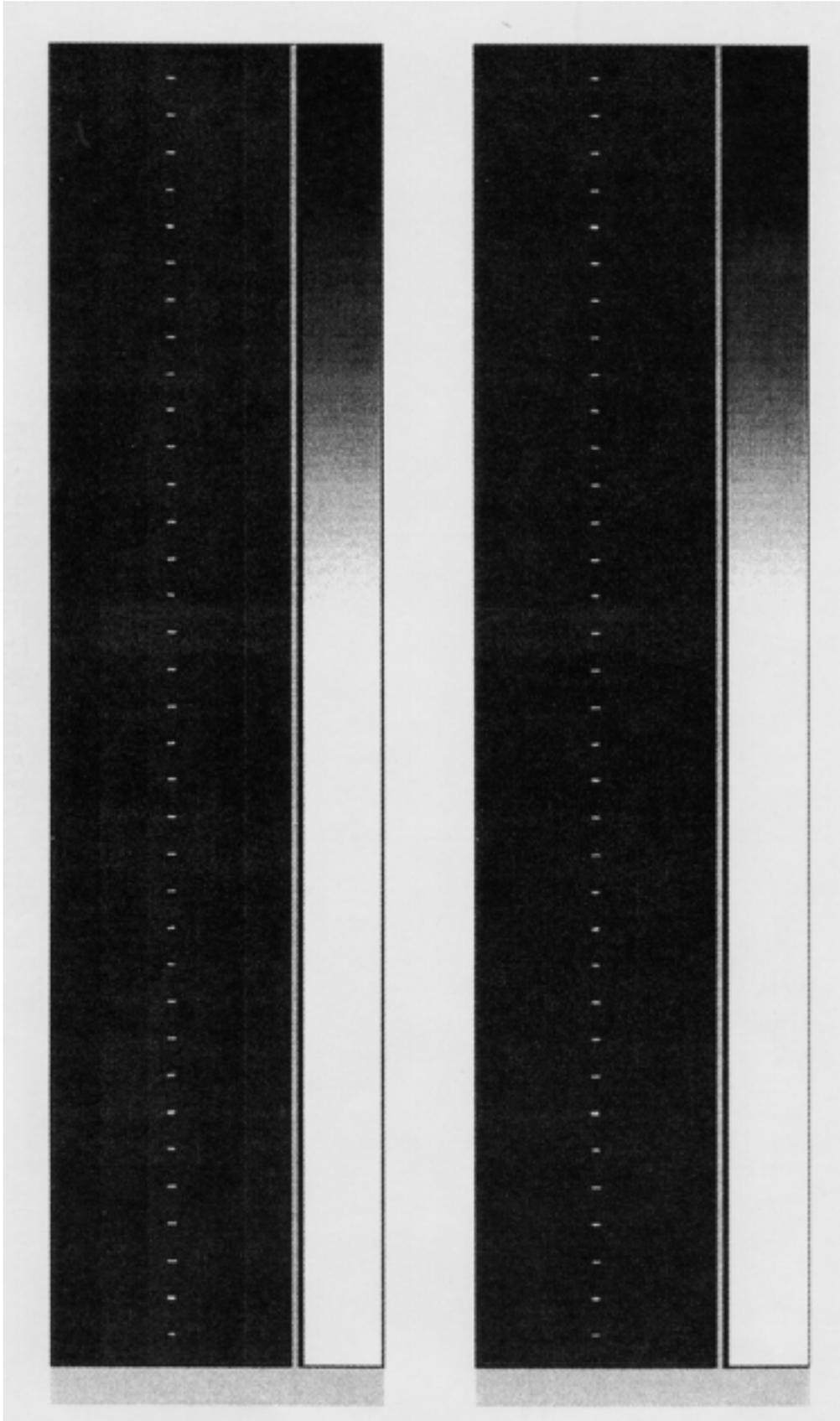


図4 補正前と補正後の強度分布の比較

### 3. 読取装置の評価

#### 1) 読取速度

読み取り速度はIPカセットの回転数と画素サイズの関数になる。サーボモーターの容量が大きいいためか、回転数を上げてても一定速度に到達する時間は殆ど変わらない。定速に達する時間と定速から止まるまでの時間は同じで約13秒、即ち13秒×2で26秒掛かる。この他クラッチの出し入れその他で約27秒かかる。これらを表3にまとめた。

表3 回転速度と読取時間

回転速度 (T/sec)	画素サイズ mm × mm	読取時間 正味(net)	定速到達時間 + その他の時間	読取総時間
2	100 × 100	7' 30"	58"	8' 28"
2	200 × 200	3' 45"	53"	4' 38"
3	100 × 100	5' 00"	54"	5' 54"
3	200 × 200	2' 30"	50"	3' 20"

#### 2) 総合的精度

これは本誌Vol.6-3、4頁に記載したことであるが、まとめとして再度記載する。

精度を的確に表すのは大変難しい問題である。量子揺らぎ、或いは統計的揺らぎがあるため、Nカウント測定するとNの揺らぎを持つため、誤差零の測定をすることは出来ない。従って、どこまで誤差をNに近づけ得るかで判断する。

印加電圧は読取ヘッドごとに異なるが約720V、2回転/秒、画素サイズ100 μm × 100 μm、の条件下では8.22レベル(デジタル値)/x-ray photonであった。一様露光したデータを測定し次の結果を得た。

100 × 100画素の平均値；	8600カウント
rms；	132.4カウント
平均値の量子揺らぎは；	8600 = 92.7
従って、rms/量子揺らぎは；	132.4/92.7 = 1.4
従って誤差は揺らぎの1.4倍；	= 1.4 I
亦誤差を%で表すと；	(129.36/8401.1) × 100 = 1.54%

どちらで表現しても、大変良い精度と言える。

#### 4. データ収集最高速度

データ収集速度は露光時間に負うところが多いが、それでは装置の最高速度を測定することは出来ないので、X線は充分強く露光に要する時間は充分短い場合を想定し、カメラ部にあるIPカセットは常にもう一方のIPカセットが読み取り及び消去が完了するのをカメラ部で待っている状態になるようパラメーターを設定し、各部の速度を測定した。測定開始状態ではIPカセットは読取部と消去部にいる。データ測定を開始すると先ず30秒間消去を行い、その後カメラ部に搬送され、データ収集が開始される、その間に他のIPカセットが読み取り部から消去部に搬送され消去を行う。条件としては読み取り速度が秒速3回転と2回転及び夫々画素サイズが100 μm × 100 μmと200 μm × 200 μmの計4条件について、2個のIPカセットが夫々2回読取を完了するまで測定し、測定開始時間を起点として各ステップに到るまでの時間を記録した結果を表4に示す。測定に当たり、各ステップの開始時間を

表4 Galaxyの自動運転速度

回転速度(回/秒)	3	3	2	2
画素サイズ(μm)	100	200	100	200
	開始時間	開始時間	開始時間	開始時間
カセット番号 1				
消去	0"	0"	0"	0"
搬送(消去 カメラ)	36"	37"	36"	36"
撮影	2' 29"	2' 35"	2' 31"	2' 29"
搬送(カメラ 読取)	4' 15"	4' 12"	4' 16"	4' 18"
読取	5' 56"	5' 56"	5' 55"	5' 57"
搬送(読取 消去)	11' 47"	9' 13"	14' 22"	10' 38"
消去	13' 08"	10' 35"	15' 41"	11' 59"
搬送(消去 カメラ)	14' 22"	11' 53"	17' 00"	13' 17"
撮影	16' 40"	14' 10"	19' 15"	15' 34"
搬送(カメラ 読取)	22' 06"	17' 08"	27' 18"	19' 49"
読取	23' 45"	18' 45"	28' 58"	21' 25"
搬送(読取 消去)	29' 39"	22' 10"	37' 27"	26' 06"
カセット番号 2				
搬送(読取 消去)	2' 49"	2' 48"	2' 49"	2' 47"
消去	4' 05"	4' 10"	4' 07"	4' 06"
搬送(消去 カメラ)	5' 29"	5' 30"	5' 30"	5' 32"
撮影	7' 45"	7' 42"	7' 46"	7' 47"
搬送(カメラ 読取)	13' 10"	10' 40"	15' 45"	12' 04"
読取	14' 49"	12' 20"	17' 26"	13' 46"
搬送(読取 消去)	20' 46"	15' 41"	25' 53"	18' 25"
消去	22' 03"	17' 03"	27' 14"	19' 44"
搬送(消去 カメラ)	23' 21"	18' 20"	28' 33"	21' 00"
撮影	25' 36"	20' 36"	30' 48"	23' 17"
搬送(カメラ 読取)	31' 01"	23' 33"	38' 48"	27' 29"
読取	32' 40"	25' 15"	40' 28"	29' 13"
搬送(読取 消去)	34' 00"	28' 36"	48' 56"	33' 47"
平均速度				
消去	1' 18"	1' 18"	1' 18"	1' 18"
搬送(消去 カメラ)	1' 55"	1' 55"	1' 55"	1' 55"
撮影	5' 27"	2' 57"	8' 01"	4' 13"
搬送(カメラ 読取)	1' 42"	1' 42"	1' 42"	1' 42"
読取	5' 54"	3' 20"	8' 28"	4' 38"
(正味読取時間)	(5' 00")	(2' 30")	(7' 30")	(3' 45")
搬送(読取 消去)	1' 20"	1' 20"	1' 20"	1' 20"

知るの簡単で、実は難しい。そこで視覚で分かる基準として次のように各ステップの開始を定義した。

- 消去； 消去用蛍光灯が点灯した時点
- 搬送（消去 カメラ）； 消去用蛍光灯が消灯した時点
- 撮影； I Pカセットがカメラ部に搬送されロックされた時点
- 搬送（カメラ 読取）； カメラ部でI Pカメラのロックが外された時点
- 読取； I Pカセットが読取部へ搬送されロックされた時点
- 搬送（読取 消去）； 読取部でI Pカセットのロックが外された時点

表4から分かるようにスタート後読取部に入るまでは条件に関係なく同じ時間である。しかし、条件により読取時間が異なるため時間に差が出てくる。この表から各ステップに要する時間、即ち平均速度を求め表4に示す。最初の消去は30秒であるが、その後は別のカセットが読取を終了するまで露光を続けるので、平均1分18秒間消去を行っている。最初に述べたようにこの測定では露光時間を最低にしているため、消去は1分18秒であるが、露光が長くなれば消去時間も長くなる。それに対し搬送時間は、条件によらず一定である。読取時間は回転速度と画素サイズにより異なるがその他の影響は受けない。最高速度は秒速3回転で画素サイズが $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ の場合で3分20秒である。この場合読み取っている正味の時間、即ちレーザー光が点灯している時間は2分30秒である。しかしこれは最近達成された速度で、耐久性が心配である。従ってこれまでテストしてきた秒速2回転、画素サイズ $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ を通常使用と仮定すると、読取時間は4分38秒、正味の読取時間は3分45秒である。この際、I Pカセットとに9フレーム(波長1A、Sセッティングの場合、分解能は2.9)記録されていたとすると、各フレーム当たり31秒(正味読取時間25秒)で呼び出されたことになる。この測定の撮影時間は充分短く取っており、この表の撮影速度は実はカメラ部での待ち時間に近い値である。別の表現をすると、若し結晶の反射強度が充分大きく、この表のに合わせた露光時間にすればこの表の速度でデータ収集が出来ることを意味している。次に、毎秒2回転、画素サイズ $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ の場合1サイクルに要した時間を表4から求めて見よう。4回の測定を終了した時間は表4より33分47秒であるから、この時間を4で割ると1サイクル当たりの時間は8分27秒である。即ち、2台のI Pカセットが使われるので、消去、露光、搬送、読取のサイクルを8分27秒で行っていることになる。この速度は最初の仕様を上回っているだけでなく、このカメラはワイセンベルグ法が使用できるため、従来の装置の10倍以上の密度で記録できることを考慮すれば、世界的見地からもこの装置に匹敵するものは無く、これは抜群の速度である。この他、フレーム交換はI Pカセットの回転によるため、この交換速度は極めて速い。亦、ワイセンベルグ法によりフレームあたりのデータ量をふやすことが出来る。従って、Galaxyを用いると単色X線による蛋白質の時分割構造解析が出来る可能性が大きい。このことに付いては別の機会に記載することにする。

## ．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

11月のはじめに更新したサーバおよびネットワークはトラブルもなく順調に稼働している。1月～3月のビームタイム期間におけるデータサーバは、12月末までのデータを消去して運用を開始した。そしてこの期間中に保存されたデータの消去は行わなかった。今期は未だBL6Cが試運転の状態にあるので主にBL6Bからのデータがサーバに書き込まれた。データの総量を図5に示す。

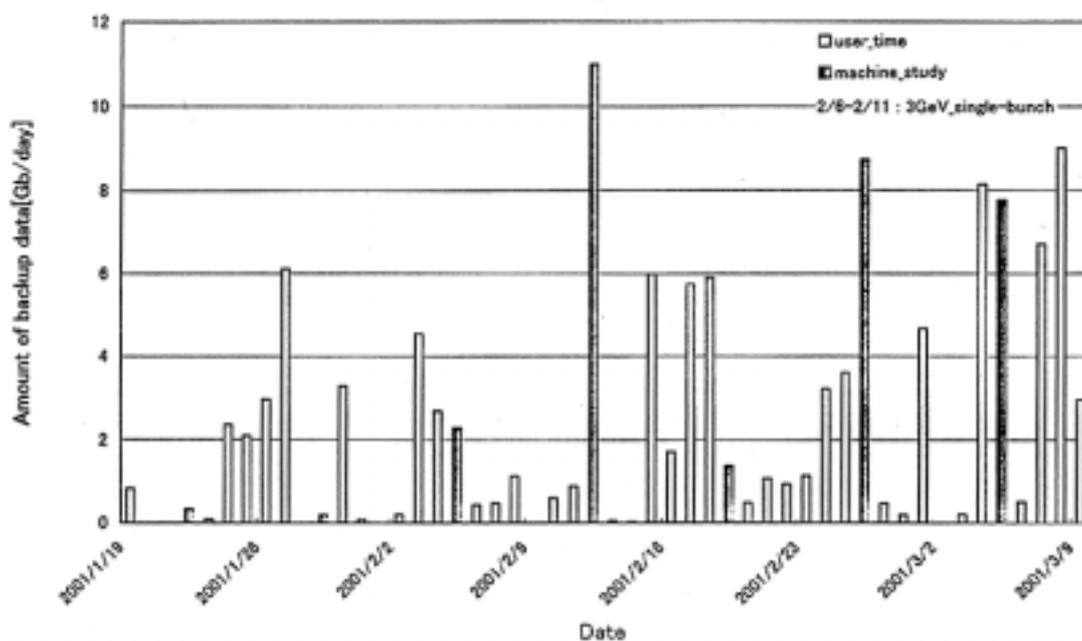


図5 1月～3月期におけるデータサーバ利用状況

・各種委員会報告

1. 編集委員会

第17回編集委員会が2001年3月19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(五十音順)の5名であった。構造生物Vol.7, No1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. 7, No.2)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。

・その他

1. 退会のお知らせ

本会の創設期から会員として多大な成果を挙げてこられた中外製薬(株)が平成12年度末日を持って退会されました。これまでのご協力を感謝いたすと共に中外製薬(株)のご発展を心からお祈り申し上げます。

2. BL6B評価試料

PFよりBL6Bに関する評価試料の提出を求められ、PFに提出したものを本号 頁に記載した。

業績紹介

1. 油谷克英 (阪大・蛋白研) 山縣ゆり子 (阪大・薬学部)

Contribution of amino acid substitutions at two different interior positions to the conformational stability of human lysozyme

Protein Engineering 12, 841-850 (1999)

Jun Funahashi<sup>1</sup>, Kazufumi Takano<sup>1</sup>, Yuriko Yamagata<sup>2</sup> and Katsuhide Yutani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871,

<sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0801, Japan

Summary

To elucidate correlative relationships between structural change and thermodynamic stability in proteins, a series of mutant human lysozymes modified at two buried positions (Ile56 and Ile59) were examined. Their thermodynamic parameters of denaturation and crystal structures were studied by calorimetry and X-ray crystallography. The mutants at positions 56 and 59 exhibited different responses to a series of amino acid substitutions. The changes in stability due to substitutions showed a linear correlation with changes in hydrophobicity of substituted residues, having different slopes at each mutation site. However, the stability of each mutant was found to be represented by a unique equation involving physical properties calculated from mutant structures. By fitting present and previous stability data for mutant human lysozymes substituted at various positions to the equation, the magnitudes of the hydrophobicity of a carbon atom and the hydrophobicity of nitrogen and neutral oxygen atoms were found to be 0.178 and -0.013 kJ/mol<sup>2</sup>, respectively. It was also found that the contribution of a hydrogen bond with a length of 3.0 Å to protein stability was 5.1 kJ/mol and the entropy loss of newly introduction of a water molecules was 7.8 kJ/mol.

2. 油谷克英 (阪大・蛋白研) 山縣ゆり子 (阪大・薬学部)

Effect of extra N-terminal residues on the stability and folding of human lysozyme expressed in *Pichia pastoris*

Protein Engineering 13, 299-307 (2000)

Shuichiro Goda<sup>1</sup>, Kazufumi Takano<sup>1</sup>, Yuriko Yamagata<sup>2</sup>, Yoshio Katakura<sup>3</sup> and Katsuhide Yutani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871,

<sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871,

<sup>3</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Summary

A human lysozyme expression system by *Pichia pastoris* was constructed with the expression vector of pPIC9, which contains the  $\alpha$ -factor signal peptide known for high secretion efficiency. *P.pastoris* expressed the human lysozyme at about 300 mg/l broth, but four extra residues (Glu<sup>-4</sup>-Ala<sup>-3</sup>-Glu<sup>-2</sup>-Ala<sup>-1</sup>-) were added at the N-terminus of the expressed protein (EAEA-lysozyme). To determine the effect of the four extra residues on the stability, structures and folding of the protein, calorimetry, X-ray crystal analysis and GuHCl denaturation experiments were performed. The calorimetric studies showed that the EAEA-lysozyme was destabilized by 9.6 kJ/mol at pH 2.7 compared with the wild-type protein, mainly caused by the substantial decrease in the enthalpy change ( $\Delta H$ ). On the basis of structural information on the EAEA-lysozyme, thermodynamic analyses show that (1) the addition of the four residues slightly affected the conformation in other parts far from the N-terminus, (2) the large decrease

in the enthalpy change due to the conformational changes would be almost compensated by the decrease in the entropy change and (3) the decrease in the Gibbs energy change between the EAEA and wild-type human lysozymes could be explained by the summation of each Gibbs energy change contributing to the stabilizing factors concerning the extra residues.

3. 油谷克英 ( 阪大・蛋白研 ) 山縣ゆり子 ( 阪大・薬学部 )

Effect of foreign N-terminal residues on the conformational stability of human lysozyme

Eur. J. Biochem. 266, 675-682 (1999)

Kazufumi Takano<sup>1</sup>, Kimiko Tsuchimori<sup>1</sup>, Yuriko Yamagata<sup>2</sup> and Katsuhide Yutani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Yamadaoka, Suita, Osaka, Japan

#### Summary

To minutely understand the effect of foreign N-terminal residues on the conformational stability of human lysozyme, five mutant proteins were constructed: two had Met or Ala in place of the N-terminal Lys residue (K1M and K1A, respectively), and others had one additional residue, Met, Gly or Pro, to the N-terminal Lys residue (Met(-1), Gly(-1) and Pro(-1), respectively). The thermodynamic parameters for denaturation of these mutant proteins were examined by differential scanning calorimetry and were compared with that of the wildtype protein. Three mutants with the extra residue were significantly destabilized: the changes in unfolding Gibbs energy ( $\Delta G$ ) were -9.1 to -12.2 kJ.mol<sup>-1</sup>. However, the stability of two single substitutions at the N-terminal slightly decreased; the  $\Delta G$  values were only -0.5 to -2.5 kJ.mol<sup>-1</sup>. The results indicate that human lysozyme is destabilized by an expanded N-terminal residue. The crystal structural analyses of K1M, K1A and Gly(-1) revealed that the introduction of a residue at the N-terminal of human lysozyme caused the destruction of hydrogen bond networks with ordered water molecules, resulting in the destabilization of the protein.

4. 松浦良樹 ( 阪大・蛋白研 ) 佐藤孝雄 ( 東工大・生命理工 )  
田中信夫 ( 東工大・生命理工 ) 五十嵐教之 ( KEK、PF )

Enhancement in the perfection of orthorhombic lysozyme crystals grown in a high magnetic field (10 T)

Acta Cryst. D56, 1079-1083 (2000)

Takao Sato<sup>1</sup>, Yusuke Yamada<sup>1</sup>, Shinya Saijo<sup>1</sup>, Tetsuya Hori<sup>1</sup>, Raita Hirose<sup>1</sup>, Nobuo Tanaka<sup>1</sup>, Gen Sasaki<sup>2,3</sup>, Kazuo Nakajima<sup>2</sup>, Noriyuki Igarashi<sup>4</sup>, Masahiko Tanaka<sup>4</sup> and Yoshiki Matsuura<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midoriku, Yokohama 226-8501, Japan,

<sup>2</sup>Institute for Mater& Research, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan,

<sup>3</sup>CREST, Japan Science and Technology Corporation, 2-1-6 Sengen, Tsukuba 305-0047, Japan,

<sup>4</sup>Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization, 101 Oho, Tsukuba 305-0801, Japan,

<sup>5</sup>Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

### Summary

Orthorhombic crystals of hen egg-white (HEW) lysozyme were grown in a homogeneous and static magnetic field of 10 T. All crystals grown at 10 T were oriented such that their crystallographic c axes were parallel to the magnetic field direction and showed a narrower average full-width at half-maximum (FWHM) of the rocking curve than those grown at 0 T. Rocking-width measurements were made at the BL-10A station at the Photon Factory, Tsukuba, Japan, using a high-resolution vertical-type four-circle diffractometer. Crystal perfection was evaluated using the FWHM of the rocking curve; the effects of the magnetic field on the quality of the crystals were examined by comparison of the FWHM of seven crystals grown at 10 and 0 T. The FWHMs of the reflections along the a, b and c axes decreased by 23.5, 35.3 and 27.8%, respectively, and those of other general reflections decreased by 17.4-42.2% in the crystals grown at high magnetic field. These results clearly showed that a magnetic field of 10 T improved the crystal perfection of the orthorhombic lysozyme crystals. As a result, the maximum resolution of X-ray diffraction increased from 1.3 Å at 0 T to 1.13 Å at 10 T. The magnetic field also affected the dimensions of the unit cell, increments being 0.2% for the a and c axes and 0.1% for the b axis, respectively. These facts suggest that the application of a high magnetic field during crystallization might result in remarkable enhancements in the diffraction power of protein crystals having magnetic anisotropy.

5 . Se Won Suh ( Seoul National University )

A thermostable xylose isomerase from *Thermus caldophilus*: biochemical characterization, crystallization and preliminary X-ray analysis

Acta Crystallographica D55, 294-296 (1999)

Changsoo Chang<sup>1</sup>, Hyun Kyu Song<sup>1</sup>, Byung Chul Park<sup>2</sup>, Dae-Sil Lee<sup>2</sup> and

Se Won Suh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea,

<sup>2</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Daejeon 305-333, Korea

### Summary

A highly thermostable xylose isomerase from *Thermus caldophilus* has been expressed in *Escherichia coli*. The purified enzyme has an optimum temperature of 363 K. It has been crystallized at room temperature using ammonium sulfate as a precipitant. The crystal belongs to the orthorhombic space group  $P2_12_12_1$ , with unit-cell parameters  $a = 84.35$ ,  $b = 123.60$ ,  $c = 140.24$  Å. The presence of one molecule of tetrameric xylose isomerase in the asymmetric unit gives a crystal volume per protein mass ( $V_m$ ) of  $2.1 \text{ Å}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$  and a solvent content of 41% by volume. The crystals initially showed diffraction to 1.7 Å Bragg spacing with synchrotron X-rays, and a set of native data extending to 2.3 Å resolution has been collected.

6 . Se Won Suh ( Seoul National University )

Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of deoxycytidylate hydroxymethylase from bacteriophage T4

Acta Crystal., D55, 1061-1063 (1999)

Se Hui Sohn, Hyun Kyu Song, Kyeongsik Min, Seung-Je Cho, Jinho Moon, Jae Young Lee, Hyung Jun Ahn, Changsoo Chang, Hie-joon Kim and Se Won Suh

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

#### Summary

Deoxycytidylate hydroxymethylase from bacteriophage T4 is a homodimeric enzyme in which each polypeptide chain consists of 246 amino-acid residues. It has been crystallized in the presence of its substrate, deoxycytidine monophosphate, at room temperature using sodium citrate as precipitant. The crystals are monoclinic, belonging to space group C2, with unit-cell parameters  $a = 174.22$ ,  $b = 53.12$ ,  $c = 75.17$ ,  $\beta = 115.29^\circ$ . The asymmetric unit contains one homodimer, with a corresponding  $V_m$  of  $2.65 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  and solvent content of 54%. Native diffraction data to 1.6 resolution have been collected from two crystals using synchrotron radiation.

7 . Se Won Suh ( Seoul National University )

Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Ypd1p, a key intermediate in phosphorelay signal transduction  
*Acta Cryst.*, D55, 1219-1221 (1999)

Myong Cyong Lee, Jae Young Lee, Hyun Kyu Song and Se Won Suh\*

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Seoul National University,  
Seoul 151-742, South Korea

#### Summary

Ypd1p, a 167-residue protein from *Saccharomyces cerevisiae*, plays a key role in osmosensing phosphorelay signal transduction. It forms part of a multistep phosphorelay system which also includes Sln1p hybrid histidine kinase and two response regulators, Ssk1p and Skn7p. It has been overexpressed in soluble form in *Escherichia coli* with a His<sub>6</sub>-tag at its C-terminus. The recombinant protein has been crystallized at room temperature using ammonium sulfate and lithium sulfate as precipitants. Native diffraction data have been collected to 2.3  $\text{\AA}$  using synchrotron radiation. The crystals are triclinic, belonging to the space group P1, with unit-cell parameters  $a = 65.78$ ,  $b = 66.74$ ,  $c = 65.75$ ,  $\alpha = 106.60$ ,  $\beta = 106.48$ ,  $\gamma = 115.53^\circ$ . The asymmetric unit contains four molecules of the monomeric recombinant Ypd1p, with a corresponding  $V_m$  of  $2.75 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  and a solvent content of 55.3%.